

NASBA 快速检测禽流感 H5 亚型病毒 *

单松华^{1**}, 刘乐庭², 陈家华¹, 吴仲梁¹

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 香港基因晶片开发有限公司, 香港)

Detection of Avian Influenza Virus Subtype H5 Using NASBA

SHAN Song-hua^{1**}, LAU Lok-Ting², CHEN Jia-hua¹, WU Zhong-liang¹

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Hong Kong DNA Chips Limited, 2 Wing Yip Street, Kowloon, Hong Kong SAR, China)

Abstract: Nucleic acid sequence-based amplification with electrochemiluminescent detection (NASBA/ECL) of avian influenza virus subtype H5 was developed, comparing with virus isolation in embryonated chicken eggs. The NASBA technique described here can detect three isolates of influenza A subtype H5 and do not detect influenza A subtype H1, 3, 6, 9, other avian viruses and allantoic fluid of SPF chicken, showing rapidness and high specificity for identifying influenza A subtype H5 viruses. Dilution of a known virus was used to determine the limit of sensitivity for both NASBA and classic virus isolation. The NASBA/ECL method was equivalent in sensitivity to virus isolation in eggs, with limit of $10^{1.5}$ ELD₅₀ dose. Virus was isolated from anal swabs, blood and tissues of chickens artificially infected with highly pathogenic avian influenza A/Chicken/Hong Kong/1000/97 (H5N1). NASBA/ECL could detect viral nucleic acid in anal swabs from the day following artificial infection until death. Conversely, Nucleic acid molecules could only be detected in blood by the NASBA/ECL and virus isolation immediately prior to death. Thus, blood and/or anal swabs are a suitable source of material for the detection of avian influenza in dead birds, but anal swabs are more suitable for detection of viral genetic material in live birds. When samples from chickens artificially infected with avian influenza virus were analysed by both egg culture and NASBA/ECL methods in parallel, the results agreed in 87/97 (90%).

Key words: Highly pathogenic avian influenza (HPAI); Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA); Virus isolation; Rapid detection.

摘要:采用建立的依赖核酸序列的扩增(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)对禽流感病毒 3 株 H5 亚型、1 株 H1、H3、H6 亚型、3 株禽流感 H9 亚型、5 株不同宿主来源的新城疫病毒、鸭肝炎病毒、鸭瘟病毒、SPF 鸡胚尿囊液及禽流感(H9)疫苗、新城疫疫苗、传染性法氏囊病疫苗、传染性支气管炎疫苗进行检测,结果 NASBA(H5 试剂)仅检测到禽流感病毒 H5 亚型,表明方法的特异性强。采用已知禽流感病毒 A/Chicken/HK/1000/97 (H5N1)的鸡胚尿囊液(ELD₅₀ $10^{-7.5}$ /mL),经 10 倍连续稀释,将经典的鸡胚病原分离法和 NASBA 进行比较,二种方法的灵敏度相当。用 A/Chicken/HK/1000/97(H5N1)病毒人工感染 SPF 鸡、商品鸡,采用 NASBA 和病原分离法同时对人工感染鸡的粪拭子、血液进行了动态检测;采集感染死亡鸡的组织脏器,共检测了 101 个组织脏器,两种方法的符合率为 90%(87/97)。

关键词: 禽流感 H5 亚型病毒; NASBA; 鸡胚病毒分离法; 快速检测

中图分类号: S831.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0288-05

收稿日期: 2004-11-16, 修回日期: 2005-02-20

* 基金项目: 上海市科委技术标准专项资助(02DZ05023)。

作者简介: 单松华(1966-3), 男, 江苏省籍, 高级兽医师, 硕士, 主要从事畜禽传染病的研究、动物检疫工作。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 021-68544059, E-mail: shansonghua@hotmail.com

