

四重 RT-PCR 快速检测 2013 新型 H7N9 禽流感病毒

莫秋华¹, 罗宝正², 杜田³, 赵俊华¹, 祝琰², 王琪¹, 滕勇勇⁴, 林继灿¹, 杨泽¹

1. 珠海国际旅行卫生保健中心, 广东 珠海 519020; 2. 珠海出入境检验检疫局;

3. 深圳市福田区疾病预防控制中心; 4. 南方医科大学

摘要:目的 建立能快速准确检测发热病人咽拭子样本中 2013 新型 H7N9 禽流感病毒的四重 RT-PCR 方法。方法 针对甲型流感病毒的 M 基因设计通用引物, 针对 2013 新型 H7N9 禽流感病毒的 HA 和 NA 基因设计特异性引物, 选择人源看家基因 beta-actin 设计质控引物, 通过优化实验条件建立一步法四重 RT-PCR 反应体系。与商品化实时荧光 RT-PCR 试剂盒进行方法比对。结果 成功建立四重一步法 RT-PCR 筛查 2013 新型 H7N9 禽流感病毒的检测技术。结论 该方法简便、实用、成本低廉, 适用于 2013 新型 H7N9 禽流感病毒快速检测。

关键词: 多重 RT-PCR; 甲型(H7N9)禽流感病毒; 甲型流感病毒;

中图分类号: R511.7 文献标识码: B

Four multiplex RT-PCR for rapid detection of 2013 novel avian influenza A (H7N9) virus

MO Qiu-hua^{*}, LUO Bao-zheng, DU Tian, ZHAO Jun-hua, ZHU Yan, WANG Qi, TENG Yong-yong, LIN Ji-can, YANG Ze

^{*}Zhuhai International Travel Health Care Center, Zhuhai, Guangdong 519020, China

Abstract: Objective To establish a four multiplex RT-PCR assay for rapid and accurate detection of 2013 novel avian influenza A (H7N9) virus in throat-swab specimens of patients with fever. **Methods** The universal primers for amplifying the M gene were designed for detection of influenza A viruses. Two pairs of specific primers of HA and NA gene were designed to detect the 2013 novel A (H7N9) influenza virus. The anthropogenic housekeeping gene of beta-actin was selected and primers were designed as quality control for throat-swab samples. The reaction system of one-step four multiplex RT-PCR assay was established by optimizing the experimental conditions. The commercially available real-time fluorescent RT-PCR kits were used to validate this method. **Results** The one-step four multiplex RT-PCR assay for screening of 2013 novel avian influenza A (H7N9) virus was developed successfully. **Conclusion** The new method is simple, practical, low-cost and very suitable for rapid detection of 2013 novel avian influenza A (H7N9) virus.

Key words: Multiplex RT-PCR; Avian influenza A (H7N9) virus; Influenza A virus

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)属正粘病毒科甲型(A型)流感病毒属的成员。由于禽流感病毒与人流感病毒存在受体特异性差异, 一般认为禽流感是不易感染给人的, 但经过近年来流感病毒的基因重组, 一些既往在禽间传播的高致病性禽流感亚型和新形成的禽流感亚型已可以突破种系感染人类^[1]。2013年2~3月在我国江浙一带发现H7N9亚型禽流感病毒感染人类的病例。基因组同源比对分析发现该病毒是一种新型重组的禽流感病毒^[2,3]。目前病例散发, 尚未发生有效人传人的证据, 但其病毒的变异不排除使之更易在人类中传播的可能。本研究建立了在一个反应管内能同时筛查甲型流感病毒

并对 2013 新型 H7N9 禽流感病毒进行特异性分型的一步法四重 RT-PCR 方法, 该方法已在珠海口岸流感疑似病人咽拭子样本的快速筛查工作中试用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 咽拭子病毒采样管为友康基业生物科技(北京)有限公司产品; 一管式病毒 RNAout 试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品; PrimeScript one step RT-PCR Kit (Ver.2) 和 100 bp DNA ladder Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品; Gold-View 荧光染料为北京赛百盛基因技术有限公司产

