

新发感染病毒诊断方法研究进展

伍海英, 游晓星, 吴移谋

(南华大学 病原生物学研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 近年在全球范围内已先后发现 70 多种新发病原体, 以病毒居多, 主要包括呼吸道感染病毒、出血热病毒、胃肠道感染病毒、肝炎病毒、逆转录病毒等。这些病毒病原体严重威胁人类健康并影响社会的稳定和发展。因此, 新发感染病毒病的快速检测对病毒性疾病预防和公共卫生监督显得非常重要。逐年发展的分子生物学方法不仅可发现和认识新发病毒, 同时对难分离培养病毒, 尤其是不能用常规实验方法进行及时诊断的病毒, 分子生物学检测显得非常重要。本文就新发感染病毒病的生物学特征和检测方法, 尤其是分子生物学方法进行了简要综述。

关键词: 新发感染病; 病毒病原菌; 检测方法; 分子生物学

中图分类号: R37

文献标识码: B

文章编号: 2095-1116(2011)01-0041-04

新发感染病(emerging infectious diseases, EID)是指在人群中新出现的或者过去存在于人群中, 但是其发病率突然增加或者地域分布突然扩大的传染性疾病^[1]。自 1967 年以来, 世界范围内先后出现了 70 多种新发感染病^[2], 其中病毒引起的有 40 多种。除了病原体基因突变和毒力的变化外, 自然灾害、生物迁徙和人类生活等社会行为也是促使新发感染病流行的重要因素。EID 的快速诊断对疾病治疗和公共卫生监督非常重要, 传统的检测方法包括病毒分离培养、血清学试验和病理学检查(存在特征性病理改变时)。对某些特殊的病毒而言, 常规的鉴定方法不仅耗时, 且灵敏度和特异性较低。近年来发展起来的分子生物学方法, 不仅提高了病原体的快速诊断, 其灵敏度和特异性也有很大的提高, 且易于标准化和自动化, 并且能进行流行病学分型, 也可利用检测病毒载量来监测治疗, 因此成为了新发感染病的重要诊断方法。本文对近年流行的一些新发病毒的检测方法做一简要综述。

1 新发呼吸道传播病毒

1.1 甲型流感病毒(Influenza A)

甲型流感病毒主要引起甲型流感, 由于病毒表面糖蛋白血凝素(H)和神经氨酸苷酶(N)基因点突

变导致了其抗原性的不断变化, 使其流行特征呈季节性, 而基因重组引起新的 H 和 N 抗原亚型变异则能引起大范围流行。在 1997 年和 2009 年分别爆发了 H₅N₁ 禽流感 and H₁N₁ 猪流感, 其根源是嘉兴流感病毒所发生的变异和重组。分子生物学是甲型流感病毒首选诊断方法, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、病原体重测序芯片(Resequencing Pathogen Microarray)能同时对甲型禽流感所有亚型和协同感染的 30 多种病原体同时进行检测^[3]。另外, 逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)也可以实现 H₁N₁ 快速准确的鉴定与诊断^[4]。

1.2 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)

SARS-CoV 于 2003 年在中国广东引起 21 世纪第一个大流行。它主要通过呼吸道分泌物和空气传播。SARS-CoV 致死性非常高, 疾病早期临床症状和体征与普通呼吸道感染无明显区别。因此基于 PCR 的分子检测显得非常重要, 它能快速筛查多种病毒。RT-PCR 在疾病初期从鼻咽吸取物中对 SARS-CoV 的检出率为 32%, 14 天后能达到 68%, 发病 14d 后粪便标本的阳性率为 97%。而 SARS-CoV IgG 血清转化试验需等到第 10 天才可检测出阳性, 18 天后阳性率达 60%, 30 天后 IgG 阳性率 100%。

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 国家科技重大专项资助(2008ZX10004-001)。

通讯作者: 吴移谋, 教授, 硕士生导师, E-mail: yimouwu@sina.com.

