

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.10.14

尼帕病毒检测技术研究进展

李芳韬,徐璐,夏应菊,赵俊杰,邹兴启,刘业兵*

(中国兽医药品监察所,国家猪瘟参考实验室,北京 100081)

[收稿日期] 2023-04-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 10-0090-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 尼帕病毒(Nipah virus, NiV)是一种人畜共患的高致病性病毒,人感染 NiV 后,死亡率接近 40%;猪作为中间宿主,感染 NiV 后具有高发病率和高死亡率特点。近年来,NiV 疫情在我国相邻的多个东南亚国家频繁出现,预示该病传入我国风险日益增高。通过介绍近年来 NiV 在血清学诊断和分子学诊断技术方面的研究进展,包括临床常用的传统技术以及重组蛋白 ELISA、Luminex、二代测序等新兴诊断方法,为临床样本中 NiV 的鉴定和监测方法更新换代提供参考,对监测 NiV 从国外的传入情况、防控猪群 NiV 疫情发生以及守护公共卫生安全具有重大意义。

[关键词] 尼帕病毒;血清学诊断方法;分子学诊断方法;新兴技术

Research Progress of Nipah Virus Detection Technology

LI Fang-tao, XU Lu, XIA Ying-ju, ZHAO Jun-jie, ZOU Xing-qi, LIU Ye-bing*

(China Institute of Veterinary Drug Control, National Reference Laboratory for Classical Swine Fever, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

Abstract: Nipah virus (NiV) was a highly pathogenic zoonotic virus with a mortality rate of nearly 40%. Pig, as the intermediate hosts, has a high morbidity and mortality after NiV infection. In recent years, NiV epidemic occurred frequently in many neighboring Southeast Asian countries, indicating the increasing risk of NiV introduced into China. In this study, the research progress of NiV in serological and molecular diagnostic techniques in recent years was reviewed, including traditional techniques commonly used in clinic and emerging diagnostic methods such as recombinant protein ELISA, Luminex, second-generation sequencing and so on, so as to provide reference for the upgrading of detection methods for NiV identification and monitoring in clinical samples. It is of great significance for monitoring the transmission of NiV from abroad, preventing and controlling the occurrence of NiV in swine and protecting public health security.

Key words: Nipah virus; serological diagnostic methods; molecular diagnostic methods; emerging technology

基金项目:甘肃省科技重大专项计划子课题:抗体检测类试剂评价体系的建立(21ZD3NA001)

作者简介:李芳韬,兽医师,博士,从事猪源病毒病的监测与研究。

通讯作者:刘业兵。E-mail: zjsliuyebing@163.com

尼帕病毒(Nipah virus, NiV)是副粘病毒科亨德拉尼帕病毒属的一种人畜共患的高致病性病毒^[1-2]。为单股负链不分节段 RNA 病毒,病毒呈圆形或多形性,由囊膜和核衣壳组成^[3]。NiV 基因组全长约 18.2 kb,包含 6 个编码基因,分别编码融合糖蛋白(F)、附着糖蛋白(G)、基质蛋白(M)、核衣壳蛋白(N)、长聚合酶(L)、磷酸蛋白(P)等 9 种蛋白^[4]。NiV 的自然宿主是果蝠,猪作为重要的中间宿主,被携带 NiV 的果蝠或其污染物感染后,从而再将 NiV 直接或间接传染给人类或狗、猫、马、羊等其他易感动物^[5]。因此,猪在 NiV 的传播过程中具有重要意义。

NiV 自 1999 年首次在马来西亚被发现后,主要在东南亚和南亚地区流行^[6]。人感染 NiV 后,主要表现为脑炎症状,死亡率接近 40%;猪群中爆发 NiV 疫情后,猪群感染率接近 100%,发病率因年龄而异,仔猪病死率可达 40%,症状主要表现为肺炎,部分发生中枢神经系统病变^[7-8]。以往的研究中在猪的上皮细胞中检测到 NiV 抗原,证明 NiV 可能在上皮细胞(如口鼻、上呼吸道和下呼吸道)复制^[8]。除了上皮组织,还在猪体内检测到低水平的病毒血症^[9],可以从人和猪的脑脊液中分离出病毒^[8]。小血管和淋巴血管内皮细胞是 NiV 易感宿主的主要病毒靶点,血管系统的感染可通过血管外扩散导致 NiV 侵染多个器官,例如脑、肺或脾脏^[10]。除了血管系统外,淋巴系统也是 NiV 感染的重要靶点,人、猪和猫的淋巴结、脾脏和胸腺中均可以检测到 NiV 抗原,出现淋巴样坏死和衰竭^[11]。同时,大脑也是主要的靶器官,除了在血管末端及周围平滑肌中检测到 NiV 抗原,还有多种类型的脑细胞被感染,包括脉络膜神经丛的神经元、胶质细胞、室管膜细胞、上皮细胞等;肺部是人类和猪的重要靶标,在心脏、肾脏、肝脏、子宫和胎盘中也检测到 NiV 病毒^[8]。

