

## 小圆形病毒样因子引起新生儿 急性胃肠炎的研究

李晓眠 任中原 瞿自强 周虹

(天津医学院微生物学教研室, 天津)

### 提 要

33例新生儿急性胃肠炎的粪便标本经EM检测, 12份(36.4%)粪便标本中检出了病毒样颗粒, 其中11份(33.3%)为SRV样因子(SRV), 1份为其他病毒样颗粒。经粪便包埋超薄切片和IEM证实SRV是引起新生儿急性胃肠炎的病原。SRV的直径为26nm, 表面结构清晰。在氯化铯( $\text{CsCl}$ )中的浮密度为 $1.36-1.40\text{g}/\text{cm}^3$ 。应用微量CF试验, 5例双份血清中的1例抗体有三倍升高, 3例恢复期血清抗补体, 1例为阴性, 该病人为其他病毒样颗粒感染。核酸电泳未显带。培养未见细胞病变。5例正常对照新生儿粪便未检出任何病毒样颗粒。

**关键词:** 小圆形病毒样因子; 急性胃肠炎; 超薄切片; 免疫电镜

1983年1~5月份我市中心妇产科医院婴儿室爆发流行新生儿急性胃肠炎, 发病率达30%以上。为了解腹泻的病因, 我们对采集的33份腹泻患儿的粪便标本和部分血清标本, 5份正常对照粪便标本作了电镜(EM)和部分细菌学检查<sup>[1]</sup>, 1987年再次对所有标本作了EM检测, 并对已发现的小圆形病毒样因子(SRV)作了进一步研究, 现将研究结果报告如下。

### 材料与方 法

(一)患者 病人为足月分娩或剖腹产的新生儿。分娩后均在婴儿室停留三天以上, 常在第四天发病, 其症状为腹泻, 每天超过6次以上, 水样稀便, 呈黄色或绿色, 部分患者发烧, 偶见呕吐, 中度至重度脱水。

(二)粪便标本 取自33例患急性胃肠炎和5例正常新生儿的粪便。所有标本均以20% (V/V) PBS稀释, 同时加入青、链霉素(作细菌学检查的标本不加), 置4℃冰箱过夜, 次日经 $3,000\text{r}/\text{m}$ 离心30分钟, 吸取上清液置-20或-80℃保存。

(三)血 在采集粪便标本的同时, 从部分新生儿足跟取血, 作为急性期标本, 经 $2500\text{r}/\text{m}$ 离心20分钟分离出血清, 56℃水浴30分钟灭活, 后置4℃冰箱保存。病后40天产妇检查时采集恢复期血, 处理同上。

#### (四)电镜检查

1. 直接电镜。应用上述提取液直接滴膜, 2%PTA (pH6.3)负染, JEM-7和JEM-100cx电

本文于1988年12月1日收到。

本研究得到中国预防医学科学院病毒学研究所洪涛教授, 天津医学院电镜测试中心于学宽以及微生物学教研室王海仙的协助, 特此致谢。部分工作得到天津市科委的资助。

镜检查, 每份标本检查一个铜网, 每个铜网检查30个视野。

2. 免疫电镜(IEM), 应用Kapikian等方法. 将患者的急性期和恢复期血清以1:5, 1:20, 1:40和豚鼠抗SRV免疫血清以1:40, 1:80, 1:160稀释加等量粪便提取液, 混匀后置37℃水浴1小时, 4℃过夜, 滴膜, 负染, 观察<sup>[1]</sup>。

3. 粪便超薄切片检查。取少量粪便用5%戊二醛固定, PBS浸洗, 1%锇酸固定, 按常规方法脱水、包埋, 超切, 后用醋酸铀和柠檬酸铅染色以及2%PTA染色。

(五) 补体结合试验(CF) 抗原制备及滴定按常规方法进行, 实验用抗原为1:5稀释。

(六) SRV在氯化铯中浮密度的确定 取2ml粪便提取液, 经8,000r/m离心1小时, 吸取上清液, 经Hitachi 85P-72, RP-55T, 39,000r/m离心2小时, 弃上清, 保留沉淀物, 后加0.5ml蒸馏水, 反复吹打, 混匀。将此病毒液铺在4.5ml不连续CsCl液上(1.1~1.5g/cm<sup>3</sup>), 其余用石蜡油补足至10ml, 应用RPS-40T转头, 37,000r/m离心18小时。吸去石蜡油, 按16个组分收集, 每一组分为0.3ml。应用Abbe氏折射仪测定每一组分的密度。后再用每一组分的液体滴膜, 负染, 电镜检查。在条件一致的前提下每一铜网按5个点随机观察30视野, 计算SRV颗粒数。

