

BALB/C 等乳鼠流行性腹泻(EDIM)的初步研究^{**}

吴小闲 魏 强 宋怀燕 施慧君 秦 川

洪瑞珍 苏树芸 张新生* 卢耀增

(中国医学科学院医学试验动物研究所 北京 100730)

提 要

本文研究了1986—1989年间BALB/C小鼠发生的两次散发流行和一次有BALB/C及NIH鼠群暴发流行的EDIM (Epizootic diarrhea of infant mice)。经过电镜、PAGE、实验感染、“ABC”组化抗原定位等证实病原为MRV,而且病毒大小、RNA电泳型与国外报道的MRV有差异。观察了本繁育场内7个品系小鼠,均查出有MRV抗体,但发病只见于BALB/C和NIH鼠群。不同鼠龄和胎次发病率亦有差异。还观察了病变组织的病理组织学,扫描电镜和超微结构的改变。

关键词: 乳鼠流行性腹泻 小鼠轮状病毒

EDIM是开放饲养小鼠群常见的一种急性传染病,以1—2周龄小鼠发生急性腹泻为主要症状。本病特点为传染性强,患病率高、病死率相对低,但病鼠发育缓慢,而且病毒一旦侵入鼠群,难以自行消除,尚无有效的防治措施。

EDIM早在1947年第一次被Chesvere等发现和研究^[1],但直至1963年Adams和Kraft^[2]用电子显微镜观察才证实其病原为病毒,并称为EDIM病毒。经过进一步研究了解,EDIM病毒其形态学和血清学上与轮状病毒A组中引起小牛、猴、马、猪、羊、兔等腹泻的轮状病毒相似,存在共同抗原,有交互血清学反应,因而又名小鼠轮状病毒(Mice rotavirus MRV)^[3]。MRV与近年来发现的副轮状病毒(pararotavirus B-E组)无血清学相关^[4]。

本所实验动物繁育场1986年春发现BALB/C和NIH鼠群的乳鼠先后出现散发的急性腹泻病例后,1987—1989年又相继发生散发和暴发流行病例。我们除了证实EDIM病原为MRV外,并进行了本病的临床、流行病学、病原诊断、病理形态学研究。

本文于1990年2月6日收到,9月1日修回

* 成都军区军事医学研究所

** 参加本工作的还有本所病毒组和病理组全体同志

材 料 和 方 法

一、临床及流行病学的资料收集： 观察并记录分析鼠群乳鼠的健康及发病情况，临床症状及大体解剖。

二、血清流行病学观察遗传型与发病的关系： 以猴轮状病毒(SA₁₁)为抗原，用ELISA和玻片免疫酶(IEA)法检查各鼠群和病鼠亲鼠的MRV抗体。观察小鼠遗传型与轮状病毒感染发病的关系。

三、病原学诊断：

1. 取各时期急性腹泻乳鼠的肠及内容物作负染，电镜观察病毒形态学。
2. 同上标本作聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析RNA基因组。
3. 选择以上典型阳性标本实验感染小鼠复制同类疾病模型。选用BALB/C、C₅₇BL和KM小鼠，其中BALB/C和C₅₇BL为SPF动物，KM为普通动物，实验小鼠经检查无轮状病毒抗体。观察病原、病理学改变、“ABC”抗原定位和不同鼠系的敏感性。
4. 排除乳鼠腹泻的主要病原如小鼠肝炎病毒(MHV)，用DBT细胞分离肠及内容物MHV和负染电镜观察病毒颗粒。

四、病理形态学改变的观察及MRV抗原定位：

1. 光镜病理形态改变观察：自发病乳鼠和实验感染乳鼠各脏器病理组织切片，HE染色和“ABC”抗原定位。
2. 电镜病理形态改变的观察：扫描电镜观察小肠绒毛的形态学改变，超薄切片透射电镜观察小肠的超微病理改变。

结 果 和 讨 论

一、临床及流行病学观察：

1. 临床及大体解剖观察：1986年春，开放饲养的BALB鼠群10—14天龄乳鼠中散发急性腹泻病例，患鼠活动减少，毛稀疏污秽，尾根部粘有成块粪便，甚至粪便干燥阻塞肛门，引起肛周红肿。仔细观察，发病始于5—8天龄，肛周附有淡黄色稀便。同窝小鼠发病不一。病程约一周。患鼠病后生长缓慢，体重小于同龄正常小鼠。大体解剖见胃扩张，充盈奶块，肠胀气，含黄色稀便(图版Ⅲ2)。同期其他车间的其他品系小鼠未发现类似疾病。发病过程持续数周。在此期间加强饲养管理，病鼠及时处理，疫情平息。

