

## 湖北成人轮状病毒性腹泻爆发 流行的病原学研究

任先平 徐乐农 黄珍华

(湖北省卫生防疫站防疫科, 武汉)

梁培劲 陈安珠

(湖北省医学科学院中心实验室, 武汉)

### 提 要

1986年5月4日—5月19日, 湖北省襄阳县发生一起以成人为主的流行性腹泻, 发病98例, 患病率为47.1%。发病涉及各年龄组, 以青壮年为主。取18名患者粪便作细菌培养, 未发现致病菌。而有50% (9/18)的粪便标本在电镜下观察到约75nm的轮状病毒颗粒; 72.2% (13/18)的粪便标本聚丙烯酰胺电泳(PAGE)检测呈阳性, 病毒核酸图象与普遍轮状病毒核酸图象十分不同; 患者双份血清补体结合试验表明57.1%的病人恢复期血清产生对分离株轮状病毒的抗体。因此, 可以确定, 本次流行性腹泻爆发流行的病原是成人轮状病毒(ADRV)。

1986年5月4日—5月19日, 湖北省襄阳县欧庙等地发生一起以成人为主的爆发性流行性腹泻。全村共45户, 总人口为208人, 本次发病98人, 患病率为47.1%, 感染者中青壮年占80%以上, 15岁以下儿童占5%左右。大多数病例起病急, 其主要症状为腹泻(100%)、腹胀(96.9%)、肠鸣(100%)、轻度腹痛(81.6%)、呕吐(44.9%), 少数病例伴有低热, 均为水样或旦花样稀便, 每日几次至数十次不等, 无里急后重, 病程一般为3—5天。为确定诊断和提供防治根据, 我们采集了患者的粪便和血液作病原学和血清学的诊断和研究。现报告如下:

### 材料与方 法

**一、材料来源** 在襄阳欧庙及枣林等地急性腹泻爆发流行区, 采取住院1-3日内症状典型的病人的粪便共18份, 并采集病人急性期和恢复期双份血清, 置-20℃冻存。同时收集1986年武汉市婴幼儿腹泻标本6份, 与ELISA及核酸分析平行检查。

本文于1986年12月19日收到。

\*标本采集及细菌培养由襄阳县卫生防疫站协助, 特此致谢。

**二、电镜检查** 直接电镜、免疫电镜及超薄切片均按常规方法进行<sup>(1)</sup>。用国产DXB<sub>2</sub>-12型电镜观察。

**三、酶联免疫吸附试验** 检查普通轮状病毒ELISA试剂盒和成人轮状病毒(ADRV)ELISA试剂盒分别购自卫生部兰州生物制品所和江西生物药品制造厂,操作试剂盒均按说明书进行。

**四、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)** 方法基本按Herring<sup>(2)</sup>法稍加改进。采用10%聚丙烯酰胺连续缓冲系统,垂直板式电泳,样品50 $\mu$ l,电流40mA,硝酸银染色30分钟。

**五、补体结合试验** 补体结合抗原按吴慎<sup>(3)</sup>方法提取,血清抗补体去除按Taran<sup>(4)</sup>所采用的微量法,双份血清同时进行。

## 结 果

**一、直接电镜法:**取10份RNA阳性病人粪便标本提取液,直接滴膜负染观察,结果仅有3例阳性,所有病毒颗粒大小为75nm左右,呈圆形,多数病毒颗粒呈空心结构,有的边缘不整齐,说明大部分病毒已开始降解(图1)。

**二、免疫电镜法:**用经直接电镜负染检查为阳性的病人粪便提取液作抗原,与7对血清进行免疫反应,然后作悬滴免疫电镜观察,其中4份为恢复期阳性血清。电镜下可见病毒颗粒聚集成团,大小一致,直径约为50nm左右,形态颇似降解后的轮状病毒的内核。此种核心成份有的已呈部分空心结构和变形。在病毒颗粒之间有不明显的絮状抗体桥紧密相连(图2)。

**三、超薄切片:**取10份RNA阳性标本的粪便沉渣做超薄切片进行电镜观察,结果有9份均见到完整的病毒颗粒,其形态与通常轮状病毒相似,直径为75nm左右,内核致密;约50nm,其外为厚约20nm的双层衣壳,由呈放射状排列的亚单位组成。这些病

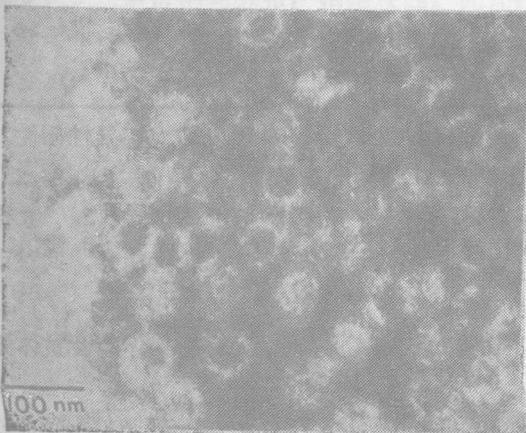


图1 粪便提取液负染电镜下病毒呈不同程度降解  
(100,000 $\times$ )

