

立百病毒感染及其實驗室診斷

李璠

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

1998 年至 1999 年間發生在馬來西亞與新加坡的人類與豬隻傳染病，經鑑定為一種新型的副黏液病毒感染，命名為立百病毒。立百病毒在型態學上為典型的副黏液病毒，血清學與核酸序列方面與澳洲發現的亨德拉病毒有相當的相似性，但與其他副黏液病毒的親緣關係較遠。這種病毒能傳染給人、豬、狗、貓。豬隻之間會相互傳播這種病毒，也能將這種病毒傳播給其他易感動物。人類之間尚未發現能夠相互傳染的病例。自然界中的食果蝙蝠可能是這種病毒的保毒動物。人類感染立百病毒會出現發燒、頭痛、暈眩、嘔吐、意識不清、出現神經症狀等腦炎的症狀，致死率 40% 至 50%。豬隻受立百病毒感染，臨床表現與病理變化以呼吸與神經系統為主，但許多豬隻呈現不顯性感染。診斷立百病毒感染的方式目前有病毒分離、免疫化學染色、反轉錄聚合酶鏈反應、酵素連結免疫吸附分析法等。

關鍵字：立百病毒、亨德拉病毒、實驗室診斷、馬來西亞

發現經過

立百病毒與犬瘟熱、牛瘟等病毒同屬於副黏液病毒科(*Paramyxoviridae*)，為有封套的單股 RNA 病毒 [3]。此病毒雖屬於副黏液病毒，但就分子生物學與血清學的特性而言，立百病毒與副黏液病毒亞科(*Paramyxovirinae*) 原有的三個屬(即 *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Morbillivirus*) 差異較大，但與 1994 年發現於澳洲的亨德拉病毒(*Hendra virus*) 親緣關係較近 [3,7,8]。比較亨德拉病毒抗血清中和亨德拉病毒與立百病毒的能力，該血清中和立百病毒的能力較前者低 8 至 16 倍，但該血清完全無法中和其他副黏液病毒。比較立百病毒與亨德拉病毒的核酸序列，亦可發現各基因的相似性頗高。以核蛋白(nucleoprotein, N) 基因為例，立百病毒的序列與亨德拉病毒有 78% 的相似性，與副黏液病毒亞科其他病毒的相似性皆不超過 49%。立百病毒與亨德拉病毒具有相當廣的宿主範圍，這種特性也與其他副黏液病毒亞科的病毒不同 [3]。因此有些病毒學家建議將這兩種病毒獨立出來，成為副黏液病毒科的第四個屬 [8]。

立百病毒首次造成的疾病出現在 1997 年。當時在馬來西亞 Perak 省的豬場工人間有人罹患腦炎，其中一人死亡。由於當地為日本腦炎的流行地區，因而被認為是日本腦炎病毒感染所造成的。然而，由於患者多為成人而非孩童，患者多接種過日本腦炎疫苗，病例相當集中而非散發，患者大多數曾與豬隻接觸，患者畜養的豬隻發病的時間與畜主有關聯性，蚊蟲防治與日本腦炎預防接種皆無法遏止疫情，這些跡象都與典型的日本腦炎疫情相左 [2,3,6]。1998 年 9 月，同一地區的成人發高燒與罹患腦炎的病例數急劇上升，並發現所有患者皆與養豬業有關。至 1999 年 5 月為止，馬來西亞衛生部在位於美國亞特蘭大的疾病管制中心(Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) 協助下，鑑定出這是一種新的病毒所引起的感染症 [6,13]。本病自 1998 年 10 月至 1999 年 5 月在當地共造成 265 個病例，105 人死亡，致死率 40% 至 50% [3,9,12]。同一期間，1999 年 3 月，新加坡處理自馬來西亞進口豬隻的屠宰場工人也罹患相同疾病，共有 13 人感染，1 人死亡。馬來西亞衛生當局以其初次自死亡病患分離到病原的村落為名，將此種病

* 抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

毒命名為立百病毒(Nipah virus) [6,13]。本病也被稱為豬呼吸系統與腦炎症候群(porcine respiratory and encephalitis syndrome, PRES)或豬吼叫症候群(barking pig syndrome, BPS) [9]。這個疾病同時也使流行地區內超過一百萬頭豬隻遭到撲殺的命運 [8]。當豬隻大量撲殺後，疫情立即得到控制，也顯示本病確實與豬隻有密切的關係 [7]。