1987年12月初，BALB/C鼠群又发生乳鼠急性腹泻，在两周内迅速蔓延到整个鼠群，乳鼠发病率达到85.57%，病死率21.76%。不久在NIH小鼠群亦发生乳鼠腹泻，发病率31.74%，病死率42.75%。历时一个多月，流行结束。临床表现和大体解剖与1986年所见类同。

1989年初，BALB/C鼠群乳鼠又发生散发腹泻病例，特点与上述相似。

2. 流行病学观察

(1) 流行季节：无论是暴发流行或散发流行均发生于冬春季。

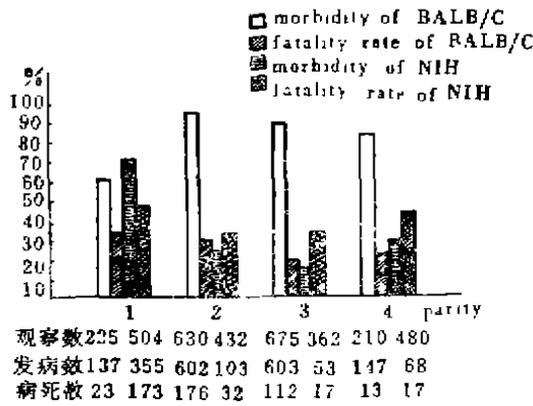


图1. 不同胎次的 BALB/C 及 NIH 小鼠发病情况
Fig. 1. EDIM morbidity and fatality of parity in BALB/c and NIH

(2) 鼠龄及胎次与发病的关系: 不同鼠龄 EDIM 发病率有很大差异, 5—12日龄发病率最高, 5日龄以下或12日龄以上均较少发病, 成年鼠未见发病。不同胎次乳鼠发病率亦有差异, 如 BALB/C 小鼠第 2、3 胎发病率明显高于 1、4 胎, 病死率则以第 2 胎为高。而 NIH 小鼠第 1 胎发病率及病死率均明显高于其它各胎次。(图版 III 1), 其原因尚有待进一步探讨。

(3) 疾病传播因素: EDIM 是传染性很强的疾病, 且有严格的季节性。病鼠排毒量大 (10^6-10^8), 排毒长达

11—13天。血清流行病学和实验感染资料表明各个品系小鼠均能感染。曾检查 5 只病鼠亲鼠有 4 只排毒, 流行鼠群在非流行期间可能呈隐性或轻症感染, 因此, MRV 能持续存在于鼠群中, 通过接触、机械性和空气等传播。但引起发病和流行还有其它的因素, 季节性是其中之一。病毒的毒力与病毒的形态学密切相关, 从非敏感个体 (如 BALB/C 成年鼠) 和非暴发流行期的病鼠所见到的病毒颗粒以粗糙型为主, 可能 MRV 在非敏感鼠群中亦以粗糙型病毒颗粒存在。因此, 个体的敏感性影响病毒的毒力, 进而影响发病, 形成了连锁关系。目前关于该病的流行因素, 除季节性已知外, 其他因素尚待研究。

二、遗传型与发病的关系: 1986—1989年三次流行中都见于 BALB/c 鼠群, 其中 1987年亦见于 NIH, 可见 BALB/c 是 MRV 的最敏感鼠群, 其次为 NIH。同期其他鼠群未见发病, 对有无潜在感染进行了血清抗体的检查, 我们在 1986和 1989年 EDIM 流行后平行地用 ELISA 和玻片免疫酶法检查了各品系小鼠的 MRV 抗体。两法的符合率为 75.88%, 结果为两法阳性的总和 (见表 3)。

表 3 表明, 两次检查共 7 个品系小鼠均查出有抗体 (1989年检查时 DBA/2 和 C_H 未

表 3 各鼠群 MRV 抗体检查结果
Table 3. Antibody of MRV in Mouse

Strain	1986		1989	
	No. mouse	No. positive (%)	No. mouse	No. positive (%)
BALB/c	30	1(3.3)	20	3(15.0)
C57Bl/6j	20	7(35.0)	20	1(5.0)
DBA/2	20	4(20.0)	20	0(0.0)
NIH	20	9(45.0)	20	11(55.0)
CH	10	4(40.0)	20	0(0.0)
615	ND		19	3(15.8)
KM	10	4(40.0)	40	8(20.0)
Parents of BALB/c ill mouse	12	8(66.6)	12	2(16.6)

