

# H7 亚型禽流感 RT-PCR

徐 珊 张婷婷 陈梓栋 敖艳华 邱筱妍 任 涛\* 辛朝安

中图分类号: S854.4 文献标识码: A

摘要: 参照 GenBank 中已发表的 H7 亚型禽流感病毒血凝素 (HA) 基因设计合成了一对预计扩增片段大小约为 310bp 的引物。利用这对引物, 通过对 RT-PCR 反应体系和反应条件的优化, 建立了针对 H7 亚型禽流感的 RT-PCR 检测方法。敏感性试验和特异性试验结果表明, 该方法敏感性高, 最低可检出 100pg 的 AIV-H7 的 mRNA, 且应用该引物对新城疫病毒 (NDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV) 及其他亚型的流感病毒 (H1、H3、H5、H9) 在相同反应条件下未扩增出任何片段, 具有较好的特异性。用所建立 RT-PCR 方法检测发病鸡组织病料及咽、肛拭子, 检测结果与鸡胚病毒分离结果相比, 阳性符合率高达 90.6%。

关键词: H7 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由正黏病毒科、流感病毒属的 A 型流感病毒引起的禽类的一种从呼吸系统感染到严重的全身性败血症等多种症状的综合征。AI 被国际兽医局定为 A 类传染病, 我国把高致病性禽流感列为一类传染病<sup>[1,2]</sup>。A 型禽流感病毒基因组由 8 个基因片段 PA、PB1、PB2、NS、NP、M、HA、NA 组成, 共编码 10 种蛋白。在病毒的表面结构蛋白中, HA 的变异幅度最大, 也是诱导体液免疫的最主要保护性抗原。根据血凝素 HA 和神经氨酸酶 (NA) 不同的抗原性, 目前已发现 AIV 有 15 种特异的 HA 和 9 种特异的 NA。迄今为止, 造成 AI 大暴发的 AIV 均为 H5 和 H7 亚型<sup>[3,4]</sup>。从 1959 年开始, H7 亚型的禽流感相继在欧洲和大洋洲暴发。进入本世纪, H7 亚型 AIV 疫情也不断有报道。虽然我国暂无 H7 亚型 AIV 的暴发, 但建立一套敏感、特异、快速的 H7 亚型 AIV 监测预防措施是非常必要的。鉴于目前检测 AIV 常用的鸡胚病毒分离法耗费的时间长, 且存在散毒的危险, 本文利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的敏感、特异、快速的优点<sup>[5]</sup>, 针对 H7 亚型 AIV 的 HA 基因设计并合成特异性高的引物建立了 H7 亚型 AIV 的 RT-PCR 检测方法, 并通过条件优化, 提高诊断的敏感性和特异性, 为 H7 亚型禽流感 RT-PCR 快速诊断试剂盒的研制打下坚实基础, 对我国 H7 亚型禽流感的诊断和预防控制将具有十分重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒 AIV-H7 亚型毒株 A/Duck/Guangdong/01/2003 (H7N3) 及其他亚型 (H1、H3、H5、H9) 的毒株、ND La Sota 株、IBV IBV-SC-93 株、ILTV 毒株、以

及 IBDV 毒株, 均由华南农业大学兽医学院禽病学教研室保存并提供。

1.1.2 非免疫鸡和鸡胚 1 日龄非免疫鸡, 购自广东省农科院畜牧研究所, 在本研究室动物舍养至 21 日龄; 9~11 日龄非免疫鸡胚, 购自佛山墟岗黄种鸡场。

1.1.3 主要试剂 TRIzol Reagent, 为 Invitrogen 公司产品; dNTPs (each 2.5mmol)、Reverse Transcriptase XL (AMV)、核糖核酸酶抑制剂 (PRI)、随机引物 random primer p (N)6、Ex Taq DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000, 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品, 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 参照 GenBank 中注册的基因组序列, 借助 DNASTAR5.07 和 Primer Premier5.0 软件, 设计针对 AIV-H7 的 HA 基因部分片段的引物 SN1 (5'-TCTTCDDTTCTATGCRGAGATGAA-3') 和 SN2 (5'-TRAARGTVACYGTGTCATTRG-3')。各引物设计完后送上海英骏生物有限公司合成, 用 DEPC 处理过的去离子水稀释为 20pmol/μL 备用。

1.2.2 总 RNA 的抽提 按 Trizol Reagent 抽提使用说明进行。加入 11.5 μL DEPC 水溶解 RNA, 即得到病毒总 RNA, 直接进行反转录或 -20 保存备用。

