

# 套式 RT-PCR 方法检测临床样品中的猪流感病毒

祁 贤<sup>1</sup>, 陆承平<sup>1\*\*</sup>, 王贵平<sup>2</sup>, 宋长绪<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东广州 510640)

## Detection of Swine Influenza Virus in Clinical Samples Using RT-nested PCR Assay

QI Xian<sup>1</sup>, LU Cheng-ping<sup>1\*\*</sup>, WANG Gui-ping<sup>2</sup>, SONG Chang-xun<sup>2</sup>

(1. Key laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; China; 2. Veterinary Medicine Institute, Guangdong Agricultural Academy of Science, Guangzhou 510640 China)

**Abstract :** Using two pairs of primer based on conserved sequences of the NP gene of influenza A virus, a RT-nested PCR assay was developed to detect Swine influenza virus in clinical samples. No cross reactions with three other swine pathogens of respiratory disease such as *Porcine respiratory and reproductive syndrome virus*, *Porcine circovirus* type 2 and *Mycoplasma suis pneumoniae*. With agarose electrophoresis detection, the RT-nested PCR was 100 times more sensitive compared to that of non-nested RT-PCR. 35 clinical samples including 4 blood samples and 31 lung tissues from Southern China were tested by RT-nested PCR, and 28 (80%) out of 35 sample were positive. By propagated in 9-to 10-day-old SPF embryonated chicken eggs, 23 strains of *Swine influenza virus* were isolated from 28 positive samples. The result of RT-nested PCR was 82% in agreement with that of virus isolation, and the RT-nested PCR were more sensitive than the virus isolation. No *Swine influenza virus* was isolated from the all RT-nested PCR negative samples. On the basis of characterization of HA gene sequences, 5 out of 23 strains had H3 and H9 subtypes. It suggested that the RT-nested PCR assay was rapid, specific and sensitive, and it was is advantageous to detect influenza virus in latent infections.

**Key words :** *Swine influenza virus*; RT-nested PCR; Virus isolation; Virus surveillance

**关键词 :** 猪流感病毒, 套式 RT-PCR, 病毒分离, 病毒监测

**中图分类号 :** S852.65      **文献标识码 :** A      **文章编号 :** 1003-5125(2005)02-0200-03

猪流感是由猪流感病毒 (*Swine influenza virus*, SIV) 引起的一种呼吸道传染病, 具有发病率高、死亡率低的特点, 罹患流感的怀孕母猪还有并发流产的危险。猪流感已给我国养猪业带来严重危害。

SIV 属于正粘病毒科 A 型流感病毒属<sup>[1]</sup>。A 型流感病毒可感染多种动物, 一般认为, 水禽是流感病毒的自然宿主和基因库, 猪则是人流感病毒株与禽流感病毒株的中间宿主和混合器<sup>[1]</sup>, 通过基因重配产生抗原转移而导致新流感病毒株的出现。研究表明猪气管上皮细胞同时具有人流感病毒与禽流感

病毒两种受体<sup>[2]</sup>, 因此所有 A 型流感病毒都能感染猪, 猪在流感病毒的生态分布中占有重要地位。目前猪流感的主要流行血清型是 H1N1 和 H3N2 亚型, 近年来跨物种直接感染人的禽流感病毒, 包括 H5N1、H9N2、H7N7 亚型, 都在猪体内有所发现<sup>[1,3-5]</sup>。猪流感对人类健康造成潜在威胁, 其公共卫生意义更加突出。在 A 型流感病毒的编码基因中, NP 基因较为保守, 可作为不同亚型流感病毒分子诊断的靶基因。本研究建立了套式 RT-PCR 分子诊断技术, 结合病毒分离技术, 检测临床样品并对该方法进行了评估。

收稿日期: 2004-09-07, 修回日期: 2004-11-10

作者简介: 祁贤 (1971 - ), 男, 山西大同籍, 博士研究生, 现主要从事猪流感病毒的研究。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

2004年春作者用 SPF 鸡胚在广东省不同地区的猪体内分离到 5 株病毒,暂命名为 Swgd104, Swgd204, Swgd304, Swgd404, Swgd504,经核酸序列分子鉴定属于 A 型流感病毒。其中 Swgd204、Swgd304 和 Swgd404 的  $EID_{50}$  分别为  $10^{-6.5}/0.2$  mL、 $10^{-5.5}/0.2$  mL 和  $10^{-6.7}/0.2$  mL。猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine respiratory and reproductive syndrome virus*, PRRSV)gd 株、猪圆环病毒 2 型(*Porcine circovirus type 2*, PCV-2)gd 株由广东省农业科学院兽医研究所保存,猪肺炎支原体(*Mycoplasma suis pneumoniae*)活疫苗购自北京中海动物保健科技公司。