查出抗体),可见各品系对MRV均能感染,但除了BALB/c和NIH外未发现明显的临床症状。从实验感染资料亦表明BALB/c症状最重,KM次之,C₅₇BL亦能感染排毒。发病鼠群BALB/c两次检查抗体阳性率并不高,原因未明。1986年检查12只病鼠亲鼠阳性率高达66.6%,1989年也检查12只,却只有16.6%阳性,这可能与采样时间距乳鼠发病时间长短有关。曾检查6只实验感染乳鼠的亲鼠MRV抗体,乳鼠感染后14天采样,亲鼠100%抗体阳性,也说明BALB/c感染MRV后能产生可检出的抗体。

三、病原学诊断

1. 负染标本电镜观察:表1所示流行期和散发病例的标本电镜检查的阳性率分别为78.57%和29.41%。MRV/北京株(MRV/Beijing)病毒形态学一致,只是流行期标本中以光滑型完整病毒颗粒居多,散发标本以粗糙型为主。病毒为圆形或椭圆形,光滑型者有外膜,直径56nm,粗糙型外膜消失,直径约40nm,较Kraft报道的MRV(75—80nm和65nm)为小⁽³⁾(图版Ⅲ4)。

2. PAGE检查MRV的RNA基因组:表1所示流行期和散发病例的标本PAGE检查阳性率分别为81.81—100%和31.25—58.82%。PAGE显示MRV/Beijing株RNA基因组有11条带,分为4组,带型呈4-2-3-2分布,属轮状病毒A组。带型与猴SA₁₁和人RV有差异(图版Ⅲ3)。MRV/Beijing株的带型与国外报道的EHP、EB和EW等的MRV株的带型有差异,即它们的第10、11条带靠近,而MRV/Beijing株的第10、11条带间距较大⁽⁵⁾。

根据电镜和PAGE的结果,MRV/Beijing株与国外报道的MRV株有差别,是否为一新株,有待进一步研究。电镜和PAGE两种方法均可应用于EDIM的诊断,尤以PAGE敏感性较佳,且条件简便。

表1 EDIM病原MRV检查结果
Table 1. Result of MRV in the etiology of EDIM

Date	The source of sample	Strain of mouse	Method			
			EM		PAGE	
			No. Sample	No. Positive%	No. Sample	No. Positive%
Mar. 1986- April	Sporadic cases	BALB/c	MD		16	5(31.35)
Dec. 1987- Jan. 1988	Prevalent cases	BALB/c	26	21(80.73)	11	9(81.81)
		NIH	8	6(75.00)	5	5(100.00)
		Parents of ill mouse	5	4(80.00)	5	5(100.00)
Fed. 1989	Sporadic cases	BALB/c	17	5(29.41)	17	10(58.82)

3. 实验感染复制出同类疾病模型:1986和1988年用散发病例PAGE阳性标本和流行期标本经电镜检查病毒形态典型,病毒量多的标本分别感染BALB/c、C₅₇BL和KM小鼠(见表2)感染后观察,无论用散发病例标本或流行期标本感染3个品系小鼠均获成功,病毒均在体内复制和排毒。但散发标本感染的BALB/c和C₅₇BL乳鼠,观察4天无临床症状和大体病理改变,这可能与散发病例标本的MRV毒力低(散发标本MRV以粗

糙型为主)和受感染乳鼠为3天龄不是最敏感的鼠龄有关。流行期标本感染5天龄BALB/c和KM乳鼠,感染后均出现临床症状如腹泻、肛门阻塞,生长迟缓,均见有大体病理改变和病理组织学改变,如空泡变和包涵体,以及“ABC”抗原定位阳性。KM乳鼠的各种表现较BALB/c为轻,各种表现和改变相似于自发的EDIM。实验感染结果表明MRV是这次EDIM的病原。

表2 MRV-北京株实验感染小鼠结果

Table 2. Results of Infected Mouse with MRV/Beijing

Date of infection	Source of sample	Method for selecting sample	Mouse strain	Age of mouse (day)	Time of observation (day)
May, 1988	sporadic	PAGE+	BALB/c	3	4
Dec, 1986	sporadic	PAGE+	C57BL	3	4
Dec, 1988	prevalent	EM+	BALB/c	5	1-15
Dec, 1988	prevalent	EM+	KM	5	1-13