基金项目: 珠海检验检疫局科技计划项目(ZH2013-12)

通讯作者: 杨泽, E-mail: zychfb@163.com

品; H7N9、H5N1 和 H1N1 等流感病毒实时荧光 RT-PCR 试剂盒为上海辉睿生物科技有限公司或上海之江生物科技有限公司产品。

1.1.2 仪器 C1000 型 PCR 扩增仪为美国伯乐 (Bio-Rad) 公司产品; BIO-PRINT 凝胶成像系统为法国 VILBER LORMAT 公司产品。

1.1.3 样本 2013 新型 H7N9 禽流感病毒阳性核酸为中国疾病预防控制中心馈赠; 甲型 H1N1、H3N2 流感病毒阳性样本为本室保存, 均来源于珠海各口岸出入境人员中发热病人的咽拭子样本。H5N1 和 H9N2 禽流感灭活抗原购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成 根据全球共享禽流感数据倡议组织 (The Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, GISAID) 网站下载的 2013 新发 H7N9 禽流感病毒的 HA (*haemagglutinin*)、NA (*neuraminidase*) 和 M (*matrix protein*) 基因序列, 以及美国 GenBank 数据库中所获得的甲型流感病毒各亚型相关基因序列, 利用分子生物学软件 DNAMAN 6.0 进行系统的同源比对分析后, 再用软件 Oligo 7.0 进行引物设计。在参考文献的基础上针对 M 基因的保守区域设计甲型流感病毒的通用检测引物, 针对 2013 新型 H7N9 禽流感病毒的 HA 和 NA 基因设计特异性检测引物^[4,5]。此外, 针对人源 beta-actin 基因设计引物用于咽拭子样本采样质控。引物序列见表 1, 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

表 1 2013 新型 H7N9 禽流感病毒四重 RT-PCR 检测引物

NO	引物名称	序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
1	FluA_M_FP	TTCTAACCGAGGTGCAAACG	232
	FluA_M_RP	ACAAABCGTCTACCGTGCAG	
2	H7N9_HA_FP	TTCAATGGGGCTTTCATAGCTC	353
	H7N9_HA_RP	GTTCCCTCTCCCTGTGCATT	
3	H7N9_NA_FP	AACGCTGACTGGAGTGGTTAC	166
	H7N9_NA_RP	GGAATTCTGTACTGGAACAC	
4	Hbeta-actin_FP	CCATGCCATCCTCGCTCTG	120
	Hbeta-actin_RP	ATGTCACGCACGATTTC	

1.2.2 RNA 提取 咽拭子样本在病毒保存液中剧烈振荡, 以洗脱拭子上粘附的病毒和细胞等, 低速离心后进行病毒核酸提取。病毒核酸提取采用北京天恩泽基因科技有限公司的一管式病毒 RNAout 试剂盒, 具体步骤参考试剂盒说明书进行。

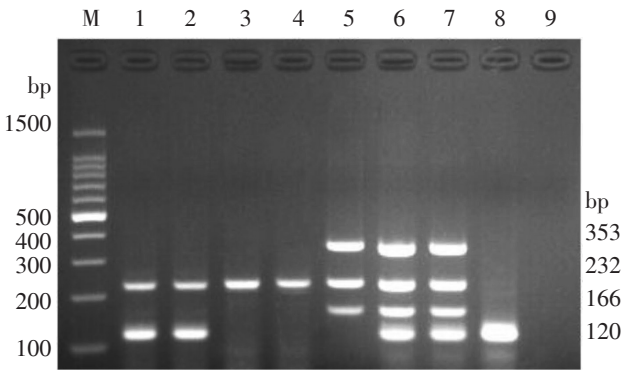
1.2.3 四重 RT-PCR 体系的建立 通过试验优化配方后按下列组成配制一步法 RT-PCR 反应液: 2× One Step RT-PCR Buffer 12.5 μl, PrimeScript One Step Enzyme Mix 1.0 μl, 8 条引物终浓度均为 0.4 μmol/L, RNA 模板 6 μl, 最后用 RNase Free dH₂O 补足至 25 μl。PCR 循环参数是: 50℃ 反转录 30 min, 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 最后在 72℃ 延伸 7 min。PCR 反应完成后取 5 μl 扩增产物在 2.5% 的琼脂糖凝胶 (加入 Gold-View 核酸染料) 中 100 V 电泳 50 min, 100 bp DNA ladder Marker 作为 DNA 分子量标准, 凝胶成像系统观察电泳结果。观察 PCR 扩增条带时, 若同时出现 232 bp 和 120 bp 条带, 证明所采咽拭子样本合格并感染了甲型流感病毒但非 H7N9 亚型; 若同时出现 232 bp、353 bp、166 bp 和 120 bp 共 4 个条带时, 则可判定所采咽拭子样本合格并感染了 2013 新型 H7N9 禽流感病毒。