禽流感是由正粘病毒科中的 A 型流感病毒引起的、发生于各种家禽和野禽的病毒性传染病^[1,2]。禽流感病毒呈世界分布,绝大多数呈隐性感染,不表现任何临床症状;只有少数具有迅速传播和高致死性的特性,引发高致病性禽流感(HPAI)。高致病性禽流感通常由 H5 和 H7 亚型引起,造成严重的经济损失,因此世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类传染病,我国也将其列为 A 类传染病。禽流感与人类流感关系非常密切,其公共卫生意义越来越受到人们的关注^[3]。

禽流感的临床症状和剖检变化因禽的年龄、种类和并发感染情况不同而异,与新城疫、传染性支气管炎等疾病很相似,因此仅仅根据临床症状及剖检变化很难确诊,必须依赖于实验室检测、诊断^[2,4]。诊断禽流感的方法主要有病原的分离与鉴定、血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)、免疫扩散试验(AGP)、间接酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光试验(IFT)、中和试验(VNT)等^[2,5,6]。但是,这些方法各有优缺点,病原的分离鉴定是国际上经典的方法,虽然敏感性高、特异性强,但操作繁琐、周期长,而 HA/HI、AGP、ELISA 等免疫学方法,虽然简便、易于操作,但检测的敏感性和准确性不如病原分离方法。

近年来,分子生物学已用于禽流感的检测、诊断。崔尚金等^[7]、刘泽文等^[8]建立了 RT-PCR 方法检测禽流感病毒,但敏感性不够,不能直接用于检测活禽、禽组织中禽流感病毒。Munch 等^[9]建立 PCR-ELISA、Spackman 等^[10]研制荧光 RT-PCR 检测禽流感病毒,大大提高了检测的敏感性。朱文斯等^[11]建立荧光 RT-PCR 检测禽流感病毒,对感染组织脏器的检测灵敏度与鸡胚病原分离法基本一致。

NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification)是在 PCR 基础上发展起来的一种新的扩增技术^[12]。1990 年 Guatelli 等首先报道了这一技术,现已用于 HIV^[13]、肝炎病毒^[14]、狂犬病病毒^[15]、口蹄疫病毒^[16]、单核细胞增多性李氏杆菌^[17]等病原体的检测。

本试验在 Collins 等^[18] NASBA 区分高致病性和低致病性禽流感病毒的基础上,通过优化反应体系,建立 NASBA 检测禽流感 H5 亚型技术,并用于人工感染禽流感鸡组织的检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

A/chicken/ HK/ 1000/ 97 (H5N1)、A/chicken/

HK/ 3014. 9/ 00 (H5N1)、A/chicken/ HK/ 2986. 1/ 00 (H5N1)、A/chicken/ HK/ 216. 3/ 01 (H6)、A/chicken/ HK/ 230. 2/ 01 (H9) 由香港基因晶片公司提供。A/ duck/ Shanghai/ ? / 00 (H9)、A/chicken/ Shanghai/ ? / 01 (H9)、新城疫病毒 F48E9 株、N79 株、鹅副粘病毒 SF02 株、鸽新城疫病毒 S 株、P9 株由上海检验检疫局库存^[19~22]。A1/ 沪防 78-29 (H1N1)、A3/ 沪防 78-49 (H3N2) 由复旦大学惠赠。鸭肝炎病毒、鸭瘟病毒由上海市农科院惠赠。新城疫病毒疫苗毒来自青岛动物检疫所。禽流感疫苗(H9)来自扬州大学农学院,传染性支气管炎 H52、H120 疫苗来自上海松江生物药厂。传染性法氏囊病疫苗来自 Intervet 公司。鸡新城疫中等毒力(I)系、低毒力(Lasota)疫苗来自中牧实业股份有限公司南京药械厂。

试验鸡和 SPF 鸡胚:SPF 鸡(43 日龄)、SPF 鸡胚购自南京药械厂。商品代鸡为上海大江公司的 35 日龄 AA 肉鸡,12 日龄时接种过禽流感 H9 疫苗,HI 试验检测 H5 亚型阴性。