(七) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 参照Herring等和王英才等方法<sup>[12,13]</sup>提取核酸和电泳。采用北京东方仪器厂生产的JDF型垂直板电泳槽作不连续电泳。浓缩胶浓度为3%, 分离胶浓度为6%, 电压500V, 电泳6小时。

(八) 5T.V的培养 取EM检测为SRV阳性的粪便提取液, 加入青霉素500u/ml和链霉素500μg/ml, 置4℃冰箱过夜, 次日以3,000r/m离心30分钟, 取上清液接种人胚肾细胞管, 每份标本接种3管, 37℃吸附1小时, 加入2%小牛血清和水解乳蛋白, 37℃培养, 每天观察细胞有无病变, 共10天。

(九) 细菌学检查 所有粪便标本在患儿住院期间均作了肠道致病菌的检查。部分标本在电镜前又重新作了检查。

## 结 果

一、直接电镜检查结果见表一和图1。表一显示33份标本中有12份检出了病毒样颗粒

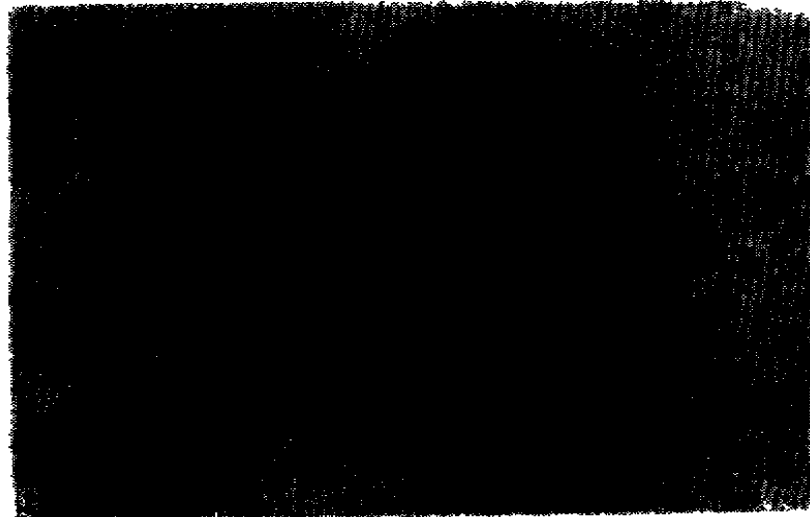


图1 粪便提取液中的SRV(×198,000)

Fig 1. Micrograph of SRV in faecal extraction (×198,000)

粒, 阳性率为36.4%, 其中11份为SRV, 占标本总数的33.3%; 1份为其他病毒样颗粒, 占总标本数的3%。同一标本未同时检出两种病毒样颗粒。SRV因子的直径为26 nm, 表面结构清晰、规则、绝大多数为完整病毒样颗粒, 仅个别为空心颗粒。

