

埃博拉病毒感染的实验室诊断方法研究进展

乔晋娟^{1,2}, 罗俊^{1,2}, 危宏平¹

1. 中国科学院武汉病毒研究所新发传染病研究中心, 武汉 430071
2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要 埃博拉病毒病是由埃博拉病毒引起的一种急性出血性传染病, 具有极高的传染性, 病死率高达90%, 世界卫生组织已将埃博拉病毒列为对人类危害最严重的病毒之一, 目前虽有一个被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于紧急治疗的实验药物TKM-Ebola, 但尚无批准上市的用于预防埃博拉病毒的疫苗。建立快速、准确、简便的实验室检测方法对及时进行临床诊断救治、开展流行病学调查并最终控制其传播流行具有重要意义。本文综述埃博拉病毒实验室检测方法的原理、应用及进展, 介绍病毒分离、电子显微镜观察、逆转录聚合酶链反应法、抗原检测试验、抗体酶联免疫吸附试验、血清中和试验及其他检测方法。

关键词 埃博拉病毒病; 埃博拉病毒; 实验室诊断

中图分类号 Q93-331

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.01.018

Laboratory diagnosis of Ebola virus disease: A review

QIAO Jinjuan^{1,2}, LUO Jun^{1,2}, WEI Hongping¹

1. Center for Emerging Infectious Diseases, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Ebola virus disease (EVD) caused by Ebola viruses (EBOV) is an acute hemorrhagic infectious disease. Because of its high infectivity and high mortality rate (up to 90%), EBOV is listed as one of the most dangerous viruses to human by World Health Organization. Although US FDA gave it emergency clearance to use an experimental drug TKM-Ebola, there is no Ebola vaccine available yet. Rapid, accurate, simple and reliable laboratory diagnostic tests are required in suspected cases for timely treatment, epidemiological investigation and controlling the spread of the EVD. This review summarizes the principles, applications and progress of the laboratory diagnosis of EVD, covering virus isolation by cell culture, electron microscopy, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, antigen detection, antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay and serum neutralization test.

Keywords Ebola virus disease; Ebola virus; laboratory diagnosis

埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)自1976年首次在扎伊尔(现刚果民主共和国)和苏丹暴发以来, 已在非洲的乌干达、刚果、加蓬、苏丹、科特迪瓦、利比里亚和南非等地形成地方性流行^[1]。EVD由埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)引

起, 可经人与人之间的亲密接触传播, 传染性强, 病死率高达40%~90%。2014年9月22日美国食品和药物管理局(FDA)批准实验药物TKM-Ebola用于紧急治疗, 但尚无批准上市的用于预防埃博拉病毒的疫苗^[2]。EBOV属于丝状病毒科(Filo-

收稿日期: 2014-08-26; 修回日期: 2014-10-21

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KJZD-EW-L02); 武汉新发传染病与生物安全重点实验室项目(WHEID-2014004)

作者简介: 乔晋娟, 博士研究生, 研究方向为诊断微生物学, 电子信箱: jjqiao234@sina.com; 危宏平(通信作者), 研究员, 研究方向为诊断微生物学和噬菌体, 电子信箱: hpwei@wh.iov.cn

引用格式: 乔晋娟, 罗俊, 危宏平. 埃博拉病毒感染的实验室诊断方法研究进展[J]. 科技导报, 2015, 33(1): 100-106.

viridae)丝状病毒属(Filovirus),是非分节段的单股负链RNA病毒^[3]。目前已鉴定的EBOV有5种亚型,分别是:本迪布焦型埃博拉病毒(Bundibugyo ebolavirus, BDBV),扎伊尔型埃博拉病毒(Zaire ebolavirus, ZEBOV),莱斯顿型埃博拉病毒(Reston ebolavirus, RESTV),苏丹型埃博拉病毒(Sudan ebolavirus, SUDV),塔伊森林型埃博拉病毒(Tai Forest ebolavirus, TAFV)^[14]。其中,扎伊尔型EBOV和苏丹型EBOV毒力最强^[5]。虽然EDV目前主要呈现地方性流行,绝大部分集中于非洲,但随着全球化进展,物流、人流的交换更加快捷频繁,增加了EDV输入性暴发流行的可能,对人类健康和公共卫生安全造成潜在的威胁。EBOV的早期临床症状与其他病毒性出血热有类似之处,及时检出和确诊病例对其流行控制和治理有重要意义。EBOV的确诊一般需要结合患者的临床症状、病理变化和实验室的检测。目前对EBOV的实验室检测方法主要有病毒分离、病毒粒子的电子显微镜、逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)、抗原检测试验、抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)和血清中和试验。主要的检测对象包括病毒抗原、抗体和核酸,以及感染的血液和组织样品中的病毒培养物。在每次EVD疫情调查中,多种实验室诊断方法被结合使用,用于EBOV感染的确诊。

