

# 深圳市婴幼儿腹泻中肠道腺病毒感染的流行特点调查

何雅青 杨洪 林奕芝 黄福新

**【摘要】** 目的 了解深圳市婴幼儿腹泻患儿肠道腺病毒的感染情况。方法 应用聚合酶链反应技术(PCR)对 195 份婴幼儿腹泻标本进行腺病毒 DNA 检测,并使用 Rsa I 内切酶对扩增产物进行限制性内切酶图谱分析,以鉴别肠道腺病毒型别。结果 婴幼儿腹泻标本腺病毒 DNA 检测的阳性率为 13.33% (26/195)。肠道腺病毒 40 型的感染率为 2.56% (5/195),肠道腺病毒 41 型的感染率为 8.21% (16/195),其他型别腺病毒的感染率为 2.56% (5/195),发热是腺病毒感染的特征性的临床表现。结论 肠道腺病毒 40 型和 41 型是引起深圳市婴幼儿腹泻的重要病原,其中又以肠道腺病毒 41 型感染为主。

**【关键词】** 肠道腺病毒; 感染率; 流行病学

## Studies on epidemic feature of enteric adenoviruses infection in feces of infants with diarrhea in Shenzhen

HE Yaqing\*, YANG Hong, LIN Yizhi, et al. \*Shenzhen Health and Anti-epidemic Station, Guangdong Shenzhen 518020, China

**【Abstract】 Objective** To estimate the enteric adenoviruses infection in feces of infants with diarrhea in Shenzhen. **Methods** All 195 fecal samples of infants were tested by PCR. Amplimers were analysed by Rsa I endonucleases and the type of enteric adenovirus identified. **Results** The positive rate of adenovirus DNA in fecal samples was 13.33% (26/195) while the prevalence rates of enteric adenovirus type 40, adenovirus type 41 and the other type of adenovirus were 2.56% (5/195), 8.21% (16/195) and 2.56% (5/195) respectively. Fever was the characteristic symptom of adenovirus infection. **Conclusion** Enteric adenovirus type 40 and 41 were important pathogens which caused infant diarrhea in Shenzhen, with latter the majority.

**【Key words】** Enteric adenoviruses; Prevalence rate; Epidemiology

婴幼儿腹泻是儿童中的常见病、多发病,据 WHO 报道,5 岁以下儿童腹泻年发病率为 2.2 次,仅次于呼吸道感染。其病原有细菌、病毒、原虫等,以病毒最为严重。肠道腺病毒是除轮状病毒外第二位引起婴幼儿病毒性腹泻的常见病原。迄今人腺病毒共有 51 个血清型,分属 A~F 6 个亚组,腺病毒 40 型(Ad40)和 41 型(Ad41)属于 F 亚组,称为肠道腺病毒。可以用组织培养的生长特性、DNA 限制性内切酶分析定型<sup>[1]</sup>、ELISA 等方法与其他血清型别腺病毒区别开。

本研究将聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction, PCR)及限制性内切酶图谱分析相结合,选择性检测肠道腺病毒。我们对 1997~1999 年婴幼

儿腹泻标本中肠道腺病毒的感染情况运用分子流行病学方法进行调查。

## 材料与方法

### 一、标本收集

于 1997~1999 年每年的 11 月份至次年的 1 月份,收集深圳市某医院因腹泻住院的患儿粪便标本 195 份,保存于 -70℃。

### 二、标准毒株

Ad3 由首都儿科研究所病毒室提供,将 Ad3 在 Hep-2 细胞上培养,当出现典型的细胞病变时,收获病毒。

### 三、DNA 提取

取粪便上清或组织培养上清 40 μl,用 TE 将其稀释成 10%,加入等量的氯仿,离心 5 min(12 000 r/min),取上清加 10% SDS 和蛋白酶 K,37℃ 30

作者单位:518020 深圳市卫生防疫站微生物检验科(何雅青、杨洪、黄福新);深圳市福田区卫生防疫站检验科(林奕芝)

min, 然后用等量酚-氯仿-异戊醇抽提, 再进行乙醇沉淀, 最后将沉淀物溶于 40  $\mu$ l 去离子水, 用于 PCR 检测。

#### 四、引物的设计及 PCR 扩增

用于 PCR 的两对寡核苷酸引物 hexAA1885 和 hexAA1913 与 Ad2、Ad5、Ad40 及 Ad41 六邻体基因高度保守区互补, hexAA1885 的序列为: 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACACTC-3'; hexAA1913 的序列为: 5'-CAGCACGCCGCGGATG TCAAAGT-3'。PCR 反应体积为 50  $\mu$ l, 在 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% Triton, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 mmol/L dNTP, 引物 hexAA1885 和 hexAA1913 各 0.8  $\mu$ mol/L 以及 1.5 U Taq DNA 酶中加入 5  $\mu$ l DNA 提取液。反应在 PE9700 扩增仪上进行, 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 最后一个循环延伸 10 min, 扩增片段为 300 bp。