1.2.3 病毒基因组 cDNA 第一链的合成 (RT) 参照 AMV 反转录酶使用说明进行。反应体系为 20 μL 反转录体系: 5 × AMV Buffer 4 μL, dNTPs (each 2.5mmol) 2 μL, 随机引物 (10pmol/μL) 1 μL、PRI 0.5 μL、AMV 1 μL, 病毒 RNA 抽提液 11.5 μL。42 水浴 1h 后反应产物置于 -20 保存或直接 PCR 扩增。

1.2.4 PCR 扩增 在 50 μL 反应体系中加入以下组分: 10 × Ex Taq Buffer 5 μL, dNTPs 2 μL, 20pmol/μL, SN1 和 SN2 引物各 1.5 μL, cDNA 产物 2 μL, Ex Taq 聚合酶 0.5 μL, 用无菌去离子水加至总体积为 50 μL。混匀后置 PCR 仪上执行以下程序: 94 预变性 1min; 然后 94 变性 50min, 53 退火 40s, 72 延伸 40s, 运行 30 个循环后于 72 后作用 10min。反应结束后, 取 3 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL EB) 进行电泳检测。

1.2.5 敏感性试验 将 AIV-H7 尿囊液提取的 RNA 溶液在分光光度计上进行浓度测定后从 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-6</sup> 作 10 倍连续稀释, 再作为模板加入该 RT-PCR 反应体系中进行 RT-PCR 扩增, 以检测其敏感性。

通讯作者: 任涛, rentao@scau.edu.cn.

广州市科技项目 编号 200422-E0231

# 诊断方法的建立

(华南农业大学兽医学院 广州 510642)

文章编号: 1008-3847(2007)01-0002-04

1.2.6 特异性试验 将 A/Duck/Guangdong/01/2003 (H7N3)、NDV La Sota 毒株、IBV-SC-93 毒株、H1、H3、H5、H9 亚型的禽流感病毒尿囊液及阴性尿囊液提取的 RNA 反转录后分别加入到该 RT-PCR 反应体系进行扩增,以检测该方法的特异性。

1.2.7 重复性试验 用该方法重复 3 次各检测 8 份 H7 亚型 AIV 阳性样品和 2 份阴性样品,比较其重复性。

1.2.8 PCR 产物的测序鉴定 将 1.2.5 中得到的 PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上并转化感受态细胞 TOP10,经质粒 PCR 筛选可疑重组质粒送上海英骏生物有限公司进行序列测定。

1.2.9 人工发病临床样品检测 非免疫鸡组织脏器、咽和肛拭子的 RT-PCR 检测方法与鸡胚病毒分离法的比较:用滴度为 1 256 的 AIV-H7 尿囊液经肌肉注射接种 21d 的非免疫鸡,同时设立 NDV、IBV 等

对照组。攻毒后第 3d 起分别采集咽拭子、肛拭子及组织病料。经处理后分别进行 RT-PCR 检测及鸡胚病毒分离,比较两种方法检测结果的符合率。

对实验室分离并鉴定的多个亚型 AIV 毒株和其他研究生在进行 NDV、IBV、ILTV 生物学特性和疫苗等研究时采集的临床样品进行 AIV-H7 亚型特异性 RT-PCR 模拟临床检验,分析结果并比较与鸡胚病毒分离法的符合率。

2 结果与分析

## 2.1 PCR 方法的特异性

将从 A/Duck/Guangdong/01/2003 (H7N3)、NDV 毒株 La Sota、IBV 毒株 IBV-SC-93、H1、H3、H5、H9 亚型禽流感病毒尿囊液及阴性尿囊液提取的 RNA 反转录后进行扩增,只有毒株 A/Duck/Guangdong/01/2003 (H7N3) 可扩出特异性条带。扩增产物大小约为 300bp,与预计的理论扩增长度相符合。其他毒株均未为见扩增带(见图 1)。

2.2 敏感性试验结果 RT-PCR 结果表明,该引物能检测出的最低 AIV-H7 mRNA 量约为 100pg(见图 2)。

2.3 PCR 产物测序结果分析 将 PCR 产物测序结果提交 NCBI 进行 BLAST 分析表明为 H7 亚型 AIV 的 HA 基因部分序列。应用 DNASTART5.07 软件将

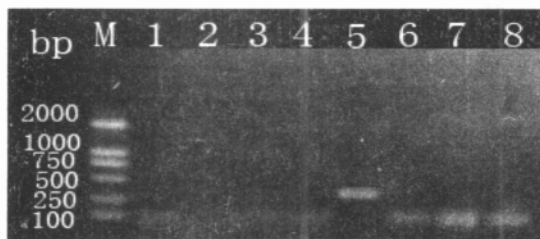


图 1 AIV-H7 亚型 RT-PCR 特异性试验结果  
M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性尿囊液; 2: AIV- H1 尿囊液; 3: AIV- H3 尿囊液; 4: AIV- H5 尿囊液; 5: AIV- H7 尿囊液; 6: AIV- H9 尿囊液; 7: IBV 尿囊液 8: NDV 尿囊液