### 1.2 引物

根据 A 型流感病毒 NP 蛋白基因的保守序列,设计 2 对引物,外套引物为,  $P_{out1}$ : 5'-ATGGACGAA GAACAA GGA TTGC-3',  $P_{out2}$ : 5'-TCTCAGTTCAA GAGTGTGGAG-3', 分别位于 NP 基因 ORF 的第 632bp-654bp 处和第 1 125bp-1 147bp 处,扩增片段长度为 515bp。内套引物为,  $P_{in1}$ : 5'-GCCCA TAA GTCCTGCTTGCCTGC-3',  $P_{in2}$ : 5'-AGCAA TCTGAACTCCTCTA GTG-3', 分别位于 NP 基因 ORF 的第 811bp-834bp 处和第 1 077bp-1 099bp 处,扩增片段长度为 287bp。引物由上海博亚公司合成。

### 1.3 临床样品的处理

采集的样品包括猪的肺脏和血样。肺脏充分研磨,按 1:5 比例加入无血清的 MEM 液,制成 20% 的悬液。将肺脏悬液和血液样品经 3 000r/min 离心 10min,取上清液以备 RNA 提取和病毒分离。

### 1.4 RNA 的提取和 RT-PCR 反应

采用异硫氰酸胍提取法提取基因组 RNA。提取的 RNA 用 20mL DEPC 处理的去离子水溶解,取 5 $\mu$ L 用于 RT-PCR 反应模板。

### 1.5 反转录和 PCR 反应

RT-PCR 采用 TaKaRa 公司的 One-Step-RNA-PCR KIT,反应体积为 25 $\mu$ L。反应混合物包括外套引物各 0.1mmol/L,进行反应时,首先逆转录反应 50 $^{\circ}$ C,30min,然后 94 $^{\circ}$ C,2min 使逆转录酶失活。第一次 PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C,50sec;54 $^{\circ}$ C,1min;72 $^{\circ}$ C,1min 30sec;30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

取第一次反应混合物 5 $\mu$ L 作模板,作第二次

PCR 反应,加入内套引物各 0.1mmol/L,反应总体积为 25 $\mu$ L。RCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C,50sec;58 $^{\circ}$ C,1min;72 $^{\circ}$ C,1min;30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

### 1.6 套式 RT-PCR 特异性试验与敏感性检测

提取 5 株 SIV 分离株(见 1.1)、PRRSV gd 株、PCV-2 gd 株和猪支原体活疫苗的基因组核酸作模板,进行套式 RT-PCR 反应,以评估该方法的特异性。取两次反应产物各 8 $\mu$ L,1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

将 SIV 分离株 Swgd204、Swgd304 和 Swgd404 的鸡胚尿囊增殖病毒液 10 倍系列稀释,每个稀释度都进行套式 RT-PCR 反应。取两次反应产物各 8 $\mu$ L 分别进行琼脂糖凝胶电泳,评估套式 RT-PCR 的敏感性。

### 1.7 套式 RT-PCR 检测临床样品

用套式 RT-PCR 方法共检测了 35 份临床样品,包括 30 份肺脏,4 份血样。这些样品是在 2004 年 3 月到 5 月期间从广东、广西不同猪场采集到的。病料采集时,有些猪场有明显的流感症状,有些则流感症状不明显。

### 1.8 病毒分离

将 35 份临床样品都用 SPF 鸡胚进行病毒分离。处理好的样品经无菌过滤后接种 9-10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔和羊膜腔,0.2mL/枚,35 $^{\circ}$ C 孵化。弃去 24 h 死亡的鸡胚,用 0.5%豚鼠红细胞对 24-72 h 收获的尿囊液进行血凝试验,盲传 3 代无血凝活性的样品视为病毒分离阴性。将病毒分离结果与套式 RT-PCR 检测结果进行比较,评估二者的符合程度。

## 2 结果

### 2.1 套式 RT-PCR 的特异性

用 5 株 SIV 分离株、PRRSV、PCV-2 和猪支原体分别进行套式 RT-PCR 反应,以检验其特异性。Swgd104, Swgd204, Swgd304, Swgd404, Swgd504 在第一次反应和第二次反应都分别出现 515bp 和 288bp 的特异性片段条带。阴性对照、PRRSV、PCV-2 和猪支原体在两次反应中都未出现 PCR 扩增产物(图 1)。对 515 bp 片段回收测序,用 BLAST 软件在 GenBank 网站对序列进行搜寻比较,结果与 A 型流感病毒 NP 基因的相关序列高度同源(资料未显示)。

