

广州地区轮状病毒血清分型的研究*

2. 应用微量细胞病变定量读数中和试验 对急性病毒性胃肠炎患儿 HRV 各血清型中和抗体的分析

张晓刚 韩守信 严泳楷

(微生物学与免疫学教研究)

提 要 用微量细胞病变定量读数中和试验,以 HRV 血清 1、2、3、4 型的四个标准毒株为抗原,分别检测了 1987 年广州地区 51 例健康儿童和 30 例急性病毒性胃肠炎患儿的急性期及恢复期血清中抗 HRV 各血清型中和抗体的水平。结果表明 30 例患儿中的 23 例,其恢复期血清中的中和抗体比急性期有 4 倍以上的增长,抗 HRV 血清 4 型者占 39.1%,抗 HRV 血清 3 型占 30.4%,抗 HRV 2 型者 8.7%,抗 HRA 1 型为 17.4%。初步认为 1987 年广州地区流行的 HRV 型别以血清型 4 型为主。

关键词 人轮状病毒 (HRV) 微量细胞病变定量读数中和试验 HRV-RNA 电泳型

急性病毒性胃肠炎是世界范围内常见的流行性疾病^[1], 目前已知人轮状病毒 (HRV) 是引起急性病毒性胃肠炎最重要的病源体之一^[2,3]。HRV 的易感人群是婴幼儿, 该病在我国的流行颇为广泛和严重。为此, 从优生优育, 保障婴幼儿健康的角度而言, 积极展开对 HRV 的流行监测和防治, 将甚为重要。

轮状病毒 (RV) 其组抗原可分为 A、B、C、D、E、F、G 等组, 引起婴幼儿急性胃肠炎者多属 A 组轮状病毒, 并至少有 4 种不同的血清型别。组抗原的特异抗体不具抗感染作用, 能中和病毒的抗体是由血清型特异的抗原所诱生的。了解在不同地区和年份 HRV 血清型的分布与变迁特点, 将有利于 HRV 传染源的追踪和监测, 亦有利于搞清该病毒抗原型别结构和变异的规律, 提供研制有效疫苗的科学依据。

本文应用 Yeh 氏定量细胞病变减数检测干扰素效价的方法, 建立了 HRV 微量细胞病变定量读数中和试验, 以 HRV 4 个血清型标准毒株对 1987 年 HRV 流行季节中, 30 例临床诊断为急性病毒性胃肠炎患儿急性期和恢复期血清中 HRV 中和抗体水平动态的检测, 并对

病人急性期粪便中 HRV-RNA 电泳型进行了分析。此外还调查了 HRV 流行季节前 51 名健康婴幼儿血清中各血清型 HRV 的中和抗体水平, 其目的希望对广州地区 HRV 各血清型的流行规律、型别更替的情况有进一步的了解。

材 料 与 方 法

一、标本来源

1. 30 例急性病毒性胃肠炎病儿的双份血清标本及急性期粪便分别由广州儿童医院及红十字会医院提供, 标本采自 1987 年 11 月至 1988 年 1 月。

2. 51 例健康儿童的单份血清由中山医科大学第一附属医院提供, 采自 HRV 流行季节前。

二、微量细胞病变定量读数中和试验

参照 Yeh 氏法^[4], 在 40 孔微量细胞培养板上进行。

1. 病毒株 HRV 标准毒株由香港大学微生物学系惠赠, 包括 wa, S₂, Yo 及 Hochi 株分

*本研究由国家自然科学基金编号 3860477 及广东省卫生厅科研经费资助

别代表HRV的血清1、2、3、4型。病毒用量为500TCID₅₀/孔, 试验前以15μg/ml浓度胰酶进行预处理。

2. 细胞 应用MA104细胞在微量细胞培养板中按常规方法培养, 接种了病毒的细胞其维持液含胰酶7.5μg/ml。

3. 中和试验 按微量中和试验方法进行, 当病毒对照达4⁺病变时, 进行染色, 染色固定液含0.8%结晶紫, 10%甲醛(vol/vol)。50%乙醇(vol/vol)和0.8%NaCl, 染色20分钟, 冲洗至无染料脱出为止, 然后置附有mB—1酶标比色附件的72型分光光度计中记读OD值, 所用波长为600nm。