病原特性

這種病毒可以從腦炎病患的腦脊髓液與尿液中分離出來 [4]，可以在 Vero、BHK、PS 等細胞株生長 [9]，並能使 Vero 細胞株產生融合性的細胞病變 [3,7]。電子顯微鏡下的立百病毒，形態與典型的副黏液病毒相似 [8]，其核蛋白衣在出芽(budding)時被原生質膜包裹。病毒顆粒的直徑 120 至 500 nm。病毒封套含有二種穿膜醣蛋白(transmembrane glycoproteins)：一種能與細胞受器結合，一種為融合蛋白(fusion protein, F)。受感染的細胞經過超薄切片處理，在電子顯微鏡下可見到細胞質的包涵體內有長度約 $1.67 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 、平均直徑 21 nm 的絲狀，亦即所謂魚脊狀(herringbone)構造的核蛋白衣。病毒顆粒表面偶爾可見長度 10 nm 的突起 [3]。

立百病毒的基因體長 11.2 kb，較一般副黏液病毒基因體的 15kb 至 16kb 短。基因體內含有核蛋白、P/V/C、基質蛋白(matrix protein, M)、融合蛋白等基因。事實上，立百病毒與亨德拉病毒皆具有 *Respirovirus*、*Morbillivirus* 的遺傳學特性。如立百與亨德拉病毒的核糖核酸編輯位址(RNA editing site)與許多 *Morbillivirus* 相同，轉譯終止訊息(transcriptional termination signals)與 *Respirovirus* 較為相似，而基因之間的序列與轉譯啓始訊息(transcriptional initiation signals)與這兩個病毒屬都很近似 [8]。

立百病毒可自然感染人、豬、狗、貓。澳大利亞動物衛生實驗室(Australian Animal Health Laboratory, AAHL)對豬隻傳播途徑所做的研究顯示，豬隻僅能以經口或注射的方式造成感染，並能從口、鼻排毒。中和抗體可在感染後第 14 日測得 [9]。在馬來西亞的立百病毒疫區也曾發現血清學呈現陽性反應

的與蝙蝠。

馬來西亞曾在兩種食果蝙蝠(*Pteropus vampyrus*, *P. hypomelanus*)測得立百病毒的中和抗體，顯示立百病毒可能與亨德拉病毒一樣，以食果蝙蝠作為保毒動物 [1,3,8,11]。馬來亞大學的一組實驗團隊，更從蝙蝠的尿液與吃過的水果上分離出立百病毒，證明這種病毒的確存在於蝙蝠的尿液與唾液內。發病的豬隻可能是經由接觸含有病毒蝙蝠尿液或唾液而受到感染 [5]。

由流行病學上的特徵顯示，許多立百病毒腦炎的患者曾接種過日本腦炎疫苗，其同居之親屬若並未在豬場工作，也不會得到此一疾病，推測立百病毒不會經由人與人的接觸傳播，蚊子與其他媒介昆蟲也不會傳播這種病毒。病毒增殖的部位可能是在動物的扁桃腺與呼吸道上皮，透過咽喉與支氣管的分泌物將病毒傳播出去 [6,9]。食用豬肉或是照顧感染立百病毒的病患也不會受到感染 [12]。

立百病毒在生物體外不穩定，可以輕易地以 Triton X 這類的界面活性劑使其不活化。養豬戶可使用 Sodium hyperchlorite、Betadine、Vircon、Lysol 等消毒劑對環境進行消毒 [9]。

臨床症狀

一、人類：感染立百病毒後出現的臨床症狀主要有發燒、頭痛、暈眩、嘔吐、意識不清以及出現神經症狀等。發燒持續 3 至 14 日 [12]。馬來西亞吉隆坡一所醫學中心分析 94 名因立百病毒感染入院的住院病患病例顯示，絕大多數的病患在接觸帶毒豬隻後兩個星期內發病。由出現症狀至病情最惡化的時間為 3 至 31 日(平均 6.9 日)。以葛氏昏迷指數(Glasgow coma scale)為評估指標，超過半數的病患有意識程度降低(低於 15)的現象，病況最差時的平均指數為 7.5。意識程度降低的病患會出現一些代表腦幹功能異常的症狀，包括洋娃娃眼反射(doll's-eye reflex)異常、針點狀瞳孔、血

