

1982—1984年上海市秋冬季婴幼儿急性胃肠炎病例中人轮状病毒分子流行病学的研究

周永洁 蒋慧惠* 曹式芳

(上海医科大学公共卫生学院, 上海)

崔桂芳*

(中科院上海生化研究所, 上海)

洪菁

(上海市工农医院, 上海)

施云程

(上海市儿童医院, 上海)

提 要

1982—1984年上海市二个医院收集的小儿腹泻标本159份, 用RNAPAGE银染法分析轮状病毒RNA迁移图谱; 在阳性标本74例中72例为2L电泳型, 2例不能分为2L或2S电泳型, RNA电泳带迁移差别较明显的为2、3和7、8、9 RNA片段。根据7、8、9三条带迁移率之不同, 将RNA迁移图谱分成3种电泳亚型。统计学检验说明82年以第2电泳亚型为主, 83年以第1电泳亚型为主, 84年均以第1电泳亚型($P < 0.05$)。提示82—84年RNA迁移图谱有明显的变迁。二个医院相距甚远, 但每年的RNAPAGE图谱分布趋势基本一致。

轮状病毒是世界性婴幼儿急性胃肠炎的主要病原体^[1], 呈散发或暴发方式流行。据WHO报道全世界每年有急性腹泻儿童七亿五千万人次, 其中死亡于轮状病毒性腹泻者就有500—800万, 部分健康恢复者发育水平降低, 严重地影响着人类健康和生命安全。

轮状病毒是双股RNA病毒, 基因组是11个分开的片段。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中(PAGE)一般能分出8—11条带^[1]。分析轮状病毒RNA迁移图谱的差异可鉴别不同的人轮状病毒(HRV)株, 以及人和动物的轮状病毒株, 有助于轮状病毒的病原学和流行病学的研究^[2]。本文应用RNAPAGE银染法, 初步分析了1982—1984上海市秋冬季婴幼儿急性胃肠炎住院病人轮状病毒RNA迁移图谱类型, 并探讨其与疾病流行的关系。

材 料 与 方 法

一、细胞:

MA-104细胞(非洲绿猴胚肾传代细胞)适于培养轮状病毒。

本稿于1986年3月26日收到

•感谢上海医科大学卫生统计教研室张照寰教授的有益指教。

*导师

二、病毒:

1. 粪便: 主要采自1982—1984年上海市儿童医院及上海市工农医院秋冬季婴幼儿急性腹泻住院患儿粪便; 对照组为非胃肠道疾病住院病人的粪便; -40°C 保存。

2. SA₁₁ 病毒株 (由美国Baylor医学院赠送):

(1) SA₁₁ 的培养: 选择传代后第2天或第3天 MA-104 细胞, 分别用无牛血清日本Eagle氏液洗细胞3次, 加入等量的轮状病毒组织培养液: $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰酶 (37°C , 预先作用15分钟) 混合液置细胞吸附1小时后, 加适量无牛血清的日本Eagle氏液。 37°C 培养, 每天观察细胞病变。对照组MA-104细胞除未加 SA₁₁ 以外, 其它操作条件与实验组相同。(2) SA₁₁ 的浓缩: 病变的 MA-104 细胞置 -40°C , 冻融3次后, 经冷冻低速离心 $3,000\text{r}/\text{m}$, 1.5小时; 弃上清后用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaAc-1% SDS 悬浮沉淀块, 置45%蔗糖之上, 超速离心 $34,000\text{r}/\text{m}$, 1.5小时; 收集的沉淀物便是提纯、浓缩的病毒。

三、酶联免疫吸附试验:

用成都生物制品研究所生产的ELISA试剂盒间接混合夹心法检测轮状病毒特异性抗原; 操作按试剂盒说明进行。

四、轮状病毒RNA电泳:

按改良的Herring方法^[5]进行, 其中电泳电流 40mA 、0.5小时, 30mA 、6小时, AgNO_3 染色1小时。

实 验 结 果

150份腹泻病人粪便标本经RNAPAGE银染法和ELISA进行检测, 并用 SA₁₁ 病毒作为阳性对照, 6份正常人粪标本作为阴性对照。RNAPAGE银染法检测阳性标本74例。与标准株SA₁₁RNA迁移图谱比较, 其中72例为电泳型2L, 2例不能分电泳型2L或2S, 未发现电泳型2S。同一电泳型2L中RNA迁移图谱可见不同, 其中迁移率差别较明显的为第I组的2、3RNA片段和第Ⅲ组7、8、9RNA片段。现已证实轮状病毒第6基因片段编码内壳蛋白^[6], 为血清亚组特异性抗原决定点^[17], 而轮状病毒第9基因片段编码一种外壳蛋白^[8], 作为轮状病毒的主要中和抗原, 为血清型特异性抗原决定点^[9]。我们按Espejo等法^[10], 试根据7、8、9三条RNA带迁移率之不同, 将RNA电泳迁移图谱分为3种电泳亚型(图1)。第1电泳亚型为7、8、9三条带完全分开, 第2电泳亚型为7、8、9分为二条带, 第3电泳亚型为7、8、9呈一条带。分析不同电泳亚型的ELISA结果, 未发现电泳带亚型与ELISA结果之明显差异。

从轮状病毒分子流行病学方面观察, 发现82—84年上海市婴幼儿轮状病毒性腹泻流行, 主要是轮状病毒RNA电泳型2L毒株, 即血清第Ⅱ亚组流行于人群中。经统计学分析每年流行的轮状病毒RNA电泳亚型(表1), 82年以第2电泳亚型占优势($P < 0.05$); 83年以第1电泳亚型占优势($P < 0.05$); 84年均为第1电泳亚型, 未发现第2, 第3

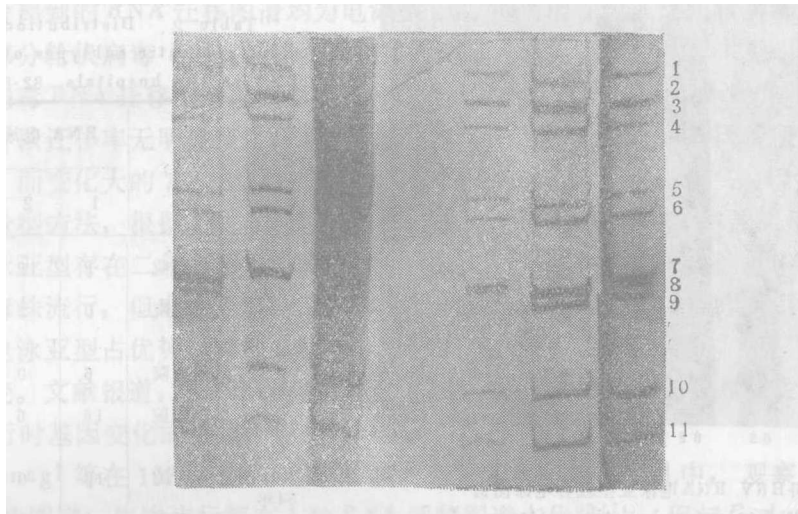


图1 HRV RNA 迁移图谱3种电泳亚型
Figure 1. Three subtypes of migration patterns of HRV-RNA

电泳亚型；各电泳亚型在10月份出现最多（图2）。将每年部分相似的同电泳亚型分别进行混合电泳，未发现明显差异（图3）。

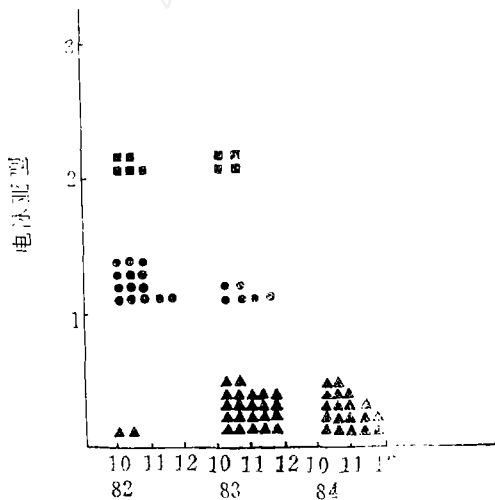


图2 82—84年上海市所见3种HRV RNA电泳亚型分布
Figure 2. Distribution of three electrophoretic subtypes of HRV RNA in Shanghai, 82-84