4. 中和抗体的效价计算及阳性结果判断 中和抗体效价计算应用Yeh公式进行推算。中和抗体阳性结果, 应符合Sato提出的原则^[6]。(1)患儿恢复期血清中和抗体的效价应比急性期血清抗体效价有4倍以上增长, 健康儿单份血清其中和抗体滴度应大于1:10以上。(2)患儿恢复期血清如呈现HRV多个血清型中和抗体的升高, 必需对同型毒株的中和抗体效价比异型毒株有8倍以上增长者方判断为阳性。

三、HRV-RNA聚丙稀酰胺凝胶电泳按本文作者所报道方法进行^[6]

四、实验数据的处理

应用医学统计程序系列软件(POMS)在IBM微机进行运算处理。

结 果

一、微量细胞病变定量读数中和试验条件的建立

病毒剂量、细胞培养时间、维持液胰酶的浓度, 染色液中结晶紫的含量均可影响微量细胞病变定量读数中和试验的结果, 我们应用正交实验优选定量读数中和试验的最佳条件, 结果如表1所示。并经随机抽取19份血清进行中和试验, 将OD值与血清稀释度进行回归分析, 表明两者之间有密切的依赖关系, 从而确定了由OD值推算中和抗体效价的可靠性, 结果见表

2所示。此外从表3结果证明根据Yeh计算公式演算中和抗体的效价与通过回归计算, 在统计学上无显著差别, 从而简化了抗体效价计算的方法。应用分光光度计记读结果, 不单避免了在结果判断上的主观因素, 而且定量读数中和试验的标本, 一经染色固定后, 在相当长的时间(3个月)重复记读OD值时, 所得结果无显著性差异, 如表4所示。因此, 可以认为该法准确、客观、重复性显著而且根据与常规微量中和试验的比较, 也略为敏感。

表1 A 影响定量读数中和试验的因素

LEVEL [*] 病毒剂量	细胞培养时间(小时)	胰酶浓度 μg/ml	结晶紫浓度 (%)
1 250TCID ₅₀	24	2.5	0.5
2 500TCIG ₅₀	36	5	0.8
3 1000TCID ₅₀	48	7.5	1

二、急性病毒性胃肠炎患儿双份血清HRV中和抗体的检测

1. 双份血清HRV中和抗体的动态观察 30例急性病毒性胃肠炎患儿中, 23例恢复期血清中和抗体有4倍以上增长, 总阳性率为76.7%, 其中HRV血清1型抗体阳性者占17.4%, 血清型2型抗体阳性者占8.7%, 血清型3型阳性者为30.4%, 血清型4型中和抗体阳性者比例较高, 占39.1%, 结果如表5及图1所示。

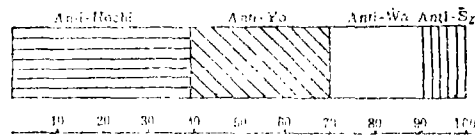


图1 23例HRV中和抗体阳性者各血清型的比例分布

2. HRV各血清型中和抗体对异型毒株交叉中和作用的观察 从表6结果提示, HRV型特异的中和抗体, 对异型毒株无明显交叉中和保护作用。

表 1 B 正交试验选择定量读数中和试验的最优条件

No	A 病毒剂量	B 细胞培养时间(小时)	C 胰酶浓度(μg/ml)	D 结晶紫浓度(%)	OD读数
1	1	1	1	1	0.0187125
2	1	2	2	2	0.00595
3	1	3	3	3	0.0229375
4	2	1	2	3	0.026225
5	2	2	3	1	0.020375
6	2	3	1	2	0.006875
7	3	1	3	2	0.016625
8	3	2	1	3	0.020725
9	3	3	2	1	0.0088
K3	0.04615	0.0386125	0.0599375	0.0698875	
K2	0.053475	0.04705	0.040975	0.02945	
K1	0.0475	0.0615625	0.0463125	0.0478875	
R	0.007325	0.2295	0.0189625	0.0404375	

