

[4] 周文芳. 血浆中氨基酸检测技术探讨[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(3): 25-28.

[5] 陈惠云, 孙志栋, 俞静芬. 利用离子色谱法检测笋制品中氨基酸含量的方法研究[J]. 宁波农业科技, 2009, 4(1): 5-8.

[6] 黎君友, 赖业馥, 孙丹, 等. 烧伤对兔血红细胞内游离氨基酸浓度的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(2): 41-43.

[7] 郑家概, 牟德海, 马丽果, 等. 血浆中游离氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(5): 131-132.

[8] 冯雷, 陈章玉, 王保兴, 等. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定烟草中的游离氨基酸[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(S1): 241-245.

[9] 杨扬, 秦强, 郭伟忠. 苯基异硫氰酸酯衍生氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1994, 8(4): 295-296.

[10] 唐志毅, 许维桂, 杨振华, 等. 体液游离氨基酸反相高效液相色谱测定法[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(3): 140-143.

[11] 李芳, 史霄燕. 2,4-二硝基氯苯衍生法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱, 1995, 9(3): 200-202.

[12] 李恒, 刘志红, 崔敏, 等. 氨基酸尿检测方法在肾脏疾病中的应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(3): 254-259.

[13] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 58-64.

[14] 黎君友, 郭振荣, 盛志勇. 烧伤患者血浆游离氨基酸的变化及意义[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(2): 127.

[15] 吴森秋, 柴家科, 黎君友, 等. 大鼠严重烫伤早期血浆游离氨基酸浓度的变化[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(4): 215-218.

[16] 黎君友, 孙丹, 赖业馥. 烧伤患者血浆和红细胞游离氨基酸变化及输注氨基酸对其变化的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 24(3): 55-58.

[17] 王杨军. 日立 835 氨基酸自动分析仪的原理及维修[J]. 现代科学仪器, 2000, 10(6): 53-55.

[18] 王洪健, 周兴起, 冯志强, 等. 氨基酸自动分析仪测定食品中牛磺酸的方法建立[J]. 现代食品科技, 2012, 28(3): 348-350.

[19] 刘阳, 倪君君, 相婷, 等. 直接注入式串联质谱法测定氨基酸含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 118-123.

[20] 段满乐, 伦立民. 缺血性脑血管疾病患者血浆氨基酸递质的测定及其意义[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(12): 1256-1257.

(收稿日期: 2013-05-21 修回日期: 2013-07-03)

腺病毒及其检测技术研究进展*

潘庆军¹综述, 朱学芝²审校(1. 广东医学院附属医院, 广东湛江 524023; 2. 广东粤海饲料集团有限公司, 广东湛江 524017)

【关键词】 腺病毒; 分类; 致病性; 检测技术
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 24. 061 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)24-3362-03

腺病毒(ADV)是一群分布十分广泛的具有双螺旋 DNA 基因组的病毒, 相对分子质量为 $(20\sim30)\times10^6$, 属于 ADV 科, 被划分为生物安全标准 2 级(BL2)。ADV 种类较多, 大部分具有临床致病性。基于不同检测技术原理的 ADV 检测试剂对 ADV 感染引起的疾病的诊断和早期预防都有重要意义。此外, ADV 已经作为一种模式生物在研究, 其应用范围相当广泛, 如基因治疗领域及疫苗载体领域等^[1-2]。本文谨对当前最新的 ADV 分类及其致病性和 ADV 检测方法和试剂的研究现状作一综述。

1 ADV 分类及致病性

ADV 颗粒直径 60~90 nm, 没有囊膜, 20 面体立体对称, 衣壳由 252 个微粒组成, 包括 240 个六邻体壳微粒和位于 20 面体顶端的 12 个微粒是五邻体。其中的 240 个壳微粒是六邻体是病毒的主要抗原性蛋白, 含有型, 型间, 属特异性抗原表位及中和性表位等大量的抗原表位, 也是群特异性抗原^[3], 具有组特异性 α 抗原, 目前已经对其结构和功能进行了广泛研究^[3-4]。位于 20 面体顶端的 12 个微粒是五邻体, 每个五邻体由基底和伸出表面的一根末端有顶球的纤维组成。基底具有毒素样活性, 能引起细胞病变, 并使细胞从生长处脱落, 具有同组共有的 β 抗原。纤维与病毒凝集大白鼠或恒河猴红细胞活