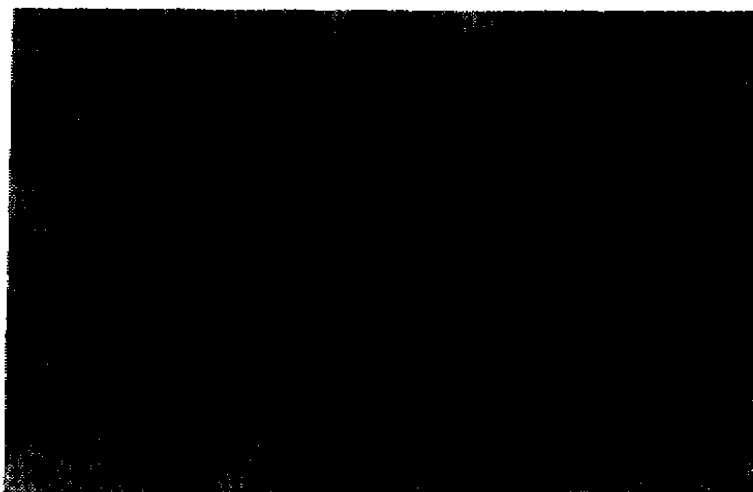
表一 12例患儿的临床症状, 电镜及血清学试验结果

Table 1 Clinical, electron microscopic and serologic data of twelve patients associated with SRV.

病例号 No. of cases	性别 Sex	年龄 (天) Age (day)	临 床 症 状			E.M		CF
			腹 泻 Diarrhea	呕 吐 Vomitting	发 热 Fever			
						DEM	IEM	
1	M	4	+	-	+	+	nd*	-
2	M	6	+	-	-	+	nd	nd
7	M	8	+	-	-	+	nd	nd
9	F	5	+	-	+	+	nd	nd
14	F	6	+	-	-	+	nd	3
18	M	7	+	-	+	+	nd	nd
23	M	26	+	-	-	+	nd**	Anti-C
24	M	7	+	-	-	+	nd	Anti-C
25	F	4	+	-	-	+	2+	nd
26	M	6	+	-	-	+	2+	nd
28	F	7	+	-	-	+	nd	nd
31	M	7	+	-	-	+	2+	Anti-C

\* nd, 未做

\*\* 2+: 有抗体升高

图2 未经超速离心的IEM图象( $\times 90,000$ )Fig 2. Micrograph of IEM of SRV in faecal extraction( $\times 90,000$ )

**IEM检测** 按Kapikan等的方法进行,分为0—4<sup>+</sup>级,双份血清如抗体复盖率出现1<sup>+</sup>的改变认为有意义。26号病例恢复期血清的检查结果,示图2。

上图所示,患者恢复期血清有抗体,并有一定的临床意义。

粪便包埋超薄切片结果示图3,4。在脱落变性细胞中可见病毒样颗粒存在,其病毒颗粒的大小,形态与粪便提取液中的病毒样颗粒一致。变性细胞的吞噬溶酶体中有病毒样颗粒存在,其中有的病毒样颗粒已被降解。

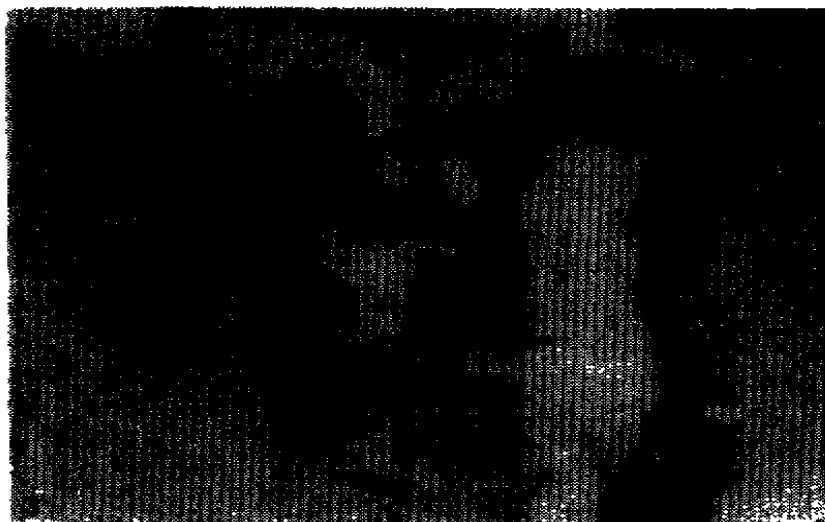


图3 粪便脱落变性细胞中的SRV( $\times 30000$ )  
Fig 3. SRV in desquamated cell of faeces( $\times 30,000$ )

