

一株新轮状病毒引起河北省石家庄市成人 腹泻爆发流行

杨红彦¹ 陈淑芬² 纪绍忠¹ 孟宗达² 康志刚³ 张忠² 齐顺祥²

摘要 1997年4月10~28日,在河北省石家庄市某高校发生一起成人急性腹泻的爆发流行,累积1 000多名大学生发病。经不连续聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检查腹泻病人粪便标本核酸图谱一致呈4-2-1-1-1-1-1排列的新轮状病毒(新RV)14份,阳性率占47%(共检标本30份),且未见其它带型的轮状病毒。提示该核酸图谱的轮状病毒是此次成人急性腹泻爆发流行的主要病原。用已知ADRV第5及第9基因片段末端引物进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),结果阳性对照ADRV的扩增结果都为阳性,而新RV的扩增结果都为阴性。这些结果表明该新RV不属于B组轮状病毒,是与成人腹泻轮状病毒(ADRV)完全不同的新RV。非ADRV的轮状病毒引起成人腹泻爆发流行在河北省尚属首次。

关键词 成人腹泻 新轮状病毒 RT-PCR

A Novel Rotavirus Causing Large Scale of Adult Diarrhea in Shi Jiazhuang Yang Hongyan^{*}, Chen Shufen, Ji Shaohong, et al. ^{*}The Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, 102206

Abstract An outbreak of adult diarrhea causing more than 1 000 hospitalized cases among graduates in a university in Shi Jiazhuang city (Hebei province), occurred in 10-28, April, 1997. The non-bacterial pathogenic agent is confirmed as Rotavirus first by PAGE. Fourteen samples have been demonstrated sharing the same nucleic acid electrophoresis pattern of 4-2-1-1-1-1-1. The positive rate was 47% (thirty samples have been checked) with no other RV pattern. Data showed that RV with this kind of nucleic acid electrophoresis pattern were responsible for the outbreaks acute diarrhea in adults. The novel RV and known ADRV was RT-PCR with end-primers 5, 9 of typical ADRV, the positive control typical ADRV's results are positive, the novel RV's are negative. Experimental results showed that the novel RV did not belong to group B RV, totally different from all the known ADRV. This case was the first reported one in Hebei province with an outbreak of adult diarrhea not by any known ADRV.

Key words Adult diarrhea Novel Rotavirus RT-PCR

引起人类腹泻的病毒有轮状病毒(Rotavirus, RV)、诺瓦克病毒、杯状病毒、星状病毒、冠状病毒、肠道腺病毒等多种病毒,迄今为止已报告的轮状病毒有七个组,其中

人畜共患的轮状病毒只有A、B、C三组,其他四个组只引起动物的传染性腹泻。但造成人类严重危害的主要是A、B两组轮状病毒。A组轮状病毒致婴幼儿腹泻,目前已根据它的中和抗原VP7的多态性分为至少十四个血清型,国际上已针对婴幼儿重型腹泻的四个血清型病毒研制并开发了疫苗,并准备把该疫苗纳入扩大免疫计划。成人腹泻轮状病毒

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
北京 102206

2 河北省卫生防疫站

3 中国预防医学科学院病毒学研究所

(ADRV) 是我国学者洪涛 1983 年^[1]发现的 B 组 RV 中唯一能引起人类腹泻流行的病原体,80 年代由 ADRV 引起的成人腹泻在我国许多省份都有过大的爆发流行,但自 90 年代初可能由于人群抗体水平的提高,由 ADRV 引起的腹泻有减少的趋势。

1997 年 4 月在河北省石家庄市某高校发生一起成人急性腹泻的爆发流行,累积 1 055 名大学生发病。其病例主要集中在女生中间。这与污染二次供水的供水面相符合,停止供应该污染二次供水后病例发生数锐减,直至消灭^[2]。我们从 30 个急性腹泻病例标本中检出 14 例核酸片段迁移率完全一致的新轮状病毒,且未见其它带型的轮状病毒。提示该轮状病毒是引起此次腹泻爆发的主要病原。经 RT-PCR 扩增进一步证明该病毒与引起我国成人腹泻多次大流行的 ADRV 是完全不同的毒株,且属于不同的组别,现将结果报告如下。

