综 述 文章编号:0253-3626(2008)s1-0096-03

尼帕病毒的研究进展

刘妍汐 综 述,谢 鹏 审 校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

尼帕病毒(Nipah virus,NiV)是1998年在马来西亚发现的一种与亨德拉病毒极其相近的病毒。它具有广泛的宿主范围,在自然条件下可感染蝙蝠、猪、猫、犬、马、鼠、人。NiV的储存宿主被认为是果蝠,人类可通过与果蝠直接接触或与猪等中间宿主接触而被感染,并造成人兽共患病性疾病--尼帕病毒病(Nipah virus disease,NVD)。尼帕病毒可侵害中枢神经系统和呼吸系统,死亡率高。本文就目前对NiV的病原学、流行病学、临床表现、诊断和预防治疗等方面做一简单综述。

1 病原学

尼帕病毒为有囊膜的连续单股负链RNA病毒,属副粘病毒科、副粘病毒亚科的亨尼帕病毒属[1]。它的基因组含有大约18 246bp基因,由6个转录单位及3'和5'端的非翻译区所组成。6个转录单位为N、P、M、L、G、F,分别翻译为核蛋白(Nucleoprotein,N)、磷蛋白(Phosphoprotein,P)、基质蛋白(Matrixprotein,M)、大蛋白(Largeprotein,L)、粘附蛋白(Attachment glycoprotein,G)和融合蛋白(Fusionprotein,F),其中P基因还编码2种非结构蛋白V蛋白和C蛋白。N蛋白参与核蛋白多聚体的形成、病毒RNA的转录和复制等过程[2]。P蛋白参与病毒RNA的转录和复制,并且保护病毒基因组RNA免受破坏。P蛋白是NiV主要的免疫显性抗原,也是病毒基因组中具有最多分叉的蛋白[3]。M蛋白是非糖基化蛋白,形成病毒外膜的内层,以维持病毒颗粒的完整性,还与G蛋白和F蛋白共同形成病毒的外膜。L蛋白是NiV中含量最少的蛋白,具有RNA聚合酶活性,在病毒的复制和转录过程中发挥重要作用[4]。F蛋白是Ⅰ型糖蛋白,G蛋白与细胞表面受体结合,并且与F蛋白共同作用,诱导病毒囊膜和细胞膜发生融合[5-7]。尼帕病毒在体内繁殖时,需要C蛋白的参与。V蛋白可以对抗人体细胞里的干扰素反应[8]。

作者介绍:刘妍汐(1981-),女,硕士,
研究方向:中枢神经系统感染。
通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:pengxie58@gmail.com。
基金项目:"十一五"国家高技术研究发展计划(863计划)中枢神经系统新发病毒感染的脑脊液分子生物学诊断及分子流行病学研究(项目编号:2006AA02Z196)

2 流行病学

尼帕病毒宿主广泛。已从5种蝙蝠体内发现NiV的中和抗体,并从一种Pteropid果蝠的尿样和被其咬过的水果中分离到NiV,因此,认为Pteropid果蝠是NiV的自然宿主[9,10]。其他动物如猪、猫、兔、马、山羊、犬、鼠等可因暴露于携带NiV的果蝠或接触其污染物而感染从而成为中间宿主。现有的资料提示,NiV的发生和流行可能与自然环境的破坏及人类活动有关[11,12]。果蝠的活动范围和人类过于接近,中间宿主捡食了果蝠吃剩或被尿液等排泄物污染的带毒果实而感染,就把这种致命的病毒带到人类生活环境中[13]。在NiV感染人的途径中,猪起了关键的作用。猪感染后可以通过咽喉部和气管分泌物、尿液、粪便等途径向外界散播病原。同一猪场内传播也可能是直接接触病猪的尿、体液、气管分泌物等而引起。八哥、九宫、掠鸟等在不同猪群或同一猪场之间活动,这也可能是造成病毒在猪群间传播的一个途径。人的NiV感染与从事密切接触猪的活动(养猪农、猪场工人、猪场的兽医、污物处理人员、屠宰场工人、生猪肉加工人员等) 有关系。病人主要是通过伤口与感染猪的分泌液、排泄物、及呼出气体等接触而感染。研究表明,与确诊的NiV感染患者接触感染的危险性最高。这说明人与人之间存在着传播机会,大大增加了这一高致命性病原广泛传播的可能[14]。

