

H1N1 亚型猪流感诊断方法的研究新进展

蔡春梅¹, 翟少伦¹, 温肖会¹, 林美玲², 严颖², 周秀蓉¹, 袁洁^{1*}

(1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东广州

510640; 2. 中山大学第三附属医院, 广东广州 510630)

摘要 2009年, 甲型H1N1流感在全球多个地方猪和人群中暴发, 给人民群众的生命健康带来了巨大威胁, 给经济发展和社会稳定产生了严重影响。及时快速的诊断是有效控制疫情大规模暴发的最有效途径之一。近几年随着现代分子生物学技术发展, 猪流感诊断方法在快速、准确性方面有了很大提高。对H1N1猪流感概况及猪流感的诊断方法进行了综述。

关键词 甲型流感; H1N1; 猪流感; 诊断方法

中图分类号 S85 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)05-127-02

Research Advances on the Detection Methods of H1N1 Swine Influenza

CAI Chun-mei, ZHAI Shao-lun, WEN Xiao-hui, YUAN Jie* et al (Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract At the year of 2009, swine H1N1 influenza broke around the world, which not only brought out huge threatens for life health of human, but seriously affected the development of economic and the stability of the society. However, rapid detection was one of the most effective measures for the control of swine H1N1 influenza. Therefore, the aim of this paper was to review the detection methods of swine H1N1 influenza based on some published literatures.

Key words Influenza type A; H1N1; Swine influenza; Detection method

2009年3月, 发生在墨西哥的人感染猪流疫情很快在多个国家发生。起初WHO将其称为“人感染猪流感”, 然后又将其更名为“甲型H1N1流感”^[1], 由此引起人们对猪流病的高度关注。它是一种新型呼吸道疾病, 其病原是人流感病毒基因、禽流感病毒基因和猪流感病毒基因混合的重配株, 其造成的疫情来势凶猛, 危害极大, 引起世界各国的广泛关注。

据报道, 猪在“禽—猪—人”的种间传播链中, 充当禽、人、猪流感病毒重组和复制的“混合器”, 扮演着流感病毒中间宿主及多重宿主的作用, 猪流感在人和动物流感的病原学、生态学及流行病学中占有举足轻重的地位。此外, 流感病毒依靠抗原漂移与抗原重组机制不断发生变异^[1]。及时快速的诊断是有效控制疫情大规模暴发的最有效途径之一。因此, 猪流感(Swine influenza, SI)的诊断具有重要意义, 但是在临床上及时检测还有一定难度, 需要借助实验室的检测方法来进行诊断。猪流感的诊断方法研究经过多年发展, 已取得新进展。笔者结合一些新文献报道, 对H1N1亚型猪流感的诊断方法进行了综述。

1 猪流感概述

SI是由SIV引起的传染性疾病。甲型流行性感病毒自1918年西班牙流感严重疫情以来, 诊断与防控研究取得很好进展, 已经证实SI在人和动物流感的病原学、生态学及流行病学中占据重要地位。

1.1 猪流感(SI)是世界性分布的危害猪的传染性呼吸道病

SI是一种由正粘病毒科猪流感病毒(Swine Influenza Vi-

rus, SIV)感染可引起的呼吸道传染病。SIV可引起不同日龄、性别和品种猪发病, 能引起种猪繁殖障碍、育肥猪增重减慢, 也是猪产生免疫抑制的主要诱因。临床以突发、咳嗽、呼吸困难、发热、衰竭、迅速康复或死亡为特征, 呈世界性分布和地方性流行。

血凝素(HA)抗原和神经氨酸酶(NA)抗原, 是划分流感病毒亚型的依据。猪群中除了常见的经典型H1N1、类禽型H1N1和类人型H3N2流感病毒引起的SI外, 由重组病毒H1N2、H1N7、H3N6引起的SI也时有报道。目前, 造成世界性流行的血清型主要有H1N1、H1N2和H3N2。其中, 25%的全世界猪群曾受H1N1型感染, 比较普遍流行。在美国有30%的猪被H1N1感染过, 在美国中北部猪的感染比例达51%。1998年, 美国卡罗莱纳洲、明尼苏达洲、爱荷华洲和德克萨斯洲接种了H1N1SI疫苗的4个猪场暴发了严重的SI, 令人对防控好猪流感产生怀疑。