材料和方法

一、标本来源:1997 年 4 月 10~28 日,河北省石家庄市某高校发生一起因二次供水污染而引起的成人急性腹泻爆发流行,共有 1 055 名大学生发病。其中 90% 病例是女生,男生病例只占 10%,这是由于被污染的水源在女生宿舍及其食堂,只有少部分男生来此就餐。主要症状为发烧 38~40℃、厌食、腹部绞痛、恶心呕吐、水样便或稀便^[2]。取流行高峰在校医院住院腹泻病人粪便标本,-20℃保存待检。成人腹泻轮状病毒 ADRV 标本为本室 1986 年采于唐山 ADRV 腹泻大流行病例^[3]。

二、RNA 电泳:不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色按常规,浓缩胶为 5%,分离胶为 10%,垂直凝胶板为 15cm × 13cm × 0.1cm。

三、RT-PCR 试验方法:逆转录酶 (AMV)、Taq DNA 聚合酶为 Promega 产品。ADRV 主要结构蛋白 VP6、VP7 编码基因 5、

9 末端引物参照文献报道的基因序列设计合成^[6,7]。取经 Gene Clean Kit 纯化的 ADRV dsRNA 4.0μl, ddH₂O 5.5μl, 二甲基亚砜 (DMSO) 1.0μl, 引物 2.0μl (100ng), 95℃ 2min, 置 42℃ 加等量 2 × 反应混合液 (2 × RM: 2 × Taq Buffer, MgCl₂ 5mmol/L, dNTP 0.4mmol/L, 牛血清白蛋白第五片段 0.2μg/μl, AMV 反转录酶 6U units, Taq 酶 3U units), 42℃ 平衡 10min, 42℃ 逆转录 30min 后,直接进入 PCR 循环,程序是 94℃ 2min、55℃ 1min、70℃ 4min 25 个循环,最后一循环 72℃ 延至 10min。反应结束后,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查。

结 果

一、病毒基因组特征:经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳对照比较,新轮状病毒与 A 组或 C 组显然不同,与 ADRV 的迁移率也差别较大,新轮状病毒 11 条 RNA 核酸带与 ADRV 的具体区别是:①新轮状病毒除第 2 条核酸带以外其它十条的迁移速率都较 ADRV 对应的条带慢;②第一组 4 个基因片段呈均匀分布,而 ADRV 第一组 4 条带中 3-4 带呈双联带(图 1)。

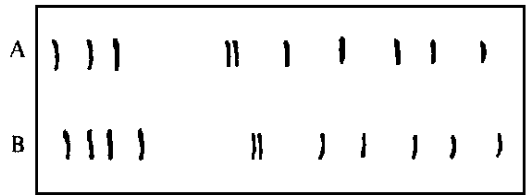


图 1 粪便标本中轮状病毒基因组的不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳图结果

- A: 原成人轮状病毒 ADRV RNA
- B: 此次腹泻爆发流行腹泻标本中的轮状病毒 RNA

二、RT-PCR 试验结果:取强阳性粪便标本,提取病毒 RNA,采用 Gene Clean Kit 纯化后,用上述 ADRV 第 5 和 9 基因末端引物进行 RT-PCR 试验,致本次腹泻流行的新 RV 标本结果均为阴性,而 ADRV 阳性对照

