

高致病性 A(H5N8) 亚型禽流感病毒 NA 基因核酸检测方法的建立

李晓丹, 张焯, 薄洪, 杨磊, 舒跃龙, 王大燕*

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 卫生和计划生育委员会医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 102206)

摘要:建立以 Real-time PCR 为基础的新型高致病性 A(H5N8) 亚型禽流感病毒 NA 基因检测方法。针对 2016 年 6 月起频繁暴发的 H5N8 禽流感疫情, 从 GenBank 和 Global Initiative on Sharing All Influenza Data(GISAID) 下载 2014 年以来的 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 序列, 通过序列比对, 在相对保守区域设计适用于实时荧光逆转录聚合酶链式反应(rRT-PCR)的引物和探针。选用 28 株不同 NA 亚型的流感病毒进行特异性验证, 结果显示本文设计的引物探针组合能够特异性检测高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 基因。灵敏度检测结果显示, 本文设计的引物探针组合能检出最低 23 个拷贝的 RNA。本文建立了高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒 NA 基因特异性荧光定量检测方法, 与世界卫生组织(WHO)推荐的 A 型流感病毒 M 基因、H5 基因检测引物探针的最低检测限一致, 可以组合用于 H5N8 亚型禽流感病毒的检测。

关键词: 流感; A(H5N8); 实时荧光逆转录聚合酶链式反应(Real-time RT-PCR)

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2017)-0457-05

DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003147

高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒于 2010 年首次在中国野鸭中检测并分离到, 属于 A/goose/Guangdong/1/1996 系的 2.3.4 分支^[1]。2014 年初在韩国的野鸟和家禽中检测到属于 2.3.4.4 分支的高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒, 随后日本、中国、德国、荷兰、英国、意大利和俄罗斯等欧亚国家也报告了这一病毒引起的家禽和野鸟的暴发疫情^[2-5]。2014 年末, 该病毒通过候鸟传播至北美大陆^[6], 并迅速与北美地区流行的低致病性禽流感病毒重配产生新型的高致病性 H5N1 和 H5N2 亚型流感病毒^[7]。此后, 2015 年在中国台湾、比利时和瑞典也检测到高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒^[8]。自 2016 年 6 月开始, 欧洲和亚洲的多个国家包括澳大利亚、克罗地亚、丹麦、德国、比利时、印度、以色列、荷兰、波兰、俄罗斯联邦和瑞士报告野鸟和/或家禽中有高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒暴发, 其中多次伴随着禽类的大批死亡^[9], 引起全球高度关注。

截止目前, 尚无人感染 2.3.4.4 分支高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒^[10]的报道, 但是同分支中的高

致病性 H5N6 亚型禽流感病毒可以感染人类^[10, 11], 提示 H5N8 亚型禽流感病毒具有感染人的潜力, 而且近期该亚型禽流感病毒在全球广泛传播和分布, 对家禽、野生动物以及人类健康都具有威胁。本研究针对高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 基因设计了一组 Real-time PCR 引物和探针, 并对其特异性和灵敏度等进行了评价, 为高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒感染病例的早期发现和诊断提供了手段。

材料与方法

1 引物、探针设计及合成

从 GenBank 和 GISAID 下载 2014 年以来的高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 序列 72 条, 利用 MEGA 软件进行比对, 选择相对保守区域, 利用 Oligo 软件(版本 7)设计引物和 TaqMan 探针, 并由大连宝生物公司合成, 探针 5'端标记 FAM, 3'端标记 BHQ1。

A 型流感病毒 M 基因及高致病性 H5 亚型流感病毒 HA 基因检测引物探针为 WHO 推荐。

2 病毒和病毒 RNA 制备

本研究使用的毒株共 28 株, 其中 26 株由国家流感中心分离、测序并保存, 另外 2 株为国际疫苗代表株(表 1)。病毒核酸提取使用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen, Mainz, Germany), 操作方法参照厂家提供的说明。

收稿日期: 2017-02-15; 修回日期: 2017-03-02

基金项目: 国家重点研发计划(项目编号: 2016YFD0500208), 题目: 人感染动物流感病毒

作者简介: 李晓丹(1981-), 女, 吉林省吉林市, 硕士, 助理研究员, 主要从事流感病毒研究, Tel: 010-58900855, E-mail: lixiaodan@cnic.org.cn

