

婴幼儿肠道腺病毒研究进展

金玉 叶新华 方肇寅

【关键词】 肠道腺病毒; 病毒性腹泻

Progress on the study of enteric adenovirus in young children
JIN Yu*, YE Xin-hua, FANG Zhao-yin. *The First Hospital
of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Key words】 Enteric adenovirus; Viral diarrhoea

婴幼儿腹泻病是世界范围内影响儿童健康的常见病和多发病。病毒性腹泻是导致全球儿童急性重症腹泻的重要原因,此病也是发展中国家小儿死亡的主要疾病^[1]。肠道腺病毒(enteric adenovirus, EAdv)是 20 世纪 80 年代发现的一种新的导致婴幼儿腹泻的主要病原。近年来的研究表明 EAdv 在免疫缺陷患儿中可增加发病率和延长住院时间^[2],国内外有暴发或流行的报道^[3,4]。许多国家已将 EAdv 的检测列入腹泻病的常规检查。但我国目前对 EAdv 的基础、临床及流行病学的研究还比较缺乏。近年来,随着临床检测技术的提高,对其研究不断深入,危害性日益受到临床医生的重视。50 年代初,Rowe 等在切除的儿童腺体细胞培养物的自发性退行性病变中,首次发现腺病毒;1975 年 Flewett 等首次应用电镜技术,从急性胃肠炎患儿粪便中发现与婴幼儿胃肠炎直接相关的腺病毒。这些在电镜下观察到的大多数腺病毒,均不能在常规应用的腺病毒细胞培养系统中培养,这些腺病毒称之为肠道腺病毒^[5]。1981 年 Takiff 等首次用 Graham 293 细胞分离成功,推动了对 EAdv 的研究。1995 年程绪杰等^[6]首次在我国从腹泻患儿粪便中分离到 EAdv。现将 EAdv 的生物学特性、流行病学特点及临床表现及其检测技术等方面的研究现状作简要综述。

1. EAdv 的生物学特性:

(1)EAdv 的形态学与理化特征:与普通腺病毒相同,电镜下 EAdv 为直径 70~100 nm 的颗粒,中心为 40~45 nm 核心包裹的双链直线 DNA,长约 36 kb,外层为蛋白外壳,有 252 个壳粒,无脂溶性包膜。二十面体对称结构的 12 个顶角上均有 1 个子粒与相邻的 5 个子粒围绕构成五邻体。每个顶角子粒的基部都伸出 1 根带有顶球的纤维,长度 28~35 nm 不等,使病毒颗粒类似通讯卫星样而区别于其他病毒。EAdv 理化特性和增殖方式与普通腺病毒类似。不耐热,在 50~56℃ 很快灭活。在 36℃ 以下病毒较稳定,至少能存活 7 d,但是提纯的病毒颗粒在同样条件下相对不稳定。在 -70℃ 可长期保存。腺病毒耐酸,在 pH 值 1.5~3.0 经 24 h 还保留感染性,pH 值 11 时很快灭活。所有腺病毒对大

多数脂溶剂有抵抗力。增殖方式是在细胞核内装配,呈核内包涵体^[7]。

(2)抗原性与血清型:迄今为止人类腺病毒共有 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 EAdv。可以用组织培养的生长特性、DNA 限制性内切酶电泳图谱分析定型^[8],大多数哺乳动物腺病毒具有共同的群抗原,可用酶免疫试验(EIA)和免疫荧光法检测。用补体结合试验可检测该抗原的特异性抗体。腺病毒感染后,机体产生中和抗体、补体结合抗体及血凝抑制抗体。中和抗体能中和病毒,使其失去感染性,因此有保护作用,同型腺病毒再感染很少见。补体结合抗体无保护作用。Ad40、Ad41 型在氯化铯中浮密度为 1.71 g/cm³,同源型为 62%~69%。用补体结合试验可检测该抗原的特异性抗体。两型在抗原上密切相关,中和试验也有相当的交叉反应。不同血清型的腺病毒甚至同一血清型的不同株系会产生不同的酶切电泳图谱^[9]。EAdv 区别于普通腺病毒的抗原主要是六邻体表面与中和反应相关的抗原决定簇和纤维突起上的血凝素,EAdv 与普通腺病毒之间无交叉中和反应和血凝反应,它们具有与普通腺病毒相同的组特异抗原。EAdv 之间虽然有交叉的血凝抑制反应,但是在六邻体上的型特异性抗原却是有区别的,根据区别将它们分别定为 EAdv40 和 EAdv41 型。根据抗原特性及细胞培养和 DNA 限制性内切酶图谱分析,已公认将 Dugan-Hovix 病毒称为 Ad40 型, Tak 病毒称为 Ad41 型。