1.3 人冠状病毒 (Human coronavirus, HCoV)

HCoVs 为有包膜的正链 RNA 病毒,60 年代曾证实 HCoV 亚型 229E 和 OC43 能引起普通感冒,在 SARS 爆发后不久,鉴定出另外两种 HCoVs,即 NL63 和 HKU1。HCoVs 一般引起上呼吸道感染,然而在幼儿和免疫低下的成年人,可引起严重的下呼吸道感染。传统的病毒的培养和免疫试验可用于检测 HCoV-229E 和 HCoV-OC43,但需要 2~3 周。HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 营养要求更苛刻,血清免疫试验相对不敏感。因此,分子试验成为了重要的检测方法,它可一次性检测数种亚型^[5],但是基因变异对所有流行株难以检测。

1.4 人类偏肺病毒 (hMPV)

hMPV 属单链核糖核酸病毒,可引起不同年龄人群的呼吸道感染,但以儿童居多。hMPV 在细胞培养中生长缓慢,血清学试验特异性低,RT-PCR 是检测 hMPV 的重要手段^[6]。van den Hoogen^[7] 利用基于随机引物 PCR,通过克隆和序列分析,已获得了 hMPV 的基因组序列。

1.5 人博卡病毒 (Human Bocavirus, HBoV)

HBoV 是细小病毒科中的单链线状 DNA 病毒,在 80% 病例中与其他病原体共同引起呼吸道感染,临床症状和其他病原体相似。目前对 HBoV 的诊断主要是采用 PCR 扩增和实时 PCR 扩增,并且 HBoV 的首次发现就是通过 PCR 扩增、大规模的序列测定和生物信息检测出来的。尽管目前可用衣壳抗原来检测血清中 HBoV 抗体,但是受到纯化特异性蛋白等因素的制约,PCR 依然是目前最有价值的诊断方法。

2 出血热病毒 (Hemorrhagic Fevers virus)

病毒性出血热综合征常伴出血症状,是由一组异源病毒引起。这些病毒常为单链负股 RNA,有脂质包膜,多属于砂状病毒科、丝状病毒科、布尼亚病毒科和黄病毒科。人类感染率和致死率非常高,为自然疫源性疾​​病,常呈地域分布。近年报道的新发病毒主要有:辛诺柏病毒 (Sin Nombre virus, 引起汉坦病毒肺综合征)、Junin 病毒 (Junin virus, 引起阿根廷出血热)、马丘波病毒 (Machupo virus, 玻利维亚出血热)、Lassa 病毒 (Lassa virus, Lassa 热)、Sabia 病毒 (Sabia virus, 巴西出血热)、马尔堡病毒 (Marburg virus, 马尔堡出血热)、埃博拉病毒 (Ebola virus, 埃博拉病毒出血热)、Alkhurma 病毒等。此类病毒的分离只能在 BSL-4 实验室里进行,一般以患者血清、血浆或其他体液为标本,通过细胞培养或实验动物进行分离鉴定。电

子显微镜对该类病毒的鉴定需要高浓度的病毒颗粒 ($>10^7$ 颗粒/mL)。血清学可检测抗原和 IgM,免疫组化对抗原检测也有一定价值。RT-PCR 可检测该类所有病毒,常规 PCR 或实时 PCR 可用来检测此类病毒。病毒的异源性使其不能利用通用的靶点,因此需要设计特定的引物,因而实时多重 PCR 受到了一定的限制。改良的核苷酸扩增技术如巢式或半巢式 PCR 提高了灵敏度和特异性。

3 新发胃肠道感染病毒

3.1 诺如病毒 (Norovirus, NoV)

NoV 是 RNA 杯状病毒,通过粪-口途径传播或人与人之间接触传播引起非细菌性腹泻暴发,其致病剂量低,发病率高。急性感染表现为呕吐、痉挛和水样腹泻,大部分呈自限性,但能持续排出病毒。NoV 尚不能进行细胞培养,也缺乏相应的动物模型。电子显微镜可检测出病原体,但敏感度非常低。ELISA 可进行快速检测,但是相对于 RT-PCR,其灵敏度和特异性差,RT-PCR 是检测呕吐物、粪便和食品中 NoV 比较理想的方法。然而由于 NoV 基因多样性,引物设计不能针对所有基因型。目前实时 RT-PCR 是检测 NoV 最好的方法^[8]。

3.2 轮状病毒 (Rotavirus)