3 临床表现

尼帕病毒爆发时,猪的病死率低,约为5%~15%,但感染率可高达100%。猪的NiV感染可出现中枢神经系统和呼吸系统症状,但临床特征随猪的年龄不同而异。乳猪表现为呼吸困难,四肢无力,肌肉震颤,抽搐,死亡率约为40%。4~6周龄猪的表现为急性高热,并伴有呼吸困难、咳嗽等呼吸症状,同时还可能出现肌痉挛、抽搐等神经症状,以致步态不协调,影响行走。成年猪感染后最初表现为发热,之后可出现唾液分泌增多、呼吸困难、易激怒、头部颤动、口紧闭、眼球震颤,严重时出现痉挛抽搐,甚至突然死亡,母猪可能早产,死亡率低[15]。

人感染NiV后有1~2周的潜伏期,8%~15%的患者为亚

临床症状。患者的临床表现初期呈发热、剧烈头痛和无菌性脑膜炎症状。之后，出现明显的神经系统症状，脑干功能异常、意识水平降低、行为异常、失去自制能力、轻度视力模糊、眩晕，典型的表现有间歇性的肌肉抽搐、反射降低或消失、张力减弱等。数日后，出现昏睡。部分病人在24~48h可进一步发展为昏迷，1/3病人会在昏睡中死亡，其余昏迷的患者可能出现永久性脑损伤[16]。严重者时有癫痫发作。除中枢神经系统症状外，可表现为呼吸道症状，如呼吸困难、咳痰，胸部听诊双侧肺部有啰音[17]。严重的患者可发生并发症，包括败血症、胃肠道出血、肾功能损害等。患者可在发病后3～14d内死亡，直接的死因主要是脑炎，病死率高达40%~70%。研究发现，存活者中75%可完全康复，7.5%完全恢复的病人又可在很长时间后再次出现脑炎症状，3.7%没有出现临床症状的感染者在感染很长时间后发病，其余25%有残存的神经系统损害[18]。在急性期有正常意识水平的病人中，经过大约2周的平均病程后，均可完全康复，而在急性期有意识水平减低的病人中，仅15%可完全康复[19]。

4 诊断

4.1 病毒分离

病毒分离是“金标准”。用于尼帕病毒分离的细胞有Vero、BHK、PS等细胞。进一步鉴定病毒分离株，还需做固定后的免疫染色，电镜或免疫电镜观察，特异性抗血清中和实验，细胞培养上清PCR等。但病毒分析和电镜观察均需在生物安全4级(P4)条件下进行[20]。

4.2 血清中和试验

血清中和试验在某种程度上可以作为标准检测方法。但为安全起见，进行血清中和试验应在生物安全4级(P4)实验室中进行。有报道指出，血清可能引起细胞毒性[21]，但血清中和试验对血清质量要求低，是可靠的实验方法。

4.3 酶联免疫吸附检测(Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)

ELISA具有敏感、快速的特点，美国CDC使用捕获ELISA来检测血清中IgM抗体的方法成为马来西亚国家猪病监督计划的有效方法。由于病毒高度危险，所以使用基因工程表达的重组蛋白作为检测抗原大有前景。Eshaghi等[22]利用杆状病毒表达系统对NiV N蛋白进行重组表达研究，结果提示重组N蛋白可以代替全病毒作为ELISA检测抗原。Eshaghi等[23]在大肠杆菌中对NiV G蛋白的胞外区基因进行表达，结果发现表达的蛋白作为抗原适用于常规的NiV抗体检测，也可以应用于血清学的流行病学调查。但ELISA检测阳性的样本需用SNT进行验证。