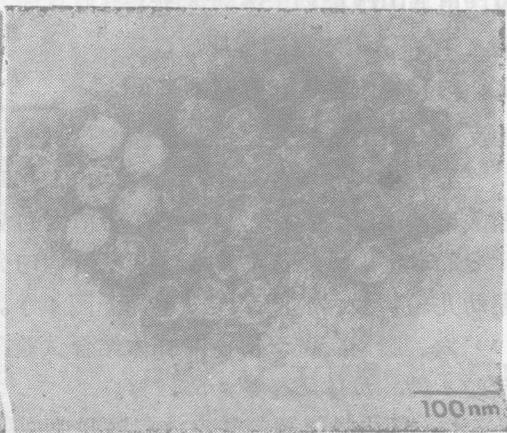


图2 免疫电镜显示降解后的轮状病毒内核聚集,其间有絮状抗体桥( $\uparrow$ )  
(80,000 $\times$ )

毒颗粒多分布于肠道脱落细胞残片内(图3)。

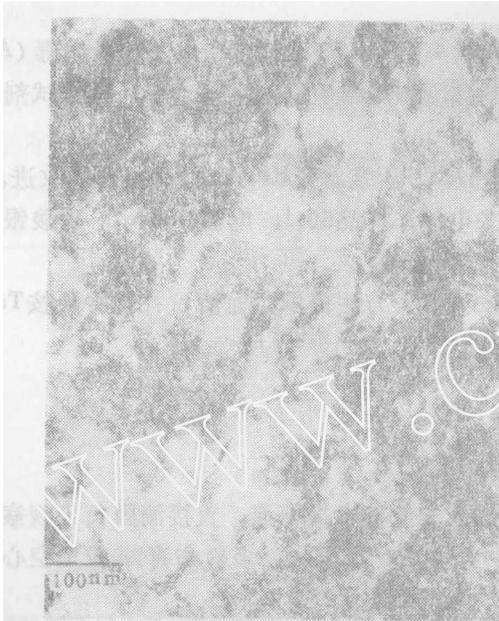


图3 粪渣超薄切片在细胞残片内完整的轮状病毒颗粒形态 (100,000×)

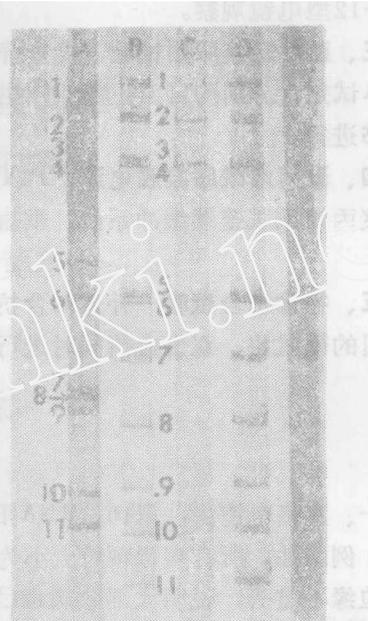


图4 从湖北襄阳县成人流行性腹泻得到的轮状病毒的RNA基因组电泳图谱(A为普通轮状病毒, B-E为成人轮状病毒)

四、酶免疫吸附试验检测:

用普通轮状病毒ELISA试剂检测, 18份标本均为阴性, 而与6例婴幼儿轮状病毒标本呈阳性反应。用ADRV的ELISA试剂盒检测, 有14份标本呈阳性反应, 反之, 与婴幼儿轮状病毒标本呈阴

性反应(表1)。将14份阳性标本作阻断试验, 除1例外, 其余13份均为特异性阳性。

五、病毒核酸分析: 18份标本, 其中13份PAGE核酸电泳为阳性, 阳性率为72.2%, 核酸电泳型较为特殊, 11条核酸带清晰可见, 第一区3、4带相接近, 第二区5、6带十分靠近, 但第三区7、8、9三带均匀分布, 相距较远, 与普通成人轮状病毒, 武汉市婴幼儿轮状病毒的图象十分不同(图4)。

六、腹泻病例双份血清补体结合试验: 7例病人双份血清, 恢复期补体结合抗体阳转的4例, 抗体阳转率为57.1%。

七、聚丙烯酰胺核酸电泳和酶免疫吸附试验检测ADRV敏感性比较: 18例腹泻病例粪便标本分别作上述两种方法检测, 检出结果不完全一致, ELISA阳性的14例标本中, PAGE检出了病毒RNA带的有10份, 检出率分别为72.2%和55.6%。为了证实其特

表1 R<sub>o</sub>t.病毒的酶联免疫吸附试验测定

标本采集地点	份数	检测方法			
		普通R <sub>o</sub> t.病毒ELISA		成人R <sub>o</sub> t.病毒ELISA	
		阳性数	检出率(%)	阳性数	检出率(%)
襄阳县	18	0		13	72.2%
武汉市	6	5	83.3%	0	