性有关, 是型特异性 γ 抗原所在。并且在壳体周围没有脂质体外鞘, 而是直接作用于宿主细胞能引起人类呼吸道、胃肠道、泌尿系统及眼的疾病, 少数对动物有致癌作用。

ADV 血清型的确定是根据感染性中和反应, 直接针对六邻体蛋白的中和抗原决定簇, 血清型又根据核苷酸的同源性、纤维蛋白的特性及生物学特性^[3, 5]。目前鉴定的有 57 个血清型(HADV 1~57), 分为 7 个亚属: A(12、18、31), B(3、7、11、14、16、21、34、35、50、55), C(1、2、5、6、57), D(8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、36、37、38、39、42、43、44、45、46、47、48、49、51、53、54、56), E(4), F(40、41)和 G(52)。主要基于免疫学标准的人血清型划分, 已经由于历史原因而成为 ADV 分类的基础, 中和试验和血凝抑制试验可鉴定 ADV 型别。

ADV 是引起人类呼吸道和消化道感染的重要病原之一, 其中, C、E 和部分 B 亚属是呼吸道疾病的主要病因, 其他 B 亚属 ADV 引起尿路感染, A 和 F 亚属引起消化道感染, D 亚属是角膜炎、结膜炎的主要病因^[6]。F 和 G 亚属为肠道 ADV。由 ADV 感染造成疾病的严重程度还取决于感染个体的年龄和免疫状态^[7]。

人群中 ADV 可分布于人的腺体组织、扁桃体和肠系膜淋

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202346); 广东省自然科学基金资助项目(S2012040006216)。

巴结等处,这组病毒的某些血清型 ADV,如 3、4 和 7 型等对人类特别是婴幼儿可引起呼吸道疾病。临床上婴幼儿急性上呼吸道感染约 5% 由 ADV 引起,成人感染很少发生于呼吸道。传播以粪-口为主要途径,也可通过呼吸道或污染物品传播。在小于 5 岁的儿童急性呼吸系统疾病中 ADV 引起的肺炎较为严重。在大规模流行时,其所导致的病死率较高^[8]。在人类 ADV 感染中大约 50% 引发相关症状。ADV 可致轻重不等的上呼吸道感染,如鼻咽炎、咽炎、咽结膜炎滤泡性结膜炎。如流行性角膜炎(常为血清型 ADV5、8、19 和 37 型)和咽结膜热(常为血清型 ADV3、4 和 7 型)以及婴儿肠胃炎等,也可引起肺炎流行,3、7 型 ADV 可持续存在于上呼吸道腺体中,且可引起致死性肺炎^[9-12]。多通过呼吸道传播,尤其在集体托幼机构中,其中 3、7 及 11 型致病者多见^[11]。ADV 对酸碱度及温度的耐受范围较宽,36 ℃ 7 d 病毒感染力无明显下降。ADV 对脂溶剂和酶类均有一定抵抗作用,但 56 ℃ 30 min 可将其灭活。我国尚缺少系统的 ADV 感染流行病学调查,要全面认识我国 ADV 感染的临床及流行病学特点,还有待进一步深入研究,也依赖于准确可靠的检测方法。

2 ADV 检测方法和试剂

由于 ADV 的种类及感染后致疾病的多样性,亟需特异性抗原与抗体检测进行鉴别诊断。ADV 特异性抗原和抗体的检测方法的开发,对及时有效的诊断及控制感染原和传播原有决定性作用。组织培养法、免疫学检测和分子生物学检测等是目前临床和实验室检测常用的经典方法。

当前,ADV 检测的产品采用的技术方法包括基于免疫学抗原抗体反应的有免疫荧光法、胶体金法、酶联免疫吸附试验(ELISA);基于分子生物学检测特异核酸序列的方法包括聚合酶链反应(PCR)系列方法,如普通 PCR、实时荧光定量 PCR 和 PCR-ELISA 等。相对来说,免疫荧光法检测试剂的操作方法略为复杂,检测结果需要使用荧光显微镜观察,其结果具有一定的主观性;胶体金法检测试剂的特点是操作方法简单,结果判断直观,方便快捷,特异性比较强,但灵敏度低;ELISA 检测试剂和胶体金法检测试剂相比,特异性相当,操作略为复杂,但检测的灵敏度明显要高;化学发光法和时间分辨法是当前检测的主流方法;PCR-ELISA 检测试剂结合了 PCR 和 ELISA 技术的特点,具有高灵敏度和特异性,但易发生污染。这些产品及其检测技术各有优缺点,在特异性、灵敏度、方便快捷、经济实用等方面都存在不同问题。

以上检测方法进行开发的检测试剂种类和生产厂家较多,但质量参差不齐。基于免疫学检测原理的产品主要受限于各型 ADV 特异抗原的鉴别和制备,而分子生物学检测试剂依赖于特异引物的比对和设计。准确、快速检测试剂对于开展 ADV 的检测和其感染性疾病的辅助诊断至关重要。ADV 检测试剂除了用于医疗机构临床辅助诊断外,还广泛用于各级疾病预防和控制中心、出入境口岸、动物防疫系统。