表1 82—84年上海市婴幼儿轮状病毒RNA电泳亚型分析
Table 1. Analysis of electrophoretic subtypes of infantile rotavirus RNA in Shanghai, 82-84

	RNA 电泳亚型			合计
	1	2	3	
82年	2	14	5	21
83年	22	6	4	32
84年	19	0	0	19
合计	43	20	9	72

上海市工农医院位于市区西南方向40多公里，二个医院每年分离到的轮状病毒RNA电泳亚型，分布趋势倾向一致（每年 $P>0.05$ ，表2）。分析各年龄组，不同性别组每年流行的HRV-RNA电泳亚型分布情况，趋势基本一致（表3）。

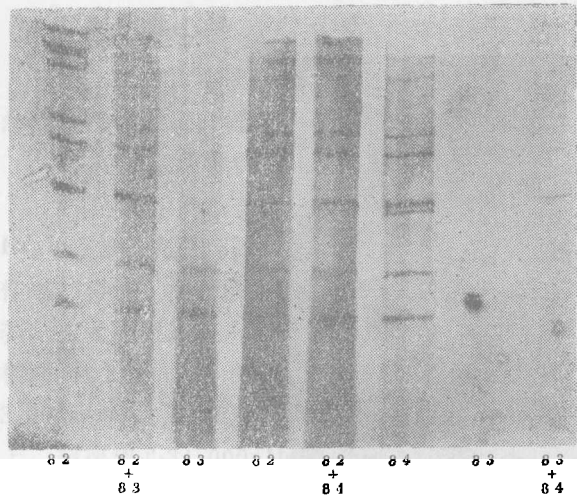


图3 部分HRV RNA电泳亚型混合电泳图谱
Figure 3. Coelectrophoretic patterns of electrophoretic subtypes of some HRV-RNA

表2 82—84年二个医院HRV RNA电泳亚型分布
Table 2. Distribution of electrophoretic subtypes of HRV RNA in two hospitals. 82-84

		RNA 电泳亚型		
		1	2	3
82年	儿童医院	2	12	4
	工农医院	0	2	1
83年	儿童医院	6	0	0
	工农医院	16	6	4
84年	儿童医院	13	0	0
	工农医院	6	6	0

表3 82—84年不同年龄和性别分离到的HRV RNA电泳亚型
Table 3. Electrophoretic subtypes of HRV-RNA isolated from different ages and sexes, 82-84.

年 龄 (月)	女			男			合 计		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
82年	<6	0	0	0	1	1	0	1	1
	6—12	0	8	1	2	5	2	2	13
	>13	0	0	1	0	0	0	0	1
83年	<6	2	0	0	2	0	0	4	0
	6—12	6	2	1	10	2	2	16	4
	>13	1	0	1	1	2	0	2	2
84年	<6	1	0	0	0	0	0	1	0
	6—12	6	0	0	11	0	0	17	0
	>13	0	0	0	1	0	0	1	0

讨 论

RNAPAGE 已广泛应用于研究 HRV 分子流行病学, 许多国家从 HRV 性腹泻标本中分离出的病毒株, 建立了不同的 HRV-RNA 迁移图谱, 其中有些电泳图谱同时流行, 持续存在多年, 每年都有些 RNA 迁移图谱占优势。Espejo 等根据基因组 10、11 迁移率之不同, 将电泳迁移图谱分为 2 种电泳型。在相同条件下 (电泳的时间、电压、电流), 迁移慢, 具有短图谱的 HRV 为电泳型 2S, 而迁移快, 具有长图谱的 HRV 为电泳型 2L。

Thouless 等发现 HRV 电泳型 2S 属于血清亚组 I；电泳型 2L 属于血清亚组 II^[7]。本文中三年中分离到的 RNA 迁移图谱均为电泳型 2L，即血清亚组 II 之轮状病毒株占优势。

