

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.02.0212

• 短篇论著 •

西南地区部队官兵 55 型人腺病毒中和抗体的研究

刘媛¹, 王文博², 邹自英¹, 范泉水², 冯子良², 熊杰^{1*}

1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083

2. 成都军区疾病预防控制中心, 成都 610021

[摘要] **目的** 探究西南地区部队官兵 55 型人腺病毒 (HAdV55) 抗体流行情况, 并检测 HAdV55 抗体的中和活性, 为部队预防和控制 HAdV55 疫情提供参考依据。**方法** 收集西南地区部队官兵血清样本 325 份, 用 ELISA 法检测血清中 HAdV55 抗体, 通过体外中和实验检测抗体阳性血清中和 HAdV55 感染的活性。**结果** 西南地区部队官兵体内 HAdV55 抗体的阳性率较低, 325 份血清中抗体阳性仅有 19 份, 阳性率为 5.85%。19 份抗体阳性的血清中, 14 份在人喉癌上皮细胞系 Hep-2 具有中和活性, 中和效价最高为 1 : 64。**结论** 西南地区官兵体内 HAdV55 抗体水平较低, 抵抗 HAdV55 感染的能力较弱。因此一旦出现个别感染者, 部队应加强对 HAdV55 感染的预防和控制, 以防止感染的扩散。

[关键词] 腺病毒; 官兵; 中国西南地区; 血清; 中和抗体**[中图分类号]** R 373.1; R 843.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)02-0212-04

Study of neutralizing antibody against human adenovirus type 55 in soldiers of Southwest China

LIU Yuan¹, WANG Wen-bo², ZOU Zi-ying¹, FAN Quan-shui², FENG Zi-liang², XIONG Jie^{1*}

1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan, China

2. Center of Disease Control & Prevention of Chengdu Military Area Command, Chengdu 610021, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the prevalence and neutralizing activity of anti-human adenovirus type 55 (anti-HAdV55) among the soldiers in Southwest China, so as to provide reference for the prevention and control of HAdV55. **Methods** The sera of 325 soldiers in Southwest China were collected, and the anti-HAdV55 in serum was detected by ELISA. The neutralization activity of antibody positive serum was detected by neutralization test *in vitro*. **Results** The positive rate of anti-HAdV55 was low (5.85%, 19/325) among the soldiers in Southwest China. Of the 19 cases of positive serum, 14 cases were able to neutralize HAdV55 infection in human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2 cells) with the highest titer being 1 : 64. **Conclusion** The positive rate of anti-HAdV55 is low among the soldiers in Southwest China, which suggests the soldiers in Southwest China have a low resistance to HAdV55 infection. Once the individual infection is found, the troops should strengthen the prevention and control of HAdV55 infection to prevent the spreading of infection.

[Key words] adenovirus; soldiers; Southwest China; serum; neutralizing antibody

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(2): 212-215]

人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 属于腺病毒科 (*Adenoviridae*) 的哺乳动物腺病毒属 (*Mastadenovirus*)。根据不同的免疫学、生物学和生物化学特性可将其分为 7 个亚群 (A~G), 至今国际病毒分类委员会已经公布了 57 种血清型^[1]。引

起部队呼吸道疫情的主要是 B 亚群 HAdV 感染, 包括 B1 亚群的 3 型、7 型和 14 型及 B2 亚群的 55 型。其中 55 型是基于 HAdV-B14 型基因组骨架嵌合 HAdV-B11 型 *Hexon* 基因部分片段的重组新病毒, 近年来在我国已引起多起疫情^[2-4]。2016 年,

[收稿日期] 2017-06-29 **[接受日期]** 2017-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81301445), 全军后勤“十二五”重大专项(AWS11L009), 全军医学科技青年培育项目(14QNP057), 上海市医学生物防护重点实验室开放课题(SKLM1401)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81301445), Major Project of the “12th Five-Year Plan” of PLA (AWS11L009), Youth Training Project of Medical Science and Technology of PLA (14QNP057), and Opening Project of Key Laboratory of Medical Biodefense of Shanghai (SKLM1401)。

