

成人腹泻轮状病毒的分子流行病学调查

王长安 杨荣鉴* 陈广牧 王金利
熊浩莹** 刘红梅* 洪涛

(中国预防医学中心病毒学研究所, 北京)

本文在我们先前研究的基础上,报道用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对我国 12 个地区 53 份成人腹泻轮状病毒 (Adult Diarrhea Rotavirus, 简称 ADRV) 的核酸 (RNA) 进行了分析。研究结果表明,我国各地流行的 ADRV 具有共同而独特的 RNA 图型,同时首次观察到不同地区的成人腹泻轮状病毒 RNA 在电泳迁移率上存在着微小的差别;这意味着我国目前流行的 ADRV 为一群基因图型基本相似,而在毒株间存在着微小的变异。

关键词 成人腹泻轮状病毒; RNA 图型; 共同电泳

成人腹泻轮状病毒是我国首次发现的一种轮状病毒,它在成人中引起大规模腹泻流行^[1-4];它在形态上与普通轮状病毒无区别,但抗原性与普通轮状病毒无关,且具有独特的 RNA 电泳图型^[1,2]。本文进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 对我国 12 个地区成人腹泻样品,进行 RNA 电泳图型分析,发现它们之间的差别。

材料和方法

(一) 病毒来源

1. 取自 1982—1984 年在锦州(A)、兰州(B)、阜新(C)、湖南(D)、广西(E)、贵州(F)、福建(G)、青岛(H)、黑龙江(I)、丹东(J)、济南(K)、承德(L) 12 个地区典型腹泻病人粪便,按前文^[1]处理。

2. 对照用普通轮状病毒取自东北、福建地区流行的婴幼儿腹泻粪便。

3. 呼肠孤病毒,由北京市儿科研究所赠送,在 Vero 细胞上培养。

(二) 电镜检查

按前文^[1]方法。

(三) 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

按前文^[1]方法。

(四) 病毒的 RNA 提取^[1,2,7,8,10]

1. 病毒经超速离心浓缩: 取全粪便样品 20—50ml, 加入等体积的氯仿和适量的玻璃珠震荡 20 分钟; 经 3,000rpm 离心 20 分钟, 取上清液; 再 8,000rpm 离心 40 分钟, 取上清液; 继以 36,000rpm 离心 60 分钟, 得沉淀物; 沉淀物经 pH 7.2 PBS 重悬后, 铺于 2ml 45% 的蔗糖液上面, 36,000rpm 离心 90 分钟, 弃上清液, 以 0.3—0.5ml pH7.2 PBS 液悬浮沉淀物。

2. 病毒未经超速离心浓缩: (1) 取 0.5—1g 粪渣, 加入 1ml pH7.2 PBS 混匀, 震荡; 超声波处理 60 秒 2 次 (20,000 Hz/sec); 3,000rpm 离心 15 分钟, 取上清液作为提取核酸的病毒材料。(2) 呼肠孤病毒在 Vero 细胞上培养 3 天刮下, 3,000rpm 离心 15 分钟, 取沉淀, 加入 pH7.2 PBS (或培养上清液) 1ml; 超声波处理 30 秒 3 次 (20,000 Hz/sec); 再以 3,000rpm 离心 15 分钟, 取上清液待提核酸。

取上述两种方法处理的病毒液各 0.3ml, 分别加入 10% SDS30 μ l, 56℃ 处理 30 分钟; 加入等渗溶液饱和酚 0.3ml、氯仿 0.3ml, 进行震荡,

本文于 1984 年 7 月 9 日收到。

* 江西省医学科学研究所, ** 广西省医学院。

本文电泳图由黄大路同志摄影。实验中得到姚恒礼、蔡日芬、梁晓光、赵同兴、温瑞福、田淑芳、范瑞莲等同志的热情支援; 兰州、锦州、阜新、湖南、广西、安顺、福建、青岛、黑龙江、丹东、济南、承德等地卫生防疫站提供标本, 在此一并感谢。

离心分相,取上层水相。如此反复抽提 3—4 次;最后一次的水相加入 2.5 倍体积的无水乙醇, -20℃过液;13,000rpm 离心 15 分钟,留沉淀;真空抽干(15 分钟);加入 100—150μl 的样品液(pH 6.8、0.5M Tris—HCl 7.5ml/甘油 2.5ml/溴酚蓝 10mg),置冰箱备用。

(五) PAGE^[9]

