

2015 年广州市孕产妇人类 T 淋巴细胞病毒 I 型感染情况及其基因分型研究

程婷婷¹, 张炼², 周艳霞¹, 蔡晓懿¹, 罗红凤¹, 聂述山¹

1. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510623; 2. 深圳市宝安区妇幼保健院, 广东 深圳 518133

摘要: **目的** 了解广州市分娩产妇母乳中人类 T 淋巴细胞病毒 I 型(human T-cell leukemia virus type I, HTLV-I)感染情况及其流行特征。 **方法** 收集 2015 年 1-12 月期间广州市妇女儿童医疗中心产科分娩后 1~3 d 内的初乳乳汁, 共 1 900 份样本, 通过 ELISA 方法初筛和 PCR 扩增的方法检测 HTLV-I 抗体, 对阳性样本扩增 HTLV-I 膜基因的 gp46 片段, 进行测序分析, 确定 HTLV-I 亚型。并对阳性母乳进行冻融或巴氏消毒处理, 利用免疫荧光方法检测处理后母乳中 HTLV-I 病毒载量的变化情况。 **结果** 1 900 名分娩产妇中, 有 4 名孕产妇感染 HTLV-I 病毒, 感染阳性率为 0.21%。经过序列分析发现, 4 名分娩产妇均感染 HTLV-I C 亚型流行株。免疫荧光检测结果显示, 4 份 HTLV-I 阳性乳汁样本未处理前的病毒载量分别为 (18.34±1.23)、(17.43±1.41)、(19.67±1.65)、(17.90±1.54); 经冻融处理后病毒载量分别为 (1.02±0.09)、(1.04±0.12)、(1.07±0.08)、(1.03±0.11); 经巴氏消毒处理后病毒载量分别为 (1.04±0.13)、(1.02±0.07)、(1.03±0.13)、(1.06±0.14)。阳性乳汁样本未处理前的病毒载量均高于经巴氏消毒处理后或经冻融处理后病毒载量, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** 广州市孕产妇存在 HTLV-I C 亚型感染, 流行株与我国其他地区一致, 无新的变异亚型产生。经过冻融或巴氏消毒处理后的母乳中 HTLV-I 病毒载量显著降低。建议 HTLV-I 感染的产妇应避免直接进行母乳喂养, 或将阳性产妇乳汁进行冻融处理后喂养。

关键词: HTLV-I; 孕产妇; 免疫荧光; 病毒载量

中图分类号: R373 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)04-0462-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.021

人类 T 淋巴细胞病毒 1 型(human T-cell leukemia virus type I, HTLV-I)是一种逆转录病毒, 是成人 T 细胞白血病/淋巴瘤 (adult T-cell leukemia, ATL) (一种侵袭性 CD4⁺/CD25⁺ T 细胞) 的病原体^[1-2]。HTLV-I 也可引起 HTLV-I 相关性脊髓病/热带痉挛性下肢轻瘫的慢性炎症性疾病^[3-4]。据估计, 全世界至少有 2 000 万人感染 HTLV-I, 大多数病例在日本西南部, 加勒比海盆地, 撒哈拉以南非洲地区和巴西^[5-6], 大约 3%~5% 的 HTLV-I 携带者在 20~50 年的潜伏期后发展为 ATL 感染^[7]。与 HTLV-I 感染有关的其他疾病包括葡萄膜炎, 感染性皮炎, 肌炎和其他具有重要炎症成分的病状^[8]。HTLV-I 主要通过母婴垂直传播、性交、器官移植、输血和污染针头重复利用等途径传播, 母乳喂养是最主要的传播途径^[9-10]。通过感染细胞的转移进行传播并导致持续感染, 主要在 CD4⁺ T 细胞^[11]。我国对 HTLV-I 的流行病学研究主要局限于献血者血清抗体的研究, 而对于 HTLV-I 最主要的传播途径母乳传播的流行病学研究较少^[12-16]。Suzuki

等^[17]研究表明日本每年约有 1 600 名 HTLV-I 携带者分娩, 日本与我国毗邻, 因此为进一步了解我国孕产妇中 HTLV-I 感染情况, 避免 HTLV-I 进一步向健康子代的播散, 对分娩的产妇进行 HTLV-I 筛查具有重要的意义。本研究通过 ELISA 抗体检测, 对 HTLV-I 的膜基因 (Env) gp46 片段进行 PCR 扩增, 研究广州市孕产妇 HTLV-I 感染情况及其基因亚型分析, 同时对阳性母乳样本进行冻融或巴氏消毒处理, 分析 HTLV-I 阳性母乳处理前后病毒载量的变化情况, 为相关母乳喂养提供指导。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2015 年 1-12 月期间广州市妇女儿童医疗中心产科分娩的产妇分娩后 1~3 d 内的初乳乳汁共 1 900 份。具体操作步骤: 首先清洗消毒乳房局部, 应用已标记姓名住院号的一次性无菌容器采集母乳 10 ml, 盖紧盒盖置于冰盒内送到实验室, 4℃离心机, 10 000 r/min, 离心 5 min, 弃上层脂肪层, 吸取下层母乳待测。登记产妇信息 (包括年龄、孕产史、疾病史、家族史等)。本研究经过医院伦理委员会审批及家属同意。