2.1 组织培养法 最经典的分离鉴定方法,从急性期患者咽、直肠、结膜等处获取标本,迅速接种敏感细胞(Hela、Hep-2 等),根据特征性细胞病变及抗原性进行 ADV 鉴定。大部分 ADV 可连续细胞传代,但肠道 ADV 不能在 Hela 细胞内传代,而对 Craham293 有较高的易感性。同时,ADV 不能在鸡胚中增殖。组织培养法依赖于良好的组织培养技术规范和典型细胞病变特征及其他辅助手段。主要应用在科研教学方面,不太适合大规模、快速、准确的临床检测需求。

2.2 免疫学检测 基于特异的抗原抗体反应,直接用生物分析传感技术如基于表面等离子共振开发的生物大分子相互作

用分析仪等进行检测,或通过间接指示方法,如用过氧化物酶(辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、放射性元素(¹³¹I、¹⁴C 等)、稀土金属镧系元素(如铈、钐、铈、铽等)等标记抗原或抗体,再用酶反应底物,自显影或仪器显示标记元素的物理状态变化来表示有特异的抗原抗体反应发生,如 ELISA 和时间分辨等检测方法。目前已有多个基于抗原抗体特异反应的免疫学商品化检测试剂盒。

2.2.1 血清学检测 血清学检测包括不同亚型 ADV 特异 IgM、IgG 和 IgA 抗体的定性或定量检测,通常对以 8~10 d 为间隔采集的 2 份血样进行检测比较,如果发现后 1 份血样抗体浓度有显著提高(如增加 4 倍),则表明为 ADV 急性感染。而不同亚型 ADV 特异抗体检测,其关键在于 ADV 高度保守蛋白的鉴别和制备。具有定量功能的标准化 ELISA 等技术的发展对提高单一血样检测评估的可靠性具有重要作用。

常用的检测模式以 ELISA 法为例,主要有间接法和捕获法。间接法即包被 ADV 特异亚型抗原,加入标本反应,再与标记的抗 IgM、IgG 或 IgA 抗体反应进行检测的模式,检测抗体较少,如 IgM 抗体,则需要中和去除 IgG 抗体,防止特异的 IgG 抗体竞争性地与有限的抗原反应,抑制 IgM 抗体的反应效率,进而导致假阴性,国外厂家多采用该模式。捕获法即先捕获所有的 IgM 抗体,再与标记的 ADV 特异亚型抗原反应的模式,国内厂家多采用该模式。

2.2.2 抗原检测 获取急性期患者咽、直肠、结膜等处标本,利用双抗体夹心 ELISA 或胶体金(免疫层析快速检测试剂条)等检测 ADV 抗原,通常该抗原为病毒优势种类的特异性抗原表位,ADV 的特异性抗原表位主要是六邻体蛋白。临床 ADV 感染对于呼吸系统 ADV 的感染,其亚型特征一般不需要区分。抗原检测试剂的研发主要受制于有无高效特异的单克隆抗体以及用来评价检测试剂特异性和灵敏度的临床标本。近年来发展起来的基于抗原抗体反应的实时在线监控的生物分析传感技术,在提高检测灵敏度的同时,可实时获得检测结果^[13-14]。

常用的检测模式以 ELISA 为例,主要有双、单抗夹心法和单多抗夹心法。以双、单抗夹心法为主,但不同厂家所采用的单抗识别的 ADV 抗原表位不完全一致,导致不同厂家试剂的检测结果有所不同。严谨的质控体系和大样本的临床试验有助于该问题解决。

2.3 分子生物学检测 利用特异性引物以及探针对 ADV 核酸进行检测和亚属分型,包括普通 PCR、实时荧光定量 PCR 等方法,是一种快速、特异、敏感、高效的手段^[15-16]。最近,有学者基于特异的引物序列对临床分离的 3 型 ADV 进行测序,而且已开始作为疫苗候选载体^[17-19]。还包括 7、14 和 55 型^[20-22]临床分离的 ADV 等进行了测序,为临床分离的 ADV 分子生物学检测和基础研究提供了完备的背景资料。

另外 PCR 与限制性片段长度多态性技术、原位杂交技术、免疫荧光技术等结合应用,也为临床 ADV 检验技术的发展开辟了广阔的前景。目前 PCR 在 ADV 感染诊断检测中的应用正不断发展和深入。

3 存在的问题

近年,在 ADV 检测试剂研发方面,国外研究机构处于领先地位,而国内企业和研发机构已开始启动,但进展缓慢,主要是病毒学研究基础较弱,受标准品、抗原研制和临床样本收集的限制较大。

国内 ADV 检测试剂相关产品的产业化开发,包括注册号和生产批文申报以及产业化生产销售必须的产品特异性、敏感

性、重复性、稳定性、放大制造工艺和企业标准品研究,三批生产和企业自检、国家抽样检定,3 家临床单位应用考核,新药申报材料编写和新药证书申报等多道规范化程序仍是制约该产业发展的瓶颈问题。这与国内严峻的呼吸道疾病的临床现状严重脱节,这方面的基础研究和临床检测试剂开发仍需进一步加强。