[作者简介] 刘媛, 博士, 主治医师。E-mail: liuyuan198231@163.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 028-86570510, E-mail: xiongjie1969@126.com

我军西南地区部队暴发多起 HAdV 感染的疫情, 所引起的呼吸道感染在营区传播, 严重影响部队日常训练等^[5-7]。

目前, HAdV 感染和其他病毒性感染疾病一样, 没有特效药物及疗效显著的治疗方法, 主要依靠机体自身免疫系统的抵抗。机体产生的 HAdV 抗体对同型 HAdV 具有长久、稳定的保护性。因此, 为进一步调查西南地区部队官兵体内 HAdV55 中和抗体状况, 本研究收集了来成都军区总医院体检和就诊的官兵血清, 筛查 HAdV55 抗体流行情况, 并检测 HAdV55 抗体的中和活性, 为部队预防和控制 HAdV55 疫情提供支持。

1 材料和方法

1.1 血清样本收集 收集 2016 年于成都军区总医院就诊和体检的西南地区部队官兵中非呼吸道疾病患者的血清样本, 血清分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存, 共 325 份, 其中男性 279 份、女性 46 份, 患者平均年龄为 (25.26 ± 6.12) 岁。

1.2 细胞与毒株 人喉癌上皮细胞系 Hep-2 由中国科学院细胞库提供, 本实验室保存培养。Hep-2 细胞用含 10% 胎牛血清、 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 $100\text{ U}/\text{mL}$ 青霉素的 DMEM 培养液, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养。HAdV55 毒株由本课题组前期分离培养鉴定^[8]。

1.3 主要试剂 胎牛血清、DMEM 培养液、青/链霉素、Invitrogen PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Millipore 超滤管购自默克化工技术(上海)有限公司; 常规 ELISA 试剂购自武汉基因美生物科技有限公司; HRP-羊抗人 IgG、生物化学试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.4 ELISA 法检测 将 HAdV55 病毒以 Millipore 超滤管(截留相对分子质量 $30\text{ }000$) 浓缩, 浓缩液用包被液 $1:5$ 稀释后包被 ELISA 板, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。弃包被液, 每孔加 5% 脱脂奶粉封闭液 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h , 洗板 1 次; 将待测血清用包被液以 $1:1\text{ }000$ 稀释, 每孔加稀释后的血清 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h , 取出酶标板, 洗板 3 次, 每次 5 min ; 每孔加酶标二抗(HRP-羊抗人 IgG, $1:5\text{ }000$ 稀释) $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min , 用洗涤液洗板 3 次, 每次 5 min ; 加底物显色 15 min 终止反应, 用酶标仪检测 450 nm 和 630 nm

波长处的光密度 (D) 值。

1.5 病毒滴度测定 取细胞以 $1\times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种至 96 孔板, 按照常规方法培养过夜。将 HAdV55 病毒按 $10^{-1}\sim 10^{-9}$ 梯度稀释, 每个稀释度设 8 孔, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 病毒液。持续培养 3 d 后观察细胞病变, 按照 Reed-Muench 公式计算病毒滴度。

1.6 血清毒性测定 按照 1.4 项下的方法将 Hep-2 细胞铺板, 培养过夜。将阳性血清样本先用 PBS 等比稀释, 过滤除菌, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min 。每份血清再按照原液、 $1:2$ 、 $1:4$ 、 $1:8$ 、 $1:16$ 和 $1:32$ 稀释后直接加入细胞板, 培养 3 d 后观察细胞生长状态。

1.7 血清中和实验 按照 1.4 项下方法将 Hep-2 细胞铺板, 培养过夜。分别取 ELISA 检测结果为阳性的血清样本, 先用 PBS 等比稀释, 过滤除菌, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min 。每份血清再按照原液、 $1:2$ 、 $1:4$ 、 $1:8$ 、 $1:16$ 和 $1:32$ 稀释, 与 100 倍半数组织培养感染剂量 ($50\%\text{ tissue culture infective dose, TCID}_{50}$) HAdV55 病毒等体积混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h , 接入 96 孔板, 每份标本感染 3 个孔, 同时设病毒对照和细胞对照组, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 条件下静置培养, 病毒对照呈现 70% 以上病变时判断结果。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行数据分析。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05 。

