

ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1469—2007

尼帕病毒病诊断技术

Diagnostic techniques of Nipah virus disease

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：陈继明、王志亮、魏荣、孙承英、王清华、赵永刚、刘佩兰。

尼帕病毒病诊断技术

1 范围

本标准规定了尼帕病毒(Nipah virus, NiV)病临床诊断技术、实验室检测技术、疑似病例判定标准和确诊病例的判定标准以及相关操作要求。

本标准适用于各种动物尼帕病毒病的诊断,也可以作为诊断某些类似 NiV 的病毒感染的参考。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 19489—2004 实验室生物安全通用要求

国务院令 第 424 号 病原微生物实验室生物安全管理条例

3 生物安全措施

诊断尼帕病毒病疑似病例时,应遵守《实验室生物安全通用要求》(GB 19489—2004)和《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院令 第 424 号);在尼帕病毒病感染猪场或疑似感染猪场进行现场调查诊断过程中,生物安全防范措施参见附录 A。

4 临床诊断

4.1 猪感染 NiV 的临床诊断

感染 NiV 的猪场临床发病的猪可能只占少数,大部分的猪可不表现任何临床症状。该病的潜伏期估计为 7~14 d,猪可以经消化道和其它途径感染 NiV。此病在猪群内传播迅速。NiV 可以感染各个月龄的猪,都可表现出急性发热症状,并伴有呼吸困难和(或)神经症状,但不同类别的猪可表现不同的临床症状:种母猪主要表现为神经症状,包括兴奋、头颈僵直、破伤风样痉挛、四肢前伸、眼球震颤、空嚼等,怀孕的母猪可发生流产;种公猪可表现呼吸困难(气喘),唾液分泌增多,从鼻孔流出带有血丝和脓性分泌物的黏液,以及一些神经症状,也可发生急性死亡;肉用猪主要表现为呼吸道症状,绝大多数感染的乳猪表现张口呼吸、后肢无力并伴有肌肉震颤以及神经性抽搐等症状,乳猪病死率可达 40%;断奶仔猪主要表现为程度不同的呼吸道症状。临床诊断时,应注意感染的猪场及其周围人和其它动物的发病情况,以及新猪引进情况。

4.2 其它动物感染 NiV 的临床诊断

人感染 NiV 后,出现急性高热,多数以神经症状为主,有些以呼吸道症状为主;犬感染 NiV 后,可出现类似犬瘟热症状;猫感染 NiV 后,死亡率很高;马感染 NiV 后可出现神经症状,通常可自然康复。

5 实验室检测

5.1 样品的采集和运输

按照生物安全要求,采集可疑动物的脑、肺、肾、脾、肝、淋巴结及血清,在低温和密封状态下,运输到指定的具备生物安全条件的实验室检测。

5.2 病理学诊断

动物感染 NiV 后,肺和脑膜是主要的病变器官:大多数病例肺部发生病变,包括程度不同的实变、

气肿、淤斑性溢血以及呼吸道有带血丝的分泌物,切开肺部,可见肺小叶间隔肿胀;脑膜弥漫性充血、水肿。其它内脏器官一般无明显的变化。

5.3 病原学诊断

5.3.1 病毒分离

5.3.1.1 样品处理和细胞培养

在无菌情况下处理受检样品。用密闭的匀浆器处理含 10%(w/v)组织样品的悬浮液(悬浮液为 PBS,配方见附录 B)。样品磨碎后,4℃下 5 000 r/min 离心 15 min,将上清加入到培养的 Vero 细胞或兔肾细胞(RK-13)中,培养 5 d。如果 5 d 内细胞出现大量死亡,则停止培养,进行进一步检测。

5.3.1.2 结果判断

如果上述培养的细胞在 2~5 d 内出现大量的细胞死亡,则判受检样品含有病毒,但不一定是 NiV。如果受检样品中含有 NiV,一般可引起特征性细胞病变:经过 24~48 h,有些感染的细胞死亡,有些感染的细胞发生融合,融合的细胞可含有 60 个以上的细胞核,并且融合细胞的细胞核分布在融合细胞的周围。如果上述培养的细胞在 2~5 d 内没有出现大量的细胞死亡,应该再盲传 2 次,每次培养 5 d,如仍未见大量的细胞死亡,则判病毒分离阴性。