#### 五、PCR 扩增产物的纯化

使用宝灵曼 High Pure PCR 产物纯化试剂盒, 按说明书进行操作。

#### 六、扩增产物的限制性内切酶分析

用限制性内切酶 Rsa I 消化 PCR 扩增产物, 10  $\mu$ l PCR 扩增产物加 2~5 U 限制性内切酶, 总反应体积 20  $\mu$ l, 置 37  $^{\circ}$ C 水浴中过夜。分子量对照为  $\phi$ X174 DNA/Hae III Markers, 取 10  $\mu$ l 酶切产物, 然后进行 1% 琼脂糖 (含 EB) 电泳, 60 V, 2 h, 置凝胶分析系统观察拍照。

## 结 果

### 一、腺病毒的检测情况

以 Ad3-DNA 作为标准阳性对照, 用 PCR 法扩增 195 份粪便标本的核酸样品, 结果有 26 份样品扩增出一条 300 bp 的清晰条带, 阳性率为 13.33%。1997~1999 年婴幼儿腹泻中腺病毒 DNA 阳性率在 9.09%~18.64% (表 1)。

表1 1997~1999 年深圳市婴幼儿腹泻中肠道腺病毒的检测结果

年份	检测人数	阳性数	阳性率 (%)
1997	55	5	9.09
1998	59	11	18.64
1999	81	10	12.35
合计	195	26	13.33

### 二、腺病毒感染的流行特点

腺病毒感染者中有 19.23% 以上的人出现呕吐、咳嗽、咽炎等临床症状。84.62% 的腺病毒感染者出现发热, 15.38% 的感染者不发热, 经统计学处理, 两者差异有显著性 ( $\chi^2 = 5.9756, P < 0.05$ )。133 例男性患者有 18 例为腺病毒感染, 62 例女性中有 8 例感染腺病毒, 经统计学处理两者差异无显著性 ( $\chi^2 = 0.0145, P > 0.05$ )。发病最小的 3 个月, 0~ 岁组 101 例中 11 例为腺病毒感染, 1~ 岁组 59 例中有 12 例为腺病毒感染, 2~ 岁组 18 例中有 1 例感染腺病毒, 3~5 岁组 17 例中 2 例感染腺病毒, 经统计学处理各年龄组间差异无显著性 ( $\chi^2 = 3.978, P > 0.05$ )。

### 三、PCR 产物的限制性内切酶图谱分析

纯化的扩增产物经 Rsa I 酶切后可清楚地将肠道腺病毒 40 型和 41 型区别开, Ad40 被水解为 256 bp 和 45 bp 两个片段, Ad41 被水解为 211 bp 和 90 bp 两个片段<sup>[2]</sup>, 1997~1999 年 Ad40 总的感染率为 2.56%, Ad41 总的感染率为 8.21%, 2.56% 的腺病毒不能分型 (表 2)。

表2 1997~1999 年深圳市婴幼儿腹泻中肠道腺病毒的分型及感染率

年份	检测人数	Ad40	Ad41	未分型
1997	55	1(1.82)	3(5.45)	1(1.82)
1998	59	1(1.69)	8(13.56)	2(3.38)
1999	81	3(3.70)	5(6.17)	2(2.47)
合计	195	5(2.56)	16(8.21)	5(2.56)

注: 表中括号内数字为感染率 (%)

## 讨 论

肠道腺病毒感染的分子流行病学研究依赖于可对大量粪便标本进行检测的诊断方法, 由于 PCR 技术具有很高的敏感性, 因此可用于直接对病毒核酸的检测。研究证实, 用引物 hexAA1885 和 hexAA1913 可扩增不同基因型的腺病毒。我们对 195 份标本的检测结果显示, 深圳市婴幼儿腹泻标本中腺病毒 DNA 的阳性率为 13.33%, 发热是腺病毒感染的特征性的临床表现。

在腹泻标本中, 许多腺病毒不能确定其型别, 但很有必要将 F 亚组与其他型别的腺病毒区别开来。本研究是将 PCR 技术与限制性内切酶图谱分析结合起来, 用于检测粪便中的肠道腺病毒。300 bp 的扩增产物用 Rsa I 内切酶进行限制性内切酶图谱分

析,则产生不同的图谱。Ad40 和 Ad41 的基因型不同,所产生的酶切图谱和已发表的 Dugan 和 Tak 株的序列相同<sup>[3,4]</sup>。195 份标本中,Ad40 的阳性率为 2.56%, Ad41 的阳性率为 7.69%,其他型别腺病毒的阳性率为 2.56%,这与国外的报道基本类似<sup>[5]</sup>。

婴幼儿腹泻是儿童中的常见病、多发病,病毒性腹泻占 70%~80%。我们已于 1991~1993 年对深圳市婴幼儿腹泻标本中的轮状病毒用 RNA-PAGE 法检查,轮状病毒 RNA 的阳性率为 47.73%<sup>[6]</sup>。本文结果表明,肠道腺病毒是除轮状病毒外引起深圳市婴幼儿腹泻的又一重要病原,其中又以肠道腺病毒 41 型感染为主。

参 考 文 献

1 Van der Avoort HGAM, Wermenbol AG, Zomerdijk TPL, et al.

Characterization of adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralization with monoclonal antibodies. *Virus Research*, 1989, 12: 139-157.