4.4 PCR检测

PCR技术发展时间较短，但此技术快速、准确，因而被广泛用于对尼帕病毒的检测。PCR方法有两种，一种是澳大利亚AAHL的RT-PCR法，采用巢式引物扩增编码病毒基质蛋白M基因以检测新鲜组织、固定组织、脑脊液样品及细胞培养分离物的病毒序列；另一种是美国CDC的PCR法，扩增编码病毒核蛋白N基因，但该方法首先要对病毒P基因进行PCR扩增和鉴定。Guillaume等[24]建立的Real time RT-PCR即TaqMan荧光探针方法检测尼帕病毒核衣壳蛋白灵敏度高，能检测1PFU的病毒量。Wacharapluesadee等[25]建立了针对NiV N基因的Duplex nest RT-PCR检测方法，用卡那霉素RNA质粒作为内参，同时扩增内参和NiV N基因，有效的避免了假阴性结果，检测限为0.37pg/μl，PCR检测的灵敏度进一步提高。

4.5 单克隆抗体(Monoclonal antibody, MCA)

单克隆抗体具有敏感性高特异性强的特点，广泛应用于对病原及其特异性抗体的免疫学鉴定。目前已经有关于针对NiV的MCA制备及其在诊断实验中应用的报道。Imada等利用福尔马林灭活的尼帕病毒作为抗原制备了8株MCA，Kashiwazaki等[26]利用其中1株针对尼帕病毒的特异性MCA，建立了一种阻断ELISA的方法，可检测感染猪血清中的尼帕病毒抗体，该方法与血清中和试验(SNT)有很好的符合率，可用于对血清抗体的检测。Berhane等[27]利用灭活的尼帕病毒免疫小鼠，制备了5株针对尼帕病毒的MCA(IgG)。在体外实验中，所有的MCA均无中和作用，可用于ELISA和免疫荧光实验。Berhane[27]等制备的抗-N MCA和抗-M MCA可用于尼帕病毒的基本鉴别。

5 治疗和预防

目前尚无有效的药物和治疗方法，只能采取强制措施，以防止疫情的蔓延。对尼帕病毒急性感染的病人主要是支持疗法。有证据表明，早期抗病毒(病毒唑及阿昔洛韦)治疗可缩短病程和减轻疾病的严重程度[28]。随着科学家对这一病原的不断了解，Eshaghi等[29]利用疱疹病毒作为载体进行F、G融合蛋白克隆，并在大肠杆菌中进行表达，有可能用来防治尼帕病毒的感染。Weingartl等[30]依靠金丝雀痘病毒作为载体，将尼帕病毒的F、G基因重组到载体上制成疫苗，可保护猪免受感染。Guillaume等[31]制成抗-G或-F的单克隆抗体，并在仓鼠身上进行了实验，可产生消除性免疫，使仓鼠免受感染。这表明免疫疗法也可用于人的尼帕病毒感染。

迄今为止，没有发现病毒的再次爆发流行，但世界各地都存在着蝙蝠-猪-人类的生物链，发生尼帕病毒的可能性依然存在。因此应做好尼帕病毒知识的普及工作，对农场主进行培训，以便在发现疫情时能及时向兽医部门报告，让农场主学习个人防护知识等。农业及畜牧业从业人员应避免与病猪直接接触，处理猪或排泄物时要穿防护衣(包括防护鞋和手套)，而后用香皂或洗涤剂清洗。与病人接触的医务人员在接触患者分泌物、排泄物和体液时应该格外警惕。

参 考 文 献

[1] Wang LF,Harcourt BH,Yu M,et al.Molecular biology of Hendra and Nipah virus[J]. Microbes Infect,2001;3:279-287.

[2] Eshaghi M,Tan WS,Ong ST,et al.Purification and characterization of Nipah virus nucleocapsid protein produced in insect cells[J]. J Clin Microbiol,2005;43(7):3172-3177.

[3] Chen JM,Yaiw KC,Yu M,et al.Expression of truncated phosphoproteins of Nipah virus and Hendra virus in Escherichia coli for the differentiation of henipavirus infections[J].Biotechnol Lett,2007;29(6):871-875.

[4] Daniels P,Ksiazek T,Eaton BT.Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections[J]. Microbes and Infection,2001;3(4):289-295.

[5] La SK. Nipah virus a potential agent of bioterrorism[J]? Antiviral Research,2003;57(1/2):113-119.

[6] Liu YJ,Xiao C,Wang GP,et al. Expression of Nipah virus structural proteins F1 and G and preparation of hyperimmune antisera against two proteins[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao,2007;47(3):465-470.

[7] Diederich S,Maisner A.Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins[J].Ann N Y Acad Sci,2007;11(2):39-50.