通过临床症状,难以鉴别 NiV 与猪群中长期存在的呼吸道症状为主要表征的病毒。虽然目前我国人群及猪群中暂未发现 NiV 感染病例,但我国与 NiV 主要流行国家经济贸易往来密切,并且已在我国蝙蝠体内也检测到 NiV 抗体,所以我国存在 NiV

流行的潜在风险^[12]。NiV 的高发病率和高死亡率,对养殖业和公共卫生安全构成了重大威胁。目前,尚无 NiV 特异性治疗药物和疫苗^[13],因此通过实验室诊断技术持续监测 NiV 疫情对防控该病的爆发至关重要。

NiV 的实验室诊断方法主要分为血清学诊断方法和分子学诊断方法。传统的血清学诊断方法主要包括酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和血清中和试验^[14]。分子学诊断方法主要包括一系列针对病毒核酸的检测方法,主要包括聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法和核酸测序方法。本综述阐述了近年来在 NiV 诊断技术方面的研究进展,并讨论了新兴诊断技术相较于传统诊断技术的进步之处,为临床样本中 NiV 的鉴定和监测方法的更新换代提供参考,对监测 NiV 从国外的输入情况、防控猪群 NiV 疫情发生以及守护公共卫生安全具有重大意义。

1 血清学诊断方法

NiV 血清学传统诊断方法主要包括 ELISA 和血清中和试验,常用靶标为 NiV 的 F 蛋白、G 蛋白和 N 蛋白。其中,血清中和试验需要在生物安全四级实验室中进行,是 NiV 实验室诊断的“黄金”标准;ELISA 是一种安全性好、敏感性高、特异性强和经济实惠的诊断工具,可用于临床样本的大规模流行病学调查和持续监测^[15]。目前,检测 NiV 常用 ELISA 方法包括捕获 ELISA 检测 IgM 抗体和间接 ELISA 检测 IgG 抗体^[16]。以往研究表明,第一代间接 ELISA 结果存在非特异性反应,须由在生物安全四级实验室中操作的血清中和试验进一步确定 ELISA 结果,使 NiV 阳性样本的筛选不具有普适性^[17]。因此,开发和评价用于筛查 NiV 疑似病例的 ELISA 新方法,有助于监测猪群 NiV 疫情以及制定公共卫生预防措施。随着诊断技术的发展和进步,近些年来逐渐研发出更多适用于 NiV 疫情监测的新方法,对于新技术的开发使现有的血清学分析得以改进,主要包括以下技术:

1.1 基于重组蛋白的 ELISA 鉴别方法 由于 NiV 具有高度危险性,利用重组蛋白代替全病毒作为

ELISA 检测抗原,可适用于临床样本的流行病学调查。NiV 的 G 蛋白和 N 蛋白可以用于建立 NiV 间接 ELISA 检测方法,进行阳性血清的筛选以及 NiV 与亨德拉病毒(Hendra Virus, HeV)的鉴别诊断。使用不同的表达系统表达 HeV 和 NiV 截短形式的 G 蛋白以及 NiV 的全长 N 蛋白,以这些重组蛋白为基础,采用 ELISA 检测猪血清中 HeV 或 NiV 特异性抗体^[18],以达到鉴定 NiV 或 HeV 目的。因为 HeV 和 NiV 的交叉反应性,可以通过使用基于全长 N 蛋白的 ELISA 对血清进行初筛,然后再用基于截短 G 蛋白的 ELISA 区分 HeV 和 NiV 感染。但是 HeV 和 NiV 均属亨德拉尼帕病毒属,抗原之间密切相关,为了排除交叉反应与假阳性现象,仍需进行血清中和试验才能确认为 NiV 阳性。

1.2 基于 NiV - g 蛋白多克隆抗体的抗原捕获夹心 ELISA 采用基于 NiV - g 蛋白多克隆抗体的抗原捕获夹心 ELISA 方法,可以用于检测咽拭子、鼻拭子、脑脊液、尿液和血液中的 NiV 感染。经研究表明,该方法能够更快速地诊断常规 PCR 方法无法检测到的新型 NiV^[19]。虽然 PCR 是诊断 NiV 感染最敏感的技术,但当病毒变异后,可能会造成 PCR 鉴定方法失效。因此,这种基于 NiV - g 蛋白多克隆抗体的抗原捕获夹心 ELISA 方法可以在血清学层面鉴定到新型 NiV 感染,补充传统血清学方法和 PCR 方法在检测过程中可能遗漏的阳性病例。