将部分轮状病毒 RNA 迁移图谱相接近的标本进行混合电泳，未见明显的差异。对于轮状病毒 RNA 迁移图谱差别明显的标本，本文未做混合电泳。RNAPAGE 图谱中第 6 条基因片段迁移率无明显变化，RNA 迁移率变化大的第 2、3 基因片段与血清抗原关系不大，而变化大的 7、8、9 基因片段与轮状病毒的中和抗原有关，因此参照 Espejo 等人的分型方法，根据 7、8、9 基因片段迁移率的不同分成 3 个电泳亚型。其中第 2、第 3 电泳亚型存在二年，第 1 电泳亚型存在三年。虽然 3 年期间均为 RNA 电泳型 2L 的轮状病毒株流行，但电泳亚型的比例每年都有变迁。开始为第 2 电泳亚型占优势，以后为第 1 电泳亚型占优势，其他 2 种电泳亚型逐渐减少。推测 7、8、9 三条核酸顺序可能有突变。文献报道：在 HRV 连接流行过程中，基因可能不断出现点突变，类似于流感病毒流行时基因变化的特点^[13]。

Schnagl 等在 1976-1979 年间中澳大利亚 HRV 腹泻婴儿中，观察到几种不同的 RNA 电泳图谱，每次流行都有 1 种 RNA 迁移图谱占优势^[11]，但与 Rodger 报道的墨尔本流行的 HRV RNA 电泳图谱不同^[12]。Schnagl 认为不同的流行区存在不同的流行株。上海市二个医院相距甚远，但每年 RNAPAGE 电泳亚型分布趋势倾向一致，提示上海市小儿腹泻病毒之 RNA 迁移图谱类型分布基本相同，可能两地区人口的频繁交流足以相互传播人轮状病毒。

参 考 文 献

- [1] Estes, M.K. et al., 1983, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 105:123-184.
- [2] Flewett, T.H., 1983, 10, 访华报告.
- [3] Kalica, A.R. et al., 1981, *Infection & Immunity* 33:958.
- [4] Kalica, A.R. et al., 1978, *Virology* 87:247-255.
- [5] Herring, A.R. et al., 1982, *J. Clinical Microbiology* 16:437-477.
- [6] Demarch, J.M., 1978, *Virology* 89:643-646.
- [7] Thouless, M.E. et al., 1982, *Archives of Virology* 73:219-230.
- [8] Beards, G.M. et al., 1982, *Archives of Virology* 74:65-70.
- [9] Gaul, S.K. et al., 1982, *J. Clinical Microbiology* 16:495-503.
- [10] Espejo, R.T. et al., 1980, *Infection & Immunity* 30(2):342-348.
- [11] Schnagl, R.D. et al., 1981, *Infection & Immunity* 33(1):17-21.
- [12] Rodger, S.M. et al., 1981, *J. Clinical Microbiology* 13(2):272-278.
- [13] Follett, E.A.C. et al., 1983, *New York, Elsevier: Biomedical* 331-342.

PRELIMINARY STUDY OF MOLECULAR EPIDEMIOLOGY
OF HUMAN ROTAVIRUSES AMONG INFANTS WITH
ACUTE GASTROENTERITIS IN SHANGHAI, 1982—1984

Zhou yong-jie Jiang Hui-hui Cao Shi-fang

(*Shanghai Medical University, Shanghai*)

Cui Gui-fang

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai*)

Hong Qing

(*Shanghai Hospital for Workers and Peasants, Shanghai*)

Shi yun-cheng

(*Shanghai Children's Hospital, Shanghai*)

150 stool samples were collected from acute infantile gastroenteritis patients in two hospitals in Shanghai from 1982 to 1984. The migration patterns of rotavirus RNA genome segments in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were compared by silver-staining. RNA PAGE showed that 74 samples were positive, among which 72 samples were of long electropherotype (2L), and 2 samples could not be categorized into 2S or 2L. Significant differences could be detected in some of the 2, 3, 7, 8 and 9 segments. According to the differences in the migration of segments 7, 8 and 9, isolates of electropherotype 2L could be divided into three subtypes. Subtype 2 was predominant in 1982, subtype 1 was predominant in 1983 and subtype 1 was all but subtype 2 or 3 in 1984 statistically ($P < 0.05$). The two hospitals are located far away from each other, but the distribution of RNA PAGE patterns were similar each year.