

禽流感病毒三种检测方法的比较研究

Comparison of Three Methods for the Detection of Avian Influenza Virus

李莉萍 / LI Li-ping, 韦平 / WEI Ping, 韦天超 / WEI Tian-chao, 滕丽琼 / TENG Li-qiong, 韦信贤 / WEI Xin-xian, 李康然 / LI Kang-ran

广西大学养禽与禽病研究所, 南宁 530005

Institute for Poultry Science & Health, Guangxi University, Nanning 530005, China

[摘要] 对分别应用病毒分离鉴定、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、间接免疫荧光(IFA)3种方法对病料组织中的禽流感病毒(AIV)进行检测与比较研究。结果显示: 经鸡胚尿囊腔接种分离到的病毒, 通过用禽流感病毒H5、H9亚型单克隆抗体所进行的血凝(HA)和血凝抑制试验(HI), 鉴定为AIV H5亚型毒株; 应用RT-PCR技术直接对病料组织抽提的RNA样品进行检测, 从病料组织能扩增出大小为229bp的AIV通用目的片段和大小为380bp的H5亚型特异性片段; 取病料组织的过滤液接种狗肾上皮细胞(MDCK)单层, 24h后用H5亚型AIV特异性的单克隆抗体进行间接免疫荧光试验, 结果在细胞核、细胞质内观察到特异性的荧光。研究的结果表明, 3种技术都可对病料样品中的AIV进行检测, 而RT-PCR和IFA两种方法还可直接对病料样品中的病毒进行亚型的鉴定。相对而言, 后两者具有更快速、更敏感、操作更简便的特点。

[关键词] 禽流感; 病毒分离鉴定; 反转录酶-聚合酶链式反应; 间接免疫荧光技术; 亚型鉴定

[中图分类号] S831.7, S855.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)03-0018-03

Abstract: Three methods including the classical virus isolation and identification, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and indirect fluorescence assay (IFA) were used to detect avian influenza virus (AIV) in the sample and were compared. A virus was isolated by egg allantoic cavity inoculation and identified as H5 subtype of AIV with a monoclonal antibody (McAb) against H5 subtype via the hemoagglutination (HA) and hemoagglutination inhibit (HI) test. RT-PCR was performed to detect the sample directly and a 229bp-band of AIV specific and a 380bp-band of H5 subtype specific were both amplified with the designed primers. The tissue suspension was infected onto the monolayer of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and a H5-McAb was applied to run the IFA on the monolayer cells at 24 hours post-infection. The fluorescence in both nucleolus and cytoplasm were observed. The results of the study demonstrated that these three methods could be applied to detect the AIV in the sample, while RT-PCR and IFA could identify the subtype of AIV at the same time, and have the advantages over the classical method in the aspects of sensitivity, rapidity and simplicity.

Key Words: avian influenza; virus isolation and identification; RT-PCR; IFA; subtype identification

CLC Numbers: S831.7, S855.3

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)03-0018-03

禽流感(Avian Influenza, AI)是由A型流感病毒引起的一种禽类(家禽和野禽)的感染和疾病综合征^[1]。禽类感染后AI可表现为无症状带毒(隐性感染)、亚临床症状、轻度呼吸系统疾病、产蛋量下降或急性全身致死性疾病。由高致病性禽流感病毒(主要为H5、H7亚型毒株)引起的高致病性禽流感常给家禽养殖业带来巨大的经济损失^[2]。因此,在实际生产中迫切需要快速的诊断技术对临床疑似病料进行检测并分型,以控制禽流感的危害。目前诊断禽流感的方法主要有病毒分离、

中和试验、酶联免疫吸附试验、免疫荧光试验、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、荧光RT-PCR等多种方法。其中比较常用的有经典的病毒分离、RT-PCR、荧光RT-PCR,而免疫荧光方法检测禽流感的报道比较少见。本研究分别应用病毒分离、RT-PCR、免疫荧光3种方法对禽流感病毒(AIV)进行检测并比较,为实际的应用提供参考。

11 材料

1.1 病料

疑似AI的病鸡。

1.2 试验鸡胚

购自广西壮族自治区畜牧所未免疫禽流感疫苗鸡群所产蛋孵化的10天龄健康胚胎。

1.3 单克隆抗体

禽流感病毒H5和H9亚型的单克隆抗体、新城疫病毒的单克隆抗体,由扬州大学惠赠。

1.4 引物设计及合成

参考中华人民共和国农业行业标准禽流感病毒RT-PCR试验方法^[3],主

收稿日期: 2006-01-13

作者简介: 李莉萍, 女, 南宁市西乡塘东路10号广西大学, 研究生, 主要研究方向为禽病病原的分子生物学; E-mail: pinglili2000@163.com
韦平(通讯作者), 男, 南宁市西乡塘东路10号广西大学, 教授, 主要研究方向为禽病与病原分子生物学;
E-mail: pingwei8@eyou.com