图 2 AIV- H7 亚型 RT-PCR 敏感性试验结果  
M: DL2000 DNA Marker; 1: AIV- H7 阳性尿囊液; 2: 100ng; 3: 10ng; 4: 1ng; 5: 100pg; 6: 10pg; 7: 1pg

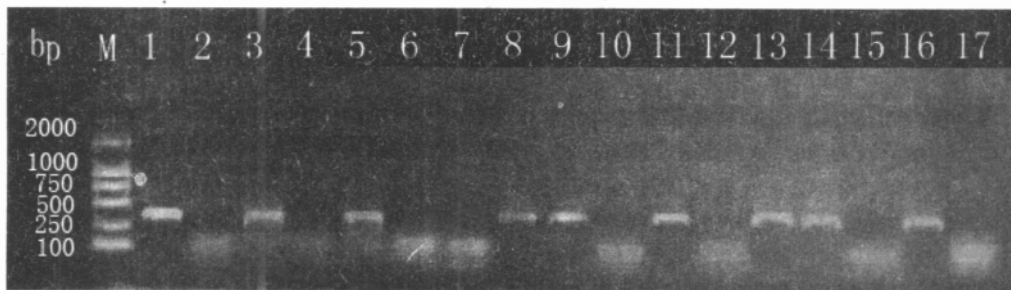


图 3 临床样品检测结果

M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性(约 310bp); 2: 阴性; 3-6: AIV- H7 咽拭子; 7-10: AIV- H7 肛拭子; 11-17: AIV- H7 组织病料

# 禽大肠杆菌病 多发原因及防治

霍清合 (山东省益生种畜禽有限公司 265508)

中图分类号: S858.3 文献标识码: B 文章编号: 1008-3847(2007)01-0004-02

近年来,家禽大肠杆菌病在国内大多数养殖场中广泛流行,发病率和死亡率居高不下,很多地方已呈暴发性流行的趋势,严重威胁着养禽业,造成了巨大的经济损失。

## 1 禽大肠杆菌病多发的原因分析

### 1.1 血清型众多,不同地区存在不同的优势血清群

禽大肠杆菌病的病原为大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*),其血清型极多,有文献报道,菌体抗原 O 171 种,荚膜抗原 K 103 种,鞭毛抗原 H 56 种,这些抗原可组合成大量抗原性不同的血清型。国外家禽大肠杆菌病主要是由 O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>35</sub>、O<sub>78</sub> 这 4 种血清型所致,很少分离到其他致病性血清型,而国内不同地区都有其独特的优势血清群,就是在同一地区不同养殖场血清型也相差较大,甚至在同一鸡场同一鸡群可以存在多个血清型。不同血清型之

间的抗原交叉保护力较弱,不可能制备出一种覆盖所有血清型的超广谱疫苗。

目前我国家禽大肠杆菌耐药性严重而复杂,几乎所有的抗菌药物都已经产生耐药性。中国兽药药品监察所对其收藏于 20 世纪 50 年代到 90 年代的大肠杆菌进行药敏试验发现,50 年代分离的菌株基本上不存在耐药性问题,60 年代耐药谱也较窄,在 15 种目前常用的抗生素中仅对链霉素和四环素产生耐药性,而且耐药性仅为 20%。从 70 年代起大肠杆菌的耐药性迅速增长,并出现多重耐药的菌株,80、90 年代分离菌株多为多耐药菌株,90 年代分离菌株有 87% 可同时耐 5 种以上的抗生素。

在我国目前的家禽养殖环境、养殖方式和技术水平上,家禽大肠杆菌耐药性产生的速度极快。在山

东地区对盐酸环丙沙星进行连续 3 年的耐药性调查发现,1996 年盐酸环丙沙星治疗大肠杆菌的有效率为 100%,1997 年为 63.7%,而 1998 年降低到 33.3%。药物使用周期的缩短必然使药物成本增加,并间接转移到养殖用户,使大肠杆菌病的防治费用增加,养殖效益下降。因此,不通过药敏试验很难选择出一种合适的治疗药物。

