

云南省昭通市婴幼儿急性胃肠炎中 轮状病毒的研究

陈元鼎^{*} 张惠芬^{*} 孙茂盛 丁雪凤 戴国珍^{**}
万新邦^{*} 王丽春 李家喜 苏 晔 郭 仁
陈孝贤[△]

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明)

提 要

本文报道应用PAGE、EM、ELISA检测技术, 对1982年10月到1985年12月间采自云南省昭通市的婴幼儿急性胃肠炎患者大便标本中的A组轮状病毒(RV)和腺病毒(Adv)的研究结果。从309例标本中共检出169例含有RV, 阳性率为54.7%。在不同性别间RV检出率没有显著差异。RV>6月~24月龄患儿组中的检出率(59.1%)显著高于≤6月龄患儿组(33.3%)($P<0.01$)。10月至1月是RV胃肠炎流行的高峰季节, 在这一季节中RV的检出率(65.1%)显著高于其它季节($P<0.001$)。对RV基因RNA的分子流行病学研究发现, 1984年2月至1985年12月间在昭通市流行的RV全为第二亚组。Adv在婴幼儿急性胃肠炎中的检出率为16.7%。结果表明, RV是昭通市婴幼儿急性胃肠炎的主要病原体, 它的流行具有明显的季节性。

关键词: 婴幼儿急性胃肠炎, 轮状病毒。

急性传染性胃肠炎不论是发达国家还是在发展中国家都是人类重要的疾病^[1], 轮状病毒(RV)是这一疾病的主要抗原。全世界RV胃肠炎每年都有很高的发病率和死亡率^[2]。就目前所知, 在RV属中有五个不同的组^[3], 与人类胃肠炎关系密切的有三个组。B组RV(在中国)是引起成人急性胃肠炎的主要病原^[3], 而A组RV则仍然是婴幼儿急性胃肠炎的主要病原^[4]。肠道腺病毒(EAd)是婴幼儿急性胃肠炎的另一重要病原, 在全世界都有广泛的流行和很高检出率^[5]。

人类虽然已经有了关于这两类病毒及疾病的许多知识, 然而有关它们的较长时期的流行病学研究资料仍然是很缺乏的。我们运用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)方法, 电子显微镜(EM)技术和酶联免疫吸附试验(ELISA), 对1982年10月至1985年12月期间采自我国云南省昭通市婴幼儿急性肠胃炎住院患儿的大便中的A组RV和腺病毒(Adv)进行研究。本文报道研究结果。

* 河南省卫生防疫站、中国河南病腹泻研究中心

** 广州市卫生防疫站、△云南省昭通地区人民医院
本文于1988年4月12日收到。

材料与方 法

一、临床标本的采集和处理 位于昭通市的昭通地区人民医院小儿科住院部中诊断为急性胃肠炎中婴幼儿, 其大便标本在住院 1~3 天内进行收集。大便多为淡黄、浅绿色的米汤样或蛋花样稀水便。自 1982 年 10 月至 1985 年 12 月, 共收集 309 例, 其中除 2 例为 2 岁 6 月龄和 3 岁 2 月龄外, 其余都在 2 岁及以下年龄。最小年龄为 32 天。

采集的大便标本, 置 4°C 存放, 并迅速送至实验室。立即将标本用 MEM 维持液 (含青霉素 2000 μ /ml, 链霉素 2000 μ g/ml, 10mol/L Ca⁺⁺, pH7.4) 稀释为 20% 悬液。经 3,000r/ml 离心 30 分钟后, 取上清液于 -20°C 保存待检。

二、大便中 RV RNA 和 Adv DNA 的提取和 PAGE 检测 取 0.4ml 20% 大便液, 加入 0.25ml 1% SDS 0.5% 醋酸钠混合液和 0.25ml 苯酚-氯仿 (3:2v/v) 液, 室温振荡 2 分钟 15,000r/m 离心 5 分钟, 吸上部水相即为 RV RNA 和 Adv DNA 样品。

聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 3% 浓缩胶和 10% 分离胶。电泳在不含 SDS 的 Laemmli 不连续缓冲液中进行, 电流为 40mA, 在室温下电泳 3~4 小时。电泳完毕后, 凝胶用 0.19% AgNO₃ 染色。详细过程见前文^[617]。

三、EM 检测 大便上清直接滴铜网, 2% PTA (pH6.8) 染色, 上电镜观察 RV 和 Adv。

四、ELISA 检测 大便上清液用检测 A 组 RV 抗原的 ELISA 试剂盒 (WHO RV 研究合作中心英国东伯明翰医院 Flewett 博士提供) 进行 RV 检测。操作按说明书进行。