要针对 MP 基因设计 A 型禽流感通用引物 MP1、MP2, 以及针对 HA 基因设计禽流感 H5 亚型引物 H5A1、H5A2, 引物均由上海 Sangon 生物工程有限公司合成。

引物序列及扩增的目的片段大小如下:

MP1: 5'-TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'; MP2: 5'-AAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3', 预计扩增目的片段大小为 229bp; H5N1: 5'-AGTGAATTGGAATATGGTAACTG-3', H5N2: 5'-AACTGAGTGTTCATTTTGTCAAT-3', 预计扩增目的片段大小为 380 bp。

1.5 试剂

UNIQ-10 TRIZOL 总 RNA 抽提试剂盒、TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μ l)、M-MuLV 逆转录酶 (200 U/ μ l)、RNasin (5 U/ μ l)、dNTPs (25 mM/ μ l)、5 $\times$ PCR Buffer, 10 $\times$ PCR Buffer, MgCl₂ (25 mM/ μ l), 均购自上海 Sangon 生物工程有限公司; 随机引物 (25 pmol/ μ l) 购自大连 Takara 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体为 Merck 公司产品; DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品; 丙酮、甘油等试剂均为从商业公司购买的分析纯产品。

1.6 细胞系

狗肾上皮细胞(MDCK), 由扬州大学惠赠。

2 方法

2.1 病毒分离鉴定

2.1.1 病料处理

取病禽的胰腺、肝脏、脾脏等有病变的器官组织, 剪碎、研磨成匀浆, 用生理盐水制成 1:5 悬液, 反复冻融 3 次, 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液分成 2 份, 一份经 0.45 μ m 滤膜过滤后分别留作鸡胚及细胞培养接种, 另一份留作 RT-PCR 的检测。

2.1.2 尿囊腔接种

取上述滤液经尿囊腔接种 10 天龄鸡胚, 0.2 ml/枚, 后于 37℃ 下继续孵化, 弃 24 h 内的死胚, 24 h 后死亡的鸡胚置于 4℃ 冻存。鸡胚冻存 24 h 后收集尿囊液, 观察胚体病变。

2.1.3 死亡鸡胚尿囊液的细菌检查

收集死亡鸡胚的尿囊液, 划线接种鲜血平板, 置 37℃ 培养箱进行细菌培养。

2.1.4 血凝试验 (HA) 和血凝抑制试验 (HI)

收集接种病料后死亡鸡胚的尿囊液, 按常规方法用鸡红血球 (1%) 进行 HA 试验; 结果为阳性者, 应用 AIV 和 NDV 的单克隆抗体进行 HI 试验。

2.2 RT-PCR 方法

2.2.1 样品 RNA 的提取

取 2.1.1 制备的病料组织上清液用 UNIQ-10 TRIZOL 总 RNA 抽提试剂盒进行 RNA 抽提, 按照试剂盒的使用说明进行。

2.2.2 cDNA 合成

取抽提的 RNA 样品 15 μ l, 加入 5 $\times$ buffer 5 μ l, M-MLV 1 μ l, RNasin 1 μ l, dNTPs 2 μ l, 随机引物 1 μ l, 在反应管中混匀后, 先后置 25℃ 5 min, 42℃ 1 h 和 95℃ 灭活反转录酶 5 min, 即得 cDNA, 于 -20℃ 保存备用或立即用于 PCR 扩增。

2.2.3 AIV 通用片段扩增

25 μ l 反应体系中分别加入: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 1.5 μ l, dNTPs 0.5 μ l, TaqDNA 聚合酶 0.3 μ l (1.5U), MP

1 和 MP 2 引物 (25pmol/ μ l) 各 0.5 μ l, cDNA 2.0 μ l, 加灭菌双蒸水至 25 μ l。扩增反应的循环参数为: 95℃ 6 min, 94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 重复以上 94℃、52℃ 和 72℃ 三个步骤 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 6 min 后终止反应。

2.2.4 AIV H5 亚型特异性片段的扩增

25 μ l 反应体系中分别加入: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 1.5 μ l, dNTPs 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ l, H5N1 和 H5N2 引物 (25pmol/ μ l) 各 0.5 μ l, cDNA 2.0 μ l, 加灭菌双蒸水至 25 μ l。扩增反应的循环参数与通用片段扩增反应的一致。

2.2.5 结果判定

取 2 次 PCR 产物各 6 μ l, 分别与 2 μ l 6 $\times$ Loading Dye Solution 混合, 加入含溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶, 以 75V 电压进行电泳 45 min, 在凝胶成像系统下观察结果并拍照记录。