猪流感在我国不少省市都有猪流感流行, 主要亚型是H1N1和H3N2。2000~2003年, 从我国东北、西北、华中、华东、华南及西南地区20个省、市、自治区猪群中分离到116株不同亚型SIV, 其中45株为H3N2, 25株为H1N1, 2株为H1N2, 8株为H9N2, 2株为H5N1, 说明在我国猪群中流行多种亚型, 以H3N2、H1N1为主的流感发生流行风险大, 其诊断与防控压力很大。

1.2 猪流感与甲型H1N1流感密切相关 回顾人类流感史, 20世纪人流感的3次大流行都和SI密切相关, 而1976年1月美国新泽西州佛迪狄克斯5名新兵因感染猪源H1N1病毒, 1人死于肺炎的事件则是SI人畜共患病史上的里程碑。

人类感染甲型H1N1流感病毒后的早期症状与普通人流感相似, 但部分患者病情可迅速发展, 来势凶猛, 突然高热, 体温超过39℃, 可继发多脏器功能损伤, 甚至导致死亡。最新数据表明, 确诊病例的病死率为0.8%^[1]。肺部体征常不明显, 部分患者可闻及湿啰音或有肺部实变体征。

基金项目 广东省科技计划社会发展项目(2010B080701024); 广东省科技计划特定任务项目(2011B060700075); 广州市科技计划项目(2012224-26)。

作者简介 蔡春梅(1962-), 女, 广东揭西人, 畜牧师, 从事动物疫病防控研究。*通讯作者, 兽医师, 从事动物疫病诊断和检测。

收稿日期 2014-12-25

因此,鉴于猪流感的世界性分布,而且与甲型 H1N1 流感流行密切相关,流感病毒依靠抗原漂移与抗原重组机制不断发生变异,采取科学、及时、准确的诊断方法用于临床对控制疫情大规模暴发、流行具有重要意义。

2 流感诊断方法

2.1 传统方法 传统方法是指病毒分离方法和抗体检测方法等。采集人畜的呼吸道样品进行甲型 H1N1 流感的分离,也可动态检测双份血清病毒特异性抗体水平呈 4 倍或以上升高^[2]。病毒分离方法能分离到病毒,但分离病毒的时间较长,如鸡胚接种需要 2 周左右时间,此外,病毒分离后还要用其他方法辅助进行鉴定,不适合大量样品的快速检测。血清抗体检测方法亦不能在感染初期抗体未产生或者抗体滴度过低时进行检测,而且可能要进行 2 次采血,费时费力,同样也不适用于大规模样品的快速检测^[2]。

2.2 分子生物学方法

2.2.1 RT-PCR 方法。该方法是我国疾控中心于 2009 年公布的快速检测方法,涉及 4 对引物:甲流 M 基因通用引物 FluA、甲流 H1N1 亚型通用引物 H1HA 引物、人季节性流感病毒 H1N1 亚型通用引物 HuH1HA 引物、2009 年甲流 H1N1 亚型流感病毒引物 SWH1HA-1 引物。首先提取样品的病毒 RNA,应用 RT-PCR 的方法将样品中与引物互补的基因片段扩增后,用琼脂糖凝胶将扩增产物分离。该方法可对疑似病例的呼吸道样品进行检测,筛选甲型 H1N1 病毒并排除季节性 H1N1 流感病毒^[3]。

2.2.2 多重 RT-PCR 方法。莫秋华等^[4]建立了同时检测 A 型流感病毒、B 型流感病毒及新型甲型 H1N1 流感病毒的一步法多种 RT-PCR 方法,该方法针对 A 型流感病毒的 M 基因、B 型流感病毒的 NS 基因设计通用引物,针对新型甲型 H1N1 流感病毒的 HA 基因设计特异性引物。将 3 对引物加入同一个反应管中,采用一步法 RT-PCR 的方法扩增目的片段,用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物。该方法操作简单,成本低廉,特异性强,可对流感疑似病例在 4~5 h 内获得确诊。齐海涛等^[5]也建立了同时检测 H1N1 和 H3N2 病毒的 RT-PCR 方法。

2.2.3 实时荧光定量 PCR 方法。实时荧光定量 PCR 方法是在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量,与常规 PCR 相比具有灵敏度高、特异性强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等优势。

TaqMan 荧光探针 PCR 方法的工作原理为:PCR 扩增时在加入 1 对引物的同时,加入 1 个特异性的探针,该探针为 1 个寡核苷酸,两端分别标记 1 个报告荧光基团和 1 个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq DNA 聚合酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增 1 条 DNA 链就有 1 个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成同步。