轮状病毒属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae),是无包膜的 RNA 病毒,其变异程度高。对人类致病的主要为小切口摘除组,经粪-口途径传播,能引起任何人群的腹泻,是引起 5 岁内婴幼儿腹泻最主要的非细菌性病原体。ELISA 快速检测粪便中抗原是标准的诊断方法,但以 NSP3 为引物的 RT-PCR 提高了诊断灵敏度,并能进行菌株基因分型^[9]。

4 新发肝炎病毒

4.1 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV)

HCV 为单链 RNA 病毒,主要通过血源或体液传播,感染后大部分患者呈终身携带病毒状态,可引起慢性肝炎和肝癌。目前对其检测包括血清学和核酸检测,血清学检测可包括抗 HCV 抗体和核心抗原检测。由于抗 HCV 抗体检测简单快速,因此广泛应用于 HCV 筛查,但是由于窗口期长、免疫缺陷病人不能产生抗体,HCV 抗原检测虽然能缩短窗口期,但灵敏度欠佳,因此检测 HCV-RNA 成为了 HCV 感染最直接的标志。定量检测中主要有分支 DNA 和

实时荧光定量 PCR,近年来发展 HCV 基因型和亚型的检测可用来指导治疗和耐药性监测。

4.2 戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus,HEV)

HEV 是无包膜、单股正性 RNA 的肠源性传播病毒,在热带和亚热带很常见。HEV 基因型 1 病情比较严重,而基因型 3 症状轻微^[10]。利用 ELISA 或免疫印迹可检测特异性抗体。通过设计针对解螺旋酶、多聚酶和部分开放阅读框 2 的部分 3' 末端设计特异性引物,然后用常规 PCR 或实时 RT-PCR 可以从血清、粪便或者环境标本中检测出此病毒,但因受实验条件的限制,目前尚无法广泛开展。

5 新发逆转录病毒

5.1 人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus)

HIV 属于慢病毒属,为单链 RNA,具有 CD4 细胞亲嗜性。主要通过感染的血液或体液、胎盘和母乳喂养等方式传播,引起获得性免疫缺陷综合征(AIDS)并导致严重的机会性感染和恶性肿瘤。HIV 有两型:HIV-1 和 HIV-2。HIV-1 在世界范围内流行,HIV-2 主要在西非和中非。目前一般用 ELISA 快速筛查 HIV 抗体,随后用 Western blot 免疫印迹或核酸检测加以确诊。在早期也可检测 HIV 特异性抗原。外周血单核细胞 PCR 检测病毒 DNA 可发现亚型^[11],亦可在早期感染中检测血浆 HIV-RNA,HIV 病毒载量检测一般用来监测治疗的反应和预测疾病进程。

5.2 人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型(HTLV-I)与人类嗜 T 淋巴细胞病毒型(HTLV-II)

HTLV 为有包膜逆转录 RNA 病毒,对 CD4 细胞易感,HTLV-I 是第一个发现与人类疾病相关的逆转录病毒,主要引起 T 细胞白血病/淋巴瘤(T-cell leukemia/lymphoma,ATL)、HTLV-I 相关性脊髓病(HTLV-I associated myelops)、热带痉挛性瘫痪(tropical spastic paraparesis,TSP)。HTLV-II 有极少数报道引起 TSP。病毒分离培养后可在电镜下观察病毒颗粒,并能测定上清液中逆转录酶活性。免疫学方法可用来检测血清中抗体,也可用 PCR、RT-PCR 和原位杂交检测感染细胞内或病毒培养物中前病毒的核酸^[12]。

6 其它新发病毒

6.1 疱疹病毒(human herpes virus,HHV)

HHV 为双链 DNA,新发的 HHV 中主要有

HHV-6、HHV-7、HHV-8 等亚型。HHV-6、HHV-7 主要通过唾液传播,全世界儿童体内有较高 HHV-6 抗体阳性率。急性感染主要表现为幼儿急疹和发热,可进行分离培养和血清学检测,也可通过 PCR 或 RT-PCR 检测血浆/血清或 PBMC 的 HHV-7 DNA 或 RNA。而 HHV-8 主要通过性接触传播,引起 Kaposi 肉瘤。除了免疫学检测血清抗体外,PCR 或实时 PCR 检测血浆或 PBMC 病毒复制和病毒载量的良好的方法^[13]。