[8] Hagmaier K,Stock N,Goodbourn S,et al.A single amino acid substitution in the V protein of Nipah virus alters its ability to block interferon signaling in cells from different species[J]. J Gen Virol,2006;87(12):3649-3653.

[9] Chua KB,Koh CL,Hooi PS,et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes[J]. Microbes Infect,2002;4(2):145-151.

[10] Chua KB.A novel approach for collecting samples from fruit bats for isolation of infectious agents[J].Microbes Infect,2003;5(6):487-490.

[11] Horvath CM. Weapons of STAT dest ruction Interferon evasion by paramyxovirus V proteins[J]. Eur J Biochem,2004;271:4621-4628.

[12] Xu YH,Gao S,David KC,et al.Basis for fusion inhibition by peptides:analysis of t he heptad repeat regions of the fusion proteins from Nipah and Hendra viruses,newly emergent zoonotic paramyxoviruses[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004;315(3):664-670.

[13] Halpin K,Hyatt AD,Plowright RK,et al.Emerging viruses:coming in on a wrinkled wing and a prayer[J].Clin Infect Dis,2007;44(5):711-717.

[14] Gurley ES,Montgomery JM,Hossain MJ,et al.Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community[J].Emerg Infect Dis,2007;13(7):1031-1037.

[15] Jin GK,Tin TC,Kong CN,et al.Clinial features of nipah virusencephalitis among pig farmers in Malaysia[J]. New England Joural of Medicine,2000;17:1229-1235.

[16] Kitsutani P,Ohta M.Nipah virus infections[J].Nippon Rinsho, 2005;63(12):2143-2153.

[17] Chua KB.Nipah virus outbreak in Malaysia[J]. J Clin Virol,2003; 26:265-275.

[18] Tan CT,Goh KJ,Wong KT,et al.Relapsed and late-onset nipah encephalitis[J].Ann Neurol,2002;51(6):703-708.

[19] Chong HT,Kunjapan SR,Thayaparan T,et al.Nipah encephalitis outbreak in Malaysia:clinical features in patients from Seremban[J]. Can J Neurol Sci,2002;29:83-87.

[20] Hyatt A,Zaki SR.Ultrastructure of Hendra and Nipah viruses [J].Microbes Infect,2001;3:297-306.

[21] Peter D,Thomas K,Bryan TE. Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra vires infections[J].Microbes Infect,2001;3:289-295.

[22] Eshaghi M,Tan WS,Ong ST,et al.Purification and characterization of Nipah virus nucleocapsid protein produced in insect cells [J]. J Clin Microbiol,2005;43(7):3172-3177.

[23] Eshaghi M,Tan WS,Chin WK,et al.Purification of the extra-cellulardomain of Nipah virus glycoprotein produced in escherichia coli and possible application in diagnosis[J]. J Biotechnol,2005;116(3): 221-226.

[24] Guillaume V,Lefeuvre A,Faure C,et al.Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR(TaqMan)[J]. J Virol Methods, 2004;120(2):229-237.

[25] Wacharapluesadee S,Hemachudha T.Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats[J]. J Virol Methods,2007;141(1):97-101.

[26] Kashiwazaki Y,Na YN,Tanimura N,et al.A solid-phase blocking ELISA for detection of antibodies to Nipah virus[J]. J Virol Methods,2004;121(2):259-261.

[27] Berhane Y,Berry JD,Ranadheera C,et al.Production and characterization of monoclonal antibodies against binary ethylenimine inactivated Nipah virus[J]. J Virol Methods,2006;132(1-2):59-68.

[28] Bossart KN,Broder CC.Developments towards effective treatments for Nipah and Hendra virus infection[J].Expert Rev Anti Infect Ther,2006;4(1):43-55.

[29] Eshaghi M,Tan WS,Chin WK,et al.Purification of the extracellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in Escherichia coli and possible application in diagnosis[J]. Journal of Biotechnology, 2005;116:221-226.

[30] Weingartl HM,Berhane Y,Caswell JL,et al.Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge[J]. J Virol,2006;80(16): 7929-7938.

[31] Guillaume V,Contamin H,Loth P,et al.Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters[J]. J Virol,2006; 80(4):1972-1978.