参考文献

- [1] Naskalska A, Szolajska E, Chaperot L, et al. Influenza recombinant vaccine: matrix protein M1 on the platform of the adenovirus dodecahedron[J]. Vaccine, 2009, 27(52): 7385-7393.
- [2] Potter RN, Cantrell JA, Mallak CT, et al. Adenovirus-associated deaths in US military during postvaccination period, 1999-2010[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(3): 507-509.
- [3] Thomson D, Meers J, Harrach B. Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (Trichosurus Vulpecula)[J]. Virus Res, 2002, 83(1-2): 189-195.
- [4] Imai Y, Kameya S, Ohkoshi M, et al. Identification of the hexon region of an adenovirus involved in a new outbreak of keratoconjunctivitis[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2975-2977.
- [5] Law LK, Davidson BL. Adenovirus serotype 30 fiber does not mediate transduction via the coxsackie-adenovirus receptor[J]. J Virol, 2002, 76(2): 656-661.
- [6] Hiroi S, Izumi M, Takahashi K, et al. Isolation and characterization of a novel recombinant human adenovirus species D[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt8): 1097-1102.
- [7] Stroparo E, Cruz CR, Debur MC, et al. Nogueira Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2010, 52(6): 317-321.
- [8] Ingenito EP, Loring SH, Moy ML, et al. Comparison of physiological and radiological screening for lung volume reduction surgery[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(5): 1068-1073.
- [9] Lin KH, Lin YC, Chen HL, et al. A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the resurgence of adenovirus types 7 and 4[J]. J Med Virol, 2004, 73(2): 274-279.
- [10] Hatherill M, Levin M, Lawrenson J, et al. Evolution of an adenovirus outbreak in a children's hospital[J]. J Paed Child Health, 2004, 40(8): 449-454.
- [11] Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, et al. Molecular and

epidermological analysis of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 140-145.

- [12] Xu W, Zheng S, Dweik RA, et al. Role of epithelial nitric oxide in airway viral infection[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(1): 19-28.
- [13] Vo-Dinh T, Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics[J]. Fresenius J Anal Chem, 2000, 366(6-7): 540-551.
- [14] Tolba M, Ahmed MU, Tlili C, et al. A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of Listeria cells[J]. Analyst(Lond), 2012, 137(24): 5749-5756.
- [15] Aberle SW, Aberle JH, Steininger C, et al. Adenovirus DNA in serum of children hospitalized due to an acute respiratory adenovirus infection[J]. Infect Dis, 2003, 187(1): 311-314.
- [16] Seto D, Chodosh J, Brister JR, et al. Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses[J]. J Virol, 2011, 85(11): 5701-5702.
- [17] Zhang Q, Su X, Gong S, et al. Comparative genomic analysis of two strains of human adenovirus type 3 isolated from children with acute respiratory infection in southern China[J]. J Gene Viro, 2006, 87(Pt6): 1531-1541.
- [18] Li H, Zhou R, Chen J, et al. A recombinant replication-defective human adenovirus type 3: A vaccine candidate[J]. Vaccine, 2009, 27(1): 116-122.
- [19] Seto J, Walsh MP, Mahadevan P, et al. Applying genomic and bioinformatic resources to human adenovirus genomes for use in vaccine development and for applications in vector development for gene delivery[J]. Viruses, 2010, 2(1): 1-26.
- [20] Su X, Tian X, Zhang Q, et al. Complete genome analysis of a novel E3-partial-deleted human adenovirus type 7 strain isolated in Southern China[J]. Virol J, 2011, 4(8): 88-91.
- [21] Zhang Q, Seto D, Zhao S, et al. Genome sequence of the first human adenovirus type 14 isolated in China[J]. J Virol, 2012, 86(12): 7019-7020.
- [22] Zhang Q, Seto D, Cao B, et al. Genome sequence of human adenovirus type 55, a re-emergent acute respiratory disease pathogen in China[J]. J Virol, 2012, 86(22): 12441-12442.

(收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-08-15)

侵袭型真菌性鼻窦炎及其分型的临床研究

王 江 综述, 毛俊明 审校(重庆市綦江区中医院五官科 401420)

【关键词】 真菌性鼻窦炎; 临床分型; 临床特征; 治疗原则

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 24. 062 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)24-3364-02

对于真菌性鼻窦炎的分型一直是临床研究的热点之一, 临床认为准确对其进行分型能够协助制订最佳治疗方案及早期

进行预后评估。传统上根据真菌的病理学改变及其免疫功能状态可分为侵袭型(IFRS)与非侵袭型(NIFRS); 后来 Fergu-