异性和敏感性,我们将PAGE阴性的4份标本重新提取RNA,延长其染色时间和加大样品量,结果有2份出现阳性,于是PAGE检出率达66.7%,两者的符合率为94.4%, $X^2=0.13$ , $P>0.05$ ,两者无显著性差异(表2)。

八、细菌学检查:所采集的18份腹泻病人新鲜粪便均作了细菌培养。结果霍乱弧菌、沙门氏菌、痢疾杆菌、结肠炎耶氏菌及致病性大肠杆菌培养均为阴性。

表2 PAGE与ELISA法检出R.t.病毒比较

PAGE	ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	12	0	12
阴性	1	5	6
合计	13	5	18

$x^2=0.13$   
 $P>0.05$

## 讨 论

感染性腹泻是一组多发病,这组疾病的病原学构成很复杂,既可由多种致病菌所致,亦有不少是由病毒所引起。据不完全统计,湖北省每年约有20余万病例。多年来,成人爆发性流行性腹泻在我省各地均有爆发流行,主要集中于青壮年组,流行季节在春末夏初,过去,我们曾作过一些调查,初步证实了是由一种病毒引起的流行性腹泻<sup>[5]</sup>。

本次爆发流行,我们从病人的粪便标本中查到了典型的轮状病毒颗粒,72.2%腹泻病例粪便提取液在PAGE上呈现轮状病毒特有的11条核酸带;有57.1%病例恢复期血清轮状病毒抗体增高4倍以上;18例病人粪便标本作细菌培养均为阴性,上述结果证实,本次流行性腹泻的爆发流行的病原是轮状病毒,即洪涛<sup>[6-8]</sup>所称的ADRV。

我们从本次流行所获得的毒株核酸分析来看,其11条核酸带的分布和图象均较以前报道的人类轮状病毒“Wa”株不同,与1979年以来武汉市婴幼儿腹泻病例中分离出来的轮状病毒株不同,其主要特征是3、4核酸带接近,5、6两条带十分靠近,7、8、9三条带均匀分布,相距较远。此外,与普通轮状病毒酶联免疫吸附试验为阴性,而与ADRV酶联免疫吸附试验为阳性,说明此轮状病毒抗原性与引起婴幼儿轮状病毒的抗原性完全不同,无共同的群特异性。

便液负染电镜所见的病毒颗粒多为75nm左右的空心或实心形态不完整的颗粒。在悬滴免疫电镜下观察到的多为50nm左右的病毒核心,这种核心保存着抗原性。而在超薄切片电镜见到存在细胞残片内的病毒,多为75nm左右完整的轮状病毒颗粒,形态上与普通轮状病毒很难区别。上述结果表明,这种轮状病毒在体外是很容易降解的。洪涛认为,这种完整的病毒颗粒,一旦释放到肠道,可能就被入肠道中某种蛋白酶或化学物质所消化,最后降解为50nm的核心样结构,与本文观察所获得的结果相吻合。

本文对PAGE及ELISA两种方法相比较,发现前者的特异性高,其敏感性次于ELISA法。而后的敏感性高,但需排除其非特异性。根据我们的经验,如能延长染色时间和加大一倍样品量,即可检出含病毒颗粒较少的弱阳性标本,提高其敏感性。ELISA虽敏感,但必须辅以旁证,可用阻断试验来排除其非特异性。总之,PAGE法及ELISA法在实际检查成人腹泻病原中是值得推广应用的。

## 参 考 文 献

- [1] 林全胜, 1980《武汉医学杂志》2(6): 1。  
[2] Herring SM et al., 1982 *J Clin Microbiol*, 16: 473。  
[3] 吴慎等, 1982《传染病资料汇编》3(6)。  
[4] Schwidt, N.J., 1969 病毒学基本技术, K、哈伯尔等编, 中国科学院微生物所译, 科学出版社, 1979。  
[5] 任先平等, 1984《防治与研究》第1期。  
[6] 洪涛等, 1984 中华微生物学和免疫学杂志, 4(1): 1-5。  
[7] Hung Tao et al., 1983, *Lancet* 2: 1078-1079。  
[8] Hung Tao et al., 1984, *Lancet* 1: 1139-1142。

## A Research on Aetiology of Rotaviral Diarrhea Outbreak in Adults, Hubei Province

Ren Xian-ping Liang Pei-gin et al

(Hubei Provincial Antiepidemic Station, Wuhan)

During a period of 4 to 19 May, 1986, there had been an outbreak of epidemic diarrhea primarily among adults in Xiang yang county, Hubei Province. 98 out of 208 people were infected, with an incidence rate of 47.1%. All age groups were attacked, most of them were youth and in their prime of life. 18 faecal samples were taken for culture of bacteria, the results showed no bacterial pathogen. Nevertheless, virus particles with typical rotavirus morphology were found in 9 samples (50%), again, 13/18 samples (72.2%) showed the RNA pattern of rotavirus, but its migration pattern on polyacrylamide electrophoresis showed difference from ordinary rotaviruses. Four-fold CF antibody rise was detected in 4/7 patients. It had been confirmed that this pathogenic agent of outbreak of epidemic diarrhea is rotavirus.