1.2 抗 HTLV-I 抗体检测 将收集的母乳样本经过 ELISA 双抗原夹心酶联免疫试剂盒 (北京万泰生物药

基金项目: 广州市卫生和计划生育委员会资助项目 (课题编号: 20151A011046)

作者简介: 程婷婷 (1985-), 女, 山东人, 硕士, 主治医师, 研究方向: 新生儿危重疾病、早产儿营养等。

业股份有限公司)检测母乳样本。实验中设阳性对照组、阴性对照组和空白组。所有操作过程严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.3 阳性母乳样本 DNA 提取 将 1.2 步骤中的阳性母乳样本进行 DNA 提取,所用试剂盒为 TIANGEN 公司基因组 DNA 提取试剂盒,实验过程按照说明书进行。

1.4 PCR 扩增 参照 HTLV-I 型 HL1PROP 株序列 (GenBank Number: M33896) 设计引物,扩增 HTLV-I 膜基因的 gp46 片段。将 PCR 扩增产物进行核酸电泳。引物序列分别为 F1 AGCCGCCAGTGGAAGGAC-CA, R1 CCTCGTCTGT TCTGGCCAGCATAC, F2 AT-GGGTAAGT TTCTCGCCAC, R2 GGAGACAAGCCAG-GCCGC。

1.5 测序 对 PCR 凝胶产物进行回收处理后测序,根据测序结果对比 GENBANK 各亚型代表株的 gp46 基因序列,分析患者感染 HTLV-I 基因型。

1.6 免疫荧光检测 HTLV-I 病毒载量

1.6.1 母乳稀释 将 ELISA 和 PCR 鉴定为阳性的 4 份母乳样本用 DMEM 培养基进行 10 倍梯度稀释, 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 至 10^{-10} , 每孔 100 μ l, 分别加入 96 孔板中, 每个梯度设置 8 复孔, 设置空白对照孔。

1.6.2 细胞培养 将 96 孔板中每孔加入 1×10^4 个 HEK293T 细胞, 轻轻混匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中, 培养 48 h。

1.6.3 固定 用 2% 多聚甲醛固定细胞。用 PBS 轻轻洗涤 3 次, 吸干上清。

1.6.4 荧光染色 随后加入荧光标记的 HTLV-I 抗体, 孵育培养 1 h 后, 用 PBS 洗涤, 置于荧光显微镜观察。通过形成荧光灶单位 (FFU) 的稀释倍数及孔数计算母乳中 HTLV-I 病毒载量。

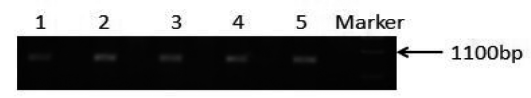
1.7 冻融或巴氏消毒处理 将母乳置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜处理, 第 2 d 将母乳在 37 $^{\circ}$ C 的水浴盆中融解。将母乳进行巴氏消毒处理, 即置水浴锅 62.5 $^{\circ}$ C, 30 min。消毒后的母乳待自然冷却, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 24~28 h, 容器标签注明消毒日期和被采集者姓名。冻融或巴氏消毒处理后的母乳中 HTLV-I 病毒抗原检测, 同前述免疫荧光法检测病毒载量。并与处理前相对比, 分析冻融或巴氏消毒处理对病毒含量的影响。

1.8 统计学分析 应用 SPSS 21.0 统计学软件对阳性乳汁样本处理前、冻融或巴氏消毒处理后的 HTLV-I 病毒含量数据进行统计分析, 所有计量数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组内比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTLV 抗体检测结果 1 900 份母乳样本通过 ELISA 检测 HTLV 抗体检测, 结果显示有 4 例 HTLV-I 型抗体阳性患者, 总阳性率 0.21%, 无 HTLV-2 型感染。

2.2 PCR 克隆 将 ELISA 方法检测为 HTLV-I 抗体阳性的 4 份母乳样本, 进行基因组 DNA 提取, 按照设计的引物序列, 将 4 份样本 DNA 进行 PCR 扩增 HTLV-I env 基因的 gp46 片段, PCR 扩增产物进行核酸电泳, 进一步鉴定 4 份样本 HTLV-I 感染情况。PCR 结果见图 1。4 例样本均呈阳性。随后将 PCR 产物回收克隆入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 株, 进行双向序列测定。