壓升高(超過 160/90 毫米汞柱)與心跳急促(超過每分鐘 120 次)等 [7]。

- 二、豬：潛伏期估計為 7 至 14 日。哺乳期受立百病毒感染的致死率約為 40%(但不易界定是直接因疾病死亡或因母豬罹病無法哺育而造成死亡)，主要的臨床症狀包括張口呼吸、軟腳、肌肉震顫。離乳與肉豬的症狀有急性發熱(超過攝氏 39.9 度)、呼吸急促且吃力、乾咳、張口呼吸，嚴重時咳血。除了呼吸系統的症狀外，還會有後肢無力、步態不穩、全身性疼痛(後軀較顯著)、顫抖、痙攣、肌陣攣(myoclonus)、偏癱(paresis)等神經症狀。症狀從不顯性感染、輕微到猛爆型者都有。感染率幾近 100%，但致死率僅有 1%至 5%。母豬與種公豬可能因感染立百病毒而突然死亡。症狀包括急性發熱(超過攝氏 39.9 度)、張口呼吸、唾液增加，有漿液性、黏液化膿性或出血性的鼻腔分泌物，懷孕母豬早期流產。此外尚可能出現搖頭、痙攣、眼球震顫、咀嚼、喉部肌肉麻痺等神經症狀 [9]。

病理變化

- 一、人類：以多種器官發生血管炎，並伴隨內皮細胞的感染為主。有時血管內受感染的內皮細胞會轉變為多核的巨大細胞、有些細胞則碎裂或脫落而進入血管腔內。受感染的器官以中樞神經系統為主，在大腦皮質與腦幹可見瀰漫性的血管炎，病變可深入實質組織，造成實質組織的壞死。受感染的神經元與實質組織細胞內可見嗜酸性質內包涵體 [3]。人類受立百病毒感染後造成廣泛的血管炎，內皮細胞的破壞遍及皮質及皮質以下的組織，這是與日本腦炎與其他腦炎不同之處 [6]。本病的特徵之一是以核磁共振掃描(magnetic resonance image, MRI)可見腦部有一個或多個高強度(high intensity)的病灶，絕大多數的病患這種病灶分布在白質。這種檢查有助於立百病毒與日本腦炎病毒感染的鑑別診斷，因為後者的核磁共振影像呈現丘腦的雙側性異常，通常與出血有關 [10]。

- 二、豬：立百病毒在豬隻所造成的影響以呼吸系統為主。肺臟細胞融合成具有特徵性的多核巨大細胞。大部分的病例可見輕重不一的肺部病變，包括不同程度的實質化、肺氣腫、出血點或出血斑、小葉間隔擴張。氣管與支氣管充滿泡沫樣液體，有時甚至帶血。腦組織鬱血與水腫。部分病例的腎臟在皮質與髓質有鬱血現象。就組織病理學上而言，立百病毒感染主要的病變是中度到重度、伴隨著廣泛性出血的間質性肺炎，肺內血管的內皮細胞有細胞融合的現象。肺臟、腎臟與腦等器官發生有類纖維素性壞死(fibrinoid necrosis)、出血、單核球浸潤，有時形成血栓的廣泛性血管炎 [9]。

實驗室診斷

立百病毒感染的實驗室診斷技術，目前主要可分為下述幾種：

- 一、病毒分離：立百病毒能在 Vero 細胞株(ATCC, CCL81)進行培養，並很快造成細胞融合的現象，形成多核的巨大細胞 [2]。
- 二、免疫化學染色：最初鑑定立百病毒抗原所用的是亨德拉病毒的抗血清。現可使用抗立百病毒的高免血清進行染色，中樞神經系統內受感染的內皮細胞與已死或將死的實質組織細胞會呈現強烈的染色性，顯示立百病毒會在人類的中樞神經系統造成廣泛的組織病變與嚴重的腦炎。肺、心、脾、腎等器官也會出現較弱的染色。感染的豬隻，其上呼吸道上皮細胞與呼吸道管腔內的細胞碎片均可染出立百病毒的抗原。少部分豬隻會出現顯著的中樞神經系統病變。腦膜可見炎症細胞浸潤。有時在腎小管上皮也會顯現病毒抗原的特異性染色 [3,9]。
- 三、反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)：聚合酶鏈反應用以增幅的位置包括磷蛋白(phosphoprotein)基因的核糖核酸編輯位址。該部位為多種副黏液病毒的保留序列(conserved sequence)。另外，用於增