采用垂直板型(北京东方仪器厂产品)、不连续电泳系统;凝胶板 20×14cm,胶厚 0.1cm,浓缩胶为 3% 聚丙烯酰胺,缓冲液为 0.125M Tris—HCl, pH6.8;分离胶为 10% 聚丙烯酰胺,缓冲液为 0.375M Tris—HCl, pH8.8;电泳液为 pH8.5、0.025M Tris—0.192M 甘氨酸缓冲液。恒电流 0.21mA/mm² (横截面积),电泳约 6 小时。

(六) 硝酸银染色^[9]

电泳后,剥下凝胶板,用双蒸水洗 2 次,0.011M 硝酸银染色 30 分钟,水洗 3—5 次;0.75 M NaOH—0.1M 甲醛液显色 10—20 分钟;当 RNA 区带清晰,用水洗去显影液,立即停影(5% 冰醋酸 30 分钟);用 10% 乙醇—0.5% 冰醋酸固定。

结 果

(一) 电镜检查

检查了九个地区 43 份样品,其中 42 份见到轮状病毒颗粒(图版 I-3)。见表 1。病毒颗粒的形态特点如前文所述^[1]。

(二) ELISA

检查了七个地区计 31 份样品,均未查出普通轮状病毒抗原。见表 1。

(三) 核酸电泳

取 12 个地区 53 份标本,进行核酸电泳,结果有 46 份阳性。详见表 1。

将 12 个地区样品经 PAGE 及硝酸银染色后,可见清晰的 11 条带(图版 I-2 A—I, 图版 II-6 J—K;承德地区(L)未列图);表明此次大规模流行的成人腹泻轮状病毒也类似普通轮状病毒(图版 I-1, b, c),其基因组是由 11 个基因片段组成的双链

表 1 12 地区成人腹泻标本电镜、ELISA 和核酸电泳检测成人腹泻轮状病毒结果

Table 1 Results of EM, ELISA and electrophoresis tests on Adult Diarrhea Rotaviruse in 12 areas

地 区 Area	电 镜 EM		普通轮状病毒 ELISA 药盒 Ordinary rotavirus ELISA kits		电 泳 Electrophoresis	
	例 数 No. of cases	阳性数 Positivity	例 数 No. of cases	阳性数 Positivity	例 数 No. of cases	阳性数 Positivity
A	5	5	3	0	5	5
B	11	11	8	0	11	11
C	5	5	4	0	5	4
D	2	2	2	0	2	2
E	2	2	2	0	2	2
F	—	—	—	—	2*	2
G	—	—	—	—	2*	2
H	8	8	8	0	8	8
I	4	4	4	0	4	2
J	4	3	—	—	4	2
K	2	2	—	—	2	2
L	—	—	—	—	6	4
总 数 Total	43	42	31	0	53	46

* 每份标本含 10 病人混合便。

* Each sample contains stool from 10 patients.

RNA, 但在电泳图型上有它的独特性。按其基因片段在电泳中的迁移率, 1—4 片段为第 1 组; 5—6 片段为第 2 组; 但 7、8、9 片段之间疏远, 以致不能按普通轮状病毒划分, 把 7、8、9 片段划为第 3 组; 诚然, 第 10、11 片段是否划为第 4 组也需斟酌。在电泳进行时, 以我国婴幼儿腹泻轮状病毒(图版 I-1, b, c) 和呼肠孤病毒(图版 I-1 a, 基因组为 10 个片段的双链 RNA, 其第 10 片段在轮状病毒第 7 片段之上^[10]) 作为参考标准。

取各地区代表样品混合组成一对, 在同一凝胶板上电泳, 以进一步分析两地区样品在电泳图型上的差别。计分析 13 对。除黑龙江地区与贵州地区(图版 II-6, I + F)、锦州地区与阜新地区(未列图) RNA

图型一致外, 其它 10 对在图型上均有一定的差别(图版 II-4、5、6、7 或示意图。I + E 第 8、10、11 片段; D + E 第 11 片段; E + A 第 11 片段; E + B 第 3、11 片段; B + A 第 3 片段; A + I 第 10 片段; I + D 第 10 片段; K + I 第 5、10、11 片段; J + I 第 5、6、10 片段; D + B 第 3 片段)。由于两个地区病毒的某些 RNA 片段的迁移率不同, 结果在共同电泳图上出现了多于 11 个片段。见图版 II-4、5、6、7, 或示意图和表 2。此外, 贵州地区混合样品未见 RNA 图型有差异(图版 I-2, F); 福建地区混合样品中的 RNA 在电泳图上出现了 13 条带(图版 I-2 G 第 6 条区带下面多了一条带)。