通过下载暴发于墨西哥的高致病性猪流感病毒 H1N1 型基因组序列进行同源性分析,借助计算机辅助软件结合手动设计特异性引物探针;筛选出特异性引物探针,进行灵敏度、稳定性等试验研究;优化样本 RNA 提取方法、优化荧光 PCR 反应体系,建立试剂盒的质控品;按照《体外生物诊断试剂注册管理办法》的要求进行中试,并进行应用验证,具有操作简便、易行且可快速、准确的得到检测结果的优点,可以大规模地应用各类标本的检测和筛查,有利于猪流感病毒的早期诊断和排查。它具有成本低廉、操作简便的优点,在灵敏度和特异性上将优于其他方法。

目前,国内外已有多家实验室建立了该方法。总体而言,特异性及敏感性较好,可用于甲型 H1N1 病毒的检测^[6-10]。

2.2.4 多重实时荧光定量 PCR 方法。在单一的实时荧光定量 PCR 方法基础上,设计多对不同病毒的引物及探针,来实现多种病毒的集成检测。Choi 等设计了同时检测甲型 H1N1 病毒、季节性流行性病毒和 H5 亚型病毒的多重实时荧光定量 PCR 方法,检测结果可行^[11]。

2.2.5 RT-SmartAmp 法。为更好地达到 H1N1 流感的快速检测,近年来日本科研人员发明了 RT-SmartAmp 方法,此方法包括反转录和等温扩增 2 个步骤,且同时在一个管中进行,无需病毒 RNA 的提取及 PCR 反应。该方法的原理是使用激子控制的敏感杂交荧光标记引物来检测甲型流感 H1N1 病毒的 HA 基因,可在 40 min 内出现检测结果,与季节性 A (H1N1)、A 型 (H3N2)、B-型 (维多利亚) 病毒无交叉反应^[12]。

2.3 生物传感器法 近年来,加拿大科研人员也尝试开发一种便携式的低成本仪器—生物传感器法来检测 H1N1 流感病毒,研究表明生物芯片传感器能让非医务人员在 1 h 内检测出流感病毒,并且每次检测仅需 10 加元。使用目前的技术这样的检测需要花费好几百加元。通过一定的校准,研发的便携式设备还能够检测出某些病原体抗体,从而用于诊断一些传染性疾(如 SARS、HIV 及乙肝等)^[13]。

3 小结与讨论

猪流感的诊断方法研究经过多年发展已取得新进展,从传统的实验室诊断方法发展为基因诊断方法,具有简便、快速、高通量的优点,为流感的有效防控发挥重要作用。流感病毒依靠抗原漂移与抗原重组机制不断发生变异,常常给人类带来防控压力,给养殖业造成重创。2009 年发生的甲型 H1N1 流感以及 2013 年发生的新型 H7N9 禽流感就是很好的案例。2009 年以来,各国研究人员开展各种有效的甲型 H1N1 流感病毒的检测方法,也为 2013 年的新型 H7N9 禽流感的检测及防控奠定了一定的科学基础及技术支持。随着生物技术的高速发展,基因芯片技术、生物传感器方法有望进一步发展和成熟应用,必将更有利于猪流感的诊断与防控工作开展。

(下转第 207 页)

ml/g, 萃取时间 60 min 时, 萃取后获得的油脂量最高, 达到 4.74 g。说明该条件为最佳萃取条件。

表 2 正交试验结果

序号	A 温度	B 添加量	C 萃取时间	油脂量/g
1	1	1	2	2.91
2	2	2	1	2.78
3	3	3	3	1.43
4	1	2	3	1.06
5	2	3	2	4.74
6	3	1	1	1.78
7	1	3	1	2.53
8	2	1	3	2.64
9	3	2	2	2.71

表 3 主体间效应的检验

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	8.967 ^a	6	1.495	30.598	0.032
截距	56.651	1	56.651	1159.819	0.001
温度	3.523	2	1.762	36.066	0.027
时间	4.654	2	2.327	47.643	0.021
添加量	0.790	2	0.395	8.084	0.110
误差	0.098	2	0.049		
总计	65.716	9			
校正的总计	9.065	8			

注: $R^2 = 0.989$ (调整 $R^2 = 0.957$)。

由表 3 可以看出, 因素时间的均方、 F 值均比较高, 说明其对整个结果的影响最大。而添加量的均方和 F 值均比较低, 说明其对整个结果的影响最小。最终分析得出, 数据间显著性分析 $R^2 > 95\%$, 说明结果差异比较显著。通过对参数进行估计, 结果表明各参数均在 95% 置信区间内, 数据可靠。

(上接第 128 页)