5.3.2 病毒中和实验(VNT)方法检测病原

5.3.2.1 病毒与细胞相互作用

标准的 NiV 样品以及受检的病毒样品(即 5.3.1 步骤所获得的病毒分离物)稀释到每 50 μ L 约含有 100 个 TCID₅₀ 的病毒。然后把它们分别加到 96 孔细胞培养板(平底)对应的孔中,再每孔加上 50 μ L EMEM 培养基、50 μ L 倍比稀释的 NiV 标准抗血清,每份样品与每个稀释度的 NiV 标准抗血清相互作用的孔至少设置 2 个,37℃作用 45 min 后,每孔加上 50 μ L 含有 2.4×10^4 个 Vero 细胞的 EMEM 培养基,最终每孔液体约为 200 μ L。37℃培养 3 d 后,观察细胞病变。

5.3.2.2 质量控制

在进行 5.3.2.1 步骤同时,设置 4 种对照:只含有细胞的细胞对照(不加标准 NiV 样品、受检样品和 NiV 标准抗血清)、含有细胞和 1:5 稀释的 NiV 标准抗血清的标准抗血清对照(不加标准 NiV 样品或受检样品)、含有细胞和标准的 NiV 样品的标准 NiV 对照(不加标准抗血清)、含有细胞和受测样品的受测样品对照(不加标准抗血清)。每种对照至少设置两个重复。细胞对照和标准抗血清对照细胞都生长良好,且标准 NiV 对照和受测样品对照都出现细胞死亡等细胞病变,以及标准的 NiV 样品和一定稀释度的 NiV 标准抗血清相互作用的孔细胞都生长良好,判为检测质量符合要求。

5.3.2.3 结果判断

在符合质量控制要求的前提下,如果受检的病毒样品和 1:5 或 1:5 以上的标准阳性血清相互作用的孔细胞都生长良好,则检测结果为 VNT 阳性;如果受检样品和 1:5 稀释的标准阳性血清相互作用的孔细胞发生细胞病变,则检测结果为 VNT 阴性。

5.3.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测病原

5.3.3.1 样本处理和 RNA 提取

用美国 Initrogen 公司生产的 TRIzol 按照其说明书,或者用其它可靠的 RNA 提取方法,提取 5.1 部分所述的临床样品或 5.3.1 步骤所获得的病毒分离物的总 RNA。提取的 RNA 如在 2 h 内检测则于冰上保存,否则置于-70℃冰箱保存。

5.3.3.2 扩增体系配置

每份被检样品检测 1 次,必要时重新检测 1 次。可采取普通 RT-PCR 扩增体系和荧光 RT-PCR 扩增体系。荧光 RT-PCR 扩增体系,每管含有 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、3 μ L MgCl₂ (25 mM)、2 μ L dNTPs(2.5 mM)、0.5 μ L 引物 NiV01(20 mM)、0.5 μ L 引物 NiV02(20 mM)、0.3 μ L 探针 NiV03 (20 mM)、5U Taq DNA 聚合酶、5U AMV 反转录酶、40U RNase 抑制剂和 2 μ L 从被检样品中提取的

RNA,用纯水将每管总体积补齐至 25 μ L。普通 RT-PCR 扩增体系除了探针用等体积纯水替代之外,其余和荧光 RT-PCR 扩增体系完全相同。每次检测设置标准阳性对照和标准阴性对照。标准阳性对照用阳性对照 RNA 作为模板,而标准阴性对照用纯水作为模板。引物 NiV01、NiV02、探针 NiV03 和阳性对照 RNA 见附录 C。