* 通讯作者: 王大燕(1975-), 女, 研究员, 博士生导师, 中国疾病预防控制中心病毒病所, Tel: 010-58900858, E-mail: dayanwang@cnic.org.cn

表 1 本文所用流感毒株

Table 1 Influenza viruse strains used in this study

| Virus | Subtype |
|---|---------|
| A/California/07/2009* | H1N1 |
| A/Switzerland/9715293/2013* | H3N2 |
| A/Hunan/42443/2015 ^{&} | H1N1 |
| A/Sichuan/51407/2016 ^{&} | H1N1 |
| A/Environment/Hunan/37939/2015 [#] | H3N8 |
| A/Environment/Hunan/46780/2015 [#] | H3N8 |
| A/Environment/Chongqing/45279/2015 [#] | H4N3 |
| A/Environment/Guangdong/77233/2014 [#] | H4N8 |
| A/Environment/Yunnan/01455/2015 [#] | H5N1 |
| A/Environment/Chongqing/38167/2016 [#] | H5N1 |
| A/Environment/Jiangsu/44039/2016 [#] | H5N1 |
| A/Environment/Guangxi/44389/2015 [#] | H5N6 |
| A/Environment/Hunan/45380/2016 [#] | H5N6 |
| A/Hunan/55555/2016 ^{&} | H5N6 |
| A/Environment/Jiangxi/10645/2014 [#] | H5N8 |
| A/Environment/Jiangsu/98335/2014 [#] | H5N8 |
| A/Environment/Guangdong/47376/2016 [#] | H6N6 |
| A/Environment/Fujian/46606/2016 [#] | H6N8 |
| A/Environment/Jiangxi/33293/2015 [#] | H7N7 |
| A/Environment/Guangxi/48394/2016 [#] | H7N9 |
| A/Environment/Hunan/51122/2016 [#] | H7N9 |
| A/Fujian/54840/2016 ^{&} | H7N9 |
| A/Jiangxi/47249/2016 ^{&} | H9N2 |
| A/Beijing/58604/2016 ^{&} | H9N2 |
| A/Environment/Hunan/28340/2016 [#] | H10N3 |
| A/Environment/Jiangxi/03486/2013 [#] | H10N8 |
| A/Environment/Jiangxi/10713/2014 [#] | H10N8 |
| A/Environment/Hunan/32486/2015 [#] | H10N8 |

* : Seasonal influenza virus vaccine strain
 &.: Avian origin, isolated from a human specimen
 # : Avian origin, isolated from an environmental sample

3 Real-time one-step RT-PCR(rRT-PCR)反应

采用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (ThermoFisher Scientific) 试剂盒进行 Real-time PCR。总反应体系为 25μl, 包含 5μl RNA 模板, 1μl 25 × RT-PCR Enzyme Mix, 12.5μl 2X RT-PCR Buffer, 0.5μl 正向引物(20μM), 0.5μl 反向引物(20μM), 0.25μl 探针(20μM), 5.25μl 无核酸酶水。反应温度循环条件为: 逆转录反应 45℃ 延伸 10min; 逆转录酶 95℃ 灭活 10min; 聚合酶链式反应 40 个循环,

95℃ 15s, 60℃ 45min。温度循环反应在 Stratagene (型号 3005P) real-time PCR 仪中进行。对结果判定, Ct 值 37 为 cutoff 值, 即 Ct 值 > 37 判定未阴性, Ct 值 ≤ 37 判定为阳性。

4 特异性检测

应用 rRT-PCR 方法, 利用高致病性 H5N8NA 亚型特异性引物和探针对上述 28 株病毒的 RNA 进行检测, 28 株流感病毒的 NA 亚型涵盖了目前可以分离到的 9 种 NA 亚型中的 7 个亚型(除了 N4 和 N5)。