表 2 不同地区分离的成人腹泻轮状病毒 RNA 共同电泳图型比较

Table 2 Comparison of RNA profiles of Adult Diarrhea Rotavirus isolated in different areas

两地区毒株共同电泳 Strains co-electrophoresed	迁移率有差别的 RNA 片段 No. of segments that differ in electrophoretic mobility
I + E	8 10 11
D + E	11
E + A	11
E + B	3 11
B + A	3
A + I	10
I + D	10
K + I	5 10 11
J + I	5 6 10
I + F	
H + D	
D + B	3

讨 论

结果说明, 从我国 12 个地区分离的成人腹泻轮状病毒在形态上、抗原上一致^[1,2], 并且具有相似的 RNA 片段电泳图型, 而与普通轮状病毒却有明显的差别, 尤以 7、8、9 片段突出——普通轮状病毒的

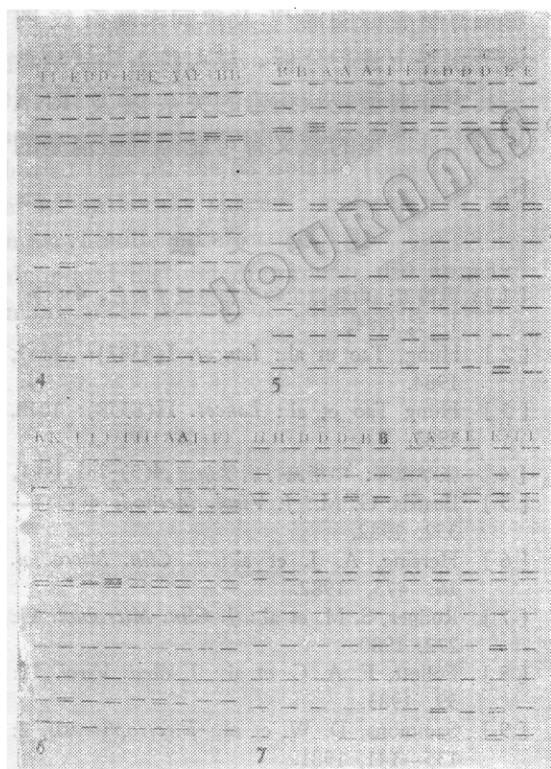


示意图: 不同地区之间成人腹泻轮状病毒 RNA 共同电泳图型的比较

A diagram showing comparison by co-electrophoresis of RNA profiles of Adult Diarrhea Rotaviruses isolated in different areas

7、8、9 片段很接近,而成人腹泻轮状病毒明显分开^[1,2]。目前,国外文献上尚未看到这种病毒的 RNA 图型。近年来,国外陆续报道了从鸡、猪、婴幼儿腹泻便中分离出数种不具有普通轮状病毒抗原,以及 RNA 电泳图型不同的轮状病毒^[11-15],称为非典型轮状病毒 (Atypical rotavirus or Pararotavirus)。McCrae (英国)将我们分离的成人腹泻轮状病毒与他们从猪中分离的几株非典型轮状病毒进行了 RNA 电泳分析比较,结果前者 7、8、9 片段明显分开与后者有些相似。我们用 Flewett (英国)赠送的抗非典型轮状病毒血清与成人腹泻轮状病毒作补体结合试验 (CFT),却未有交叉反应。这些实验均提示本病毒的独特性。

我们将 12 个地区的成人腹泻轮状病毒进一步进行共同 RNA 电泳的实验表明,大多数地区之间的成人腹泻轮状病毒 RNA 电泳图型不一样,主要差别表现在 3、5、10、11 片段迁移率的不同。这些差别将为成人轮状病毒 RNA 电泳图型的分型提供依据。Follett 和 Desselberger 以及 Sabara 和 Babiuk 认为普通轮状病毒 RNA 电泳图型的多变性,可能是两种轮状病毒毒株流行时感染了同一宿主,发生了基因重组,也可能是病毒本身在自然界发生了基因漂移^[18,19]。本实验提示,成人腹泻轮状病毒也有这些可能性。