结 果

一、大便中 RV 和 Adv 的 EM 检测

运用 EM 技术, 在婴幼儿胃肠炎患者大便中找到 RV 和 Adv 两种病毒。在 EM 下, 完整的 RV 为 ϕ 65~75nm 的 20 面体球形颗粒, 其中心为蜂窝状基因 RNA 核心, 外面环绕两层排列成车轮辐条状的蛋白子粒, 整个病毒颗粒形似车轮。Adv 在 EM 下为 ϕ 70



图1 大便中轮状病毒在电镜下的形态
Fig. 1 Electromicrogram of rotavirus
in fecal specimen

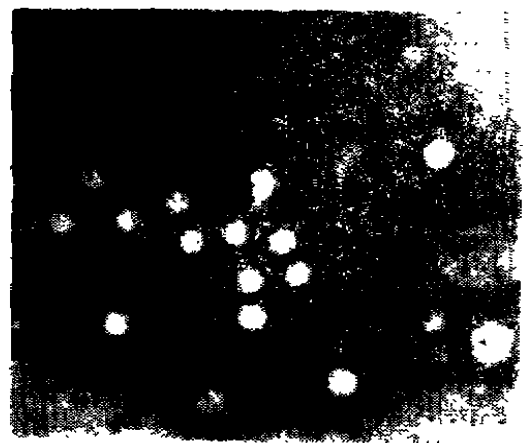


图2 大便中腺病毒在电镜下的形态
Fig. 2 Electromicrogram of adenovirus
in fecal specimen

~80 nm, 外观呈六边形的20面体颗粒, 表面有清晰的蛋白子粒排列^[7]。RV 和 Adv 在 EM 下的形态见图 1 和图 2。

二、RV 和 Adv 在婴儿胃肠炎中的检出率

在所采集的 309 例大便标本中, 经过 PAGE、EM 和 ELISA 研究, 检测出 169 例含有 RV, 阳性率为 54.7%。我们用 EM 法并经 PAGE 证实, 从 1982 年 10 月收集的 12 例大便标本中发现有 2 例含有 Adv (16.7%)。研究中没有发现 RV 和 Adv 混合感染或死亡的病例。

三、RV 在不同性别和年龄中的流行病学

1. 在男性患者中 RV 的检出率为 57.6% (102/177), 在女性患者中为 49.5% (48/97), 在两性间 RV 的检出率没有显著差异 ($P > 0.05$)。RV 胃肠炎患者以男性居多 (68%, 102/150)。

2. RV 在不同年龄患儿中的检出率: 根据年龄差异, 可将患儿分为两个年龄组: 甲组为 ≤ 6 个月龄患儿, 轮状病毒检出率为 33.3% (14/42); 乙组为 > 6 月龄患儿, RV 检出率为 59.1% (143/242)。乙组中 RV 的检出率显著高于甲组 ($P < 0.01$), 且 RV 胃肠炎患者也是乙组居多 (91%, 143/157)。

四、RV 在不同季节中的流行病学

RV 胃肠炎在全年中, 除了 6 月, 7 月和 9 月未检测到外, 其余各月中都有 RV 检出, 见表和图 3。

表 婴幼儿急性胃肠炎中的轮状病毒在各月份中的检出率

Table. Positive rate of rotavirus detected from stools of infants with acute gastroenteritis in different months of year

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Positive rate of rotavirus	74.2	20.0	54.5	20.0	16.4	0	0	33.3	0	66.7	71.9	60.1
	23/31	1/5	6/11	2/10	2/13	0/11	0/7	1/3	0/3	18/24	23/32	89/148

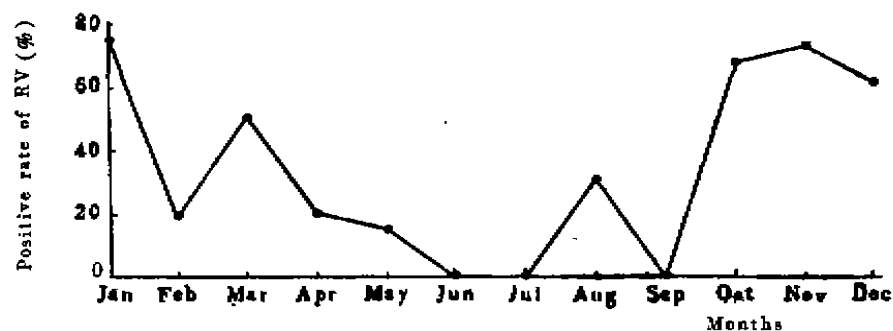


图 3 一年不同月份中轮状病毒胃肠炎的发病率

Fig. 3 Positive rate of infantile rotavirus gastroenteritis in different months of year