1 病毒分离培养

病毒分离是诊断EVD的一个简单和灵敏的方法。EBOV在MA-104、Vero E6、Vero 76、HeLa-229、SW-13和DBS-FRHL-2等多种细胞株中都生长良好,使用最多的是Vero E6细胞^[6-9]。用细胞培养分离鉴定EBOV,通常需要3~10 d。取急性期患者的血液、尿液或尸检组织悬液直接接种敏感细胞进行培养,分离培养的病毒可以通过直接观察细胞病变,或是用多克隆抗体或病毒型特异或株特异的单克隆抗体,通过间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)或其他特异性免疫检测手段进行鉴定。也可以结合其他方法,如RT-PCR方法进行检测,或通过电子显微镜进行形态学检测辅助确认。病毒分离诊断结果准确,但费时较长,实验过程中需要严格的实验环境,对实验条件和实验操作人员要求也很高。由于EBOV的分离培养须在BSL-4实验室中进行,而从疫情发生地区到BSL-4实验室通常距离较远,在适合的条件下(冷链)运输用于病毒分离的样本是非常困难的。这些都限制了病毒分离方法在EBOV检测中的应用。

2 电子显微镜

电子显微镜(electron microscope, EM)能够直接观察到细胞分离培养物或临床样品(粪便、尿液和活检标本)中的病毒颗粒的具体形态,在病毒检测尤其在鉴定未知病原和生物恐怖袭击病原中发挥着重要的作用,可以作为疫情暴发或恐怖袭击事件中病毒的快速检测方法^[10-13]。EM技术曾在EBOV的发现过程中发挥过重要作用^[14-16]。在处理1976年刚果民主共和国(前扎伊尔)暴发的出血热疫情时,通过EM观察细胞分

离培养物,发现引起出血热的病毒为一种丝状病毒,即扎伊尔型EBOV^[14]。莱斯顿型EBOV也是最早在1989年从细胞分离培养物中通过EM鉴定出的^[16]。由于只需要经过简单的负染就可以直接观察到病毒粒子的形态,EM作为一种快速的诊断方法,被多次用于EVD疫情暴发时的EBOV检测^[16,16-19]。除了检测或识别病毒,EM也可以用来通过形态上精密的超微结构的差异来区分类似的病毒,例如同属于丝状病毒科的马尔堡和EBOV^[6]。EM的灵敏度相对较低,检测的病毒浓度底限为 $10^5\sim 10^6$ /mL,而且在用EM方法鉴定EBOV时,必须在专门的高等级生物安全实验室进行^[20]。

3 逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)

分子生物学的发展为病原体的检测和特性分析提供了快速、可靠的技术手段。由于病毒核酸从症状出现后的第3~16天可在血液中检测到,因此通过逆转录PCR(RT-PCR)技术及实时荧光定量RT-PCR(real time RT-PCR)技术检测病毒核酸,可用于EBOV感染的早期诊断^[21]。

3.1 普通RT-PCR与巢式PCR

在EBOV核酸检测时,一般选择高度保守的编码聚合酶的L基因、糖蛋白(GP)或核蛋白(NP)编码基因作为扩增靶标。目前已有多个实验室分别根据这些基因设计了特异性引物或核酸探针,其敏感性和特异性与血清学抗原检测法相当或更高,且简便快速,已在多次EVD暴发或流行中得到应用^[22-26]。在检测1995年刚果民主共和国和1996年菲律宾等地暴发的EVD的人类和非人灵长类动物样本中的EBOV时, Sanchez等^[24]根据病毒L基因、GP及NP编码基因分别设计了用于扩增所有丝状病毒科病毒的通用引物FILO-A和FILO-B,用于扩增EBOV所有亚型的通用引物EBO-GP1和EBO-GP2,及用于扩增扎伊尔型EBOV的特异引物ZAI-NP1和ZAI-NP2、用于扩增莱斯顿型EBOV的特异引物RES-NP1和RES-NP2。在处理2000—2001年期间在乌干达暴发的EVD疫情时, Towner等^[25]根据NP编码基因序列设计一套巢式RT-PCR引物,可同时检测扎伊尔型和苏丹型EBOV。