幅立百病毒核蛋白基因的一組引子配合定序分析，也已證實能應用於人類、豬、狗、貓等的組織檢體 [3]。

四、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA): 目前已能利用經加瑪射線不活化處理的立百病毒抗原，以酵素免疫分析的原理檢測血清中的抗立百病毒 IgM 與 IgG。利用對 IgM 的檢測，可以在感染早期檢測出立百病毒的感染。若腦部並非原發的感染器官，疾病後期也可以在腦脊髓液中檢測出特異性的抗體。基於生物安全的考量，待測的血清於檢測前須添加 Sodium dodecyl sulfate 與 Triton X-100，並經攝氏 56 度熱處理 1 小時 [9,10]。

治療與處置

在新加坡受感染的 11 名病患曾經以抗病毒藥物 acyclovir 或 ribavirin 進行治療。雖然有 10 名病患存活，但是這些藥物對病程與治療率的關係仍有待研究。尤其高劑量的靜脈注射 ribavirin 具有毒性，必須謹慎使用 [10]。

對於感染立百病毒的家畜，在防範傳染病擴散的前提下，應採取撲殺策略以控制疫情。本病目前雖未被歸類於我國動物傳染病防治條例之動物傳染病分類內，但因對養豬業有重大影響且為嚴重之人畜共通傳染病，應比照甲類動物傳染病處理模式，並會同衛生主管單位共同進行防治與監控為宜。

參考文獻

1. Caplan CE. New virus emerges in Malaysia. Canadian Medical Association Journal, 160(11):1607, 1999.
2. Chua KB. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. The Lancet, 354:1257~1259, 1999.
3. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W-J, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BWJ. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science, 288:1432~1435, 2000.
4. Chua KB, Lam SK, Goh KJ, Hooi PS, Ksiazek TG, Kamarulzaman A, Olson J, Tan CT. The presence of Nipah virus in respiratory secretions and urine of patients during an outbreak of Nipah virus encephalitis in Malaysia. J. Infect., 42(1):40~43, 2001.
5. Enserink M. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. Science, 289:518~519, 2000
6. Farrar JJ. Nipah-virus encephalitis – investigation of a new infection. The Lancet, 354:1222~1223, 1999.
7. Goh KJ, Tan CT, Chew NK, Tan PSK, Kamarulzaman A, Sarji SA, Wong KT, Abdullah BJJ, Chua KB, Lam SK. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. The New England Journal of Medicine, 342:1229~1235, 2000.
8. Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, Bellini WJ, Rota PA. Molecular characteristics of Nipah virus: a newly emergent paramyxovirus. Virology, 271:334~349, 2000.
9. Mohd MN, Gan CH and Ong BL. Nipah virus infection of pigs in Peninsular Malaysia. In: <http://agrolink.moa.my/jph/dvs/nipah/oie990808.html>
10. Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, Ling AE, Chew SK, Ang B, Rollin PE, Umaphathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. The Lancet, 354:1253~1256, 1999.
11. Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Davis RJ, Gleeson AB, Love RJ, Daniels PW, Gould AR, Hyatt AD. An apparently new virus (Family *Paramyxoviridae*) infectious for pigs, humans and fruit bats. Emerging Infectious Disease, 4(2):269~271, 1998.
12. Tambyah PA. The Nipah virus outbreak – a reminder. Singapore Medical Journal, 40(05), 1999.
13. Watts J. Hendra-like virus responsible for epidemic in Malaysia. The Lancet, 353:1355, 1999.

Nipah Virus Infection and Its Laboratory Diagnosis

Fan Lee*

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY

Nipah virus causes outbreaks of human and pigs in Malaysia and Singapore in 1998-1999. This virus is a member of paramyxovirus. Serological evidence and nucleotide sequences indicates that the virus is closely related to Hendra virus found in Australia but less related to other members of the family Paramyxoviridae. The host spectrums of Nipah virus includes human, pigs, dogs and cats. Virus can be transmitted from pig to pig and other susceptible species. Human-to-human transmission was not documented. Fruit bats are the natural reservoir of this pathogen. The clinical features of Nipah virus infection in human include fever, headache, dizziness, vomiting, reduced level of consciousness and neurological disorders with a mortality rate of 40-50 %. Nipah virus mainly affected respiratory and nervous systems but most infections were subclinical in pigs. The diagnostic techniques of Nipah virus infection include isolation of virus, immunochemical staining, reverse transcriptase polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay.

Keywords: Nipah virus, Hendra virus, laboratory diagnosis, Malaysia

* Corresponding Author
National Institute for Animal Health