### 1.2 家禽的解剖结构特点

大肠杆菌为人和动物的肠道菌,在人和家畜中,大肠杆菌的感染途径主要通过肠道。研究发现,家禽大肠杆菌感染的主要途径是呼吸道。鸡的呼吸系统解剖结构较特殊,除肺外还具有气囊。气囊共 9 个,与肺相通,气囊又广泛分布在鸡的胸腔和腹腔中,家禽的胸腔和腹腔没有横膈膜相隔而相互连通。因此,鸡呼吸系统的这种结构成了大肠杆菌感染的极便利的通路,大肠杆菌一旦突破呼吸道的黏膜屏障,会迅速通过气囊进入胸腔和腹腔,感染内部脏器,常在临床上表现为心包炎和肝周炎。

### 1.3 环境因素和传播途径

大肠杆菌广泛地存在于自然界中,在人类公共卫生中是重点防御的一类病原,而在畜牧业生产环境中的大肠杆菌却往往被忽视。鸡舍内及其周围环境中的大肠杆菌极易污染饲料、饮水和器具,带菌鸡通过呼吸道和粪便排菌形成鸡舍内大肠杆菌强大的污染源。目前一般按

测得的序列同序列号为 AY559235 的 A/chicken/British Columbia/CN6/04(H7N3)等 10 个代表毒株进行同源性比较,结果发现同源性都在 93% 以上,证明 PCR 扩增片段属 H7 亚型 AIV 的特异性片段。

### 2.4 临床样品检测结果

对采集的咽拭子、肛拭子及组织病料的 RT-PCR 检测和鸡胚病毒分离结果比较,阳性符合率高达 90.6%,并且对组织病料的检出率最高,最佳检测时间为攻毒后 5-8d。电泳结果见图 3。多个亚型 AIV 毒株和 NDV、IBV、ILTV 等毒株临床样品进行该 RT-PCR 方法模拟临床检测,结果表明该 RT-PCR 检测方法的特异性为 100%,与鸡胚病毒分离法的符合率高达 90.6%。

## 3 讨论

目前,传统的 AIV 检测方法主要有病毒分离和

血清学诊断,但其不足之处在于操作繁琐、诊断时间长、结果重复性不好等,而且用鸡胚分离培养的方法分离鉴定流感病毒存在着散毒的生物安全风险。PCR 技术具有其特异性强、灵敏度高、快速简便及重复性好的优点。本文是根据 GenBank 中注册的 AIV HA 基因序列,设计合成一对针对 AIV-H7 亚型的特异性引物,并优化 RT-PCR 的反应条件和反应程序,建立敏感、特异、快速的 AIV-H7 亚型 RT-PCR 检测方法。

该 RT-PCR 的特异性试验和敏感性试验结果显示: AIV-H7 亚型在大约 300bp 的位置上出现特异的扩增带,而 NDV、IBV 和其他亚型流感和阴性尿囊液则无扩增带出现,目的片段经测序表明其序列为特异的 H7 亚型 AIV HA 基因部分序列,说明本试验所建立的 RT-PCR 方法具有特异性高的优点; 该 AIV-

照致病力将大肠杆菌划分为致病性大肠杆菌(高度致病性、中度致病性、低致病性)、非致病性大肠杆菌和条件性致病大肠杆菌三种类型。强致病性的菌株可直接通过消化道和呼吸道侵入机体,借助菌毛的吸附完成定殖,随后不断增殖随血液侵入机体组织,导致机体发病。条件性致病大肠杆菌为家禽肠道和上呼吸道的常在菌,在正常情况下家禽的防御系统(主要是机体黏膜屏障系统和免疫系统以及体内有益菌群的抑制)足以能够抵御这些常在菌的自然感染,但是一旦家禽的防御系统受到破坏,常在致病性大肠杆菌就会乘机侵入机体内,引起家禽发病。

1.4 继发感染 有调查显示,继发性感染是家禽暴发大肠杆菌的主要原因,占大肠杆菌病的56%。促使家禽对大肠杆菌敏感的因素很多,包括病毒、细菌和寄生虫感染,以及环境、营养导致的免疫防御系统结构和功能受损等。就目前国内的具体情况而言,引起家禽对大肠杆菌最敏感最常见的因素主要是病毒性感染,尤其是新城疫、禽流感、传染性支气管炎和传染性喉气管炎。病毒中的一些强毒株可迅速引起鸡只死亡,往往来不及引起大肠杆菌感染,而那些非高致病力毒株,因临床症状不明显而不易被发现,但其会破坏呼吸道和消化道黏膜屏障系统的完整性,从而为大肠杆菌病的入侵开辟了门户。另