1.2.4 盲法评价试验 选择 30 份核酸样本, 包括甲型 H3N2、甲型 H1N1、甲型 H5N1、甲型 H9N2、2013 甲型 H7N9 等流感阳性样本和流感阴性样本, 随机编号后分别采用本研究建立的四重 RT-PCR 方法和流感病毒实时荧光 RT-PCR 试剂盒进行检测, 最后统计两者的实验结果符合率。

2 结果

2.1 四重 RT-PCR 的特异性分析 按照建立的一步法四重 RT-PCR 反应体系对 9 份样本进行扩增, 其中第 6 号和第 7 号样本为混合样, 加入了人咽拭子样本 (流感病毒检测阴性) 提取的核酸, 用于模拟人感染 2013 新型 H7N9 禽流感病毒的咽拭子样本。从凝胶电泳图 (图 1) 可以观察到目的片段条带清晰、扩增效率高, 没有非特异扩增产物出现, 也未出现将 H1N1、H3N2、H5N1 和 H9N2 误检为 H7N9 的情况, 说明该四重 RT-PCR 反应体系特异性强, 对不同亚型病毒的检测无交叉反应, 引物之间无相互干扰。源自人的咽拭子的样本均扩增出 120bp 的人源 beta-actin 基因片段。当四重 RT-PCR 同时扩增时 (如第 6、7 号样本), 稳定明亮的电泳条带显示 4 个目的片段均有较强且一致的扩增效率。

2.2 盲法实验评价 30 份核酸样本经盲法试验评价, 四重 RT-PCR 与荧光 RT-PCR 对于甲型流感及 H7 和 N9 的检测结果完全一致, 符合率为 100%。H1N1、H3N2、H9N2 和 H5N1 属于干扰样本, 四重 RT-PCR 能检出其为甲型流感, 但未出现误检为 H7N9 的情况。



注：M：100 bp DNA Marker；1：甲型 H1N1 流感病毒；2：甲型 H3N2；3：甲型 H5N1；4：甲型 H9N2；5：2013 甲型 H7N9；6：2013 甲型 H7N9+流感病毒阴性人咽拭样本；7：2013 甲型 H7N9+流感病毒阴性人咽拭样本；8：流感病毒阴性人咽拭样本；9：空白对照 (H₂O)