注: 1 泳道: 1 号患者 PCR 产物; 2 泳道: 2 号患者 PCR 产物; 3 泳道: 3 号患者 PCR 产物; 4 泳道: 4 号患者 PCR 产物; 5 泳道: 阳性对照组。

图 1 PCR 扩增 gp46 核酸电泳

2.3 孕产妇感染 HTLV-I 基因亚型分析 根据 HTLV-1 膜基因序列的差异, HTLV-1 分为 COSMOPOLITAN (C 亚型)、JAPANESE (J 亚型)、WEST AFRICAN (WA 亚型)、CENTRAL AFRICAN (CA 亚型) 和 MELANESIAN (M 亚型) 等 5 个亚型^[15]。将 HTLV-I 抗体阳性母乳样本的 gp46 DNA 序列与 GENBANK 中不同序列进行对比, 分析发现 4 株病毒株的氨基酸和核苷酸系列高度同源, 而与 5 个流行株的基因序列也有 90% 以上的同源性, 其中与 C 亚型流行株的同源性高达 99% 以上。4 例患者的 gp64 基因序列中均与 HTLV-I C 基因相同, 孕产妇 HTLV-1 株与 HTLV-1 流行代表株 env gp46 片段核苷酸序列同源性对比分析见表 1。

表 1 广州市孕产妇 HTLV-1 株与流行代表株 env gp46 片段核苷酸序列同源性对比分析

编号	1	2	3	4	C	J	CA	WA	M
2	99.6	-							
3	98.5	98.0	-						
4	99.0	98.3	99.4	-					
C	99.2	99.0	99.7	99.2	-				
J	95.0	96.0	96.4	96.2	99.0	-			
CA	95.2	94.7	95.6	95.2	97.2	96.8	-		
WA	93.0	92.5	93.2	94.0	98.4	97.5	95.6	-	
M	92.7	93.0	92.5	92.3	95.6	94.6	94.0	93.0	-

2.4 母乳中 HTLV-I 病毒载量测定 通过免疫荧光检测处理前后 HTLV-1 病毒载量情况, 4 份母乳进行冻融和巴氏消毒处理后, 病毒载量明显减少 ($P<0.05$)。4 份 HTLV-I 阳性母乳处理前后病毒载量见表 2。

表 2 不同方法处理后母乳中病毒载量
检测结果比较($n=3$,lgFFU/ml)

样本序号	病毒载量		
	未处理	冻融	巴氏消毒
1	18.34±1.23 ^{ab}	1.02±0.09	1.04±0.13
2	17.43±1.41 ^{ab}	1.04±0.12	1.02±0.07
3	19.67±1.65 ^{ab}	1.07±0.08	1.03±0.13
4	17.90±1.54 ^{ab}	1.03±0.11	1.06±0.14

注:a 与冻融后比较, $P<0.05$; b 与巴氏消毒后比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

研究发现 HTLV-I 比较稳定,其 DNA 序列主要决定于地理分布,而与宿主和环境无关^[18]。非洲的撒哈拉地区以及非洲西部奴隶后裔聚居的地区,包括美国东南部、加勒比海、巴西等都是 HTLV-I 的高发区,水平垂直传播的感染率可达到 5%~30%^[6]。日本西南部报道的感染率最高,特别是九州岛是世界上 HTLV-I 感染率最高的地区之一,约 10% 孕妇血清学阳性^[11]。另外,伊朗的犹太人、密克罗尼西亚和澳大利亚的本地人中也发现有 HTLV-I 流行。

目前,我国流行病学调查发现局部区域存在 HTLV-I 感染,然而对 HTLV-I 的流行病学研究主要局限于献血者血清抗体的研究,而对于 HTLV-I 最主要的传播途径母乳传播的流行病学研究较少^[19]。1985 年,曾毅等^[12] 对全国 28 个省市正常人群进行 HTLV-IgG 抗体的检测,阳性率为 0.08%。此后,国内学者应用不同的方法检测了各地区献血人群中 HTLV-I 的感染情况,结果发现各地报道的 HTLV-I 感染率不尽相同,HTLV-I 感染主要流行于福建沿海地区人群。2001 年何智等^[14] 的研究发现广东地区也存在 HTLV-I 感染。Wang 等^[20] 对我国 13 个省份收集的献血者 145 293 份血清样本的检测发现,仅在来自福建省的血清样本中检测到 HTLV-1 阳性,阳性率为 0.05%,所感染的分离株为 C 基因型。为进一步了解我国孕产妇中 HTLV-I 感染情况,避免 HTLV-I 进一步向健康子代的继续传播,对广州市妇女儿童医疗中心分娩的产妇母乳应用 ELISA 和 PCR 检测的方法进行 HTLV-I 抗体的检测。1 900 名分娩产妇母乳中有 4 名 HTLV-I 抗体阳性,阳性感染率为 0.21%。进一步,对 4 份 HTLV-I 抗体阳性的母乳样本进行基因组 DNA 提取、PCR 扩展和序列分析,确定感染的 HTLV-I 的基因亚型,与 Wang 等^[20] 的研究结果一致,序列分析显示 4 名分娩产妇感染 HTLV-I C 亚型,无新亚型出现。随后,通过冻融或巴氏消毒方法对 HTLV-I 抗体阳性的母乳进行冻融或消毒处理,利用免疫荧光方法检测处理前后母乳中 HTLV-I 病毒载量情况。研究结果发现 HTLV-I 抗体阳性母乳在经过冻融或巴氏消