根据 RV 在各月份中的检出率, 可以将 RV 在全年的流行分为三个流行季节; A 流行季节, 包括当年的 10 月至次年的 1 月共 4 个月, 为 RV 流行的高峰季节, 这个季节中胃肠炎患者最多, RV 检出率(65.1%, 153/235)显著高于其它流行季节($P < 0.001$); B 流行季节, 包括每年的 2 月至 5 月, 该季节中 RV 的检出率(28.2%, 11/39)显著低于 A 流行季节而显著高于 C 流行季节; C 流行季节为 6 月至 9 月, 这一季节中只在 8 月中检出 1 例 RV, 其检出率(4.2%, 1/24)显著低于 A 流行季节($P < 0.001$)和 B 流行季节($P < 0.05$)。

五、RV RNA 和 Adv DNA 的分子流行病学研究

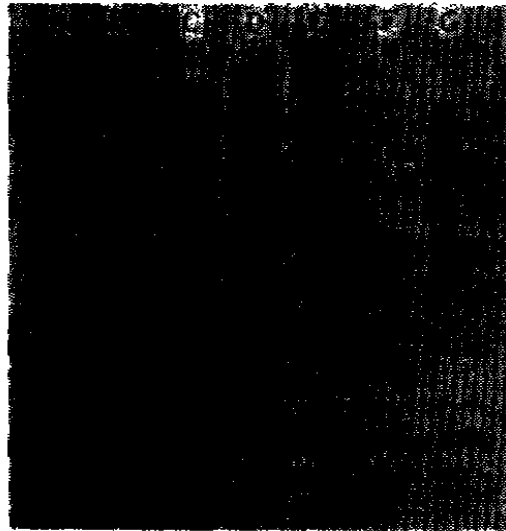


图 4 轮状病毒 RNA 和腺病毒 DNA 的 PAGE 分析

- A. 胃肠炎患儿大便中的腺病毒 DNA
- B. 人腺病毒(Ad5) DNA 标准对照
- C. 胃肠炎患儿大便中的轮状病毒 RNA
- D. 婴幼儿轮状病毒(C190株) RNA 株对照
- E. 牛轮状病毒(UK株) RNA 标准对照
- F. 成人腹泻轮状病毒(ADRV) [8] RNA 对照
- G. 新生儿腹泻轮状病毒(KMB/R85株) [9] RNA 对照

Fig. 4 Analysis of rotavirus RNA and adenovirus DNA by PAGE

- A. Adenovirus DNA extracted from fecal specimen of infant with gastroenteritis
- B. Reference human adenovirus(Ad5) DNA
- C. Rotavirus RNA extracted from fecal specimen of infant with gastroenteritis
- D. Reference infantile rotavirus(C190 strain) RNA
- E. Reference bovine rotavirus(UK strain) RNA
- F. Reference adult diarrhea rotavirus(ADRV) [8] RNA
- G. Reference neonatal diarrhea rotavirus(KMB/R85 Strain) [9] RNA

对RV RNA的PAGE研究发现,昭通市1984年2月至1985年12月流行的RV全部为第Ⅱ亚组即长型(“L”型)RV株。昭通市流行的RV RNA的PAGE图型见图4(柱3)。

Adv DNA在PAGE图型中为一条分子量较高的核酸带,位于第一条RV RNA带的上方^(8,7),见图4(柱1)。

讨 论

急性胃肠炎是全人类共同的疾病。根据世界卫生组织的统计数字,急性传染急性胃肠炎发病率在发达国家如美国,每年有四百五十万人次,其中150人死亡,而在发展中国家,每年有约三十亿人次,其中五百至七百万人死亡(大多数是5岁以下儿童)⁽¹⁾。RV是这一疾病的主要病原,在发达国家和发展中国家都有很高的检出率,在前者约34%,后者约35%,并且是引起发展中国家急性胃肠炎患儿死亡的主要原因,5岁以下儿童RV胃肠炎死亡者占有所有腹泻中死亡率的20%⁽²⁾。目前,尚缺乏有关RV感染的系统的流行病学资料。研究RV致病的最危险年龄,将有助于将来在使用疫苗时选择最佳年龄。探索引起疾病的主要流行毒株或血清型,对研制RV疫苗具有战略意义。研究腹泻病的综合病因也是WHO控制腹泻的重要课题之一⁽¹⁰⁾。