3.2 实时荧光定量RT-PCR

实时荧光定量RT-PCR技术相对于普通RT-PCR方法更为快速、灵敏、污染小、可实时定量并易于标准化和高通量,近年来也广泛应用于暴发EVD疫情时的EBOV检测^[25,27,28]。Drosten等^[27]建立的一步法实时荧光定量RT-PCR是在 Sanchez等^[24]设计的丝状病毒通用引物FILO-A和FILO-B的基础上,加入DNA荧光染料SYBR green I,用于扩增EBOV所有亚型的L基因。此外,刘阳等^[29]根据GenBank中公布的EBOV NP基因序列,通过设计引物和优化反应条件,建立了一种EBOV的SYBR green I荧光定量RT-PCR检测方法,可检测5种亚型的EBOV。染料法荧光定量PCR法在引物设计上相对简便,但特异性相对较差。在EBOV实时荧光定量RT-PCR中使用更多的是TaqMan探针法^[25,28,30,31]。Gibb等^[28]在 Sanchez^[24]设计的用于扩增EBOV所有亚型的通用引物EBO-GP1和EBO-

GP2基础上,设计了FAM和VIC两条不同标记的荧光探针,两种荧光信号通过发射光谱的不同加以区分,建立了在一个管中同时检测扎伊尔型和苏丹型EBOV的反应体系。Towner等^[29]建立了扩增苏丹型EBOV Gulu毒株NP基因上的两步法TaqMan探针法荧光定量RT-PCR方法,与巢式RT-PCR方法结合使用来检测EVD疫情处理中EBOV的检测。Huang等^[30]也针对NP编码基因的保守区域,设计了引物和探针,建立了用于扩增扎伊尔型EBOV的TaqMan探针法荧光定量RT-PCR检测方法。盖微微等^[31]根据不同国家和地区分离的苏丹型和扎伊尔型EBOV GP编码基因的保守区序列,设计了一对通用引物及苏丹型和扎伊尔型的特异性TaqMan探针,建立了EBOV荧光定量RT-PCR检测与分型方法。探针法扩增的靶基因片段比染料法更短,进一步缩短了PCR反应的时间。刘阳等^[32]根据GenBank中公布的EBOV NP编码基因序列,设计引物和MGB探针,通过优化反应条件,建立了一种检测扎伊尔亚型和苏丹亚型的EBOV一步法MGB荧光定量RT-PCR方法。TaqMan-MGB探针标记技术,与普通的TaqMan探针相比,MGB探针的3'端淬灭基团可以降低本底的信号强度,提高分辨率,同时探针上还连接有MGB修饰基团,不增加探针碱基数就可以将探针的 T_m 值提高10℃左右,进而提高扩增产物的特异性。最近非洲爆发EVD疫情后,中国的多家机构,如上海之江生物科技股份有限公司、军事医学科学院、中国疾病与预防控制中心、中国科学院武汉病毒研究所等,也分别报道研制成功了埃博拉病毒核酸检测试剂盒。

3.3 简并RT-PCR

EBOV基因组为单负链RNA,变异较大,存在许多不同的基因型和亚型,而这些RT-PCR检测方法往往是针对EBOV某一个或几个亚型设计的,相对特异,不能用于所有EBOV所有亚型的检测,尤其是对潜在的新亚型的检测。为了解决这个问题,Zhai等^[33]根据已知的L基因序列信息,设计了用于扩增所有丝状病毒的简并引物,建立了一步法RT-PCR检测体系,并用所有已知的丝状病毒,包括一株L基因序列信息还未公布的CIEBOV,验证了该体系。Ogawa等^[34]比较了所有已知的丝状病毒的核苷酸序列,设计了针对NP编码基因高度保守区域的一套简并引物。

3.4 环介导等温扩增RT-PCR

RT-PCR和实时荧光定量RT-PCR方法需要精密的温控设备和分析仪器,限制了其在EVD疫情暴发时现场检测中的应用,为解决这一问题,Kurosaki等^[35]建立了一种特异检测扎伊尔亚型EBOV的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)RT-PCR方法,对体外转录的RNA和病毒感染的细胞培养物中的RNA检出限分别为20拷贝和 10^{-3} FFU与实时荧光定量RT-PCR方法的灵敏度相当,且操作简单,不需要热循环、对仪器设备要求低,肉眼即可判定结果,适合于现场、野外或条件较差的实验室进行EBOV的快速检测。