裂解缓冲液(5mol/L 异硫氰酸胍,10g/L Triton X-100,10mmol/L Tris-HCl,pH 8.3)、冲洗缓冲液(5mol/L 异硫氰酸胍,10mmol/L Tris-HCl,pH 8.3)、洗脱缓冲液(10mmol/L Tris-HCl,pH 8.3)、500mg/mL 硅土(Silica)、仪器调试参照液(IRS)由香港基因晶片开发有限公司提供。单个酶球(6.5mg)含 1.3U/mL AMV-RT,0.5U/mL RNase H,1.3U/mL T7 RNA 聚合酶,100mmol/L Tris-HCl,pH 8.3,10g/L BSA),由 Biomerieux 公司提供。NucliSens 阅读器(BIOMERIEUX 公司产品)。

1.2 引物和探针的设计

使用 BioEdit 和 BLASTN 生物软件,通过对 Genebank 储存的 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因序列进行分析,根据设计引物的原则,筛选的最佳引物序列如下:

上游引物:AAATTCTAA TACGACTCACTA TAGGGAGAA GGCAIAAA GA (C/T) A GACCA GCTA(下划线表示 T7 DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子序列)、下游引物:GAT GCAAGGTCGCA TATGA GGA GA GAA GAA GAAAAA GA GGA C(黑体表示与 ECL 检测探针互补的序列)。

根据引物的序列,确定捕捉探针(CP)序列为: Biotin-GC(A/G)AGTTC(C/T)CTAGCACTGGCAAT,5 端标记生物素;电化学发光法属别检测探针(generic ECL detection probe)序列为:GATGCAAGGTCGCA TATGA GGTGA(C/T)AATGAA

TG(C/T)ATGGAA。由上海 BioAsia 公司合成。

1.3 反应体系的优化

对影响 NASBA 检测 H5 亚型禽流感病毒因素如离子浓度、反应温度进行试验,达到优化反应条件。

经优化后的 NASBA 操作按照 Shan S-H 等^[23]进行。

1.4 敏感性试验

对已知禽流感病毒 H5 的感染尿囊液,作 10 倍连续稀释,分成 2 份,一份做 NASBA,另一份接种 10 日龄鸡胚,每个稀释度接种 5 枚,37℃ 继续孵化,每天照胚两次,记录死亡情况。

1.5 特异性试验

采用 NASBA 检测人流感 H1、H3 亚型病毒、禽流感 H5、H6、H9 亚型病毒、不同宿主来源的新城疫病毒、鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒、禽流感疫苗(H9)、新城疫系苗、新城疫系苗、传染性法氏囊疫苗、IBV 疫苗(H₁₂₀, H₅₂)和 SPF 鸡尿囊液。

1.6 人工感染实验^[1]

人工感染 SPF 鸡:随机分组,每组 6 只,分开饲养。第 1 组为滴鼻组,每只接种 0.1 mL (ELD₅₀ 10^{-7.5}/mL) 禽流感 H5 病毒;第 2 组为饮水组,在水中注入禽流感 H5 病毒(约 1:1000 稀释);第 3 组为对照组,接种生理盐水。

人工感染商品代鸡:随机分成组,每组 5 只。饮水组,剂量同上;同居组,与接种组饲养在同一的隔理器中;对照组,接种生理盐水。在试验期间,每日记录临床症状,定时采集泄殖腔拭子和血样。死禽采集各组织脏器,立刻处理或于 -30℃ 冷冻保存。

1.8 人工感染鸡的检测

对人工感染 SPF 鸡、商品代鸡的血样、粪拭子、组织脏器进行病毒分离及 NASBA 检测;病毒分离按照 OIE 推荐的方法^[4]进行。

2 结果

2.1 NASBA 反应条件的优化

氯化钾浓度:氯化钾的浓度对 NASBA 体系中的酶促反应有一定的影响。通过 70mmol/L ~ 140mmol/L KCl 的比较,选择 100mmol/L KCl 作为使用浓度。