图 1 H7N9 禽流感病毒四重 RT-PCR 凝胶电泳图

3 讨论

甲型(A型)流感病毒是正粘病毒科分节段单股负链 RNA 病毒,是一种造成人类及动物患流行性感冒的常见病原体。根据其外膜血凝素(H)和神经氨酸酶(N)蛋白抗原性不同,目前可分为 16 个 H 亚型(H1-H16)和 9 个 N 亚型(N1-N9)。感染人的禽流感病毒亚型主要为 H1N1、H5N1、H9N2、H7N7 和最近的 H7N9 等^[6]。禽流感是不容易感染给人的,但由于其基因组变异的频率极高,如果一个宿主同时受到两种或更多种流感病毒感染,可能产生不同病毒株间的基因重组,例如 2009 年流行的甲型 H1N1 流感病毒就是由猪流感病毒、人流感病毒和禽流感病毒在宿主猪体内通过基因片段重组后产生的一种新型混合型病毒株^[7]。此外,有些原本为低致病性禽流感病毒株(H5N2、H9N2、H7N7),可经一段时间在禽间流行迅速变异成为高致病性毒株(H5N1)从而感染人。例如,2003 年发生 H5N1 高致病性禽流感流行,截至 2013 年 3 月 12 日,全球有 622 例 H5N1 人禽流感实验室确诊病例,死亡 371 例^[8]。由此可见,人感染禽流感病毒已成为一个严重的公共卫生问题,极大的影响了人类的健康和社会经济的发展。

2013 年 2~3 月,人感染 H7N9 禽流感疫情在我国发生,引起了全球的高度关注^[9]。截至 2013 年 5 月 20 日,中国大陆累计报告确诊病例 130 例,治愈 72 例,死亡 36 例,病例呈散发,分布于浙江、上海、江苏等 10 个省份。临床症状主要表现为典型的病毒性肺炎,起病急,病程早期均有发热、咳嗽等呼吸道感染症状,5~7 d 后可出现呼吸困难等重症肺炎相关表现,并进行性加重,部分病例可迅速发展为急性呼吸窘迫综合症并死亡。此次由 H7N9 型禽流感病毒引

起的人间感染病例是全球首次报道人感染这一亚型的禽流感病毒,以往有较多人感染 H7 亚型禽流感病毒报道,但多数病例表现为结膜炎和轻微的呼吸道系统症状,而关于 N9 亚型禽流感病毒感染并未有报道^[10,11]。根据 H7N9 新型禽流感病毒的基因分析显示^[12],H7N9 禽流感病毒的 8 个基因片段中,H7 片段来源于浙江鸭群中分离的禽流感病毒,并可追溯至东亚地区野鸟中分离的禽流感病毒;N9 片段与东亚地区野鸟中分离的禽流感病毒相似;其余 6 个基因片段(PB2、PB1、PA、NP、M、NS)与来源于中国上海、浙江、江苏等地鸡群中 H9N2 禽流感病毒相似。因此,该病毒基因可能来自东亚地区野鸟所携带的禽流感病毒和中国上海、浙江、江苏等地的鸭群和鸡群所携带禽流感病毒发生的基因重组。

尽管目前 2013 新型 H7N9 禽流感病毒暂没有有效人传人的证据,但我们必须加强禽类和高危人群的主动监测,防止其可能在人群中流行。因此,建立针对疑似患者的早期快速筛查技术非常必要。检测呼吸道病原体,采集口咽拭子是最便利的采样方式,而采样质量直接影响检测的有效性。成功的采样必然会收集到人类的细胞,本研究通过数个人类看家基因的筛选,选择出 beta-actin 基因做为采样的质控基因,实验结果显示其扩增的稳定性好。为降低检测成本,本研究设计建立了一组流感病毒四重 RT-PCR 检测方法,通过人源 beta-actin 基因的检测来鉴定咽拭子样本采样的质量,判定检测样本的有效性,利用 M 基因的通用型引物筛检甲型流感病毒,再利用 HA 基因和 NA 基因的特异性分型引物检测 2013 新型 H7N9 亚型禽流感病毒。若 4 个基因片段均扩增阳性,则可判断该样本采样质量可靠并感染了 2013 新型 H7N9 禽流感病毒;若只有 beta-actin 基因和 M 基因扩增阳性,则排除 H7N9,并可通过进一步的分型引物对甲型流感进行 HA 和 NA 的分型。若 beta-actin 基因扩增阴性,则提示该样本采样失败,检测无效。盲法比对实验显示,四重 RT-PCR 与荧光 PCR 方法检测结果一致。

本研究所建立的方法简便、实用、通量高、成本低廉,适合快速检测的需要。

参考文献

[1] 毛青.科学认识 H7N9,有效防控人感染禽流感病毒[J].第三军医大学学报,2013,35(8):693-695.
 [2] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. N Engl J Med, 2013, 368(20):1888-1897.