标本结果均为阳性(图 2)。

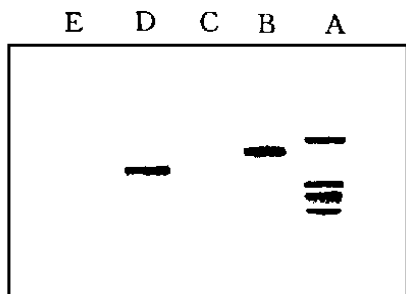


图 2 1.0% 琼脂糖凝胶(EB 染色) 示粪便标本中 RNA 用 ADRV 基因 5,9 引物进行 RT-PCR 的结果

- A: Marker (PBR322/HinfI);
- B: 新 RV 用 ADRV 基因 5 引物扩增结果;
- C: ADRV 基因 5 引物阳性对照扩增结果;
- D: 新 RV 用 ADRV 基因 9 引物扩增结果;
- E: ADRV 基因 9 引物阳性对照扩增结果。

讨 论

1987、1988 年湖南省^[8]、福建省^[9] 分别在两次腹泻调查中从个别腹泻标本中发现与 ADRV 明显不同的新轮状病毒, 该核酸带型轮状病毒 1994 年在北京某高校曾引发过一次致 400 余名男同学的腹泻爆发流行, 近期该核酸带型轮状病毒又在河北省某高校引起以女同学为主的千余名大学生爆发流行性腹泻。由这种新核酸带型轮状病毒引起的成人腹泻从散发到爆发流行表明该新轮状病毒有适宜的生存环境, 两次均为水源爆发, 说明该新轮状病毒毒力较强, 且人群抵御能力普遍较低(无男女区别), 有再次爆发的危险性, 应引起足够重视。有关该核酸带型轮状病毒的研究 1987 年王长安等^[4] 对其组别进行了鉴定, 证明不属于已发现的致人类腹泻的 A、B、C 组及致动物腹泻的 D 组轮状病毒。本次发

现的该新轮状病毒用 ADRV 主要核酸片段末端引物扩增的结果都为阴性, 这与 1994 年钱渊等^[5] 的研究结果一致, 进一步证明时隔 3 年在河北省首次引发这起成人腹泻爆发的轮状病毒与他们发现的轮状病毒可能是一个病原。有关该核酸带型轮状病毒 1987、1994 年报告的标本与近期发现的标本的比较研究正在进行当中。该病毒分子生物学和组别鉴定等生物学特性方面还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Hung T, Chen Guangmu, Wang Changan, et al. Waterborne outbreak of Rotaviruses diarrhea in adults in China caused by a novel Rotavirus. *Lancet*, 1984, 8387: 1140.
- 2 陈淑芬, 孟宗达, 张志珍, 等. 新型 B 组轮状病毒引起腹泻爆发的初步报告. *中国公共卫生*, 1998, 14: 139.
- 3 卢长江, 纪绍忠, 王广荣, 等. 唐山赵各庄煤矿成人轮状病毒腹泻的流行病学调查. *腹泻病专辑*, 1987: 21.
- 4 王长安, 胡超文, 黄发利, 等. 在我国患急性腹泻的成人中发现一种新轮状病毒. *病毒学报*, 1987, 3: 321.
- 5 钱渊, 张又, 刘军, 等. 在北京爆发流行的成人腹泻粪便中发现非 A 组轮状病毒. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1994, (增刊): 75.
- 6 Guangmu Chen, Robin Werner-Eckert, Hung Tao, et al. Expression of the Major Inner Capsid Protein of the Group B Rotavirus ADRV: Primary Characterization of Genome Segment 5. *Virology*, 1991, 182: 820.
- 7 Guangmu Chen, Hung Tao, Erich R Mackow, et al. Identification of the Gene Encoding the Group B Rotavirus VP7 Equivalent: Primary Characterization of the ADRV Segment 9 RNA. *Virology*, 1990, 178: 311.
- 8 胡超文, 黄发利, 周乐松, 等. 515 例急性腹泻患者病原学调查研究. *腹泻病专辑*, 1987: 8.
- 9 陈锦生, 邓涤夷, 陈霞, 等. 福建省首次检出新的成人轮状病毒. *中国人兽共患病杂志*, 1988, 4: 23.

(收稿: 1998-08-24)