6.2 微小病毒 B19(Parvovirus B19)

微小病毒 B19 为单股 DNA 的微小病毒科,对人红细胞有高度亲嗜性。主要经呼吸道分泌物或血液制品传播,可引起任何年龄阶段人群的感染,但以 6~10 岁儿童为多,感染后有特征性传染性红斑(erythema infectiosum,EI)。在急性感染期可检测特异性 IgM 抗体,但也可用 PCR 检测血液、呼吸道分泌物、尿液和免疫低下患者组织中 DNA 的含量,其敏感性好。

6.3 西尼罗河病毒(West Nile virus,WNV)

WNV 属于黄病毒科,为单股 RNA,主要经库蚊叮咬、血液制品输注、器官移植进行传播,引起脑膜脑炎,发热等。此病毒可用传统的分离培养方法加以鉴定,但灵敏度不高。ELISA 和 IFA 可用来检测脑脊液和血清中 IgM 和 IgG^[14]。目前 RT-PCR 应用最广泛,而实时 RT-PCR 由于快速灵敏、准确等特点。

7 展 望

新发病毒出现后,要求我们对其作出快速的诊断以便于疾病的控制和预防。分子生物学方法在新发病原体的发现和检测上体现了巨大的优势,并能进一步用于对预后和治疗效果的评价。然而这些高度自动化的检测多局限在中心实验室或大型医院,仪器要求高、技术要求严格,因此有必要进一步发展和开发即刻检验技术。所有致力于发展分子诊断方法的公司目前力图使分析仪器小型化,以便能在偏远地区使用。目前用于即刻检测前景较好的技术包括实时 PCR、纳米探针技术、生物发光实时扩增、微阵列和微型泵技术等^[2]。它们成本低、方便实用,能及时、准确地进行诊断,从而有利于进行积极有效的治疗,但需要解决的问题是如何进一步提高其诊断特异性和实验商品化,以提高新发病原菌的检测和监控。

参考文献:

- [1] 梁之祥. 新发传染病研究概况[J]. 实用医药杂志. 2010,27(10):950-952.
- [2] Olano JP, Walker DH. Diagnosing emerging and reemerging infectious diseases: the pivotal role of the pathologist[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(1): 83-91.
- [3] Metzgar D, Myers CA, Russell KL, et al. Single assay for simultaneous detection and differential identification of human and avian influenza virus types, subtypes, and emergent variants[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e8995.
- [4] Hatano B, Goto M, Fukumoto H, et al. Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification[J]. J Med Virol, 2011, 83(4): 568-573.
- [5] de Souza Luna LK, Heiser V, Regamey N, et al. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 1049-1052.
- [6] Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus[J]. Clin Lab Med, 2010, 30(1): 131-148.
- [7] van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses[J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(4): 658-666.
- [8] Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide[J]. Discov Med, 2010, 10(50): 61-70.
- [9] Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TaqMan assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples[J]. J Virol Methods, 2009, 155(2): 126-131.
- [10] Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(3): 328-334.
- [11] Weidner J, Cassens U, Göhde W, et al. An improved PCR method for detection of HIV-1 proviral DNA of a wide range of subtypes and recombinant forms circulating globally[J]. J Virol Methods, 2011, 172(1-2): 22-26.
- [12] Momose H, Kuramitsu M, Yamaguchi K. Human T lymphotropic virus type-1, HTLV-1 provirus DNA[J]. Nippon Rinsho, 2010, 68(Suppl6): 469-472.
- [13] Hrncaković-Cvjetković I, Cvjetković D, Petrić D, et al. Up-to-date knowledge of West Nile virus infection[J]. Med Pregl, 2009, 62(5-6): 231-235.
- [14] Tedeschi R, Marus A, Bidoli E, et al. Human herpesvirus 8 DNA quantification in matched plasma and PBMCs samples of patients with HHV8-related lymphoproliferative diseases[J]. J Clin Virol, 2008, 43(3): 255-259.

(此文编辑 蒋湘莲)