外,一些免疫抑制性疾病如传染性囊病可使家禽的免疫系统出现损伤,生成抗体的能力下降,因而对大肠杆菌的抵抗力也下降。目前人们为了增强疫苗的免疫效果,选用的毒株越来越强,病毒在机体呼吸道和消化道黏膜中复制时也必将损伤细胞,虽然这种损伤较轻微,也增加了大肠杆菌病的感染机会,这是目前许多鸡场在接种疫苗后易暴发大肠杆菌病的一个重要原因。

1.5 垂直感染 研究发现,正常母鸡所产蛋的0.5%~6%含有大肠杆菌,人工感染的母鸡所产的蛋中含大肠杆菌高达26%。鸡蛋被粪便污染被认为是重要的感染来源,其他来源可能是卵巢炎和输卵管炎。致病性大肠杆菌在新孵出的雏鸡消化道中出现率比孵出这些雏鸡的鸡蛋要高得多,说明致病性大肠杆菌在孵化以后迅速传播,导致雏鸡大量死亡以及出现带菌的弱雏,从而在饲养的第一天起大肠杆菌便潜伏在鸡群中,给控制带来极大的困难。

1.6 免疫抑制性疾病影响 我国家禽免疫抑制性病毒疾病感染非常普遍,免疫抑制性疾病会造成家禽机体整个防御系统(体液免疫、细胞免疫、非特异性免疫、局部免疫)受损,从而导致家禽无法抵御大肠杆菌的入侵。

## 2 鸡大肠杆菌病的防治策略

### 2.1 加强卫生消毒工作 种蛋、

孵化厅及鸡舍内外环境要搞好清洁卫生,及时清扫鸡舍内的粪便,保持良好的通风,可大大降低大肠杆菌病的发生。定期对鸡舍及其周围环境进行消毒是防治大肠杆菌病的有效措施,可用一些醛类、双链季铵盐、碘类等刺激性较轻的消毒剂。

2.2 加强科学饲养管理及舍内环境控制 提高饲养水平以减少应激,注意保持鸡舍内温度、湿度和适宜的通风。在应激前后,在饮水中加入抗应激药物可缓解应激症状。

2.3 加强病毒性疾病的预防及提高家禽免疫力和抗病力 减少继发感染,加强免疫工作,防治病毒性疾病发生而继发大肠杆菌病。在免疫接种时应选用正规生物公司生产的疫苗以减轻疫苗反应。进行定期预防性投药。

2.4 选择适宜药物 大肠杆菌主要经呼吸道感染,而且耐药菌株广泛存在,所以针对性地选择一种吸收好、无耐药性的抗菌药是确保治疗效果的关键。目前较为简单和有效的药物筛选程序如下:从病鸡的病变组织中分离致病大肠杆菌,进行增殖培养;选择多种吸收率高的抗菌药制备药敏片,利用分离的大肠杆菌进行药敏试验选出敏感的一种或多种药物;进行小群投药试验,确定最佳治疗药物和方案;选择合适的用药途径大群投药。

责任编辑:李斐

H7 特异性引物能检测出的最低 mRNA 量约为 100pg,灵敏度较高。

本文所建立的 AIV-H7 RT-PCR 方法可对活禽、禽产品等进行直接检测,比起鸡胚病毒分离培养,大大缩短了诊断的时间,也可避免消毒的危险,对我国建立快速的进出口检验检疫、禽流感的临床早期诊断、流行病学调查及发病机理研究等具有十分重要的意义。

### 参考文献

- [1] 辛朝安. 禽病学(第三版). 北京: 中国农业大学出版社, 2003, 47-51.
- [2] 许峰. 全球高致病性禽流感的发病历史及流行特点. 上海畜牧兽医通讯, 2004, 6: 38.
- [3] 陈化兰, 于康震. 禽流感病毒 A/Afri. Star/Eng- Q/

983/79/(H7N1)血凝素基因的全序列分析. 中国畜牧兽医学报, 1998, 20(5): 258-259.

- [4] M. Tollis, L. D. Trani. Recent Developments in Avian Influenza Research: Epidemiology and Immunophylaxis. The Veterinary Journal, 2002, 164(30): 202-215.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1985, 622-630.
- [6] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 郑晓飞. RNA 实验技术手册. 北京: 科学出版社, 2004, 21-23.
- [8] 费东亮, 杜绍范. 禽流感检测方法研究进展. 现代畜牧兽医, 2005, 8.

责任编辑:任涛