2.3 间接免疫荧光技术

2.3.1 MDCK 细胞飞片的制备

将胰酶消化分散的 MDCK 细胞悬液, 调至适当浓度后分装到铺有飞片的 9 mm 培养皿中, 于 CO₂ 培养箱中静置培养。培养 18 h 待细胞长至 80% 的表面后备用。

2.3.2 接种病毒

先用 PBS 轻洗培养皿及其中的飞片 2 次, 吸除洗液后以 0.4 ml 病料过滤液/皿的量接种至飞片上, 置于培养箱作用 1 h 后, 吸弃病毒液, 加入细胞维持液, 继续在 CO₂ 培养箱中培养; 阴性对照以加 PBS (0.4 ml/皿) 代替病料过滤液作同样处理。

2.3.3 固定细胞

24 h 后将细胞培养皿的细胞维持液吸除, 用 PBS 轻洗培养皿中的飞片 3 次, 每次 5 min。用冷丙酮-乙醇溶液固定 15 min, 再用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 晾干后, 置于 4℃ 备用。

2.3.4 间接免疫荧光染色

1) 一抗作用: 在准备好的细胞飞片上滴加入 0.1 ml 禽流感病毒 H5 亚型单克隆抗体, 37℃ 湿盒孵育 60 min。

2) 冲洗: 用吸管吸去单克隆抗体, 用 PBS 轻轻冲洗 3 次, 每次 5 min。

3) 二抗作用: 在飞片上滴加 0.1 ml 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (二抗), 37℃ 湿盒孵育 60 min。

4) 冲洗: 用吸管吸去二抗, 用 PBS 轻轻冲洗 3 次, 每次 5 min。

5) 晾干: 将飞片斜放, 让其自然晾干。

3 结果

3.1 病毒分离的结果

3.1.1 接种鸡胚的死亡及病变

接种的鸡胚在接种后 42 h 死亡, 胚体呈全身出血, 四肢和头部出血特别严重。

3.1.2 细菌检查结果

死亡胚体的尿囊液划线接种的鲜血平板培养 24 h, 无细菌生长。

3.1.3 HA、HI 试验的结果

首先对死亡鸡胚的尿囊液进行 HA 试验, HA 效价为 $10 \times \log 2$; 然后采用 AIV 和 NDV 的单克隆抗体分别进行 HI 试验, 结果该凝集被禽流感病毒 H5 亚型的单克隆抗体所抑制, HI 效价为 $9 \times \log 2$, 而不能被 H9 亚型的单克隆抗体和 NDV 的单克隆抗体所抑制。证明病料样品中存在有 H5 亚型的 AIV。

3.2 RT-PCR 检测的结果

病料样品能扩增出大小约为 229bp 的 A 型流感通用目的片段 (图 1) 和 380bp 的 H5 亚型特异性片段 (图 2)。证明样品中存在 H5 亚型的 AIV 或其核酸。

3.3 间接免疫荧光结果

接种了病料过滤液的 MDCK 细胞在细胞核、细胞质内可见黄绿色的特异性荧光, 而未接种病料过滤液的 MDCK 细胞则未看见有特异性的荧光 (图 3~图 5)。证明细胞被 H5 亚型的 AIV 所感染。

4 小结与讨论

1) 病毒分离鉴定是诊断禽流感的一种经典的方法, 结果确实、可靠, 在实际生产中常用到该方法。但由于它花费的时间比较长, 从采集病料、鸡胚接种至成功分离到禽流感病毒至少需要 4 d 时间, 而且操作步骤烦琐^[5], 因此不适合用于疾病的快速诊断。

2) 研究应用建立的 RT-PCR 技术对疑似禽流感的病料进行检测, 分别能够扩增出大小约为 229 bp 的禽流感通用目的片段和 380 bp 的 H5 亚型特异性片段, 其结果与患病鸡的流行病学、临床症状和病理变化等一致。整个过程, 从 RNA 的抽提、RT-PCR 到最终获得结果只需 5h。RT-PCR 是一项快速、特异的诊断技术, 可以从临床病料组织中直接检测到 AIV, 现在不少的实验室都已经应用该技术进行诊断, 取得了很好的效果。但由于 RT-PCR 方法非常敏感, 因此检测结果须结合流行病学、临床症状和病理变化等多方面情况进行综合分析, 方可做最后诊断。

3) 研究应用临床上疑似病料的过滤液接种长满单层的 MDCK 细胞, 用 H5 单抗进行的间接免疫荧光方法进行诊断, 结果发现在细胞核、细胞质内均有荧光出现, 证明间接免疫荧光方法检测禽流感具有简单、特异、准确的优点。由于间接免疫荧光使用的单克隆抗体是针对相对应的亚型, 因此该方法具有比较高