4 抗原检测试验

由于人体感染EBOV以后,发病急,死亡快,很难在患者体内产生抗体,而体内的病毒抗原会急剧增加。通常在人体遭到EBOV入侵的第3天,在病人的血液中就可以检测出病毒抗原的存在,所以抗原检测方法成为早期快速特异检测EBOV的有效方法^[21]。抗原捕获ELISA方法,借助EBOV特异抗体直接捕获血液、感染组织匀浆或病毒培养液中的病毒抗原,具有很高的敏感性和特异性,适合早期患者血清标本的检测,已被广泛用于EVD疫情中的EBOV抗原检测^[21,36]。检测病毒抗原首先需要获得特异性的多克隆或单克隆抗体。在早期的抗原捕获ELISA方法建立中,主要以EBOV的灭活病毒株为抗原制备单克隆抗体^[37]。Lucht等^[38,40]在实验中分别利用EBOV糖蛋白(GP)的单克隆抗体以及EBOV基质蛋白(VP40)的单克隆抗体对病毒进行检测,均很灵敏的检测出了EBOV的存在。由于EBOV传染性高,危险性大,需要在高等级的生物安全实验室中进行操作,而重组蛋白操作简单、易于大量培养,且更加安全,于是研究者开始探索以各种EBOV的重组蛋白NP、GP、VP40和VP30蛋白为免疫原制备单克隆抗体^[41]。Saijo等^[41]重组表达了EBOV的核蛋白(NP)His-ENP,并分别以His-ENP作为抗原制备单克隆抗体,建立了高灵敏度和特异性的抗原捕获ELISA。Ikegami^[45]和Niikura等^[46]也利用重组的病毒NP蛋白制备了单克隆抗体,用于EBOV抗原捕获ELISA方法的建立。王晓杜等^[44]利用制备的EBOV NP蛋白的单克隆抗体实现了对不同型别的EBOV特异性抗原的快速检测。除了利用完整的抗原外,抗原结构中一些特殊区域也可以用于病毒的检测中。在EBOV NP蛋白中,由于其C端结构域对于相应的抗体有强烈的亲和性,因此该结构域可以作为EBOV抗原试验的一个靶点^[47]。

除了用ELISA方法检测EBOV抗原外,死者皮肤标本或活体皮肤标本经甲醛固定后,可用多克隆或单克隆抗体进行免疫组织化学检查(IHC)病毒抗原。此法不需冷藏保存标本,操作安全,可用于感染的诊断和监测^[48]。

5 抗体酶联免疫吸附试验

抗体检测试验主要采用抗体捕获ELISA和间接免疫荧光试验(IFA)。人感染EBOV后,最早可从发病后2 d的患者血清中检出特异性IgM抗体,IgM抗体可维持数月。发病后6~18 d可检出IgG抗体,IgG抗体可维持数年^[21]。多数患者抗体出现于发病后10~14d,也有重症病人始终未能检出抗体。抗体捕获ELISA检测方法多是基于重组表达的蛋白质建立的。Prehaud等^[49]首次用大肠杆菌表达的扎伊尔型EBOV的Gabon 94毒株NP和GP蛋白建立了检测IgG和IgM抗体的ELISA方法。随后,Saijo等^[41]利用昆虫-杆状病毒系统表达的扎伊尔型EBOV NP建立起间接法ELISA,显示了高的灵敏度和特异性,不仅能检测到扎伊尔型EBOV抗体,而且与其他莱斯顿型和苏丹型等亚型的抗体均有反应。Saijo还在大肠杆

菌中表达了部分截短的扎伊尔型 EBOV NP, 截短后的 NP 蛋白仍保留了很强的抗原性。用同样的方法, Ikegami 等^[50]利用大肠杆菌表达的截短的莱斯顿型 EBOV NP 建立了 IgG-ELISA 检测体系。Groen 等^[51]建立了基于扎伊尔亚型 EBOV VP35 和 NP 的 IgG 抗体检测 ELISA。基于 NP 的 IgG 抗体检测 ELISA 方法与之前的检测方法一致, 除了检测扎伊尔型 EBOV 抗体外, 与 EBOV 其他亚型的抗体均有反应, 而基于 VP35 的 IgG 抗体检测 ELISA, 只对扎伊尔型 EBOV 抗体有反应。由此可见, 基于 EBOV NP 的 IgG 抗体检测 ELISA 方法比基于 VP35 的 IgG 抗体检测 ELISA 更灵敏。盖微微等^[52]通过基因工程方法表达的重组 VP40 蛋白作为包被抗原, 初步建立了具有应用价值的间接 ELISA 方法, 为开发检测 EBOV 的间接 ELISA 试剂盒打下了基础。

IFA 是将病毒感染或表达重组抗原的细胞经固定, 与待检测的血清标本结合后, 再用荧光标记的抗人抗体与之作用, 在荧光显微镜下观察结果, 该技术对操作者的经验要求较高。抗体 IFA 检测方法多是基于重组表达的 NP 建立的。基于 Saijo 等^[53]用昆虫-杆状病毒系统在 HeLa 细胞中表达的扎伊尔型 EBOV NP 以及 Ikegami 等^[54]用真核表达载体 pKS336 在 HeLa 细胞表达的截短的莱斯顿型 EBOV NP 建立的 IFA 检测方法, 可以灵敏、特异地检测 EBOV 抗体。