5.3.3.3 扩增反应

荧光 RT-PCR 扩增反应的条件如下:42 $^{\circ}$ C,40 min;然后 94 $^{\circ}$ C,90 s;然后 94 $^{\circ}$ C,10 s;57 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,20 s,6 个循环。然后 94 $^{\circ}$ C,10 s;60 $^{\circ}$ C,90 s,40 个循环,在此 40 个循环中 60 $^{\circ}$ C 时于 490 nm 处收集荧光信号。对于普通 RT-PCR 检测模式,扩增反应后用 1%的琼脂糖凝胶进行核酸电泳,电压 100 V,电泳 30 min 后,观察扩增片断大小。

5.3.3.4 结果判断

荧光 RT-PCR 如果阳性对照的 Ct 值在预期的范围之内,阴性对照检测为阴性,说明检测的质量合格,在此情况下如果受检样品的 Ct 值 \leq 30,则判为阳性;阳性结果进一步用核酸电泳进行验证,如果受检样品 RT-PCR 扩增产物的大小约为 300 bp,则阳性结果得到进一步确认。

普通 RT-PCR 如果阳性对照的扩增产物的大小约为 200 bp,阴性对照检测无任何扩增条带,说明检测合格,在此情况下如果受检样品的 RT-PCR 扩增产物的大小约为 300 bp,则说明受测样品检测为阳性。

5.3.3.5 序列测定和分析

RT-PCR 检测阳性的扩增产物按照常规方法进行序列测定,测定后的序列在 GenBank(网址:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)中进行最相似序列搜寻(BLAST),如果与已经报道的 NiV 序列最相似,则确认 RT-PCR 阳性检测结果真实,如果和其它病毒或生物的基因序列最为相似,而与已经报道的 NiV 序列相差较大,则判断 RT-PCR 阳性检测结果是虚假的。

5.3.4 免疫组织化学方法检测病原

5.3.4.1 组织样品和相关材料

组织样品来自 5.1 部分所述的临床样品。用于检测 NiV 特异性抗原的抗体可以用纯化的 NiV 免疫兔而制备的兔抗 NiV 血清,也可以是特异性抗 NiV 的单克隆抗体。酶标第二抗体选用碱性磷酸酶标记的抗兔抗体。

5.3.4.2 免疫组化检测 NiV 特异性抗原

5.3.4.2.1 用福尔马林固定和石蜡包埋受检样品、阳性对照样品(取自发病动物的脏器)和阴性对照样品(取自正常动物的脏器),并制作超薄切片放在载玻片上,每个样品至少制作 2 个玻片。然后进行脱蜡:将这些载玻片放入二甲苯中浸泡 3 次,每次 1 min;再将它们放入 98%~100%乙醇中浸泡 2 次,之后用 70%乙醇浸泡 1 次,再让自来水轻轻流过片子,以去掉残余的乙醇。

5.3.4.2.2 将载玻片用蒸馏水洗后,浸没在含有 0.1%胰蛋白酶的 0.01 mol/L 的 CaCl₂溶液中(用 0.1 mol/L 的 NaOH 将 pH 调到 7.8),37 $^{\circ}$ C 作用 20 min,再用蒸馏水洗。

5.3.4.2.3 将载玻片平放在一个湿盒上,用 PBS 洗涤 5 min。然后每个片子加 200 μ L 3%的 H₂O₂,室温下作用 20 min,阻断内源性过氧化物酶。

5.3.4.2.4 用 PBS 洗涤 5 min,然后在每个样品的第一套片子上加 200 μ L 用含 0.1%脱脂奶粉的 PBS 适量稀释的兔抗 NiV 的血清,在每个样品的第二套片子上加 200 μ L 用含 0.1%脱脂奶粉的 PBS 适量稀释的兔抗其它与 NiV 无关的病原的血清(作为对照),37 $^{\circ}$ C 作用 1 h。

5.3.4.2.5 用 PBS 洗涤 5 min,然后每个片子加上 2~3 滴 EnvisionTM溶液(过氧化物酶标记的抗兔的抗体,DAKO 公司生产),将载玻片平放在一个湿盒上,37 $^{\circ}$ C 作用 20 min。

5.3.4.2.6 用 PBS 洗涤 5 min,然后加上底物溶液(配方见附录 B),作用 2~5 min 使充分染色,再用蒸馏水洗。底物溶液应该在使用前新鲜配制。