最佳条件

A 2:500TCID₅₀ 病毒

B 1:24 小时

C 3:7.5μg/ml 胰酶

D 3:1% 结晶紫

表 2 14例血清标本中和试验OD值与血清稀释度的回归分析

No	$Y = a + b\ln(X + K)$	F test	Titer
1	$Y = 1.1109 - 0.1685\ln(X + 10.9)$	$P = 2E - 04$	92
2	$Y = 0.9312 - 0.104\ln(X + 0.9)$	$P = 1E - 04$	44.4
3	$Y = 1.0188 - 0.1107\ln(X + 28.4)$	$P < 0.0001$	226
4	$Y = 0.6416 - 0.0921\ln(X + 0.45)$	$P < 0.0001$	36.5
5	$Y = 0.9218 - 0.1106\ln(X + 20.4)$	$P = 3E - 04$	104.6
6	$Y = 1.1276 - 0.1673\ln(X + 6.4)$	$P = 9E - 04$	73.5
7	$Y = 0.8693 - 0.0844\ln(X + 2.9)$	$P = 1E - 04$	76.7
8	$Y = 0.7238 - 0.1039\ln(X + 1E - 03)$	$P = 1E - 04$	13.4
9	$Y = 0.9842 - 0.1175\ln(X + 6.6)$	$P = 1E - 04$	74.3
10	$Y = 0.6375 - 0.0769\ln(X + 1E - 03)$	$P = 1E - 04$	23.1
11	$Y = 0.6375 - 0.0769\ln(X + 1E - 03)$	$P = 1E - 04$	38.8
12	$Y = 1.3712 - 0.1903\ln(X + 18)$	$P = 1E - 04$	139.4
13	$Y = 0.8637 - 0.0866\ln(X + 25)$	$P = 1E - 04$	211.3
14	$Y = 0.8594 - 0.1038\ln(X + 1E - 03)$	$P = 1E - 04$	38.3

表3 yeh公式计算抗体效价与回归计算的T试验

X	Y	Y - X
77.8	92.1	14.3
49.7	44.4	- 5.299999
154.8	225.9	71.1
32.2	36.5	4.2999999
117.2	104.6	- 12.6
62.3	73.511.2	11.2
61.4	76.6	15.2
16.5	13.4	- 3.100001
122	74.3	- 47.7
18.3	23.1	4.800001
14.7	38.8	24.1
115	139.4	24.4
321.3	211.3	- 110
27.2	38.3	11.1

0.1286

S.D OF (Y - X) = 10.8761 T = 0.0118 P = 0.990

DF = 13

*X: 应用 yeh 氏公式计算的滴度

*Y: 回归计算的滴度

3. HRV 中和抗体血清型的型别与 HRV-RNA 电泳型的连系 实验结果显示, 抗 HRV 血清 2 型中和抗体阳性者, 粪便标本检出的 HRV-RNA 电泳型属于短型, 其余各型别中和抗体阳性者粪便检出的 HRV-RNA 电泳型均属长型, 如果将这些检出的 HRV-RNA 长型电

泳型, 进一步按 Tam 法^[7] 进行分类, 在 HRV 血清 I 型中和抗体阳性者之中, 所检出的 HRV-RNA 电泳型有 II B₁ 和 II B₂ 两个型。HRV 血清 3 型中和抗体阳性者检出 II A₂、II B₂、II B₃、II C₁、II C₂、等 5 个电泳型, HRV 血清型 4 型中和抗体阳性的, 所检的电泳型有, II AB II₁, II B₂、II C₁。结果提示, HRV-RNA 电泳型相同的毒株, 可分属于不同的血清型, 相反, HRV 血清型相同的毒株, 可具不同的电泳型。

表4 定量读数中和试验染色后3个月再记读OD值的比较

X	Y	Y - X
0.095	0.076	- 0.019
0.047	0.096	0.049
0.05	0.047	- 3.00000001E-0.3
0.073	0.0705	- 2.5E-03
0.081	0.07425	- 6.75E-03
0.21075	0.21725	6.50000008E-0.3
0.62425	0.61875	- 5.49999997E-0.3
0.74375	0.73	- 0.137499999
0.7425	0.74375	1.24999974E-0.3
0.69	0.71333	0.0233300002

3E-0.3

SE OF(X-Y) 6.3E-0.3 DF = 9 P = 0.6485

T = 0.4715

X: 染色后的即时OD值

Y: 三个月重测的OD值

表5 23例HRV中和试验阳性者各血清型别的百分比

	Anti-Wa	Anti-S2	Anti-Yo	Anti-Hochi	Total
例数	5	2	7	9	23
百分数(%)	17.4	8.7	30.4	39.1	100