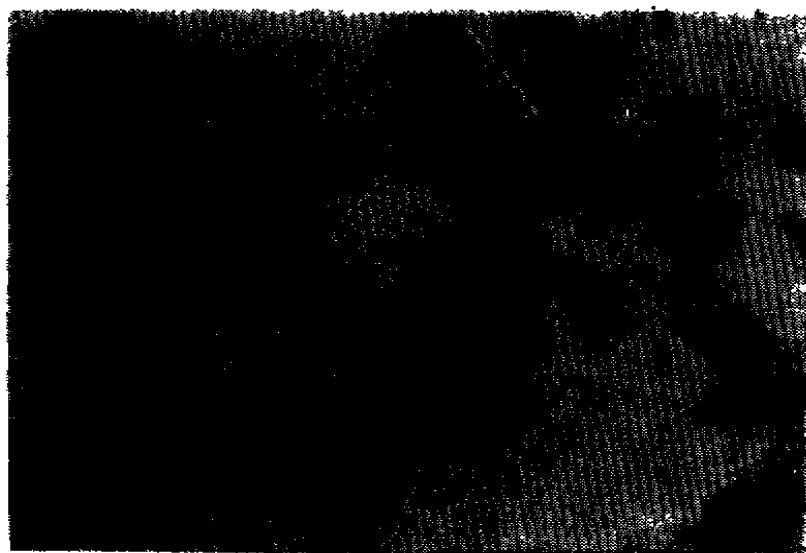


图4 脱落细胞吞噬溶酶体中的SRV( $\times 75,000$ )  
Fig 4 SRV in phagolysosome of desquamated cell( $\times 75,000$ )

二、SRV的密度。SRV在CsCl密度梯度离心每一组分中所见到的SRV颗粒的百分率

示图 5。图 5 显示有 89.8% 的 SRV 颗粒在 13—11 组分中 (为图中的 4—5 组分), 因此可以确认该病毒的密度为 1.36—1.40g/cm<sup>3</sup>。