5.3.4.2.7 用苏木素对片子进行反向染色 1~3 min,然后用自来水洗涤,再加入 Scott 溶液(0.04 mol/L NaHCO₃,0.3 mol/L MgSO₄),然后用自来水仔细洗涤,再用蒸馏水洗涤,然后盖上盖玻片,里面加有水性封片剂。

5.3.4.2.8 观察结果:如果受检的样品和阳性对照样品的细胞浆内中都观察到棕红色颗粒沉积,并且阴性对照样品检测没有观察到这些棕红色颗粒,则判断受检样品检测结果为阳性。

5.4 血清抗体检测

5.4.1 VNT 法检测血清抗体

VNT 法检测血清抗体采用引起 50%细胞培养孔发生细胞病变的 TCID₅₀判定法。将受检血清和标准 NiV 病毒液作用后再加到含有 Vero 细胞的 96 孔板中,3 d 后进行观察。细胞病变被彻底抑制的孔判为阳性孔。血清从 1:2 开始倍比稀释进行检测。血清本身也会引起细胞病变,如果血清本身引起的细胞病变干扰性太强,可以先让受检血清和标准的病毒液在 37℃作用 10 min,然后将此混合液和细胞在 37℃作用 45 min,再倾去此混合液,以减轻血清本身引起的细胞病变的干扰。对于质量不好的血清,或者量少的血清(如蝙蝠等动物的血清)从 1:5 开始稀释。

被检血清在 10 倍以上稀释时能够完全抑止细胞病变,判定为阳性;被检血清 2~10 倍之间稀释时能够完全抑止细胞病变的,判为疑似;其它情况判为阴性。

5.4.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清抗体

抗 NiV 血清抗体 ELISA 检测所用的抗原包括用 NiV 感染的 Vero 细胞裂解液制备的 NiV 抗原和用正常 Vero 细胞裂解液制备的对照抗原。同一血清分别用 NiV 抗原来检测反应值和用对照原来检测背景值,最终以反应值和背景值的比值作为判定依据。

5.4.2.1 血清处理:在 2 级生物安全柜里,在 96 孔板的孔上用含有 0.5%(v/v) Triton X-100 和 0.5%(v/v) Tween-20 的 PBS 按照 1:5 比例稀释受检血清。密封此 96 孔板,于 56℃水浴 30 min。然后,每份灭活的血清样品取 22.5 μL,和用 PBS 稀释 100 倍的对照抗原进行等体积彻底混合,并在 18~22℃作用 30 min。然后,每份血清样品加入 405 μL 封闭液(配方见附录 B),使血清的最终稀释 100 倍,在 18~22℃作用 30 min,在两个用 NiV 抗原包被的孔和在另外两个用对照抗原包被的孔中分别都加入 100 μL 这样稀释的受检血清。

5.4.2.2 包被抗原:用 PBS 稀释对照抗原和 NiV 抗原,要确保这两种抗原蛋白质浓度相同。抗原通常稀释到 1/1 000~1/4 000。但对每一批抗原,都应确定其合适的稀释度。按照下面方法向 NUNC Maxisorp 96 孔微孔板中加入 50 μL 对照抗原或 NiV 抗原;第 1、3、5、7、9、11 列的孔中加入 NiV 抗原,在第 2、4、6、8、10、12 列的孔中加入对照抗原,然后 37℃震荡 1 h。

5.4.2.3 封闭 ELISA 板:用含有 0.5%吐温 20 的 PBS 洗涤 ELISA 板三次,再加入含有 5%脱脂奶粉的 PBS,37℃震荡 30 min,封闭 ELISA 板。

5.4.2.4 加被检血清:用 PBST(配方见附录 B)洗涤 ELISA 板 3 次,并再加入 100 μL 处理好的血清。在酶标 A 蛋白对照孔和底物对照孔中加入含有 5%卵清蛋白和 5%脱脂牛奶的 PBS。37℃静置 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次。