表 6 11例患儿急性期与恢复期血清中各型中和抗体滴度的比较

No	Anti-Wa			Anti-S2			Anti-Yo			Anti-Hochi			Serotyp	PACE
	acut	con	times	acut	con	times	acut	con	times	acut	con	times		
1	5.3	659.8	124.5	566.6	771.2	1.4	234.6	356.1	1.5	847.5	1280	1.5	1	-
5	7.1	314.0	44.2	66.7	128.2	1.9	733.3	611.4	0.8	5.9	17.0	2.9	1	+
18	15.2	328.3	21.6	30.0	78.3	2.6	133.3	289.9	2.2	203.4	127.5	0.6	1	+
3	725.5	1280	1.8	869.2	954.6	1.1	109.9	804.3	7.3	7.2	4.0	0.6	3	+
10	60.8	57.4	0.9	411.3	602.9	1.5	101.5	418.2	4.1	143.6	156.4	1.1	3	+
17	161.3	327.9	2.0	760.6	955.5	1.3	4.7	118.0	25.1	34.6	44.5	1.3	3	+
2	7.0	71.6	10.2	226.4	477.1	2.0	23.7	87.3	3.6	8.0	1280	160	4	+
7	5.1	5.3	1.0	445.8	408.9	0.9	1280	1280	1.0	8.1	334.0	40.7	4	+
15	1280	1280	1.0	5.3	5.5	1.0	8.3	11.1	1.3	8.0	536.8	65.9	4	+
21	22.6	271.7	1.2	76.9	81.3	1.1	72.9	71.8	1.0	27.7	168.1	6.1	4	+
22	46.6	58.4	1.3	56.4	52.2	0.9	211.6	231.4	1.1	15.9	124.2	7.8	4	+

acut: 急性期
con: 恢复期

表 7 51例不同年龄组健康儿童血清中 HRV 各型中和抗体的阳性结果

Groups	Cases	Possessed of 4 serotype Abs		Possessed of 3 serotype Abs		Possessed of 2 serotype Abs		Possessed of 1 serotype Abs	
		cases	percentage	cases	percentage	cases	percentage	cases	percentage
0~	5	—	—	2	40%	1	20%	2	40%
7M~	19	3	15.8%	5	26.3%	6	31.6%	5	26.3%
3Y~	13	4	30.8%	4	30.8%	3	23.1%	2	15.3%
5Y~	9	3	33.3%	4	44.5%	2	22.2%	—	—
7Y~	5	4	80%	1	20%	—	—	—	—

表 8 51例健康儿童 HRV 各型中和抗体的阳性百分比

血清型	阳性例数	阳性%数
Anti-Wa	33	64.7%
Anti-S2	40	78.4%
Anti-Yo	33	64.7%
Anti-Hochi	31	60.8%

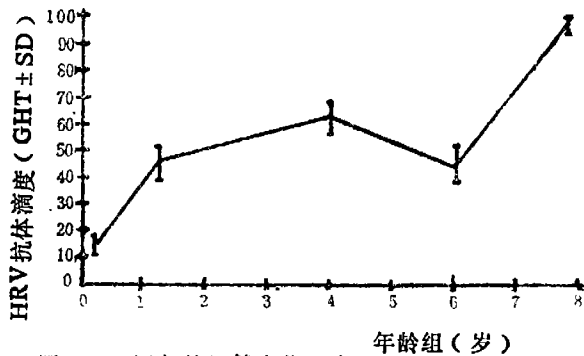


图 2 不同年龄组健康儿童血清HRV中和抗体几何平均滴度的变化

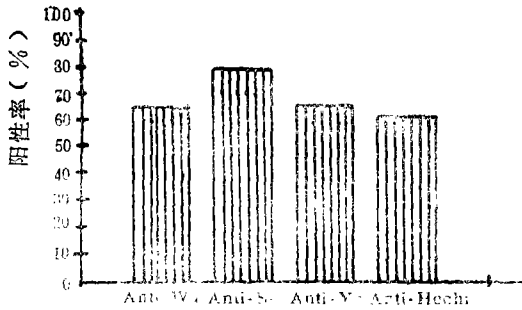


图3 51例健康儿 HRV 各血清型中和抗体的阳性率

四、流行前健康婴幼儿中和抗体的检测

结果如表7所示,婴幼儿年龄的递增,具有HRV血清型中和抗体的型别数越为广泛。而且中和抗体的几何平均滴度也有随年龄而上升的趋势。结果见图2所示。此外51例单份血清所检出HRV的各血清型中和抗体,阳性率都在60%以上,统计学上的差异无显著性,如表8及图3所示。