锦州地区和阜新地区的两样品在共同电泳图型上完全一致。这两个地区相距较近,流行时间是先锦州后阜新,说明可能系同一株病毒的传播;黑龙江地区和贵州地区的病毒 RNA 图型一样,说明也可能属同一毒株流行。福建地区样品在电泳上可辨认出 13 条区带(图版 1-2, G 第 6 条带下面多了一条带),因为该样品是由 10 个病人样品合并而成,这可能是不同的病人感染了不同的毒株所致。由此看来,同一疫

区可能有不同的毒株流行,不同疫区也可能有同一毒株流行。上述实验结果,在分子流行病学中给以有意义的启发。

由表 1 可见,53 份成人腹泻标本,经核酸电泳,结果 46 份具有成人腹泻轮状病毒 RNA 电泳图型的特征,这表明核酸电泳技术对成人腹泻轮状病毒所致疾病的诊断及分子流行病学调查颇有价值。

在普通轮状病毒中, RNA 电泳图型变化是多样的^[16],即使在同一型、同一亚组的不同毒株中情况也是如此,但这种现象的意义目前尚不明确^[17]。

成人腹泻轮状病毒 RNA 片段电泳图型变化不如普通轮状病毒的大。这种病毒与国外近来在动物及婴幼儿中发现的非典型轮状病毒之间的深入比较研究不够。随着在寡核苷酸图谱^[18]及单向末端指纹图谱^[12]水平上进行分析,成人腹泻轮状病毒与其它非典型轮状病毒的关系以及 RNA 片段电泳图型的意义有可能得到较清楚的阐明。

参 考 文 献

- [1] 洪涛等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4 (1): 1-5, 1984.
- [2] Hung, Tao et al.: *Lancet*. I(8387): 1139, 1984.
- [3] Hung Tao et al.: *Lancet*. II(8358): 1078, 1983.
- [4] 张学谦等: 中华流行病学杂志, 4(5): 281, 1983.
- [5] Beards, G. M.: *J. Virol. Methods* 4: 343-352, 1982.
- [6] Herring, A. J. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 16: 473, 1982.
- [7] Rodger, S. M. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 13: 272, 1980.
- [8] Follett, F. A. C. et al.: *J. Med. Virol.* 11: 39, 1983.
- [9] Sammons, D. W. et al.: *Electrophoresis*, 2: 135-141, 1981.
- [10] Ramig, R. F. et al.: *J. Virol.* 22: 726, 1977.
- [11] Bridger, et al.: *Infect. Immun.* 35: 1058-1062, 1982.
- [12] Pedley, S. et al.: *J. Gen. Virol.* 64: 2093-2101, 1983.

- [13] Dimitrov, D. H. et al.: *Infect. Immun.* 41: 523—526, 1982.
- [14] Nicolas, J. C. et al.: *Viol.* 124: 181—184, 1983.
- [15] Ncnulty, M. S. et al.: *J. Gen. Virol.* 55: 405—413, 1981.
- [16] Buitenwerf, J. et al.: *J. Med. Virol.* 12: 71, 1983.
- [17] Beadrds, G. M.: *Archives Virol.* 74: 65—70, 1982.
- [18] Compans, R. W. et al. (ed): *Double-Stranded RNA Viruses Elsevier Biomedical/New York. Amsterdam. Oxford*, p. 331, 1983.
- [19] Compans, R. W. et al. (ed): *Double-Stranded RNA Viruses Elsevier Biomedical/New York. Amsterdam. Oxford*, p. 105, 1983.
- [20] 王长安等: 病毒学报, 1(1): 75, 1985.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF ADRV FROM 12 OUTBREAKS

Wang Changan Yang Rongjian* Chen Guangmu Wang Jinli

Xiong Jieyin** Liu Hongmei* Hung Tao

(Institute of Virology, China National Center for Preventive Medicine, Beijing)

On the basis of our previous studies, a comparative analysis of RNA patterns of the newly discovered ADRV (Adult Diarrhea Rotavirus) was carried out by means of co-electrophoresis. The result showed that all the 53 isolates from 12 different outbreaks shared identical pattern on acrylamide gel electrophoresis, but some minor and distinct differences did appear among these isolates on co-electrophoresis.

The migrating variations appeared at 3, 5, 10 and 11th segments, signifying the heterogeneity and mutations existed in the ADRV isolates.

Key words

Adult Diarrhea Rotavirus; RNA pattern; Co-electrophoresis

*Jiangxi Institute of Medical Sciences

**Guangxi Medical College