毒后,HTLV-I 病毒载量显著降低。因此 HTLV-I 感染的产妇应避免直接进行母乳喂养,应对阳性产妇母乳进行冻融处理,或建议 3~6 个月后改为人工喂养,以减少病毒暴露风险及感染率。同时本研究对了解母乳感染 HTLV-I 情况提供理论基础,对相应防治策略的制定等都将有十分重要的意义。

参考文献

[1] Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL) [J]. *Retrovirology*, 2005, 2(1): 27.

[2] Terada Y, Kamoi K, Komizo T, et al. Human T cell leukemia virus type 1 and eye diseases [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2017, 33(4): 216-223.

[3] Olindo S, Jeannin S, Saint-Vil M, et al. Temporal trends in human T-Lymphotropic virus 1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) incidence in Martinique over 25 years (1986-2010) [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(3): e0006304.

[4] 陈梦云,宋早文,方金勇,等. 人类 T 淋巴细胞白血病 1 型病毒的感染复制及致病机制研究进展 [J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 40(3): 324-330.

[5] Pères E, Blin J, Ricci EP, et al. PDZ domain-binding motif of tax sustains T-cell proliferation in HTLV-1-infected humanized mice [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(3): e1006933.

[6] Ishikawa C, Senba M, Mori N. Effects of NVP-BEZ235, a dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, on HTLV-1-infected T-cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5311-5317.

[7] Motai Y, Takahashi M, Takachi T, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB [J]. *Virus Genes*, 2016, 52(1): 4-13.

[8] Ishidou Y, Matsuyama K, Matsuura E, et al. Endemic impact of human T cell leukemia virus type 1 screening in bone allografts [J]. *Cell Tissue Bank*, 2016, 17(4): 555-560.

[9] Watanabe T. Adult T-cell leukemia; molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells [J]. *Blood*, 2017, 129(9): 1071-1081.

[10] Wang J, Song D, Liu Y, et al. HLA-DMB restricts human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) protein expression via regulation of ATG7 acetylation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-13.

[11] Murakami Y, Hasegawa A, Ando S, et al. A novel mother-to-child human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) transmission model for investigating the role of maternal anti-HTLV-1 antibodies using orally infected mother rats [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(4): 835.

[12] 曾毅,蓝祥英,王必端,等. 成人 T 细胞白血病病毒抗体的血清流行病学调查 [J]. *病毒学报*, 1985, 1(1): 55-59.

[13] 蓝祥英,曾毅,王得新,等. 人嗜 T 淋巴细胞 I 型病毒 (HTLV-1) 与神经系统疾病关系的初步研究 [J]. *病毒学报*, 1993, 9(4): 382.

[14] 何智,张国忠,季阳,等. 福建广东 8 株 HTLV-1 前病毒长末端重复序列核苷酸序列测定及亚型分析 [J]. *中国输血杂志*, 2001, 14(2): 68-72.

[15] Yoshizumi T, Takada Y, Shirabe K, et al. Impact of human T-cell leukemia virus type 1 on living donor liver transplantation: a multi-center study in Japan [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2016, 23(6): 333-341.

[16] 吴文才,成文召,陈梦云,等. HBZ 在人类 T 淋巴细胞白血病 1 型病毒 HTLV-1 致癌中的功能 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(2): 235-242.

[17] Suzuki S, Tanaka M, Matsuda H, et al. Current status of HTLV-1 carrier in Japanese pregnant women [J]. *J Matern Fetal Med*, 2014, 27(3): 312-313.

[18] Gessain A, Gallo RC, Franchini G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift *in vivo* as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations [J]. *J Virol*, 1992, 66(4): 2288-2295.

[19] Maldonado J, Angert I, Sheng C, et al. Perturbation of human T-cell leukemia virus type 1 particle morphology by differential gag co-packaging [J]. *Viruses*, 2017, 9(7): 191.

[20] Wang Y, Li X, Song A, et al. Prevalence and partial sequence analysis of human T cell lymphotropic virus type I in China [J]. *J Med Virol*, 2010, 76(4): 613-618.