讨 论

本文实验表明微量细胞病变定量读数中和试验,在测定HRV中和抗体时,具有相对正确、客观、敏感、快速的特点,染色后三个月并不影响其OD值,有利于试验时人力与时间的调节。应用本法对30例急性病毒性胃肠炎患儿双份血清标本进行了HRV 4个血清型特异中和抗体的检测,结合对病人早期粪便HRV-RNA基因组型别的分析,提示HRV血清型与HRV-RNA电泳型间的不一致性,电泳型相同的毒株,可分属不同的血清型,而血清型相同的毒株,可具不同的电泳型,HRV的基因组是由节段性RNA所组成,易于发生重组或突变,从而使其电泳型具高度的可变性,只有在特定的条件下,为型特异抗原编码的基因发生变迁,方导致病毒抗原型别上的改变,这方面的工作,是值得深入研究的。

在23例双份血清中和抗体阳性中,呈现HRV血清型4型中和抗体者占比例最高,提示1987年广州地区HRV流行,以血清型4型为主,回顾以往的资料,结合本文实验结果,我

们推论:①HRV在一个地区,每年似有一个不同的优势血清型的流行。②不同年份流行血清型别的更替。可能与人群免疫压力选择作用有关。③健康婴幼儿随年龄的增长,感染HRV不同血清型别越广泛,中和抗体的几何平均滴度越高,易感性虽可下降,但通过不显性感染,散播HRV至易感人群的可能性是存在的^[8]。

在3例HRV-RNA为阳性的患儿,其双份血清标本HRV中和抗体却为阴性,除考虑到机体液免疫应答差异外,是否HRV还存在新的血清型别,这方面还有待进一步研究。

参 文 献

- [1] Neil RB, et al. Viral gastroenteritis. *New Engl J Med* 1981; 304(7):379.
- [2] Espejo RT, et al. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico city. *J Infect Dis* 1979; 139:474.
- [3] Lourenco MH, et al. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: Attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Virol* 1981; 132:161.
- [4] Yeh TH, et al. Automated, quantitative cytopathic effect reduction assay for interferon. *J Clin Microbiol* 1982; 16(2):413.
- [5] Sato K, et al. Antigenic relationships between rotaviruses from different species as studied by neutralization and immunofluorescence. *Arch Virol* 1982; 73:45.
- [6] 严泳楷,等. 广州地区人轮状病毒的分子流行病学研究. *中山医科大学学报* 1986; 7(1):1.
- [7] Tam JS, et al. Occurrence of rotaviruses in Guangzhou and Hong Kong. *J Infect Dis* 1988; 157(2):357.
- [8] Holdaway MD, et al. Rotavirus serotypes by serum neutralization. *J Med Virol* 1980; 5(3):231.

The Studies of Human Rotavirus Serotypes in Guangzhou
2. The Studies of HRV Serotypes with a Quantitative
Cytopathic Effect Reduction Assay in Microculture
Plate for Neutralizing Antibody to HRV

Zhang Xiaogong Han shouxin Yan yongkai
(Department of Microbiology and Immunology)

Abstract

A quantitative cytopathic effect reduction assay in microculture plate for neutralizing antibody to human rotavirus (HRV) is described. By this method, the neutralizing antibodies of different serotypes of HRV from acute and convalescent sera of 30 cases of patients with acute viral gastroenteritis within the HRV epidemic season in 1987 at Guangzhou were detected.

The results show that, the current studies establish an assay for neutralizing antibody to HRV that is accurate, objective, sensitive, rapid and reproducible. The antibody titers were four-fold higher or more in convalescent sera than acute sera of 23 cases among 30 cases of patients with acute viral gastroenteritis, the neutralizing antibody of these cases was positive. Among these cases, the positive percentage of different neutralizing antibody to HRV serotypes 1, 2,3 and 4 was 17.4%, 8.7%, 30.4%, and 39.1% respectively. Therefore, it may imply that HRV serotype 4 spread in greater extent than the other three serotypes at Guangzhou in 1987.

The finding suggests that if we analyze the variation of neutralizing antibodies to HRV in acute and convalescent sera and the electropherotypes of HRV-RNA detected with PAGE in stools of patients with HRV diarrhea, it is possible to identify the serotype of HRV which is spreading in an year. Comparing our results of the experiment with the previous data which show serotype 2 HRV spreaded widest among four serotype HRV in 1984, serotype 3 spreaded widest in 1983, serotype 1 spreaded widest in 1982 in Guangzhou area, we also discuss the factors and possibility that under the acquired immunity pressure, HRV infection might switch from one to another HRV serotype in children in different year.

Key words HRV Quantitative cytopathic effect reduction assay Electropherotypes
of HRV-RNA Neutralizing antibody