6 血清中和试验

中和试验是在体外适当条件下孵育病毒与特异性抗体的混合物, 使病毒与抗体反应一段时间后, 将混合物接种到病毒敏感的细胞或动物体内, 然后测定残存的病毒感染力。当 EBOV 侵入人体以后, 人体在抵抗 EBOV 感染的过程中会产生高水平的中和抗体, 而且中和抗体在体内存续时间长, 因而血清中和试验可以用来检测 EBOV 的感染^[55,56]。在 EBOV 感染过程中, 准确评价病毒感染后体内中和抗体反应不但对确诊具有重要价值, 而且对研究免疫保护相关性也是非常有价值和必要的。EBOV GP 是病毒表面唯一的跨膜蛋白。由于 GP 通过与宿主细胞受体的结合引导病毒进入宿主细胞, GP 是诱导产生中和抗体的最关键蛋白^[57,58]。试验证明, 来自 EVD 恢复病人的单克隆抗体对分泌型 GP (sGP) 和 GP 有不同程度的中和作用^[59]。中和试验是一种灵敏度和特异性都较高的血清学试验方法, 但须要在高等级的生物安全实验室中操作活病毒, 因而限制了血清中和试验在 EBOV 感染诊断中的应用。

7 其他检测方法

EBOV 具有多种血清型, 病毒株的变异较快, 根据已知病毒序列设计出来的引物不可能包括全部的病毒株, 尤其对未知病毒, 可能无法扩增出相应的基因片段, 因此可能造成漏检, 导致假阴性结果。基因芯片技术是近年兴起的一种快速、高通量、自动化的基因检测新技术, 能够根据同一属病原体中不同的病毒株设计多条探针, 既可分型检测又不会漏

检。夏文英等^[60]根据 NCBI 中 EBOV 的全基因保守序列, 设计合成 20 条特异性寡核苷酸探针, 结合采用多重置换扩增 (MDA) 和荧光标记 PCR 技术, 初步建立了 EBOV 基因芯片的检测方法。基因芯片除了用于检测同一属的不同病毒株外, 还可通过设计多种病原体的检测探针, 用于多种病原体的同时检测。EVD 初期症状与其他病毒性出血热的症状相似, 黄吉城等^[61]用同样的方法, 制备了黄热病、西尼罗热、登革热、基孔肯雅热、埃博拉病毒病、马尔堡出血热、拉萨热等多种病毒性出血热集合检测基因芯片, 并建立了一种适用于直接检测核酸含量较低临床血清标本的新型芯片靶基因扩增标记方法。欧青叶等^[62]也利用多重 PCR 技术结合液相芯片技术, 实现了包括 EBOV 在内的多种出血热病毒的同时检测。基因芯片在 EBOV 检测中体现出诸多优越性, 但目前仍有一定的局限性, 如探针的制备和合成过程要求严格, 使用成本高。此外, 由于一个芯片上多种探针的最适条件不一致, 因此对杂交条件的选择要求也很高。这些都限制了基因芯片在实际检测中的推广应用。

8 展望

目前已有多种实验室检测方法可以用于 EBOV 的检测。病毒分离培养简单灵敏, 但耗时长, 对样本的保存、操作者的技术以及生物安全的要求都很高。利用电子显微镜可以直观地观察病毒颗粒形态, 但灵敏度不高, 病毒滴度低时会影响观察, 需要先对病毒进行富集。由于需要操作活病毒, 病毒分离和电子显微镜观察需要在生物安全最高的 P4 级实验室中进行, 限制了这两种方法在实际中的应用。核酸检测和抗原抗体检测方法可以在生物安全 P3 级实验室将样本中病毒灭活后再进行检测, 在目前实际检测中应用较为广泛。鉴于实验室检测结果在 EBOV 防控中的重要作用, 在实际检测中, 应注重了解每种检测方法的特点和局限性 (表 1), 采用多种方法联合检测来对 EBOV 感染进行确认。

其次, 应持续关注病毒变异对于目前检测方法和试剂的影响。在对 2014 年在西非暴发 EVD 疫情研究中, 来自哈佛大学、Broad 研究院等多个研究机构的研究人员对 99 个 EBOV 基因组进行测序和分析, 发现 EBOV 在人际传播过程中已经出现了超过 300 处的基因突变^[63]。研究发现, EBOV 的基因组变化速度快, 而且通常发生在蛋白编码区, 其中包括了影响 EBOV 检测准确率的关键区域。病毒变异可能会令现有或正在开发中的诊断试剂的测试效果受到影响, 尤其是基于 PCR 技术的诊断试剂。随着对疫情研究的深入, 引起此次疫情暴发的 EBOV 相关信息正不断被完善, 为提高诊断试剂的准确率, 应持续关注病毒突变, 并在必要时, 调整目前的检测试剂或者研发后续诊断试剂。