NASBA 扩增的反应温度:NASBA 扩增时,反应的温度对体系中酶促反应的效率有重要的影响。经比较 37 ~ 45℃ 之间的不同温度,从中选择最适合 NASBA 扩增的反应温度为 41℃。

2.2 特异性试验

对禽流感病毒 3 株 H5 亚型、1 株 H1、H3、H6

亚型、3 株 H9 亚型、5 株不同宿主来源的新城疫病毒、鸭肝炎病毒、鸭瘟病毒、SPF 鸡胚尿囊液及禽流感(H9)疫苗、新城疫疫苗、传染性法氏囊病疫苗、传染性支气管炎疫苗采用 NASBA 进行检测,结果 NASBA (H5 亚型试剂)仅检测到禽流感病毒 H5 亚型,未检测出其他亚型禽流感病毒、其他禽类病毒、SPF 鸡胚尿囊液,表明设计的引物是成功的,方法的特异性强。

2.3 敏感性试验

采用已知禽流感病毒 A/Chicken/HK/1000/97 (H5N1)的鸡胚尿囊液(ELD₅₀ 10^{-7.5}/ml),用传统的鸡胚接种法和 NASBA 同时检测经 10 倍连续稀释的鸡胚尿囊液,结果表明,血凝试验仅检测到 10 倍稀释的尿囊液,而 NASBA 和鸡胚接种二种方法的灵敏度相当,均可检测到 1 × 10⁶ 稀释的病毒(ELD₅₀ 10^{-1.5}/mL)。

2.4 人工感染试验的检测结果

2.4.1 粪拭子的检测:对人工感染后不同时间采集的粪拭子同时采用 NASBA 和鸡胚接种法检测,检测结果见表 1。在共检测 20 个样品中(鸡胚病原分离法为 18 个),无论是人工感染 SPF 鸡或是商品代鸡,还是饮水或滴鼻感染,NASBA 检测结果与病毒分离检测(virus isolation, VI)结果基本一致,两种方法的符合率为 95% (17/18)。NASBA 检出阳性样本 9 个,鸡胚分离到 7 个阳性样品,NASBA 比鸡胚接种法对粪拭子检出率高,与 NASBA 直接检测拭子(拭子直接放入裂解缓冲液),而鸡胚接种法检测上清液有关。

2.4.2 血液的检测:通过人工感染禽流感病毒,对不同时间死亡鸡的血液进行检测,结果见表 2。从表 2 可见,尽管感染途径不一,NASBA 检测结果与病毒分离检测结果基本一致,共检测了 15 个样品(鸡胚为 14 个),NASBA 检出阳性样本、鸡胚分离阳性样品虽然均为 4 个,但两种方法的符合率为 93% (13/14)。

2.4.3 组织脏器的检测:用 NASBA 和病原分离法对人工感染鸡的 16 种组织脏器、肌肉、血块和胸水同时进行检测,结果见表 3。从表可见,共检测了 66 个组织样品(鸡胚为 65 个),NASBA 检出阳性样本 37 个,鸡胚分离到 34 个阳性样品,两种方法的吻合率为 87.7% (57/65),表明 NASBA 对人工感染鸡组织脏器的检测率稍高于病毒分离。结果同时表明,病毒感染鸡体后,分布于许多组织器官中,这与禽流感病毒引起全身性、败血性疾病是一致的。

表 1 NASBA 检测人工感染鸡的粪拭子情况

Table 1 Detection of swabs from experimentally infected chickens using NASBA and VI

After infection	Inoculation via drinking water route		VINasal inoculation		Inoculation via drinking water route		Control	
	NASBA	VI	NASBA	VI	NASBA	VI	NASBA	VI
Prior to infection	-	-	-	-	-	-	-	-
1 day	+	-	+	+	+	+	-	-
2 days	+	+	+	+	+	+	-	-
3 days	+	ND		dead		dead	-	ND
4 days	+	+					-	-
5 days	+	+					-	-
6 days		dead					-	-
9 days							-	-

VI: virus isolation; ND: Not done.