参考文献

- [1] PEIRIS J S, POON L L, GUAN Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans [J]. J Clin Virol, 2009, 45 (3): 169-173.
- [2] 魏成军, 江新泉, 高佩安. 甲型 H1N1 流感病毒特征及快速检验方法 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40(4): 21-22.
- [3] 王大燕, 高荣保, 李晓丹, 等. 甲型 H1N1 流感病毒快速核酸检测技术的建立 [J]. 病毒学报, 2009, 25(S1): 1-3.
- [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] 齐海涛, 孔维立, 张桂红. 猪流感病毒 H1, H3, N1, N2 亚型分型 RT-PCR 方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(3): 187-191.
- [6] 王伟, 潘明, 常国辉, 等. 中国内地首例确诊甲型 H1N1 流感病例的实验室检测 [J]. 病毒学报, 2009, 25(S1): 4-7.
- [7] 秦智锋, 张彩虹, 孙洁, 等. 甲型 H1N1(2009) 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立与评价 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 48-53.

3 结论

研究结果表明, 试验的 3 因素中, 影响最大的温度因素以 60 °C 合适, 影响其次的时间因素以 60 min 为宜, 影响最小的萃取剂与干物质比值为 4 ml/g 最好, 其影响最小说明萃取剂用量还可以增加。

参考文献

- [1] 毕生雷, 张成明, 李十中, 等. 异养小球藻半连续发酵生产油脂工艺探讨 [J]. 食品与发酵科技, 2014(5): 36-40.
- [2] 郑世文, 赵玉峰, 毕生雷. 不同型号酵母浸粉及补糖对异养微藻生长的影响 [J]. 现代农业科技, 2014(8): 178-179.
- [3] 毕生雷, 乔建援, 刘钺, 等. 异养小球藻用发酵罐的使用与维护 [J]. 化学工程与装备, 2014(7): 64-65.
- [4] 景建克, 许倩倩, 刘硕, 等. 大规模异养发酵培养小球藻 USTB-01 研究 [J]. 现代化工, 2008, 28(12): 67-70.
- [5] ZHENG Y, CHI Z, LUCKER B, et al. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production [J]. Bioresource Technology, 2012, 103(1): 484-488.
- [6] CERON-GARCIA M C, MACIAS-SANCHEZ M D, SANCHEZ-MIRON A, et al. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source [J]. Applied Energy, 2013, 103: 341-349.
- [7] CHEN Y H, WALKER T H. Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids [J]. Bioresource Technology, 2012, 114(1): 512-517.
- [8] MUGE ISLETEN-HOSOGLU, IDIL GULTEPE, MURAT ELIBOL. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 61: 11-19.
- [9] 李兴武, 李元广, 钱峰慧, 等. 小球藻异养-光自养串联培养技术及其放大研究 [C]//全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集. 大连, 2006: 2-6.
- [10] 毕生雷, 杜风光, 孙沛勇, 等. 异养小球藻的半连续发酵方法: 中国: CN201310031846.7 [P]. 2013-04-24.
- [11] 钱文倩. 微生物对异养小球藻生长及代谢产物影响的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008: 2-10.
- [12] 梁世中, 朱明军, 孟海华, 等. 发酵罐葡萄糖流加大规模异养培养小球藻 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2000, 28(12): 66-70.

- [8] 尹航, 杨焕良, 陈艳, 等. 甲型 H1N1 流感病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 36-39.
- [9] YANG Z, MAO G, LIU Y, et al. Detection of the pandemic H1N1/2009 influenza A virus by a highly sensitive quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay [J]. Virol Sin, 2013, 28(1): 24-35.
- [10] ITO M, NUKUZUMA S, SUGIE M, et al. Detection of pandemic influenza A(H1N1)2009 virus RNA by real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Pediatr Int, 2012, 54(6): 959-962.
- [11] CHOI J H, KIM M S, LEE J Y, et al. Development and evaluation of multiplex real-time RT-PCR assays for seasonal, pandemic A/H1pdm09 and avian A/H5 influenza viruses detection [J]. J Microbiol, 2013, 51(2): 252-257.
- [12] KAWAI Y, KIMURA Y, LEZHAVA A, et al. One-step detection of the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus by the RT-SmartAmp assay and its clinical validation [J]. PLoS One, 2012, 7(1): 30236.
- [13] 科学家开发新型传感器 可快速检测 H1N1 病毒 [EB/OL]. (2010-04-06) http://ee.ofweek.com/2010-04/ART-8220-2806-27335400.html.