5 灵敏度检测

来自 A 型流感病毒 M 基因的体外转录 RNA 用于灵敏度实验。对毒株 A/江西东湖/346/2013 (H10N8) 全长 M 基因进行扩增, PCR 产物纯化后插入 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 中, 根据 ME-GAscript T7 Transcription Kit (Thermofiser Scientific) 的操作说明对 M 基因进行体外转录, 最后使用 Nanodrop 分光光度计 (Thermofiser Scientific) 对转录 RNA 的浓度进行定量。

将高致病性 H5N8 亚型流感病毒 A/环境/江苏/98335/2014 的 RNA 依次进行 10 倍梯度稀释, 从 10⁻¹ 到 10⁻⁷, 利用 rRT-PCR, 通过流感病毒 M 基因体外转录标准品对病毒拷贝数进行定量。通过 rRT-PCR 测定 A 型流感病毒 M 基因、高致病性 H5 亚型流感病毒 HA 基因以及本文设计的高致病性 H5N8 亚型流感病毒 NA 基因检测引物探针组合与不同稀释度 RNA 反应的 Ct 值, 确定各组引物探针的检测极限。

结 果

1 Real-time RT-PCR

本研究设计了一套针对高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒 NA 基因的引物和探针, 序列见表 2。其 rRT-PCR 检测条件与 A 型流感病毒 M 基因及高致病性 H5 亚型流感病毒 HA 基因检测条件相同。

表 2 本研究使用的引物和探针

Table 2 Sequences of primers and probes

| Target | Primer/probe | Sequence | Source |
|--------|--------------|---------------------------|--------|
| M | FluA-Forward | GACCRATCCTGTACCTCTGAC | WHO |
| | FluA-Reverse | GGGCATTYTGGACAAAKCGTCTACG | |
| | FluA-probe | TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG | |

| Target | Primer/probe | Sequence | Source |
|--------|--------------|-----------------------------|--------------|
| HA | H5HA-F1481 | TGGAAAGTRTAARAAACGGAACGT | WHO |
| | H5HA-R1631 | YGCTAGGGARCTCGCCACTG | |
| | H5HA-P1510 | TACCCGCAGTATTCAGAAGAAGC | |
| NA | H5N8NA_F973 | CTCCAAGAGGGGAAGATRCT | Own designed |
| | H5N8NA_R1094 | CTGAYCTGGAGGTTCTGACTA | |
| | H5N8NA_P1061 | CGCCCCACCCACACATCAGTTCCCTGT | |

2 H5N8 NA 引物探针检测不同亚型流感病毒, 确定方法的特异性

通过 rRT-PCR 方法, 利用本文设计的引物探针组合对 28 株不同 NA 亚型的流感病毒进行检测。实验结果显示(图 1), 两株 H5N8 亚型禽流感病毒和一

株 H10N8 亚型禽流感病毒(A/环境/湖南/32486/2015)用本文设计的引物探针进行检测结果为阳性, 模板为 A/环境/重庆/38167/2016(H5N1)和 A/环境/湖南/46780/2015(H3N8)的反应在循环数 37 之后出现荧光信号值, 判定为阴性。

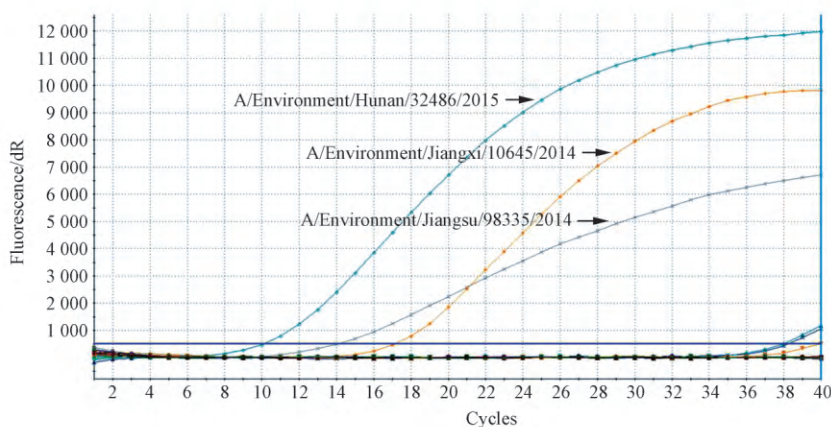


图 1 H5N8 NA 引物和探针组合检测不同亚型流感病毒

Figure 1 H5N8 NA primers and probe used to detect different subtypes of influenza viruses