Observation after Infection					
Clinical symptom	Macroscopic pathology	Histopathology	Antigen location (ABC)	EM***	PAGE
0/3*	0/3	ND	ND	1/1	3/3
0/3	0/3	ND	ND	ND	4/4
30/30	12/23 (1-6d)**	16/23 (1-6d)	13/23 (1-6d)	25/30 (1-13d)	27/30 (1-14d)
30/30	10/10 (1-5d)	12/18 (1-6d)	10/18 (1-4d)	20/26 (1-11d)	22/26 (1-12d)

Note: * No. positive/No. examination ** (No. of day), positive or pathological change

*** EM negative stain sample

ND, not done

4. 排除其它腹泻的病毒病原: 鼠肝炎病毒(MHV)是鼠病毒性腹泻的另一主要病原,本研究工作中作为检查对象之一。流行期标本12份,取肝和肠内容物分别接种DBT细胞,盲传3代,未分离出MHV。同时全部负染标本电镜检查未发现MHV,可排除MHV病原的可能性。

四、病理形态学改变的观察及MRV抗原定位:

1. 病理改变: 以小肠绒毛上皮细胞大量空泡化特征。空泡主要出现在细胞顶端,圆形或椭圆形,胞核被挤压,空泡内偶见圆形的嗜酸性包涵体。绒毛上端增粗,固有层内淋巴管扩张,粘膜下层轻度水肿(图版Ⅲ5)。散发病例病理改变相似,但较轻,甚至无明显改变,实验感染BALB/c和KM乳鼠,病理改变也相似, BALB/c乳鼠空泡变持续8天,包涵体见于第1—4天, KM小鼠病变较轻,空泡变和包涵体各持续6天和2天,其它脏器未见异常。

2. “ABC”免疫组化MRV抗原定位: 在流行和散发病例的小肠绒毛细胞内见到“ABC”阳性反应,呈棕褐色细颗粒状着色。大肠细胞未见阳性反应。实验感染的BALB/c和KM小鼠感染后24小时少数小肠上皮细胞中出现“ABC”阳性着色反应,随着感染时间增加,阳性细胞增多, BALB/c小鼠第3—5天达高峰,6天后逐渐消失。KM

小鼠3天后下降,4天后逐渐消失。

3. 微观病变

(1) 扫描电镜观察: MRV实验感染后1—4天的BALB/c乳鼠小肠绒毛顶端变粗,表面破损,继而小肠绒毛顶端变圆钝,集结如“盘珠”样,表层部分细胞破损脱落,外观不整,大肠表面粗糙。感染第5天逐渐恢复。绒毛顶端出现的“盘珠”样改变可能就是在光镜和电镜下所見上皮细胞高度空泡变的表象(表7)。

(2) 透射电镜观察: BALB/c乳鼠感染MRV 24小时后,小肠上皮细胞增大,粗面内质网扩张,线粒体数量减少,胞质内出现无数大小不等,形态各一的空泡,有些空泡充填脂类物质和病毒颗粒。在胞质和病毒粒质中可见到散在或成堆的病毒颗粒,有完整的(直径约56nm)和不完整的(40nm)两种颗粒,另外病毒粒质附近可见到直径与RV近似的微管样结构,表明胞质是MRV复制的场所(图版Ⅲ6)。

参 考 文 献

- (1) Cheever ES, et al., 1947, *J Exp Med*, 85: 405—416.
- (2) Adams WR, et al., 1963, *Science*, 141: 359—360.
- (3) Kraft LM, et al., 1982, *The mouse in biomedical research Vol II*: 159—167.
- (4) Snodgrass DR, et al., 1984, *J Gen Virol*, 85: 909—111.
- (5) Herring AT, et al., 1982, *J Clin Microbiol*, 16: 473—474.
- (6) Broderick IR, et al., 1976, *Lab Ani Sci*, 26: 324.

Studies on the Epidemic Diarrhea of BALB/c et. Infant Mice

Wu Xiao-xian et al

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS, Beijing 100730)

During 1986—1987, two times of sporadic diarrhea in BALB/c suckling mice and an outbreak of diarrhea in BALB/c and NIH were studied in our breeding farm. The pathogenic agent was identified to be murine rotavirus (MRV) by means of EM, PAGE, infant mice inoculation and 'ABC' antigen location in small intestine. The size of MRV and the RNA migration in PAGE were different from EHP, EW and EB of MRV. There were 7 strains of mice showing positive antibody against MRV without clinic symptom and sign except BALB/c and NIH suckling mice. The EDIM morbidity of mice is dependent upon the strain, age and parity. The changes of pathology, scanning EM and ultrastructure also observed. The transmission of EDIM was discussed in the paper.

Key words, Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM) Mouse rotavirus (MRV)