由于目前 EBOV 主要在经济比较不发达的非洲爆发, 为了更有效地早发现 EBOV 感染病人, 非常有必要研制操作简单、不需要复杂设备、能在现场快速检测 EBOV 的方法和试剂盒。由于操作感染病人的血液和体液具有高度的风险性, 现

场检测方法还要实现不需要、或者很少样本处理就可以检测样本中EBOV的要求。现场检测EBOV的方法和试剂盒将会

是今后EBOV检测的发展方向。

表1 不同检测方法的对比
Table 1 Comparison of different detection methods

检测方法	检测靶标	样本来源	方法特点	方法局限性	所需的生物安全实验室级别
病毒分离培养	病毒颗粒	血液尿液 唾液组织	简单、灵敏	耗时较长,对样本的保存情况、实验室条件及操作者技术要求较高	BSL-4
电子显微镜观察	病毒颗粒	血液尿液 唾液组织	直观、快速	灵敏度不高	BSL-4
RT-PCR	普通 RT-PCR	L 基因 ^[24] 、NP 编码基因 ^[24] 、GP 编码基因 ^[24]	快速、灵敏	存在 RNA 酶和基因组 DNA 污染的风险	BSL-3
	巢式 PCR	NP 编码基因 ^[25]	灵敏度和特异性都很高	操作过程需要开盖处理,容易污染	
	实时荧光定量 RT-PCR	L 基因 ^[27] 、NP 编码基因 ^[25,29,30,32] 、GP 编码基因 ^[28,31]	快速、灵敏、污染小、高通量,可进行定量分析	成本高、需要精密的温控设备和分析仪器	
	简并 RT-PCR	L 基因 ^[33] 、NP 编码基因 ^[34]	针对保守区域设计的简并引物可用于 EBOV 所有亚型,甚至是潜在的新亚型的检测	扩增效率和特异性差	
	环介导等温扩增 RT-PCR	尾随序列 ^[35]	不需要热循环、对仪器设备要求低,可用于现场检测	引物设计复杂	
抗原检测试验	抗原捕获 ELISA	NP ^[41,44-47] 、GP ^[38] 、VP40 ^[40]	血液尿液 唾液组织	快速、灵敏、操作简便、对技术设备要求不高	BSL-3
	免疫组织化学检查	NP ^[48] 、GP ^[48]	肝脾 皮肤组织	特异性强,灵敏度高,且不需冷藏保存标本,操作安全	结果判定不易标准化,对操作者的经验要求较高
抗体捕获 ELISA	NP 抗体 ^[41,49-51] 、GP 抗体 ^[49] 、VP35 抗体 ^[51] 、VP40 抗体 ^[52]	血清尿液唾液	快速、灵敏、操作简便、对技术设备要求不高	不能用于病毒的早期诊断	BSL-3
间接免疫荧光	NP 抗体 ^[53,54]	血清尿液唾液	特异性强	需要荧光显微镜,存在非特异性染色,结果判定客观性不足,对操作者技术要求高	BSL-3
血清中和试验	GP 抗体 ^[59]	血清尿液唾液	灵敏、特异	成本高、耗时长、对操作者技术要求高	BSL-4

致谢 中国科学院埃博拉应急科技攻关项目、中国科学院新发和烈性传染病病原学与生物安全重点实验室给予大力支持。

参考文献 (References)