(3)EAdv 的生长特性:EAdv 不能象普通腺病毒细胞连续传代,虽然某些 EAdv 在初次接种到这些细胞系上时能产生腺病毒样细胞病变效应,有研究发现^[10],EAdv 不能在 KB 和 HeLa 细胞中生长,但却可以在张氏结膜细胞、Craham293、HT-29、Hep-2、第 3 代食蟹猴肾细胞中生长,但只有 Craham293 细胞对 EAdv 有较高的易感性^[11]。Craham293 细胞是经人腺病毒 5 型基因 E1A 和 E1B 转化的人胚肾(HEK)细胞,该细胞中表达的早期腺病毒 5 型基因产物对 EAdv 复制起辅助作用^[12]。

2. EAdv 流行病学特点:

(1)地区分布:EAdv 感染呈全球性分布,世界各地均有报道。各国的研究发现婴幼儿急性腹泻 EAdv 的发病率在 1.1%~12.0%^[13-15]。我国大陆自 1995 年报道小儿急性腹泻的粪便标本中 EAdv 的检出率为 4.3% 以来,1994~2003 年福州市的检出率(4.8%)与上海地区的检出率(4.7%)接近^[16,17]。但 2001 年深圳市 EAdv 的检出率为 10.8%,明显高于前者;其中 Ad40 型的感染率为 2.56%(5/195),Ad41 型

作者单位:730000 兰州大学第一医院儿科(金玉、叶新华);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所腹泻病室(方肇寅)

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)^[18]。以上结果表明我国的 EAdV 感染也很普遍。国外报道巴西 EAdV 阳性率 1.55% ($n = 1420$)^[19], 南非和博茨瓦纳(2%) 低于中国、沙特阿拉伯、新加坡, 阳性率分别为 2.5%、5.3%、3.0%^[20-24]。尼日利亚和伊朗分别为 6.7%、6.8%^[25], 印度尼西亚为 4% (11/273) 相对高一些^[26]。国内外对儿童腹泻患者中腺病毒感染率报道中我国南京地区较高, 分析原因可能与应用单克隆免疫法快速检测方法有关。2164 例检测腺病毒阳性率达 49.6%, 高于美国地区的 35.0% 及德国的 14.0% (18/129, 2003 年)^[27]。兰州大学第一医院采用 ELISA 方法对 2004 年 7 月至 2005 年 6 月住院的腹泻患儿进行腺病毒检测, 阳性率为 7.5% (30/400)。日本、韩国、越南的腺病毒分子流行病学研究结果显示, 腺病毒总感染率 4.4%, 发病率最高的是韩国 (8.7%, 20/231), 其次是日本 (5.0%, 100/1991) 和越南 (2.8%, 38/1355)^[28]。值得注意的是随着 Ad40 的减少 (6%, 12/158), Ad41 型相应的增加 (63.9%, 101/158); 与国内外相关报道一致。

(2) 季节分布: 各国的研究表明腺病毒肠炎无明显季节特点, 全年均可发病。我国的研究也证实了这一点, 秋冬季虽有增多但与其他月份相比无统计学意义。这与我国福州地区的报道一致^[16]; 国外研究也无明显季节性在瑞典全年可从粪便标本中分离到 EAdV, 但在夏季、冬末可出现两个小感染高峰^[19-22, 28, 29]。以 3、8、10-12 月份多见, 印度尼西亚以 4 月份为相对高峰期^[22], 但总体无明显趋势。

(3) 年龄分布: EAdV 主要侵犯 5 岁以下儿童, 85% 以上 EAdV 感染者为 3 岁以下, 70% Adv 感染者为 2 岁以下儿童^[30], 国内的研究显示, 腺病毒腹泻 2 岁以下发病占总病例数的 86.7%。福州地区易感人群为 1.6 岁以内, 特别是 1 周岁以内的婴儿, 与国外报道一致^[25]。Leili 等^[28] 的研究则表明, 所有腺病毒感染的急性腹泻患儿 < 36 月龄, 高峰年龄是 24~36 月龄, 发病率随超过 36 月龄而减少。

(4) 性别差异: 国内外的研究表明 EAdV 发病男女性别间差异无统计学意义。

3. 实验室检查:

(1) 电镜和免疫电镜: 粪便中病毒颗粒多, 腺病毒形态独特, 易于辨认, 但不能分型, 且要求条件高、费时、灵敏度不高, 不适用于流行病学调查。免疫电镜技术的运用提高了检测灵敏度, 并且能区分不同的血清型。

