DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.02.009

重庆地区婴幼儿急性胃肠炎的病原学观察

王守良 张淑莲 熊大慧* 李光平（微生物学教研室）

提 要 本文就1978～1981年重庆地区婴幼儿急性胃肠炎流行期连续4年做了该病的病原学研究。从117例病儿粪标本中用电镜观察到轮状病毒者有63例（53.8%）；又从60例病儿急性期和恢复期双份血清或单份恢复期血清中用补体结合试验检测出轮状病毒抗体者52例(86.6%)。在32例病儿的双份血清中抗体滴度呈4倍以上升高者28例。从病原学和血清学上证明1978年至1981年重庆地区冬季所流行的婴幼儿急性胃肠炎其主要病原为轮状病毒。并证明重庆地区轮状病毒的隐性感染在小儿中相当普遍。

关键词：胃肠炎，急性，婴儿—病因学；轮状病毒—超微结构

婴幼儿急性胃肠炎据 Estes 等[1]报告在世界范围内每年发病人数达五亿余人，死亡病例竟达500～1 800万之多。此病在我国又称之为秋季腹泻，是危害婴幼儿较严重的传染病之一。在我国，于1978年由庞其芳等[2]和王守良等[3]分别在北京和重庆地区该病流行期从患儿粪便中用电镜观察到轮状病毒。

本文报告1978～1981连续四年婴幼儿急性胃肠炎流行期对重庆地区病儿粪便和血清标本的研究结果。

材料和方法

一、标本采集

1．粪便标本：于流行期间采集患病三天以内病儿粪便117份（例）标本。于－20℃保存。多数标本做过肠道致病性细菌分离培养，未分离出致病性细菌。粪便标本以2 000～3 000rpm离心1～2次除去粪渣，取上层液直接作电镜样品观察或按下述方法进一步处理后再作电镜样品检查。

2．血清标本：采集60例病儿发病早期和恢复期双份血清或单份恢复期血清共92份，保存于－20℃冰箱中待测定有无轮状病毒补体结合抗体。同时收集102人份无腹泻病史的其他病儿血清标本。

二、电镜样品制备法

1．直接滴膜法：将粪标本直接滴在涂有formvar支持膜载网上，自然干燥后负染色电镜下观察。

2．超速离心浓集法：将粪标本经27 000～35 000rpm离心2～4 h，倾去上液，沉淀物悬于少量蒸馏水中，均匀后取之滴膜，经负染色后电镜下观察。

3．琼脂扩散过滤法：先将1.0～1.5%琼脂溶化液2ml铺于载玻片上，待凝固后横切成三块，移入一个先垫有三层滤纸的平皿内，然后，将粪标本滴在琼脂块表面，使标本滴成凸起呈珠状，迅速将载网复盖在标本滴珠表面，载网随滴珠吸干而下落，至快干时即将载网取下，经负染色后电镜检查。

4．免疫电镜法：取粪标本0.2ml，加轮状病毒抗体血清（补结试验1:64以上，作1:10或1:20稀释）0.1ml，混合后置37℃水浴中作用60 min，转置4℃冰箱过夜。翌日，用3 000～5 000rpm离心20min，除去上清液，滴加少许蒸馏水于沉淀物，混匀后取它滴膜制样，经负染色后电镜检查。

5．快速免疫电镜法：此法即上述免疫电镜法和琼脂扩散过滤法两者结合的方法。

三、补体结合试验

抗原是经电镜检查富含轮状病毒颗粒的粪标本，用差速离心(5 000rpm×30min及35 000rpm×3h)纯化和浓缩的轮状病毒液。抗原效价是用方阵滴定法滴定。补结试验为常用补结试验微量法。正式试验中轮状病毒抗原用量为0.1ml内含8个单

* 重庆医科大学附属儿科医院

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

位。

结　　果

一、病原学检查

1. 电镜观察粪标本中轮状病毒：

117份婴幼儿急性胃肠炎病儿粪标本，85份经细菌学分离培养未分离出致病性大肠杆菌或其他病原菌。电镜观察发现63份标本含有特征形态的轮状病毒，其阳性率为53.8%。

轮状病毒颗粒在电镜图象中均匀分布或聚集成堆（图1～2），大多数病毒颗粒呈现特征性典型形态。病毒颗粒为球形，直径约为65～75nm，为双层衣壳结构，内层壳微粒呈现车轮辐射状排列等特征。