3 比较 H5N8 NA 引物探针与 WHO 推荐的引物探针检测灵敏度

利用流感病毒 M 基因体外转录标准品, 通过标准曲线法对本文使用的高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒 A/环境/江苏/98335/2014 的 RNA 进行定

量, 当稀释度为 10^{-6} 时(反应体系中 RNA 含量为 23 个拷贝), 达到本文设计的 N8 引物探针的检测下限, 与 WHO 推荐的 A 型流感病毒 M 基因和 H5HA 基因检测引物探针检测下限相同(表 3)。

表 3 H5N8 NA 引物和探针组合与 WHO 推荐的 A 型流感病毒 M 基因和 H5HA 基因检测引物探针检测灵敏度比较

Table 3 Comparison of Ct values of ourself designed rRT-PCR assay and WHO recommended rRT-PCR assay with influenza virus A/Environment/Jiangsu/98335/2014

| RNA dilution ratio | No. of RNA copies in reaction | Mean relative Ct value | | |
|--------------------|-------------------------------|------------------------|-------|-------|
| | | M | HA | NA* |
| 10^{-1} | 2 300 000 | 17.48 | 18.36 | 18.77 |
| 10^{-2} | 230 000 | 20.87 | 21.69 | 22.28 |
| 10^{-3} | 23 000 | 24.52 | 25.12 | 25.60 |
| 10^{-4} | 2 300 | 27.80 | 28.58 | 29.02 |
| 10^{-5} | 230 | 31.22 | 32.01 | 32.62 |
| 10^{-6} | 23 | 34.52 | 35.17 | 35.84 |
| 10^{-7} | 2.3 | 37.74 | 39.03 | 39.24 |

* A reproducibility assay suggested that the Ct values had a coefficient of variation $< 3\%$

讨 论

流感病毒快速变异和进化,为流感病毒检测引物和探针的设计带来了挑战,本文针对高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 基因设计了一对引物和一条 TaqMan 探针,以往针对流感病毒 NA 基因设计的引物和探针其检测灵敏度往往低于针对 M 基因和 HA 基因设计的引物和探针,而本文设计的针对高致病性 A(H5N8)亚型禽流感病毒 NA 基因的特异性引物探针检测极限与 WHO 推荐使用的流感病毒 M 基因及高致病性 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因引物探针检测极限相似,同时本文设计的引物和探针与 WHO 推荐的检测引物和探针反应条件相同,因此可组合用于高致病性 A(H5N8)亚型禽流感病毒的检测。

由于毒株资源的限制,本研究中使用的 28 株病毒没有 N4 和 N5 亚型的流感毒株。在 NA 亚型交叉反应实验中,除 2 株 H5N8 亚型禽流感病毒检测阳性,3 株 H10N8 亚型禽流感病毒中有 1 株检测结果也为阳性,为此我们将本文研究使用的 9 株 NA 亚型为 N8 的毒株进行 NA 基因同源性比较,比较结果显示 A/环境/湖南/32486/2015(H10N8)的 NA 基因与本文两株 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 基因同源性高于 90%,而其余 6 株 N8 亚型禽流感病毒 NA 基因与本文两株 H5N8 亚型禽流感病毒的 NA 基因同源性低于 80%。我们将 A/环境/湖南/32486/2015(H10N8)的 NA 序列输入 GenBank 中进行核酸相似性比较,结果显示该病毒的 NA 基因更接近序列库中 H5N8 亚型的 N8 基因,与 H5N8 亚型禽流感病毒 A/duck/Eastern China/L0611/2011 的 NA 基因同源性达到 95%,而与我国 2014 年分离得到的 H10N8 亚型禽流感病毒 A/Jiangxi/09037/2014 的 NA 基因同源性仅为 74.9%,表明本研究设计的检测引物探针可以特异性对高致病性 A(H5N8)亚型禽流感病毒的 NA 基因进行鉴定。