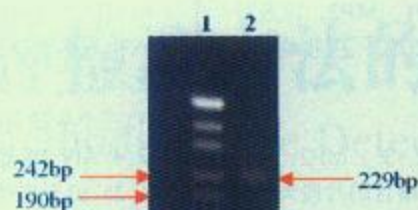


图 1 AIV 通用引物 RT-PCR 扩增的结果
Fig. 1 The result of RT-PCR with AIV primers

1. pUC19DNA /Msp1(Hpa2) Marker; 2. Sample

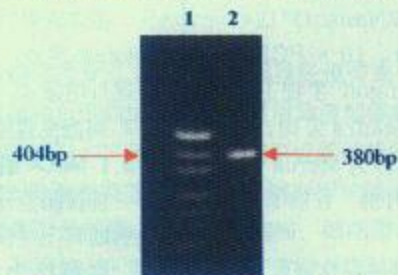


图 2 AIV H5 引物 RT-PCR 扩增结果
Fig. 2 The result of RT-PCR with AIV -H5 specific primers

1. pUC19DNA /Msp1(Hpa2) Marker; 2. Sample



图 3 阴性对照 IFA 的检测结果
Fig. 3 IFA on the un-infective cells (10 × 20)

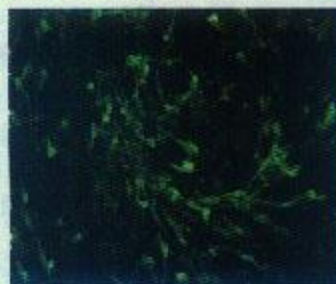


图 4 病料接种细胞 IFA 检测的结果
Fig. 4 IFA on the infected cells (10 × 20)

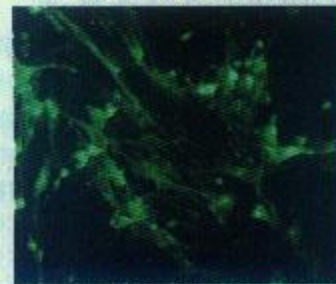


图 5 病料接种细胞 IFA 检测的结果
Fig. 5 IFA on the infected cells (10 × 40)

的特异性。扬州大学^[6]研制出禽流感病毒 H5 和 H9 亚型的单克隆抗体并建立了检测禽流感病毒的间接免疫荧光技术。该技术敏感性好, 24 h 内检测出病毒的最小感染量为 10 个 TCID₅₀/孔, 感染 14 h 后, 可以检测到相应的 H5 亚型禽流感病毒。但要注意排除非特异性的荧光染色。

4) 通过以上 3 种方法的比较, 在检测时间方面, RT-PCR 技术所需的时间最短, 可以达到快速诊断 AI 的目的, 为疾病的快速控制提供更好的服务; 在敏感性方面, RT-PCR 技术和 IFA 技术的检测是敏感的; 在准确度方面, RT-PCR 技术不如 IFA 和病毒分离; 成本方面, IFA 成本比较高, 病毒分离、RT-PCR 相对较低; 在病毒亚型鉴定方面, RT-PCR 和 IFA 在检测的同时都可对病毒的亚型进行鉴定, 从而能够采取相应的措施; 此外, IFA 还可确定病毒在感染细胞核还是细胞质, 具有其特定的优势。

综上所述, RT-PCR 和 IFA 都具有很好的应用前景。它们与病毒分离的结果相符合, 能够满足实际生产中准确、灵敏诊断禽流感的要求, 而且还具有更快速、更敏感、操作更简便的特点。

(致谢: 本研究得到广西玉市科技攻关项目 (0467008)、广西大学科学基金项目 (X051011) 的资助, 在此谨表示衷心的感谢。)

参考文献 (References)

- [1] 甘孟侯 主编. 禽流感[M](第二版). 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [2] 李莉萍, 韦平, 韦天超, 等. 禽流感病毒的分子生物学特性及其检测技术的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24 (4): 347-351.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准——禽流感[S]病毒 RT-PCR 试验方法. 2004-02-17.
- [4] 龙进学, 郝贵杰, 唐应华, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体的制备及其应用[J]. 中国兽医科技, 2005, 35 (6): 450-454.
- [5] 赵云玲, 李振华, 柴同杰, 等. 禽流感诊断方法研究概况[J]. 养禽与禽病防治, 2001, 10: 10-11.
- [6] 秦爱建, 邵红霞, 钱瑞, 等. 抗禽流感病毒 H5 和 H9 亚型血凝素特异性单克隆抗体的研制及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25 (3): 161-163.

(责任编辑 李慧政)