(2) 细胞培养: EAdV 可在张氏结膜细胞、Craham293、HT-29、Hep-2、第 3 代食蟹猴肾细胞中生长, 但只有 Craham293 细胞对 EAdV 有较高的易感性。

(3) 血清学实验: ①中和试验: 是检测腺病毒的经典方法, 可对腺病毒分型, 但该方法需要的病毒量大, 需用特异性抗体; ②补体结合试验: 不能确定腺病毒基因的特异性; ③血凝抑制试验 (HIA): 测定 EAdV 的特异性较高, 但不能对其进行分型。

(4) 免疫学实验: ①酶联免疫吸附试验 (ELISA): 试验的

特异性和敏感性较高且快速、特异、操作简便, 与 HIA 联合用于检测 EAdV 及对腺病毒进行分型; ②免疫斑点法 (DIA): 是一种新的固相免疫鉴定技术, 比 ELISA 和 IFA 更为简便快捷、经济且易于推广, 适用于腺病毒性腹泻患者的快速诊断及其流行病学调查^[31]。

(5) 分子生物学检测方法: ①DNA 分子杂交法: 是最新的微生物检测方法, 已用于 EAdV 的检测和分型, 该法特异性高, 不依赖细胞分离病毒, 诊断迅速, 但 DNA 探针制备过程复杂, 技术要求高, 且标记物 ³²P 的半衰期短; ②基因电泳: 取腺病毒细胞培养物或急性腹泻的粪便标本提取腺病毒 DNA, 用限制性内切酶消化后进行琼脂糖电泳, Ad40 和 Ad41 型可出现独特的酶切图谱; 用琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行腺病毒 DNA 酶切图谱分析, 其意义不仅在于提供一个特异性诊断, 而是提供了不同毒株的有关生化性质的资料; 十二烷基硫酸钠 (SDS)-PAGE 操作简便, 不需制备特异性的抗血清, 36 h 可得出结果, 其特异性高、敏感性高, 可用于腺病毒肠炎的流行病学调查, 但该方法不能对腺病毒分型。③聚合酶链反应 (PCR): PCR 是由一对人工合成的寡核苷酸引物介导, 以待扩增的 2 条 DNA 链为模板体外酶促合成特异目标 DNA 的方法, 方法简单、快速, 灵敏度和特异性都较高。采用 PCR 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法对腺病毒进行分型, 主要是通过 3 种限制性内切酶对 PCR 产物消化酶切后电泳图谱分析。另外对不同的基因型还可以通过对核苷酸序列的测定来分析它的遗传特点。荧光 PCR (real-time PCR) 是目前最先进的检测方法, 在传统 PCR 的基础上加上了荧光探针技术改善了结果的特异性和敏感性, 并可以对检测物质进行量化, 该方法现已用于对 EAdV 检测^[32]。

4. 临床表现: 不同亚群腺病毒感染所出现的症状有所不同, 研究发现腺病毒 3、4、7、8、19、37 可以出现腹泻症状^[28]; 人类 EAdV 感染的主要症状是腹泻, 水样便, 同时伴有发热、呕吐, 大多数患儿有轻至中度脱水, 可伴有呼吸道症状^[33]。EAdV 感染所出现的呕吐更频繁, 其中 Ad41 感染者腹泻持续时间较长。EAdV 感染潜伏期约为 3-10 d, 粪便排毒可持续 10 d^[34]。腺病毒肠炎一般较轻, 预后较好, 但严重时也可因脱水而死亡。