表 2 NASBA 检测人工感染鸡血液排毒情况

Table 2 Detection of bloods from experimentally infected chickens using NASBA and VI

After infection	Inoculation via drinking water route		Nasal inoculation		Inoculation via drinking water route		Control	
	NASBA	VI	NASBA	VI	NASBA	VI	NASBA	VI
Prior to infection	-	-	-	-	-	-	-	-
1 day	-	-	-	-	-	+	ND	ND
2 days	-	-	+	+	+	+	-	-
3 days	+	ND		dead		dead	ND	ND
4 days	+	+					-	-
6 days		dead					-	-

VI: virus isolation; ND: Not done.

表 3 病毒在组织器官中的分布

Table 3 Detection of viscera from experimentally infected chickens using NASBA and VI

Tissue	Nasal inoculation		Inoculation via drinking water route		Cohabit infection		Control	
	NASABA	VI	NASABA	VI	NASABA	VI	NASABA	VI
Heart	+	+	+	+	+	+	-	-
Liver	+	+	+	+	+	+	-	-
Spleen	+	+	-	-	+	-	-	-
Lung	+	+	+	+	+	+	-	-
Kidney	+	+	+	+	-	+	-	-
Heart	+	-	+	+	+	+	-	-
Trachea	+	+	-	-	ND	ND	-	-
Proventriculus	+	+	+	+	+	+	-	-
Intestine	-	-	+	-	+	+	-	-
Pectora muscle	+	+	+	+	ND	ND	-	-
Leg muscle	+	+	+	+	+	+	-	-
Feather marrow	+	+	-	-	-	-	-	-
Thymus	+	+	-	+	ND	ND	-	-
Pancreas	ND	ND	-	-	+	ND	-	-
Esophagus	+	+	ND	ND	ND	ND	-	-
Bone marrow	+	+	ND	ND	ND	ND	-	-
Skin	+	-	+	-	ND	ND	-	-
Paw	+	+	ND	ND	ND	ND	-	-
Clot	+	+	-	+	-	-	-	-
Pectoral water	+	+						
Total	19	19	16	16	12	11	19	19

VI: virus isolation; ND: Not done.

3 讨论

NASBA 是一种快速、等温的 RNA 扩增技术, 整个反应有赖于 AMV 逆转录酶、T7 RNA 多聚酶

和核酸酶 H(RNase H) 共同协作而完成, 不需特殊仪器, 不需温度循环, 其扩增效率高于 PCR, 其反应产物是单链 RNA^[12]。在与捕捉探针(带磁珠的)和 ECL(电化学发光)寡核苷酸探针(钉标记的)杂交

后,形成复合物,携带该复合物的磁珠被电极捕获,钉标磁珠发出的光经 NucliSens 阅读器直接检测电化发光强度,从而提高了检测系统的特异性和敏感性。此外,ECL 阅读器自动化程度高,无需凝胶电泳,克服了传统 PCR 技术易污染的缺点^[12]。

通过优化反应条件,建立的 NASBA 技术可检测到病毒的最高极限为 $ELD_{50} 10^{-1.5} / mL$,与经典的病原分离法的敏感性相当。在对 20 个禽类病毒的检测中,NASBA 仅检测到禽流感病毒 H5 亚型,对其他禽流感病毒亚型不能检出,也不能检测常见其他禽类病毒,说明该方法是特异的。

对感染鸡泄殖腔拭子的检测结果显示(表 2),滴鼻组和饮水组鸡从感染后第一天直至死亡均可从粪拭子检测到病毒,表明病毒感染鸡后,鸡群经消化道一直在排毒,这与该病的特性是一致的,因而粪拭子是一个很好的核酸源样品,粪拭子可作为一项监测指标反映鸡群禽流感的感染情况。对感染鸡血液检测结果表明(表 3),NASBA 只能检测到临死的前 1~2d 的病毒血症,可能与样本存放时间太久(数月)有关,也可能与感染后动物急性死亡,血液中病毒滴度太低有关。试验结果表明,采集血液作为样品对鸡场进行禽流感监测,对濒死前鸡可能更有意义。