5.4.2.5 在含有 1%脱脂牛奶的 PBST 中稀释酶标 A 蛋白和酶标记 G 蛋白的混合物,稀释倍数为 1/3 000。仔细混匀后每孔加入 100 μL。底物对照孔中加入 100 μL 含有 1%脱脂牛奶的 PBST,37℃静置 1 小时,然后用 PBST 洗涤 3 次。

5.4.2.6 每孔中加入 100 μL 底物溶液(配置见附录 B),18℃~22℃孵育 10 min 后每孔加入 100 μL 1 mol/L 的硫酸,终止反应。

5.4.2.7 以底物对照孔为空白对照,测定各个孔的 450 nm 处的 OD 值,计算 OD 比,即每份血清样品在 NiV 抗原包被孔的 OD 值(OD_{NiV})和在对照抗原包被孔中的 OD 值(OD_{CON})的比值。

5.4.2.8 结果判定:①OD 比>2.2,且 OD_{NiV}>0.2,判为阳性;②OD 比>2.0,且 OD_{NiV}<0.2,判为阴

性；③OD 比在 2.0 和 2.2 之间，且 $OD_{NiV} > 0.2$ ，判为疑似；④疑似和阳性样品应该用 VNT 进行进一步检测。

5.4.2.9 阳性血清从 1:100 开始 2 倍系列稀释，按照上述方法进行检测，测定血清效价。

6 疑似病例和确诊病例的判定标准

6.1 疑似病例的判定标准

尼帕病毒病的疑似病例的判定标准是以下 4 项中任意 1 项：

第一项：按 5.3.2 所述方法，检测阳性。

第二项：按 5.3.4 所述方法，检测阳性。

第三项：未经人为的 NiV 特异性免疫的动物血清抗体按 5.4.1 部分所述方法，检测阳性。

第四项：未经人为的 NiV 特异性免疫的动物血清抗体按 5.4.2 部分所述方法，检测阳性。

6.2 确诊病例的判定标准

尼帕病毒病的确诊病例的判定标准应同时满足以下两项指标：

第一项：临床样品或临床样品中分离的病毒，按 5.3.3 所述的 RT-PCR 方法检测为阳性，并且一个地区的首发病例此 RT-PCR 阳性检测结果得到核酸序列测定的证实。

第二项：第一项所述的阳性结果得到国家外来动物疫病诊断中心的确认。

附录 A
(规范性附录)

尼帕病毒感染猪场或疑似猪场现场调查诊断时的生物安全防范措施

在尼帕病毒感染猪场或疑似猪场进行有关操作,如临床症状的观察、剖检、采样时,应当采取以下生物安全防范措施:

- A. 1 到达猪场时,划定“干净区”(通常包括猪场里的住房、办公室和交通工具)和“潜在感染区”,保证在场的全体人员容易识别此两区的界限。采取一些措施以保证不会将猪圈里的可能存在的 NiV 传到干净区。在干净区和潜在感染区交界处放置消毒桶,使用的消毒剂有高氯酸钠、来苏儿等。
- A. 2 在干净区内,穿上合适的防护服,包括长袖外套、橡胶靴、手套(最好两双,用带子连在外套袖口上)、护眼(护目镜、安全眼镜或安全面具)以及护鼻和护口(口罩或可以过滤病毒颗粒的面具)。进行动物尸检的人员最好配上正压呼吸器和抗穿刺手套。
- A. 3 在进入感染区之前,计划好尽可能减少从感染区回到干净区的次数。如果在操作过程中返回到清洁区,那么必须在感染区和干净区的边界上消毒靴子、手套等。
- A. 4 进入感染区和进行现场视诊时,注意动物(猪)的健康状况、所有病畜或死畜的分布状况、需要采样的各组动物所在位置,注意选择合适的采样区或者进行尸检的场所。如果对猪进行采血,应使用专用的有利于凝集的采血管。如果进行验尸操作,应选择一个对其它动物感染机会较少并且便于清洁和消毒的地方。
- A. 5 在感染区内,应携带一个消毒喷雾瓶,以便手和设备在整个操作过程中可以随时清洗和消毒,从而防止人和设备带来的污染。
- A. 6 当操作完后,用合适的容器收集所有的垃圾,把所有的针或一次性解剖刀片放入标有“尖锐物”字样和含有消毒液的容器中,帮助畜主销毁验尸后的尸体(将尸体放入密封的口袋,消毒袋子的外面,然后掩埋或焚烧)。
- A. 7 从设备、靴子、手和衣服上洗掉所有可见的污染物(血,粪便),然后在干净区和感染区的边界处,对衣服、围裙、设备和样品进行消毒。喷雾消毒衣服,在消毒桶里清洗靴子,将设备搬上交通工具之前消毒设备。如果防水外套准备重新使用,那么也彻底消毒这些外套。
- A. 8 样品容器(血液管,组织瓶)的外面应该清理干净且用消毒剂消毒。这些容器必须用塑料袋系紧,然后放在运输容器内(理想的是塑料或金属容器,但起码是塑料袋),而且在运输容器的外面也要用消毒剂消毒。
- A. 9 当所有的东西消毒完搬上交通工具后,把样品和设备摆好,然后脱掉防护衣。如果使用了布制的外套,那么用消毒剂浸泡这些外套,并保存在防漏的塑料袋里。
- A. 10 丢弃的物品如手套和其它任何生物危害垃圾或者其它结实的塑料袋放入垃圾袋并系好袋口,并根据实际情况进行无害化处理。
- A. 11 离开清洁区之前换上干净衣服,完成最后一次脱衣之后才脱掉最里层手套。工作中,至少每天都要更换所有的衣服,而且在不同的猪场穿不同的衣服。
- A. 12 离开猪场前用消毒剂消毒交通工具,包括轮胎与轮轴。

附录 B
(规范性附录)
溶液配置

- B.1** PBS的配置:8.0 g NaCl,0.2 g KCl,1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,2.0 g KH_2PO_4 ,溶于800 mL H_2O 中,调pH至7.2,用水定容到1 000 mL,高压灭菌而成。
- B.2** PBST:每1 L PBS中加入0.5 mL吐温-20。
- B.3** 免疫组化检测 NiV 特异性抗原所用底物的配置:用200 μL 二甲基甲酰胺溶解2 mg 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC),将其加入到10 mL 0.02 mol/L的醋酸溶液中(pH7.0),然后在其中加入5 μL H_2O_2 (30%,w/v),轻轻摇匀而成。
- B.4** ELISA 封闭液的配置:每100 mL_{PBST}中加入5 g 脱脂奶粉,摇匀。
- B.5** ELISA 底物的配置:用10 mL 二甲亚砜(DMSO)溶解101 mg 四甲基联苯胺(TMB),分装保存在4℃,使用时在10 mL 底物缓冲液(底物缓冲液为8.2 g 醋酸钠加纯水900 mL 溶解,然后用0.1 mol/L 柠檬酸将pH调到5.9,再加纯水定容到1 000 mL 而成)加入100 μL 溶解的TMB溶液和1 μL H_2O_2 (30%,w/v),轻轻摇匀而成。

附 录 C

(规范性附录)

RT-PCR 引物、探针和阳性对照序列

- C.1 上游引物 NiV01 的序列:5 - TAGAAATAATCTCAGACATCGGAAA - 3。
- C.2 下游引物 NiV02 的序列:5 - CCCATAGACCTGTCAATAGTAGTAGC - 3。
- C.3 探针 NiV03 的序列:FAM - TTTGCCCCTGGAGGTTACCCATTATCG - TAMRA。
- C.4 阳性对照是体外转录的 RNA,含有 NiV01、NiV02 和 NiV03 的对应的序列。其序列为:
UAGAAAUAAUCUCAGACAUCGGAAACUAUGUCGGCUGCUGCAGUUCAGGAAA
CAUCAGCUACUCUACAGAGAAAUUGGCCCAAGAGCCCCUUAUAUGGUGCUUCU
UGAAGAAUCAAUUCAGACUAAAUUUGCCCCUGGAGGUUACCCAUUAUUCAGU
UCUGUGAGCACAUCCGGUUGGCUACUACUAUUGACAGGUCUAUGGG。
-