5. 预防: 腺病毒能在哺乳动物胃肠道中复制, 并可在污水和灰尘中存活, 主要经粪-口途径传播。亦可通过呼吸道传播。四季均可发病。因此, 控制腺病毒胃肠炎的主要措施是防止水污染, 养成良好卫生习惯, 注意环境卫生是预防的关键。腺病毒疫苗曾在军队中用于预防新兵的腺病毒感染, 但后来被发现存在许多问题而停止使用。目前尚没有研制出针对 EAdV 的疫苗, 故寻找和开发新的有效安全腺病毒疫苗是未来工作的重点之一。要全面认识我国 EAdV 感染的临床及流行病学特点, 还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(5):565-572.
- [2] De Jong JC. Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 and other adenoviruses in immunocompetent and immunodeficient individuals. *Perspect Med Virol*, 2003, (9):407-445.
- [3] VanR Wuncc, O' Ryan ML, Matson DO, et al. Outbreaks of human enteric adenovirus type 40 and 41 in Houston day care center. *J Pediatr*, 1992, 120(1):516-521.
- [4] 曹卫中, 曹康生. 一起肠道腺病毒引起的感染性腹泻暴发. *中国公共卫生*, 2004, 20(1):85.
- [5] Kidd AH, Medalay CR. In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *J Clin Pathol*, 1981, 34(2):213-216.
- [6] 程绪杰, 王树惠, 张云, 等. 我国肠道腺病毒的分离与鉴定. *中国医学科学院学报*, 1995, 17(1):16-19.
- [7] 杨占秋, 余宏. *临床病毒学*. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 205.
- [8] Vander AH, Wermenbol AG, Zomerdijk TP, et al. Characterization of adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralization with monoclonal antibodies. *Virus Research*, 1989, 12(2):139-157.
- [9] Toogood CI, Murali IR, Burnett RM, et al. The adenovirus type 40 hexon: Sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *General Virol*, 1989, 70(12):3203-3214.
- [10] Wadell GC. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1984, 110:191-220.
- [11] Noel J, Mansoor A, Thaker U, et al. Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the Hospitals for Sick Children, London, 1989 - 1992. *J Med Virol*, 1994, 43(1):84-90.
- [12] Wood DJ, Bijlsma K, deJong JC, et al. Evaluation of a commercial monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1989, 27(6):1155-1158.
- [13] Shinozaki T, Araki K, Fujita Y, et al. Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children in the Tokyo area. *Scand J Infect Dis*, 1991, 23(5):543-547.
- [14] Barnes GL, Uren E, Stevens KB, et al. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. *J Clin Microb*, 1998, 36(1):133-138.
- [15] Caeiro JP, Mathewson JJ, Smith MA, et al. Etiology of outpatient pediatric nondysenteric diarrhea: a multicenter study in the United States. *Pediatr Infect Dis J*, 1999, 18(2):94-97.
- [16] 吴志潮, 陈俊杨, 蔡忠钦, 等. 福州市儿童肠道腺病毒感染调查与研究. *海峡预防医学杂志*, 2004, 10(5):39.
- [17] 夏绿蒂, 张耀金, 丁韵珍, 等. 肠道腺病毒 ELISA 的建立及其临床应用. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1992, 6(1):54.
- [18] 何雅青, 杨洪, 林奕芝, 等. 深圳市婴幼儿腹泻中肠道腺病毒感染的特点调查. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(2):96-98.
- [19] Soares CC, Volotao EM, Albuquerque MC, et al. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol*, 2002, 23(3):171-177.
- [20] Basu G, Rossouw J, Sebanga TK, et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East African Med J*, 2003, 80(12):652-655.
- [21] Akhter J, Burdette JM, Qadri SMH, et al. Aetiology of gastroenteritis at a major referral centre in Saudi Arabia. *J Int Med Res*, 1999, 22(1):47-54.
- [22] Qiao H, Nilsson M, Abreu ER, et al. Viral diarrhea in children in Beijing, China. *J Med Virol*, 1999, 57(4):390-396.
- [23] Mendis L, Kumarasinghe G, Chow C, et al. Bacteria, viruses, yeasts and protozoans associated with diarrheal disease in Singapore. *Pathology*, 1995, 27(1):48-52.
- [24] Audu R, Omilabu SA, Peenze I, et al. Viral diarrhoea in young children in two districts in Nigeria. *Central African J Med*, 2002, 48(5-6):59-63.
- [25] Subeketi D, Lesmana M, Tjanjadi P, et al. Incidence of Norwalk-like virus, rotavirus and adenovirus infection in inpatients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, 133(1):27-33.
- [26] 郭敏, 戈建军, 李敬顺, 等. 单克隆免疫法快速检测轮状病毒和腺病毒. *江苏预防医学*, 2004, 15(1):61-62.
- [27] Wigand R, Adrian T. Diagnostik von adenovirus infections nen. *Internist*, 1985, 26(2):109-112.
- [28] Leili, Tang GP, Tuan AN, et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(2):121-128.
- [29] Uhnou I, Wadell G, Sevansson L, et al. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol*, 1984, 20(3):365-372.
- [30] Jarekl, Khan K, Unicomb LE. Seroprevalence of enteric and nonenteric adenoviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(10):2733-2734.
- [31] 苏东梅, 岳长青, 孟林, 等. 免疫斑点法对病毒性腹泻病人腺病毒抗体的检测. *青岛大学医学院学报*, 2003, 39(1):34-35.
- [32] JianWen H, Sunny J. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied Environ Microbiol*, 2005, 5(71):2250-2255.
- [33] Lin HC, Kao CL, Lu CY, et al. Enteric adenovirus infection in children in Taipei. *J Microbiol Immunol Infect*, 2000, 3(33):176-180.
- [34] Albert M. Enteric adenoviruses: a brief review. *Arch Virol*, 1996, 88(1):1-17.

(收稿日期:2006-04-13)

(本文编辑:尹廉)