在人工感染动物中,NASBA 和病毒分离法共检测了 101 个样本,两种方法的符合率为 90%。Spackman 等^[10]采用荧光 RTP-CR 和病毒分离对来自禽鸟市场的 1,550 个气管和泄殖腔拭子样品进行禽流感检测,两者的符合率为 89%。不同禽流感检测方法之间的结果差异,与试验方法本身有关。与经典的病原分离方法相比,NASBA 技术更快、更容易操作,可用于禽流感快速诊断、市场禽肉产品的监测、出入境禽副产品的口岸检验检疫。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版,北京:科学出版社,1997.
- [2] 甘孟侯. 禽流感[M]. 第二版,北京:中国农业出版社,2002.
- [3] 王永康,周锦萍. 禽流感公共卫生上的意义和对国际贸易的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯,2001,4:15-16.
- [4] Highly pathogenic avian influenza (fowl plague). In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [M]. 2001:123-129.
- [5] 赵云玲,柴同杰,赵宏坤. 禽流感诊断方法概述[J]. 中国家禽,2001,23(3):5-6.
- [6] 于康震,付朝阳,崔尚金. 我国禽流感防制研究进展[J]. 中国兽医学报,2001,21(1):103-106.
- [7] 崔尚金,陈化兰,唐秀英,等. 禽流感 RT-PCR 诊断法的建立[J]. 中国畜禽传染病,1998,20(2):105-107.
- [8] 刘泽文,徐涤平,杨峻,等. 应用逆转录套式 PCR 检测禽流感病毒核酸研究[J]. 湖北农业科学,2003,4:90-91.
- [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.
- [10] Spackman E, Senne D A, Meyers T J, et al. Development of a real-time Reverse Transcriptase PCR Assay for type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes[J]. J Clin Microbiol, 2002,40(9):3256-3260.
- [11] 朱文斯,赖平安,黄茜华,等. 荧光 RT-PCR 快速检测禽流感病毒 H5 亚型的研究[J]. 中国医药导刊,2003,1:59-63.
- [12] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. Nature, 1991,350:91-92.
- [13] Romano J W, van Gemen B, Kievits T. NASBA: a novel, isothermal detection technology for qualitative and quantitative HIV- RNA measurements[J]. Clin Lab Med, 1996,16(1):89-103.
- [14] Damen M, Sillekens P, Cuypers T H M, et al. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay [J]. J Virol Methods, 1999,82(1):45-54.
- [15] Wacharapluesadee S, Krug R M. Nucleic acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies [J]. Lancet, 2001,15358(9285):892-893.
- [16] Collins R A, Ko L S, Fung KY, et al. A method to detect major serotypes of foot-mouth disease virus[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2002,297:267-274.
- [17] Uyttendaele M, Schukink R, Gemen B, et al. Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method[J]. Int J Food Microbiol, 1995,27(1):77-89.
- [18] Collins R A, Ko L S, So K-L, et al. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA [J]. J Virol Methods, 2002,103(2):213-225.
- [19] 王恒安,王士强,严亚贤. 鸭源禽流感病毒的分离与鉴定[J]. 江苏农业研究,1999,20(4):57-60.
- [20] 单松华,胡永强,何水林,等. 鹅源副粘病毒 SF02 株的生物学特性研究[J]. 上海农业学报,2004,20(2):109-113.
- [21] 单松华,邵朝纲,胡永强,等. 鸽基因 VII 型新城疫病毒的分离鉴定[J]. 病毒学报,2003,19(4):360-364.
- [22] 徐辛红,曹国华,单松华,等. 鸽新城疫病毒的分离鉴定[J]. 上海交通大学学报,2003,21(2):121-124.
- [23] Shan S H, Ko L S, Collins R A, et al. Comparison of different methods for avian influenza subtype H5N1 detection[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,302:377-383.