- [1] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, et al. The natural history of Ebola virus in Africa[J]. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, 2005, 7(7-8): 1005-1014.
- [2] Zampieri C A, Sullivan N J, Nabel G J. Immunopathology of highly virulent pathogens: Insights from Ebola virus[J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(11): 1159-1164.
- [3] Gonzalez J P, Pourrut X, Leroy E. Ebolavirus and other filoviruses[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2007, 315: 363-387.
- [4] Li Y H, Chen S P. Evolutionary history of Ebola virus[J]. *Epidemiology and Infection*, 2014, 142(6): 1138-1145.
- [5] Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Reston)[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2007, 30(5-6): 391-398.
- [6] Geisbert T W, Jahrling P B. Differentiation of filoviruses by electron microscopy[J]. *Virus Research*, 1995, 39(2-3): 129-150.
- [7] Leguenno B, Formentry P, Wyers M, et al. Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus[J]. *Lancet*, 1995, 345(8960): 1271-1274.
- [8] Truant A L, Regnery R L, Kiley M P. Development of an immunofluorescence focus assay for Ebola virus[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1983, 18(2): 416-419.
- [9] Stroher U, West E, Bugany H, et al. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(22): 11025-11033.
- [10] Hazelton P R, Gelderblom H R. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(3): 294-303.
- [11] Biel S S, Gelderblom H R. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method[J]. *Journal of Clinical Virology*, 1999, 13(1-2): 105-119.
- [12] Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: Present and future[J]. *Micron*, 2006, 37(2): 91-106.
- [13] Goldsmith C S, Miller S E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, 22(4): 552-563.
- [14] Johnson K M, Lange J V, Webb P A, et al. Isolation and partial characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire[J]. *Lancet*, 1977, 1(8011): 569-571.
- [15] Bowen E T, Lloyd G, Harris W J, et al. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent[J]. *Lancet*, 1977, 1(8011): 571-573.
- [16] Jahrling P B, Geisbert T W, Dalgard D W, et al. Preliminary report: Isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA[J]. *Lancet*, 1990, 335(8688): 502-505.
- [17] Geisbert T W, Jahrling P B. Use of Immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United-States epizootic[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1990, 43(10): 813-816.
- [18] Geisbert T W, Rhoderick J B, Jahrling P B. Rapid identification of Ebola virus and related filoviruses in fluid specimens using indirect immunoelectron microscopy[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1991, 44(6): 521-522.
- [19] Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea—preliminary report[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 371: 1418-1425.
- [20] Alymbayeva D, Kuchuk T, Usmanov R. Diagnosis of viral infections by electron microscopy in Kyrgyzstan[J]. *Electron Microscopy*, 1994, 3a/3b: 1399-1400.
- [21] Rowe A K, Bertolli J, Khan A S, et al. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179(Suppl 1): S28-S35.
- [22] Leroy E M, Baize S, Lu C Y, et al. Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting[J]. *Journal of Medical Virology*, 2000, 60(4): 463-467.
- [23] Formenty P, Leroy E M, Epelboin A, et al. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo[J]. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2006, 42(11): 1521-1526.
- [24] Sanchez A, Ksiazek T G, Rollin P E, et al. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179(Suppl 1): S164-S169.
- [25] Towner J S, Rollin P E, Bausch D G, et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(8): 4330-4341.
- [26] Onyango C O, Opoka M L, Ksiazek T G, et al. Laboratory diagnosis of Ebola hemorrhagic fever during an outbreak in Yambio, Sudan, 2004 [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196(Suppl 2): S193-S198.
- [27] Drosten C, Gottig S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(7): 2323-2330.
- [28] Gibb T R, Norwood D A, Woollen N, et al. Development and evaluation of a fluorogenic 5' nuclease assay to detect and differentiate between Ebola virus subtypes Zaire and Sudan[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11): 4125-4130.
- [29] 刘阳, 史子学, 王玉堃, 等. SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测埃博拉病毒方法的建立[J]. *病毒学报*, 2012, 28(5): 567-571.
Liu Yang, Shi Zixue, Ma Yukun, et al. Development of SYBR Green I real-time RT-PCR for the detection of Ebola[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(5): 567-571.
- [30] Huang Y, Wei H, Wang Y, et al. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays[J]. *Virologica Sinica*, 2012, 27(5): 273-277.
- [31] 盖微微, 郑学星, 薛向红, 等. 埃博拉病毒检测与分型 Real-time PCR 方法的建立[J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(3): 208-211, 216.
Gai Weiwei, Zheng Xuexing, Xue Xianghong, et al. Development of a real-time PCR method to detect and type Ebola virus[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2013, 8(3): 208-211, 216.
- [32] 刘阳, 史子学, 王水明, 等. 一步法 MGB 荧光定量 RT-PCR 检测埃博拉病毒扎伊尔亚型和苏丹亚型方法的建立[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(4): 343-346, 350.
Liu Yang, Shi Zixue, Wang Shuiming, et al. Establishment of one step MGB real-time RT-PCR for detection of Ebola virus Zaire and Sudan subtypes[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2012, 28(4): 343-346, 350.
- [33] Zhai J, Palacios G, Towner J S, et al. Rapid molecular strategy for filovirus detection and characterization[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(1): 224-226.
- [34] Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, et al. Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene[J]. *Journal*