2014 年以来高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒迅速在全球蔓延,目前已经在多个国家和地区的野鸟和家禽中检测到该病毒。截至目前虽然还没有人感染该亚型禽流感病毒,但是同属于 2.3.4.4 分支的高致病性 H5N6 亚型禽流感病毒已经造成多名病例感染,因此建立相应的检测技术是十分必要的。本文建立了基于 Real-time one-step RT-PCR 特异性对高致病性 H5N8 亚型禽流感病毒 NA 基因进行检测

的方法,该方法具有较好的灵敏度和特异性,为病例的早期诊断提供了有效手段。

参考文献:

- [1] Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, Zhao G, Zhao M, Chen Z, Hu S, Liu W, Liu X, Peng D, Liu X. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 163(3-4):351-357.
- [2] Jeong J, Kang H M, Lee E K, Song B M, Kwon Y K, Kim H R, Choi K S, Kim J Y, Lee H J, Moon O K, Jeong W, Choi J, Baek J H, Joo Y S, Park Y H, Lee H S, Lee Y J. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 173(3-4):249-257.
- [3] World Organization for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). Paris: OIE; 2014[OL]. Available from: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2014/>.
- [4] Verhagen J H, Herfst S, Fouchier R A M. How a virus travels the world [J]. *Science*, 2015, 347(6222):616-617.
- [5] Marchenko V Y, Susloparov I M, Kolosova N P, Goncharova N I, Shipovalov A V, Durymanov A G, Ilyicheva T N, Budatsirenova L V, Ivanova V K, Ignatyev G A, Ershova S N, Tulyahova V S, Mikheev V N, Ryzhikov A B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014 [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(11):2857-60.
- [6] Lee D H, Torchetti M K, Winker K, Ip H S, Song C S, Swayne D E. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds [J]. *J Virol*, 2015, 89:6521-6524
- [7] Hall J S, Dusek R J, Spackman E. Rapidly expanding range of highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(7):1251-1252.
- [8] World Organization for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). Paris: OIE; 2015[OL]. Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/>
- [9] World Organization for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). Paris: OIE; 2016[OL]. Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/>
- [10] Pan M, Gao R, Lv Q, Huang S, Zhou Z, Yang L, Li

- X, Zhao X, Zou X, Tong W, Mao S, Zou S, Bo H, Zhu X, Liu L, Yuan H, Zhang M, Wang D, Li Z, Zhao W, Ma M, Li Y, Li T, Yang H, Xu J, Zhou L, Zhou X, Tang W, Song Y, Chen T, Bai T, Zhou J, Wang D, Wu G, Li D, Feng Z, Gao GF, Wang Y, He S, Shu Y. Human infection with a novel highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings [J]. *J Infect*, 2016, 72: 52-59.
- [11] Xu W, Li X, Bai T, Zhao X, Zhao X, Zhang Y, Guo J, Li Z, Yang L, Wang D, Shu Y. A fatal case of infection with a further reassortant, highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6 virus in Yunnan, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 40: 63-66.

Establishment of a Real-time PCR Method for Detection of the NA Gene of the Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus

LI Xiaodan, ZHANG Ye, BO Hong, YANG Lei, SHU Yuelong, WANG Dayan*

(*Institute for Viral Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention,*

Key Laboratory for Medical Virology, National Health and Family Planning Commission, Beijing 102206, China)

Abstract: We wished to develop an assay for identification of the neuraminidase (NA) gene of the highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus NA gene by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method. NA gene sequences of the avian influenza H5N8 virus deposited in GenBank and GISAID since 2014 were downloaded. After alignment, primers and a probe targeted to the conserved region were designed. Cross-reactivity was tested using 28 influenza viruses with different NA subtypes. Results showed that only the NA gene originating from the avian influenza A(H5N8) virus could be detected. The results of sensitivity assay revealed that the detection limit of detection of the primers and probe designed in this study was 23 RNA copies per reaction. Overall, we offered an efficient and reliable diagnostic method for identification of NA gene identification of the highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. Our method can be applied to the characterization of this virus in combination with the World Health Organization-recommended protocol for detection of the matrix and hemagglutinin genes of this virus.

Key words: Influenza; A(H5N8); Real-time RT-PCR

* Corresponding author: WANG Dayan, E-mail: dayanwang@cnic.org.cn