1.3 Luminex 测定抗体法 血清学诊断方法除了传统的 ELISA 和血清中和试验诊断方法,还有一种 Luminex 测定法已开发用于 NiV 的血清学检测,包括设计用于抗体检测和鉴别的 Luminex 结合测定法,以及设计用于病毒中和的 Luminex 阻断测定法^[20]。该技术通过在不同荧光编码的微球上进行抗原 - 抗体结合反应,运用激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多种不同的生物学反应,可同时检测上百种生物靶标,并且在数小时内完成检测。通过对临床样本的筛选结果进行比较,结合测定法和阻断测定法可以替代传统的 ELISA 和血清中和试验^[17]。因此,Luminex 测定法是一种快速、灵敏、特

异的检测临床样本血清中 NiV 的有效替代方法。并且该方法不需要在活细胞上培养病毒,无需在生物安全四级实验室中进行,适用于临床疾病诊断和流行病学监测可能需要的大批量操作条件^[7]。

ELISA 可以用来准确测定大批量生物样品,但传统 ELISA 只能分析一个目标分子,不具备同时分析多种目标分子的能力。在 ELISA 基础上发展的 Luminex 测定法不仅可以替代传统方法,还可以在一次实验中完成对多种目标分子的分析,从而建立了更加高效、快速的分析平台。

1.4 基于假病毒的中和试验 由于 NiV 中和试验不具有普适性,因此可以通过构建 NiV 假病毒,设计基于假病毒的 NiV 中和试验。已有研究通过基因重组技术构建了单独表达 F 或 G 蛋白的重组水泡性口炎病毒作为已知抗原,并在此基础上建立了检测 NiV 抗体的空斑抑制试验;或利用基因重组技术构建了共表达 F、G 蛋白与绿色荧光蛋白(GFP)的重组水泡性口炎病毒,作为已知病毒抗原检测 NiV 血清样本。上述表达绿色荧光蛋白或荧光素酶的 NiV 假病毒被称为第一代假病毒。在检测过程中,基于 NiV 第一代假病毒的中和试验仍需要特定的检测设备以检测荧光蛋白或荧光素酶。所以,在上述假病毒的基础上,NiV 第二代假病毒采用表达分泌型碱性磷酸酶的水泡性口炎病毒模型重组 F 和 G 蛋白,通过使用 ELISA 酶标仪测量上清液中的分泌型碱性磷酸酶活性,从而开发出一种新型的基于 NiV 假病毒的血清中和试验检测方法,其结果与传统的活体 NiV 试验获得的抗体检测结果一致^[21]。

2 病原学诊断方法

分子学诊断方法主要包括一系列针对病毒核酸的检测方法,除了传统 PCR 方法外,还有实时荧光逆转录 - 聚合酶链反应(qRT - PCR)、多重 PCR、逆转录 PCR 和双重套式 RT - PCR 等方法,以及多种核酸测序方法^[20]。在临床上,通过采集脑、肺、脾脏或淋巴结等组织,可用于 NiV 的初筛及进一步鉴定。针对 NiV 的 M、N 和 P 基因保守区域设计引物监测疑似 NiV 感染样本,常用于东南亚地区爆发

NiV 疫情时的病毒鉴定^[13]。其中,qRT-PCR 作为目前应用最为普遍的分子学诊断方法^[22],已被证明比传统 PCR 灵敏 1000 倍,因此在多次疫情爆发时使用^[19],其批间和批内差异小、重复性好、操作简单、安全、快速,已成为病原分子诊断的金标准^[7]。除了 PCR 方法外,还有更多新兴分子学方法可以用于 NiV 诊断,主要包括以下技术:

2.1 Luminex 测定核酸法 Luminex 测定法除了可以应用于 NiV 的血清学检测,还可以应用于 NiV 的核酸检测,对 HeV 和 NiV 分离株进行检测和鉴别,并且检测灵敏度与 qPCR 相当^[23]。已有研究通过利用低聚标记微球构建了用于 HeV 和 NiV 检测和鉴别的多重鉴定方法,针对 N 蛋白和 P 蛋白编码基因的多个位点构建 Luminex 测定法,使微球悬浮阵列系统能够在一次反应中同时识别多个核苷酸靶标,其结果与已有的 qPCR 相比,Luminex 测定法可明确鉴别 HeV 和 NiV 感染病例,并且 HeV 检测的敏感性与 qPCR 相当,具有较高的分析和诊断特异性和敏感性^[23]。