2 结果

2.1 血清 HAdV55 抗体阳性率 采用 ELISA 检测, 以标准血清为阴性对照, 抗体阳性判断标准为 $D_{450}/D_{630}\geq 2$ 倍阴性对照值。325 份血清样本中, 共检出 HAdV55 抗体阳性 19 份, 总体阳性率为 5.85% ; 其中男性阳性率为 5.37% ($15/279$), 女性阳性率为 8.70% ($4/46$), 男女间 HAdV55 抗体阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2=0.790$, $P=0.374$)。

2.2 血清中和抗体效价 采用 Reed-Muench 法得到 HAdV55 分离株的 TCID_{50} 为 2.5×10^5 , 将病毒稀释至 200 倍 $\text{TCID}_{50}/100\text{ }\mu\text{L}$ 备用。血清毒性实验结果显示, 19 份阳性血清中有 11 份在 $1:2$ 稀释浓度时细胞出现细胞病变效应 (cytopathic effects, CPE), 2 份血清在 $1:4$ 稀释浓度时细胞出现 CPE, 而 $1:8$ 及以下稀释浓度孵育的细胞均未出现 CPE, 因此采用 $1:8$ 作为稀释度进行血清中和抗体效价实验。

15份男性 HAdV55 抗体阳性血清在 1:8、1:16、1:32、1:64 稀释浓度时分别有 11、7、3、2 份具有中和 HAdV55 感染的能力,随着稀释度的增加血清中和活性降低。4 份女性 HAdV55 抗体阳性血清中,3 份在 1:8 稀释度时有中和活性,1 份在 1:16 和 1:32 稀释度时仍有中和活性,在 1:64 稀释度时均不能中和 HAdV55

感染。

19 例阳性血清中和实验细胞经结晶紫染色,随机选取部分结果如图 1 所示。1、2 号血清在各稀释度均不能中和 HAdV55 的感染,3、6、7 号血清在 1:16 稀释度时仍有中和活性,但在 1:32 稀释度时中和活性显著减弱,4、5 号血清在 1:64 稀释度时仍能够中和 HAdV55 感染。