由于注意了标本的采集和电镜样品制作方法的不断改进，故自1978～1981四年中所采集的标本检出轮状病毒的阳性率不断提高（表1）。

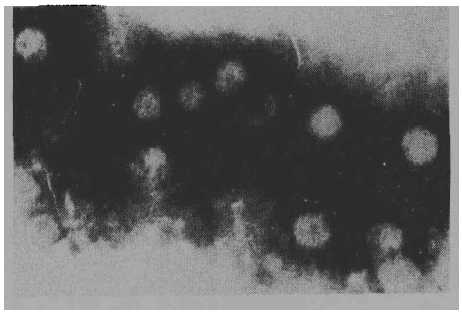


图1　为粪标本中轮状病毒电镜图象。病毒颗粒散在分布（负染色，放大100 000倍）

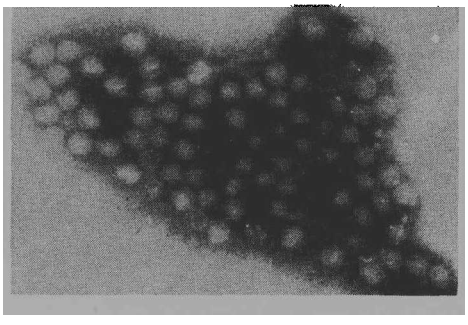


图2　为粪标本中轮状病毒电镜图象。病毒聚集成团（负染色，放大90 000倍）

2. 比较五种电镜样品制作法的敏感度：

任意选出40份病儿粪标本用五种电镜样品制作法平行检测标本中轮状病毒检出阳性数以比较五种制作法的敏感度。结果证明以快速免疫电镜法最为敏感，见表2。

3. 比较电镜检出轮状病毒和血清中检测轮状病毒抗体的符合率

表1　1978～1981年病儿粪标本中轮状病毒的电镜检查

样品制备法	标本采集时间	标本份数	阳性份数	阳性率（%）
超速离心法	1978.10～11	20	6	30.0
琼脂扩散过滤法	1979.11～12	17	6	35.3
免疫电镜法	1980.11～12	48	31	64.5
免疫电镜法	1981.10～12	32	20	60.2

表2　五种制样法比较检出轮状病毒的敏感度

标本份数	五种制样法的检出阳性数和阳性率（%）				
	直接滴膜	琼脂扩散过滤	超速离心	免疫电镜	快速免疫电镜
40	7 (17.4)	11 (27.4)	24 (60.0)	28 (70.0)	31 (77.5)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 患者粪便中检出病毒和血清中出现抗体的符合率

粪标本中查出轮状病毒	血清中出现轮状病毒抗体		
	阳性例数（%）	阴性例数（%）	共计
阳性例数	21(65.6)	0(0)	21(65.5)
阴性例数	6(18.8)	5(15.6)	11(34.4)
共计	27(84.4)	5(15.6)	32(100.0)

就32例病儿比较研究了他们粪便中轮状病毒的检出和恢复期血清中出现抗体的符合率。经免疫电镜法检查出21例病儿粪标本含有轮状病毒；27例病儿的恢复期血清中测出补结特异性轮状病毒抗体。两法同为阳性者21例；同为阴性者5例，共有26例完全相符，其符合率为81.2%。证明该病的流行确系轮状病毒引起。

二、血清学检查

收集了32例急性胃肠炎病儿的急性发病期和恢复期双份血清，28例只收集到单份恢复期血清。32例病儿双份血清中轮状病毒抗体滴度呈4倍以上升高者28例，另4例未见4倍升高但滴度水平较高；28例单份恢复期血清中有24例呈病毒抗体阳性，滴度在1:16～1:256。合计60例病儿血清中检出轮状病毒抗体者52例，阳性率为86.4%。

102例年龄在10岁以内无腹泻病史而患其他疾病的婴幼儿血清中也有63例检出轮状病毒补结抗体，滴度在1:4～1:128之间，其中约有80%阳性者是5岁以内的婴幼儿，而后，随年龄增加而阳性率相应递减，此说明重庆地区婴幼儿轮状病毒隐性感染相当普遍。

讨论

我们连续四年在重庆地区婴幼儿急性胃肠炎流行季节收集病儿粪标本117份(例)，电镜观察检出63例含有典型形态特征的轮状病毒，而粪标本经肠道病原细菌培养则为阴性；病儿发病早期和恢复期双份血清的特异性补结抗体4倍升高。据此，我们认为重庆地区于1978年至1981年四年中所流行的婴幼儿急性胃肠炎的病原主要是轮状病毒。

由轮状病毒引起的婴幼儿急性胃肠炎的病原学诊断目前仍以观察病毒形态或检测病毒抗原为主要手段。由于人类轮状病毒的分离培养相当困难，故用电镜直接检查可疑病人粪标本中有无轮状病毒对诊断甚为重要。然而，电镜样品制作法同标本中检出轮状病毒的阳性率密切相关。我们任选40例病儿粪标本平行比五种电镜样品制作方法的敏感度，证明快速免疫电镜法和免疫电镜法检出阳性率较高（70%以上）；其次为超速离心法（60%），而琼脂扩散过滤法和直接滴膜法较低（27%以下）。在作免疫电镜观察时我们注意到轮状病毒是否有血清型别。为此，我们从粪标本和血清标本中各选出数份，分别做过交叉免疫电镜试验，从结果看，四年中引起婴幼儿急性胃肠炎流行的轮状病毒之血清型似属同一型别。

参考文献

1. Estes MK, et al. Epidemic viral gastroenteritis. Am J Med 1979; 66:1001
2. 庞其芳，等。婴幼儿秋季急性胃肠炎病原—轮状病毒的研究。中华医学杂志 1979; 59:589
3. 王守良，等。从非细菌性婴幼儿急性胃肠炎病人粪便中发现轮状病毒。第三军医大学学报 1980; 1:50

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

A Study on the Etiology of Acute Infantile Gastroenteritis in Chongqing

Wang Shouliang, et al (Department of Microbiology, Third Military Medical College)

The etiology of acute infantile gastroenteritis in Chongqing area was studied during a 4-year period from 1978 to 1981. The morphologically characteristic rotavirus particles were found in the stool specimens of 63 cases out of 117; specific antibodies against rotavirus was demonstrated in the serum of 52 cases out of 60; and the titer on convalescent serum showed a 4-fold elevation as compared with the titer at the onset of the disease in 28 cases out of 32.

On the basis of these findings, it was concluded that the most common pathogen of acute infantile gastroenteritis in Chongqing area in the period from 1978 to 1981 was rotavirus, and the subclinical infection of this virus might be more common than it was.

Key words: Gastroenterits, acute, infantile/etiology; Rotavirus/ultrastructure

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net