### 2.2 套式 RT-PCR 的敏感性

Swgd204、Swgd304 和 Swgd404 在鸡胚尿囊腔增殖,将尿囊液  $10^{-1}$ - $10^{-12}$  倍系列稀释,提取每个稀

释度的 RNA 作模板分别进行套式 RT-PCR 反应, 以此评估其敏感性。第一次反应能检测到 515bp 条带的上限分别是  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-7}$  稀释度, 而第二次套式反应可分别检测到  $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  稀释度, 显示套式 RT-PCR 比非套式 PCR 敏感 100 倍。

### 2.3 临床样品的套式 RT-PCR 检测

35 份临床样品经套式 RT-PCR 检测, 共有 28 份阳性, 其中有 2 份血样, 阳性率为 80%。

### 2.4 病毒分离

从套式 RT-PCR 检测阴性的 7 份样品中未分离到病毒, 而从 28 份阳性样品中分离出 23 株病毒, 套式 RT-PCR 与鸡胚病毒分离方法的符合率为 82%, 且比后者更敏感。23 株 SIV 分离株的亚型正在鉴定中。

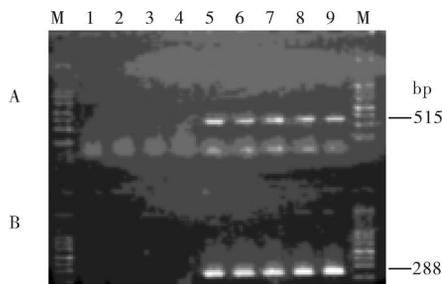


图1 套式 RT-PCR 的特异性检测

Fig.1 Specificity evaluation of the RT-nested PCR assay

A, first reaction; B, second reaction. Lane M, 100-bp ladder. Lane 1-9: negative control, PRRSV, PCV-2, Mycoplasma. suis pneumoniae, Swgd104, Swgd204, Swgd304, Swgd404, and Swgd504, respectively.

## 3 讨论

A 型流感病毒的检测方法有病毒分离法、ELISA 法、免疫荧光技术、RT-PCR、荧光 RT-PCR 等。病毒分离法是一种经典的检测方法, ELISA 法受病毒感染时间的限制, 免疫荧光法易出现假阳性, 荧光 RT-PCR 要求实验条件高, 不易推广。PCR 检测技术日益普及, 一些基于不同靶基因的 RT-PCR 检测方法在国外相继建立<sup>[6,7]</sup>。刘明等建立了检测禽流感病毒的 RT-PCR 方法<sup>[8]</sup>, Munch 等建立了 RT-PCR-ELISA 法, 该方法比 RT-PCR 敏感 100

倍<sup>[9]</sup>, 并可用于隐性感染的检出。但对 SIV 的相应检测国内未见报道。本实验建立的套式 RT-PCR 法, 其敏感性与 RT-PCR-ELISA 法相同, 但比后者易于操作。部分临床样品采自无明显流感症状的猪体, 经套式 RT-PCR 和病毒分离都为阳性, 表明该法也适用于 SIV 隐性感染的检出。

在对 35 份临床样品进行 SIV 检测时, 同时也进行了 PRRSV、PCV-2 的检测, 结果有 40% 的样品存在 SIV、PRRSV 和 PCV-2 的二重感染或三重感染(资料未显示)。说明可由多种病原协同引起猪群的呼吸道疾病, SIV 在猪呼吸道疾病中的作用应引起重视。

## 参考文献

- [1] 陆承平. 高致病性禽流感与流感病毒[J]. 中国病毒学, 2004, 19:204-207.
- [2] Ito T, Nelson J, Couceiro S S, *et al*. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998, 72:7367-7373.
- [3] Inomiya A, Takada A, Okazaki K, *et al*. Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China[J]. Vet Microbiol, 2002, 88:107-114.
- [4] van Kolschooten F, Dutch veterinarian becomes first victim of avian influenza[J]. Lancet, 2003, 361:1444.
- [5] Peiris J S M, Guan Y, Markwell D, *et al*. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in Southeastern China: potential for genetic reassortment? [J]. J Virol, 2001, 75:9679-968.
- [6] Ellis J S, Zambon M C. Molecular diagnosis of influenza[J]. Rev Med Virol, 2002, 12:375-385.
- [7] Choi Y K, Goyal S M, Kang S W, *et al*. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays[J]. J Virol Meth, 2002, 102:53-59.
- [8] 刘明, 于康震, 崔尚金, 等. RT-PCR 快速诊断禽流感的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(增刊):176-178.
- [9] Munch M, Nielsen L P, Handberg K J, *et al*. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA [J]. Arch Virol, 2001, 146:87-97.