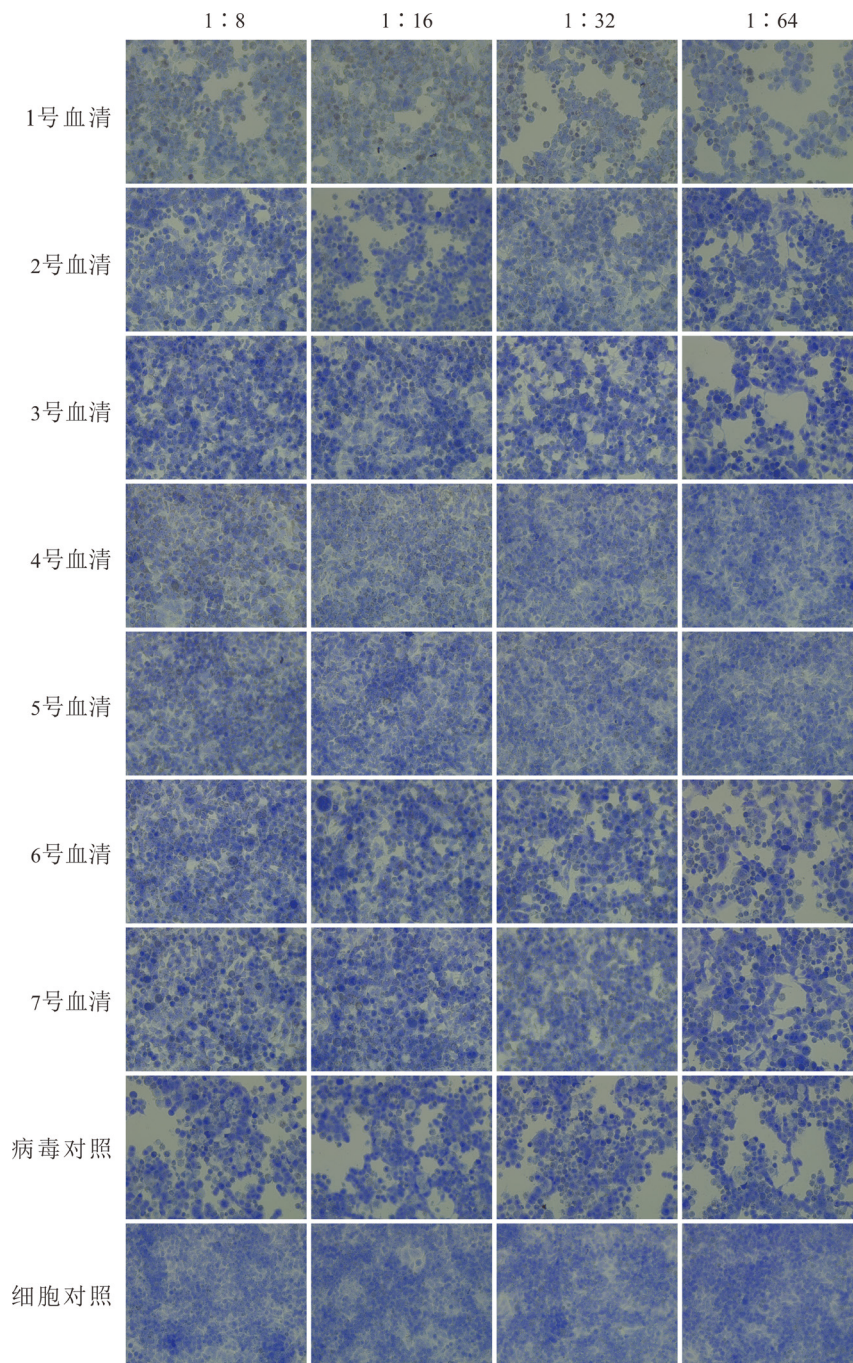


图 1 部分阳性血清各稀释度中和实验结果

Original magnification: ×100

3 讨论

HAdV 感染在全球范围内广泛流行,具有传染

性强、宿主范围广的特点。近几年,我国出现了多起 HAdV 感染的疫情,并且多发生于学校和部队。部队流行的 HAdV 感染以呼吸道感染为主,

主要包括3型、7型、14型和55型HAdV。尤其是HAdV55,其由11型和14型重组而来,2006年在我国首次报道。近几年,部队常暴发HAdV55呼吸道感染疫情。2016年,我军西南地区部队暴发3起HAdV55感染的疫情,其症状以发热、咽痛、咳嗽为主,部分感染者伴随肺部影像学表现,感染后实行严格隔离和对症治疗,从初次发病到治愈需2~3周时间。由于其传播特点,起初的个别HAdV感染者往往迅速通过飞沫传播给营区的其他战友,给部队的训练和战备造成了重大影响^[6]。

HAdV感染属于自限性疾病,病毒感染人体后,机体可激发自身免疫力清除病毒。其免疫反应包括先天免疫反应和获得性免疫反应,其中获得性免疫反应产生的HAdV抗体对同型腺病毒具有长久、稳定的保护性。HAdV感染分为地方性感染、流行性感染和散发性感染3种感染方式,随着我国疾病监控机构和网络的不断完善,大范围的暴发感染都能被检测到,但散发性感染很难被检测,另外部分HAdV感染者为隐性感染。因此检测人群血清中的抗体有助于合理制定HAdV感染的防控措施。盛慧英^[9]检测了普通人群血清中的3型、4型和7型HAdV中和抗体,发现从7~20岁组开始,3型、4型和7型HAdV中和抗体阳性率显著上升;在20~40岁组人群中3型、4型和7型HAdV中和抗体阳性率分别为78%、57.5%和49.6%。Yu等^[10]报道普通人群中5型HAdV中和抗体阳性率约为50%,HAdV中和抗体阳性水平与地区、型别、人群等有关。