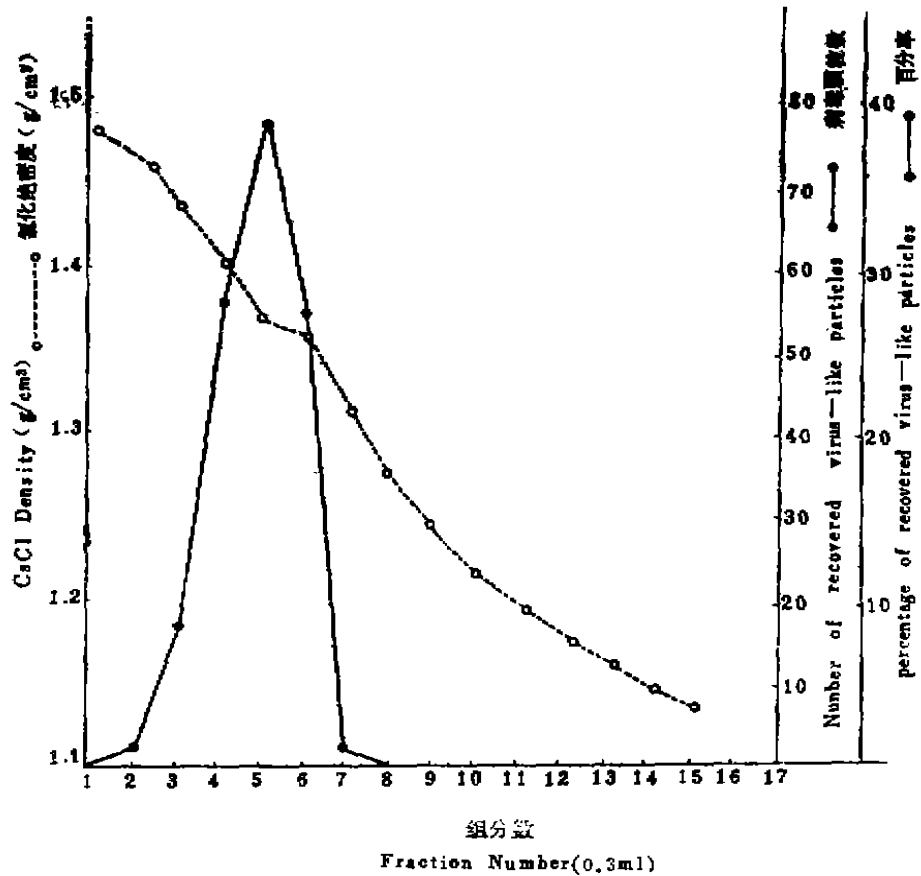


图 5 RSV 颗粒在氯化铯密度梯度中的等电带分布

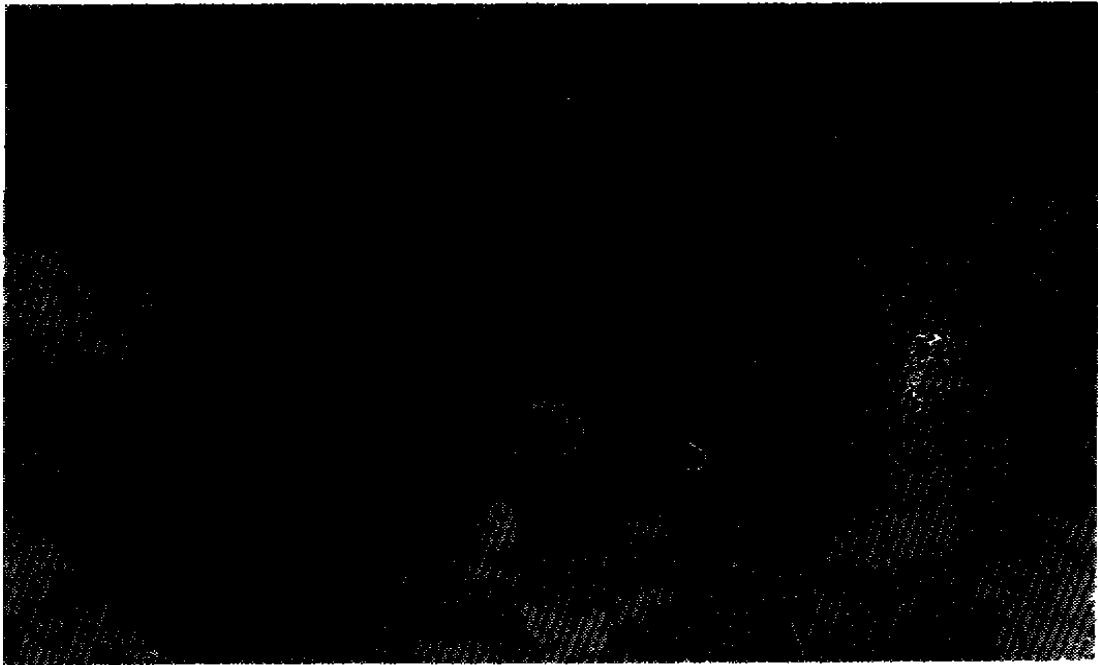
Fig 5 Isopycnic binding of SRV particles in CaCl<sub>2</sub> density gradient

三、5 例双份血清微量 CF 结果。1 例抗体有 3 倍升高, 3 例恢复期血清抗补体, 电镜均检出了 SRV 颗粒; 1 例为阴性 (1 号病例), 电镜下为其他病毒样颗粒 (示图 6), 颗粒直径约 25nm。

四、PAGE 未显示核酸带, 培养未见细胞病变。

5 月份采集的 3 份粪便标本, 经细菌学检查, 其中 1 份检出致病性大肠杆菌 O<sub>116</sub>B<sub>14</sub>, 电镜下未检出病毒样颗粒, 其他两份标本中 1 份为 SRV 颗粒, 另 1 份为阴性。

5 例正常新生儿的粪便标本, 电镜检查均未见病毒样颗粒。

图6 粪便提取液中的其他病毒样颗粒 ( $\times 100,000$ )Fig 6 Other virus-like particles in faecal extraction ( $\times 100,000$ )