本研究中的RV检出率为54.7%,比发展中国家的平均水平要高。RV在两性别中的检出率没有显著差异,可能说明RV感染在不同性别中的机会是相等的。RV胃肠炎发病率在6月龄以下较低(33.3%),而在6月至24月龄较高(59.1%),这与世界各地的结果是一致的⁽³⁾。6月至24月龄,是RV感染的高敏年龄。

在昭通市,RV轮状胃肠炎主要发生在冬季,10月至1月是流行的高峰季节,其发病率很高(60.1%~74.2%)。在春季,RV胃肠炎的发病也是很高的,即使在夏季,也有散在流行。

对RV RNA的分子流行病学研究表明,昭通在这段时间内流行的RV胃肠炎全为第Ⅱ亚组引起。这是一个流行特点。第Ⅱ亚组人RV包括血清型1、3和4,各血清型在昭通市胃肠炎中的意义有待进一步研究。

Adv也是我们在研究病毒性胃肠炎中常碰到的病毒,但由于我们目前没有进行血清分型,不能鉴定出检测到的Adv是肠道腺病毒(EAd),还是非肠道腺病毒(NEAd)⁽⁶⁾,它们在婴幼儿胃肠炎中的作用仍需进一步研究。

我们曾经报导从昭通地区医院妇产科病房中的新生儿急性胃肠炎患儿大便中检测到一种新RV,这种新RV在外形上与A组RV没有区别,但在基因组RNA和抗原性上,与A组RV截然不同⁽⁹⁾,而与近来国内报导的引起成人胃肠炎的RV(ADRV)相似^(3,9,10),这是目前为止全世界唯一的一次由新RV引起新生儿急性胃肠炎的报道。昭通市RV胃肠炎流行的这些特点,应引起卫生防疫部门的重视。

参 考 文 献

- [1] Bukrinskaya, A.G., 1986, *Soviet Prog in Virol* 6: 1-10
 [2] Dozovsa, I. et al., 1985, *Bull WHO* 83(3): 569
 [3] 孙茂盛, 1987, *医学生物学研究*(3~4): 65~70
 [4] Nakata, S. et al., 1987, *J Clin Microbiol* 25(5): 812-818
 [5] 陈元鼎, 1987, *腹泻病专辑* pp109-113
 [6] 陈元鼎等, 1987, *医学生物学研究*(3-4): 60-65
 [7] 陈元鼎等, 1987, *中国人兽共患病杂志* 3(3): 2-4
 [8] 戴国珍等, 1984, *云南医药* 54: 370-372
 [9] Dai, G.Z. et al., 1987, *J Med Virol* 22: 366-373
 [10] Edelman, O. et al., 1987, *Pediatr Infect Dis J* 8: 704-710
 [11] 洪涛等, 1987, *腹泻病专辑* PP105-109

Study on Rotavirus Involving in Acute Infantile Gastroenteritis in Zhaotong City, Yunnan Province

Chen Yuan-ding Zhang Hui-fen* Sun Mao-sheng Ding Xue-feng
 Dai Guo-zhen** Wan Xing-bang* Wang Li-chun Li Jia-xi
 Su Ye, Guo Ren Chen Xiao-xian*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical
 Sciences, Kunming)

This paper presents the research results of rotavirus (RV) in group A and adenovirus (ADV) in fecal specimens collected from infants with acute gastroenteritis in Zhaotong, Yunnan from October 1982 to December 1985.

By means of PAGE, EM and ELISA, 309 fecal specimens of 169 cases were detected with rotavirus, the positive rate was 54.7%. There is no significant difference in positive rate of rotavirus between two sexes. Positive rate in >6-24 month age group (59.1%) is much higher than that of ≤6 month (33.3%) ($P < 0.01$). The peak period of the epidemic was from October to January, and in these months, positive rate (65.1%) is much higher than other months ($P < 0.001$). By epidemiological analysis of rotavirus genome RNA, we find that rotavirus prevailed in Zhaotong during February 1984 to December 1985 was all belonging to a subgroup. Positive rate of adenovirus in acute infantile gastroenteritis was 16.7%. The results indicate that rotavirus is the main causative agent of the disease and evidently its epidemic is seasonal.

Key words: Acute infantile gastroenteritis, Rotavirus

* Anti-epidemic Station of Henan Province, Research Center of Diarrheic Diseases of Henan, China

** Anti-epidemic Station of Guangzhou

* Zhaotong Prefectural Hospital, Yunnan Province