2.2 二代测序 基于 PCR 结果的一代测序在过去 NiV 的发现和诊断中起关键作用,对 NiV 扩增产物的测序可以进一步证实检测结果,并且对研究病毒基因突变和病毒基因演化方面具有重要作用。随着二代测序的普遍应用,相比于一代测序大幅降低了经济成本,并且在保持测序准确性的同时,大幅降低了测序时间。利用二代测序从初筛阳性的样本中获取 NiV 全长基因组,以及鉴定新型 NiV 毒株,是目前最快捷、有效的诊断与分析流程^[24-25]。

随着技术的进一步发展,具有巨大测序深度的高通量测序,在排除大量宿主及环境背景信息的干扰后能够检测到较小基因组的病毒,可以不进行 PCR 步骤、直接在临床和环境样本中检测 NiV 核酸,为更加直接、精确地从样本中鉴定 NiV 基因信息提供了技术支持。该深度测序诊断方法设计了基于生物素化 RNA 诱饵原理的病毒富集板,能够特异性捕获并富集宏基因组中的病毒信号,可显著提高检测背景信息复杂临床样品的敏感性,对于感染多种病原的样本,能够同时检测到不同种病原的遗传信息^[26]。

3 小结与展望

血清中和试验虽然是 NiV 实验室诊断的“黄金”标准,但是在临床采样检测和攻毒实验中,血清中和试验的检测阳性率低于 qRT-PCR 和 ELISA 检测阳性率^[22,27]。ELISA 试验作为普遍应用的血清学检测方法,无需在生物安全四级实验室中即可进行检测;然而,其敏感性和特异性略低于分子检测技术,如 RT-PCR、qRT-PCR 和其他分子生物学方法,无法快速、敏感和特异性地检测到 NiV^[13]。在 NiV 疫情再次爆发时,PCR 方法和基因组测序结果对于 NiV 的遗传学分析和分子特征研究是必不可少的,但是由于引物靶向序列的局限性,PCR 诊断方法无法适应病毒的快速变异,可能会造成 PCR 鉴定方法失效。因此,只有将多种检测方法相结合,才能更加快速、高效地诊断 NiV,对防控猪群 NiV 疫情发生、监测 NiV 从国外的传入情况以及守护公共卫生安全具有重大意义。

在目前的研究中,为了更精确的筛查临床样本中的 NiV 阳性病例,可先采用 qRT-PCR 方法初步筛选大量临床样本中的阳性样本,再采用 ELISA 方法对阳性样本的血清抗体进行进一步筛选及确认,最后利用二代测序(NGS)对组织和拭子样本进行 NiV 的全基因组测序。随着 NiV 假病毒相关研究的进一步发展,NiV 的血清中和试验无需在生物安全四级实验室中进行,使血清中和试验作为 NiV 实验室诊断的“黄金”标准有望在日后进一步推广;而具有巨大测序深度的高通量测序,能够排除大量宿主及环境背景信息的干扰,并且可以不进行 PCR 步骤、直接在临床和环境样本中检测 NiV 核酸,为更加直接、精确地从样本中鉴定 NiV 基因信息提供了技术支持,也有利于 NiV 检测进一步从实验室推广到临床。

NiV 的高发病率和高死亡率,对养殖业和公共卫生安全构成了重大威胁。目前,通过临床症状难以鉴别 NiV 与猪群中长期存在的呼吸道症状为主要表征的病毒,为临床诊断 NiV 造成了巨大困难。所以,在发展实验室诊断技术的同时,应进一步简化操作步骤,发展易于临床操作的快速诊断分析技术,以降低我国 NiV 流行的潜在风险,防控该病的输入与爆发。

参考文献:

- [1] Wang L, Harcourt B H, Yu M, *et al.* Molecular biology of Hendra and Nipah viruses[J]. *Microbes and Infection*, 2001, 3(4): 279–287.
- [2] Paul D, Mohanty A, Shah A, *et al.* Outbreak of an emerging zoonotic Nipah virus: An emerging concern [J]. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2023, 5(2): 57–59.
- [3] Broder C C, Wong K T. Henipaviruses[M]. *Neurotropic Viral Infections*, 2016, 9(1): 45–83.
- [4] Talukdar P, Dutta D, Ghosh E, *et al.* Molecular pathogenesis of Nipah virus[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(4): 2451–2462.
- [5] Hanna J N, McBride W J, Brookes D L, *et al.* Hendra virus infection in a veterinarian[J]. *The Medical journal of Australia*, 2006, 185(10): 562–564.
- [6] Uwishema O, Wellington J, Berjaoui C, *et al.* A short communication of Nipah virus outbreak in India: An urgent rising concern[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2022, 82(1): 104599.
- [7] 赵洋, 赵明, 吴海燕, 等. 尼帕病毒病实验室检测技术研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(4): 854–858.
Zhao Y, Zhao M, Wu H Y, *et al.* Research progress on laboratory detection technology for Nipah virus disease [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 40(4): 854–858.
- [8] Maisner A, Neufeld J, Weingartl H. Organ and endotheliotropism of Nipah virus infections *in vivo* and *in vitro* [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(6): 1014–1023.
- [9] Berhane Y, Weingartl H M, Lopez J, *et al.* Bacterial infections in pigs experimentally infected with Nipah virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(3/4): 165–174.
- [10] Wong K T, Shieh W J, Kumar S, *et al.* Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(6): 2153–2167.
- [11] Weingartl H M, Berhane Y, Caswell J L, *et al.* Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge [J]. *J Virol*, 2006, 80(16): 7929–7938.
- [12] 舒黄芳, 王可艺, 刘社兰, 等. 尼帕病毒病预防与控制研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2022, 43(2): 286–291.
Shu H F, Wang K Y, Liu S L, *et al.* Progress in the prevention and control of Nipah virus disease [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2022, 43(2): 286–291.
- [13] Sharma V, Kaushik S, Kumar R, *et al.* Emerging trends of Nipah virus: A review[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2019, 29(1): e2010.
- [14] Fischer K, Pickering B, Diederich S. Detection of Serum Antibody Responses in Nipah Virus – Infected Pigs[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2610(1): 17–29.
- [15] Atherstone C, Diederich S, Weingartl H M, *et al.* Evidence of exposure to henipaviruses in domestic pigs in Uganda [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 921–928.
- [16] Shete A M, Jain R, Mohandas S, *et al.* Development of Nipah virus – specific IgM & IgG ELISA for screening human serum samples[J]. *Indian J Med Res*, 2022, 156(3): 429–434.
- [17] McNabb L, Barr J, Cramer G, *et al.* Henipavirus microsphere immuno – assays for detection of antibodies against Hendra virus [J]. *J Virol Methods*, 2014, 200(1): 22–28.
- [18] Fischer K, Diederich S, Smith G, *et al.* Indirect ELISA based on Hendra and Nipah virus proteins for the detection of henipavirus specific antibodies in pigs[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0194385.
- [19] Kaliappan A, Kaliappan V, Lakshmi J T, *et al.* Nipah amidst Covid – 19 Pandemic, another Re – Emerging Infectious Disease of Pandemic Potential – a Narrative Review [J]. *Maedica*, 2022, 17(2): 464–470.
- [20] Schulz J E, Seifert S N, Thompson J T, *et al.* Serological Evidence for Henipa – like and Filo – like Viruses in Trinidad Bats[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, 221 (Suppl 4): S375–s382.
- [21] Kaku Y, Noguchi A, Marsh G A, *et al.* Second generation of pseudotype – based serum neutralization assay for Nipah virus antibodies: sensitive and high – throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase [J]. *J Virol Methods*, 2012, 179(1): 226–232.
- [22] Kasloff S B, Leung A, Pickering B S, *et al.* Pathogenicity of Nipah henipavirus Bangladesh in a swine host [J]. *Scientific reports*, 2019, 9(1): 5230.
- [23] Foord A J, White J R, Colling A, *et al.* Microsphere suspension array assays for detection and differentiation of Hendra and Nipah viruses[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(1): 289–295.
- [24] Sudeep A B, Yadav P D, Gokhale M D, *et al.* Detection of Nipah virus in *Pteropus medius* in 2019 outbreak from Ernakulam district, Kerala, India[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2021, 21(1): 162.
- [25] Hassan M Z, Ahmed M S, Khan M M, *et al.* Genomic profiling of Nipah virus using NGS driven RNA – Seq expression data[J]. *Bioinformatics*, 2019, 15(12): 853–862.
- [26] Wylezich C, Calvelage S, Schlottau K, *et al.* Next – generation diagnostics: virus capture facilitates a sensitive viral diagnosis for epizootic and zoonotic pathogens including SARS – CoV – 2 [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 51.
- [27] Pickering B S, Hardham J M, Smith G, *et al.* Protection against henipaviruses in swine requires both, cell – mediated and humoral immune response[J]. *Vaccine*, 2016, 34(40): 4777–4786.