2 Annika Allard, Adriana Kajon, Goran Wadell. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1994, 44: 250-257.

3 Toogood CIA, Hay RT. DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *J Gen Virol*, 1988, 69: 2291-2301.

4 Toogood CIA, Murali IR, Burnett RM, et al. The adenovirus type 40 hexon: Sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J Gen Virol*, 1989, 70: 3203-3214.

5 Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, et al. Importance of enteric Ad40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol*, 1984, 20: 365.

6 何雅青,林和顺. 1991~1993 年深圳市婴幼儿秋冬季腹泻中轮状病毒感染的分子流行病学调查. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996, 10: 287-288.

(收稿日期: 2000-06-11)

• 短篇报道 •

孕妇弓形体感染情况调查

韩希凤

弓形体感染所造成的危害,已逐渐受到人们的重视。目前有关部门专家已将弓形体感染致畸列为弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒等 4 种主要生物致畸之首。在我国的部分地区弓形体感染率为 5.2%,仅次于乙型肝炎感染率(8.8%)<sup>[1]</sup>。因此,对金水区孕妇弓形体感染情况进行了调查,旨在预防胎儿感染及畸形的发生。

一、资料与方法

资料来自门诊建档孕妇 1 803 名。常规进行弓形体检测,并详细询问病史、既往史以及动物接触史和食肉习惯等。取孕妇手指静脉血,分离血清备用。采用免疫荧光法间接抗体试验(IFAT),试剂由卫生部上海生物制品研究所提供。对 IFAT 阳性者进行聚合酶链反应(TOX-PCR),了解近期感染情况。对 TOX-PCR 阳性者,根据孕周劝其做人工流产或引产,并服用螺旋霉素(4 g/d)分 4 次口服,2 周为一疗程,转阴后可再次妊娠。对抗体阳性者以及不愿终止妊娠者,要重点监护,用 B 超监测胎儿发育情况。

二、结果

1 803 名孕妇中弓形体抗体阳性者 91 例,占 5.0%。(1) 孕龄与弓形体感染的关系: 1 803 名孕妇中孕龄最小 8 周,最大 26 周。以 12 周以前为妊娠早期,阳性率为 5.1% (40/786), 13~28 周为孕中期,阳性率为 5.0% (51/1 017), 晚期妊娠孕妇因病例数太少无法统计。两组经统计学处理差异无显著性( $\chi^2=4.8, P>0.05$ )。(2) 生活环境及食肉习惯与弓形体感染的关系: 生活环境包括家庭内养过动物,有动物

直接接触史(动物主要指猫、狗),居住区内养有动物。食肉习惯主要指食未熟透之肉。结果在 91 例弓形体抗体阳性中 13 例有动物接触史,占 14.3%, 67 例在居住区内养有动物,占 73.6%, 11 例有食烤羊肉史,占 12.1%。

三、讨论

孕妇弓形体抗体阳性率,国内外报道不一。国外以欧美等白人为高。国内报道多在 10.0%。本资料为 5.0%,与国内报道接近。(1) 生活环境与弓形体感染的关系: 目前,养宠物的人很多,到处可见,动物的粪便遍及大街小巷,特别在庭院内随处可见。人可以经过口、胃肠道、损伤的皮肤、空气尘埃传播、输血和器官移植传播以及经胎盘直接垂直传播<sup>[2]</sup>。本资料 73.6% 的孕妇是通过空气尘埃传播, 14.3% 的孕妇有动物密切接触史, 12.1% 有食烤羊肉史。孕妇于不同孕期感染弓形体后,对胎儿危害很大,可导致流产、早产、死胎、胎儿畸形。本资料由于采取了相应的措施,使娩出的婴儿无一例畸形。因此建议,孕前或孕早期应常规筛查弓形体抗体,对弓形体抗体阳性者再进一步检查近期感染情况,并定期复查。(2) 孕期与弓形体感染的关系: 本研究将孕妇分为妊娠早、中、晚期,晚期妊娠资料太少无法统计,而早、中期弓形体感染的阳性率比较差异无显著性。说明弓形体感染可在任何时间发生。

参 考 文 献

1 中国人畜弓形虫病调查研究协作组. 1983-1986 中国 19 省市自治区人畜弓形虫病流行病学调查. *中国公共卫生*, 1988, 4(增刊): 43-44.

2 尚涛. 产科领域的弓形体感染. *中国实用妇科与产科杂志*, 1995, 11: 169-170.

(收稿日期: 2000-08-17)