因此,调查部队官兵体内HAdV抗体流行率有助于了解官兵HAdV感染史和对HAdV感染的抵抗能力,为部队今后采用合理方案提高官兵预防HAdV感染提供参考。本研究采用ELISA法筛查血清样本中HAdV55抗体的流行情况,并进一步分析血清对HAdV55的中和活性。结果发现,HAdV55抗体在部队官兵体内阳性率较低,总体阳性率为5.85%。同时,研究还采集了本地区健康体检者血清样本,检测HAdV55抗体阳性率为17.8%(48/270,未发表数据),提示部队官兵中HAdV55抗体阳性率低于地方人群。19份抗体阳性的血清样本中,14份有中和活性,在体外能够中和HAdV55的感染,说明大部分官兵此前很长一段时间内未被HAdV55感染过,他们在一定

程度上抵抗HAdV55感染的能力较弱。目前尚没有商品化的HAdV55抗体ELISA检测试剂盒,本实验采用了自制的ELISA检测试剂对部队官兵中HAdV55抗体的流行情况进行了检测,以血清标准品和HAdV55灭活病毒免疫小鼠血清进行前期验证实验,敏感性较好。本研究初步提示,西南地区官兵体内HAdV55抗体水平较低,一旦出现个别感染者,部队应加强对HAdV55感染的预防和控制,以防止感染的扩散。

[参考文献]

- [1] LIU J, NIAN Q G, ZHANG Y, XU L J, HU Y, LI J, et al. *In vitro* characterization of human adenovirus type 55 in comparison with its parental adenoviruses, types 11 and 14[J/OL]. PLoS One, 2014, 9: e100665. doi: 10.1371/journal.pone.0100665.
- [2] LU Q B, TONG Y G, WO Y, WANG H Y, LIU E M, GRAY G C, et al. Epidemiology of human adenovirus and molecular characterization of human adenovirus 55 in China, 2009–2012[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2014, 8: 302-308.
- [3] LI X, KONG M, SU X, ZOU M, GUO L, DONG X, et al. An outbreak of acute respiratory disease in China caused by human adenovirus type B55 in a physical training facility[J]. Int J Infect Dis, 2014, 28: 117-122.
- [4] 赵春洪,张志强,翟永志,陈歆,缪媛媛,刘昕,等. 青壮年腺病毒B组55型重症肺炎临床特征分析[J]. 解放军医学院学报,2014,35:663-666.
- [5] 赵瑞臣,高文文. 高原92例成人B组55型腺病毒感染治疗浅析[J]. 华南国防医学杂志,2016,30:470-471.
- [6] 古良琪,刘晓莉,赵伟,周奕帆,张林,李国凯,等. 拉萨部队55型腺病毒呼吸道感染暴发疫情调查分析[J]. 西南国防医药,2016,26:1350-1352.
- [7] 王文博,刘媛,周奕帆,古良琪,张雪莲,张林,等. 高原地区55型腺病毒的病原分离及全基因序列分析[J]. 军事医学,2017,41:453-456.
- [8] 刘媛,王文博,邹自英,冯子良,范泉水,熊杰. 快速获取55型腺病毒基因组序列的方法[J]. 微生物学通报,2017,44:2708-2713.
- [9] 盛慧英. 普通人群血清中的腺病毒中和抗体调查及3型腺病毒中和表位的鉴定和分析[D]. 广州:南方医科大学,2013.
- [10] YU B, WANG Z, DONG J, WANG C, GU L, SUN C, et al. A serological survey of human adenovirus serotype 2 and 5 circulating pediatric populations in Changchun, China, 2011[J/OL]. Virol J, 2012, 9: 287. doi: 10.1186/1743-422X-9-287.

[本文编辑] 尹茶