- of Virological Methods, 2011, 171(1): 310-313.
- [35] Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 141(1): 78-83.
- [36] Ksiazek T G, Rollin P E, Jahrling P B, et al. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(4): 947-950.
- [37] Lucht A, Grunow R, Moller P, et al. Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus[J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(1): 21-28.
- [38] Lucht A, Grunow R, Otterbein C, et al. Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein GP of Ebola virus[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2004, 193(4): 181-187.
- [39] Saijo M, Niikura M, Maeda A, et al. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Medical Virology, 2005, 76(1): 111-118.
- [40] Lucht A, Formenty P, Feldmann H, et al. Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection[J]. Journal of Infectious Diseases, 2007, 196 (Suppl 2): S184-S192.
- [41] Saijo M, Niikura M, Morikawa S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(1): 1-7.
- [42] Saijo M, Niikura M, Ikegami T, et al. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2006, 13(4): 444-451.
- [43] 王淑杰, 王喜军, 胡森, 等. 抗埃博拉病毒VP40蛋白单克隆抗体的制备及在抗原捕捉ELISA中的应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(4): 309-313.
Wang Shujie, Wang Xijun, Hu Sen, et al. Development of an antigen capture ELISA against VP40 protein of Ebola virus using monoclonal antibodies[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 30(4): 309-313.
- [44] 王晓杜, 刘阳, 王皓婷, 等. 埃博拉病毒NP蛋白的单克隆抗体制备及抗原肽的定位[J]. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1317-27.
Wang Xiaodu, Liu Yang, Wang Haoting, et al. Generation and epitope mapping of a monoclonal antibody against nucleoprotein of Ebola virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(11): 1317-1327.
- [45] Ikegami T, Niikura M, Saijo M, et al. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2003, 10(4): 552-557.
- [46] Niikura M, Ikegami T, Saijo M, et al. Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(9): 3267-3271.
- [47] Sherwood L J, Hayhurst A. Ebolavirus Nucleoprotein C-Termini potently attract single domain antibodies enabling monoclonal affinity reagent sandwich assay (MARSA) formulation[J]. Plos One, 2013, 8(4): e61232.
- [48] Zaki S R, Shieh W J, Greer P W, et al. A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: Implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit[J]. Journal of Infectious Diseases, 1999, 179 (Suppl 1): S36-S47.
- [49] Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, et al. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections[J]. The Journal of General Virology, 1998, 79 (Pt11): 2565-2572.
- [50] Ikegami T, Saijo M, Niikura M, et al. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus[J]. Epidemiology and Infection, 2003, 130(3): 533-539.
- [51] Groen J, van den Hoogen B G, Burghoorn-Maas C P, et al. Serological reactivity of baculovirus-expressed Ebola virus VP35 and nucleoproteins[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(5): 379-385.
- [52] 盖微微, 郑学星, 薛向红, 等. 埃博拉病毒VP40蛋白的原核表达及其抗体间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(9): 782-786.
Gai Weiwei, Zheng Xuexing, Xue Xianghong, et al. Expression of the VP40 gene of Ebola virus and development of recombinant protein-based indirect ELISA[J]. Journal of Pathogen Biology, 2013, 8(9): 782-786.
- [53] Saijo M, Niikura M, Morikawa S, et al. Immunofluorescence method for detection of Ebola virus immunoglobulin G, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(2): 776-778.
- [54] Ikegami T, Saijo M, Niikura M, et al. Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells[J]. Microbiology and Immunology, 2002, 46(9): 633-638.
- [55] MacNeil A, Reed Z, Rollin P E. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG Antibodies to five species of Ebola Virus[J]. Plos Neglect Trop D, 2011, 5(6): e1175.
- [56] Nidom C A, Nakayama E, Nidom R V, et al. Serological evidence of Ebola virus infection in Indonesian orangutans[J]. Plos One, 2012, 7(7): e40740.
- [57] Manicassamy B, Wang J, Jiang H, et al. Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry[J]. Journal of Virology, 2005, 79(8): 4793-4805.
- [58] Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, et al. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge[J]. Virology, 1998, 246(1): 134-144.
- [59] Maruyama T, Rodriguez L L, Jahrling P B, et al. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection[J]. Journal of virology, 1999, 73(7): 6024-6030.
- [60] 夏文英, 郑夔, 黄吉城, 等. 埃博拉病毒检测基因芯片的制备初探[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(3): 150-154.
Xia Wenyong, Zheng Kui, Huang Jicheng, et al. Preliminary preparation of microarray for detecting Ebola virus[J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2011, 34(3): 150-154.
- [61] 黄吉城, 郑夔, 王洪敏, 等. 多种病毒集合检测芯片的研制及其在临床血清标本检测中的初步应用[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(4): 297-300.
Huang Jicheng, Zheng Kui, Wang Hongmin, et al. Research on microarray for simultaneous detection of multiplex viruses and primary application on detection of clinical serum specimens[J]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2012, 16(4): 297-300.
- [62] 欧青叶, 顾大勇, 胡春凌, 等. 8种重大烈性传染病病毒液相芯片检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2012, 35(4): 222-227, 234.
Ou Qingye, Gu Dayong, Hu Chunling, et al. Development of a luminex liquid chip technology for detection of eight kinds of deadly infectious virus[J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2012, 35(4): 222-227, 234.
- [63] Gire S K, Goba A, Andersen K G, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak[J]. Science, 2014, 345(6202): 1369-1372.

(编辑 田恬)