- [3] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses [J]. *Lancet*, 2013, doi:pii: S0140-6736(13)60938-1.
- [4] 莫秋华,杨翠兰,林继灿,等.一步法多重 RT-PCR 快速筛查 A 型、B 型和新型甲型 H1N1 流感病毒[J].南方医科大学学报,2009,29(8): 1545-1547.
- [5] Fereidouni SR, Starick E, Grund C, et al. Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 135(3-4):253-260.
- [6] 朱闻斐,高荣保,王大燕,等.H7 亚型禽流感病毒概述[J].病毒学报, 2013,29(3):245-249.
- [7] Pan C, Cheung B, Tan S, et al. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus[J]. *PLoS One*, 2010,5(3):e9549.
- [8] WHO/GIP. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013[R]. Geneva: WHO/GIP,2013.
- [9] Uyeki TM, Cox NJ. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1862-1864.
- [10] Nguyen-Van-Tam JS, Nair P, Acheson P, et al. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis [J]. *Euro Surveill*, 2006,11(5): E60502-E60503.
- [11] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. *Lancet*, 2004,363(9409):587-593.
- [12] Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013[J]. *Euro Surveill*, 2013,18(15)pii: 20453.

收稿日期:2013-05-31

(上接第 292 页)

毒,应加强入境人员传染病监测,加强入境人员传染病防控知识的宣教。

参考文献

- [1] 范国珍.“3+1”防线建设[M].昆明:云南人民出版社,2011.
- [2] 胡孔新,平芮巾,刘胜牙,等.基于症候群监测初步建立我国口岸入境人员传染病监测网络及其 2009—2011 年监测结果分析[J].中国国境卫生检疫杂志,2011,34(5):289-295.
- [3] Coirs MT, Pérez-Breña P, Garía ML, et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay[J]. *J Med Virol*,2003,69:132-144.
- [4] Coirs MT, Aguilar JC, Garía ML, et al. Simultaneous detection respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays[J]. *J Med Virol*,2004,72:484-495.
- [5] Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia[J]. *J Virol*, 2005,79:884-895.
- [6] Peiris JS, Tang WH, Chan KH, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in HongKong[J]. *Emerg Infect Dis*,2003,9(6):628-33.
- [7] Allard AK, Girones R, Juto P, et al. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stools[J]. *J Clin Microbiol*,1990,28: 2659-2667.
- [8] Chung JY, Han TH, Kim CK, et al. Bocavirus Infection in Hospitalized Children[J]. *South Korea Infect Dis*,2006,12(8):1254-1256.
- [9] 雷小英,彭东红.人副流感病毒的研究进展[J].儿科学杂志, 2012,18(11):54-58.
- [10] Lee J, Choi EH, Lee HJ, et al. Clinical severity of respiratory adenovirus infection by serotypes in Korea children over 17 consecutive years (1991-2007) [J]. *J Clin Virol*, 2010, 49(2): 115-120.
- [11] Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, et al. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan [J]. *J Clin Microbiol*,2002, 40(1): 140-145.
- [12] 高小倩,金玉,谢志萍,等.南京地区 2010—2011 年度呼吸道感染患儿腺病毒的流行病学研究[J].病毒学报,2012,28(5):531-534.
- [13] 唐浏英,熊英,霍佃香,等.2004 年中国四省市腺病毒疫情的流行病学和病原学研究[J].疾病监测,2006,21(6):285-287.
- [14] 高雪芬,樊婷,左素俊.一起聚集性腺病毒肺炎疫情的流行病学调查[J].中国公共卫生管理,2012,28(6):761-762.
- [15] 黄国虹,徐文波.腺病毒新型别的研究进展[J].病毒学报,2013,29 (3):342-348.

收稿日期:2013-06-21