## 讨 论

我们通过多种检测方法,特别是粪便包埋超薄切片和IEM,证实SRV是引起这次新生儿急性胃肠炎的主要病原。此病原在国内尚未见报道。小圆形病毒样颗粒的直径为26nm,CsCl中的浮密度为1.36—1.40g/cm<sup>3</sup>[2,9,10]。Ripenhoff等报道,SRV主要引起小于5个月的婴儿感染,我们的研究也证实这点<sup>[14]</sup>。本次流行的患儿多为剖腹产,他们在婴儿室停留的时间较长,一般多在出生3天后发病。这些患者的母亲在分娩后住院期间有1例腹泻,另1例在分娩前曾患腹泻,多数无腹泻症状。我们推测,这次爆发流行的新生儿急性胃肠炎有可能是医院内感染,病毒可能来自产妇,通过尿布,奶瓶等传播。国外有的作者认为,SRV引起的腹泻较轮状病毒引起的轻。但我们发现,多数患儿都出现中度和重度脱水,个别患儿发病1天后,体重减轻500g。因此,对SRV引起的腹泻应予以高度重视。有的学者也进行了分类研究<sup>[1-5,7]</sup>。我们虽然已对SRV的大小、浮密度,培养、核酸电泳作了研究,但对其化学性质仍不十分清楚,加上培养困难,又无已知的SRVS免疫血清,目前尚难以归类,暂称为SRV样因子,其有关特性尚需进一步研究。

1号病例检出的病毒样颗粒,根据其形态和CF结果,它不同于SRV样因子,而且在本次流行中出现的次数少,可以认为它不是这次急性胃肠炎的重要病原。

## 参 考 文 献

- [1] Dolin R et al., 1987, *J Infect Dis* 155: 365
- [2] Kogasaka R et al., 1980, *J Med Virol* 5: 161
- [3] Oliver AR et al., 1988, *J Med Virol* 24: 211
- [4] Sawyer LA et al., 1988, *Amer J Epidem* 127: 1261
- [5] Caul EO et al., 1982, *J Med Virol* 9: 257
- [6] Madely CR., 1979, *J Clin Pathol* 32: 1
- [7] Cukor G et al., 1984, *Microbiol Rev* 84: 157
- [8] Kapikian AZ et al., 1976, *Man Clin Immunol* 467
- [9] Jeffries CB et al., 1983, *J Clin Microbiol* 18: 71
- [10] Ashley CR et al., 1979, *J Clin Pathol* 31: 1
- [11] 李晓眠等, 1984, *天津医药* 12: 593
- [12] Herring J et al., 1982, *J Clin Microbiol* 16: 473
- [13] 王英才等, 1986, *病毒学报* 2: 215
- [14] Ripenhoff-Tolty M et al., 1983, *J Clin Microbiol* 17: 352

## Studies on the Small Round Virus-like Agent of Causing Neonatal Acute Gastroenteritis

Li Xiao-mian Ren Zheng-yan Zi Zi-qiang Zhou Hong

(Department of Microbiology, Tianjin Medical College, Tianjin)

Out of 33 neonates with acute gastroenteritis, 12 (36.4%) were detected to have virus-like particles by electron microscopy once again. The small round virus-like agent (SRV) was found in 11 (33.3%) samples. In one sample other virus-like particle was found. The SRV was confirmed to cause this neonatal acute gastroenteritis by ultrathin section and immune electron microscopy (IEM). The SRV was measured 26 nm in diameter and showed fine spiky structure on the surface. The buoyant density of SRV was determined to be 1.36—1.40 g/cm<sup>3</sup> in CsCl density gradient. Using microtechnique of complement-fixation test, one out of the 4 pair sera rises three-fold in antibody titer. Three convalescent sera were found to have anti-complement. One pair serum was negative. The patient was infected by other virus-like particle. No PAGE showed band of nucleic acid. The development of cytopathic effect was not observed in all inoculated human embryonic cell tubes. Five faeces from normal neonates as control were not found any virus-like particles by EM. We suggest that it be a new virus of causing neonatal gastroenteritis.

**Key words:** Small Round Virus-like Agent (SRV), Acute Gastroenteritis, Ultrathin Section, Immune Electron Microscope (IEM)