

福建省首例人感染 H7N9 禽流感病例实验室诊断和病毒序列分析

翁育伟^{1,2}, 张拥军^{1,2}, 谢剑锋^{1,2}, 黄萌¹, 陈炜¹, 张炎华¹,
何文祥¹, 吴冰珊^{1,2}, 王金章^{1,2}, 郑奎城^{1,2}, 严延生^{1,2}

摘要:目的 应用 real-time RT-PCR 和病毒序列测定等方法对福建省首例人感染 H7N9 禽流感病例开展实验室诊断。
方法 采集人感染 H7N9 禽流感病例呼吸道标本并提取 RNA, 分别采用甲乙型流感通用引物和探针、季节性流感(包括 H3N2、H1N1、H1N1pdm)特异性引物和探针以及 H7N9 特异性引物和探针进行 real-time RT-PCR 检测。利用自行设计的引物扩增病毒基因组节段, 测定并分析病毒基因序列。**结果** real-time RT-PCR 结果表明, 应用甲型通用引物扩增结果阳性, 乙型及季节性流感(包括 H3N2、H1N1 以及 H1N1pdm)扩增结果均为阴性, 特异性 H7N9 亚型流感病毒扩增结果阳性。序列测定获得的病毒 4 个节段的序列与已公布的人感染 H7N9 禽流感病毒序列高度一致。**结论** 病例呼吸道标本中存在人感染 H7N9 禽流感病毒, 病毒的基因与近期国内流行的人感染 H7N9 禽流感病毒高度类似。

关键词:禽流感; H7N9 亚型; 实验室诊断; 序列分析

中图分类号:R373.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)06-0543-04

Confirmation of first case of human infection with influenza A (H7N9) virus in Fujian Province: laboratory diagnosis and viral sequence analysis

WENG Yu-wei^{1,2}, ZHANG Yong-jun^{1,2}, XIE Jian-feng^{1,2}, HUANG Meng¹, CHEN Wei¹, ZHANG Yan-hua¹, HE Wen-xiang¹, WU Bing-shan^{1,2}, WANG Jin-zhang^{1,2}, ZHENG Kui-cheng^{1,2}, YAN Yan-sheng^{1,2}

(1. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention,
Fujian Priority Laboratory for Zoonoses, Fuzhou 350001, China

2. Teaching Base for School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: In this study, we confirmed the first case of human infection with influenza A (H7N9) virus in Fujian Province by viral specific nuclear acid detection and sequencing the four segments of viral genome. The respiratory specimen (throat swab) was collected from a case with pneumonia of unknown cause reported in Longyan City, Fujian Province. Viral RNA was extracted from the specimen and applied for real-time reverse transcript PCR with universal primer/probe sets for influenza A & B, specific primer/probe sets for seasonal influenza A virus (including H3N2 subtype, H1N1 subtype and H1N1pdm), specific primer/probe sets for newly emerging H7N9 virus, respectively. The four near full-length segments of viral genome were sequenced by using two-step RT-PCR methods with a set of self-designed primers. Positive results obtained with universal influenza A virus and specific H7N9 subtype virus primer/probe sets, whereas negative results with the other primer/probe sets. Four segments of viral genomic sequence were obtained and compared with the published N7N9 viral genomic sequences. The results of real-time RT-PCR and viral segments sequencing revealed that presence of H7N9 subtype influenza A virus in the specimen from the case with pneumonia of unknown cause. Viral sequence was highly identical to that of H7N9 subtype viruses currently epidemic in mainland China. It should conclude that the patient was the first case of human infection with novel H7N9 subtype virus in Fujian Province.

KEY WORDS: avian influenza, H7N9 sub-type, laboratorial diagnosis, sequence analysis

国家科技重大专项项目资助(2012ZA10004-210)资助(翁育伟、张拥军、谢剑锋对本文具有同等贡献)

通讯作者:严延生,Email:yys@fjcdc.com.cn

作者单位:1. 福建省疾病预防控制中心,福建省人兽共患病研究重点实验室,福州 350001;

2. 福建医科大学公共卫生学院教学基地,福州 350001

Supported by National Science and Technology Major Project (No. 2012ZX10004-210), WENG Yu-wei, ZHANG Yong-jun, and XIE Jian-feng contributed equally to this article

Correspondence author: Yan Yan-sheng, Email: yys@fjcdc.com.cn

2013年2—3月期间,一种由新H7N9亚型禽流感病毒导致的人感染H7N9禽流感在我国长江三角洲地区出现^[1]。4月23日,福建省龙岩市报告了一例不明原因肺炎病例,福建省病预防控制中心应用real-time RT-PCR法进行了病毒核酸检测,并进一步对病毒的4个基因节段进行了序列测定和分析,证实了该病例为人感染H7N9禽流感病毒感染者。这是迄今我省发现的首例人感染H7N9禽流感病例,病例的实验室检测情况报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 采集病例发病第7天的咽拭子标本,置于5mL标本保存液中(DMEM培养液,含0.5%牛血清白蛋白组分V和50mg/mL庆大霉素),低温运输至实验室。

1.1.2 主要试剂 病毒RNA提取试剂盒QIAamp viral mini kit购自QIAGEN公司;通用型real-time RT-PCR试剂Ag-path ID one-step RT-PCR kit购自life technologies公司;季节性流感病毒(包括甲、乙型流感,季节性H1N1、季节性H3N2和H1N1pdm)核酸检测试剂购自上海之江生物科技有限公司;RNA逆转录试剂QIAGEN one-step RT-PCR kit购自QIAGEN公司;高保真Pyrobest DNA polymerase购自大连TaKaRa公司;胶回收试剂QIAquick gel extraction kit购自QIAGEN公司;DNA测序试剂盒BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit购自life technologies公司。其它试剂为实验室常规试剂。

1.1.3 引物和探针 H7N9特异性引物探针由国家流感中心下发,其序列参考世界卫生组织文件^[2];用于H7N9病毒血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)、基质蛋白(Matrix protein, MP)、非结构蛋白(Nonstructural, NS)等4个节段扩增的引物参考Naresh Jindal等^[3]设计,本实验室对其进行部分改进并委托上海生工合成。

1.1.4 主要仪器 ABI 7500荧光PCR仪用于real-time RT-PCR试验;ABI 3500测序仪用于病毒序列测定。

1.2 方法

1.2.1 病毒RNA提取 病毒RNA提取在生物安全II级(BSL-2)实验室的生物安全柜内进行,提取方法按QIAamp viral mini kit说明进行。

1.2.2 real-time RT-PCR检测 季节性流感(包括甲、乙型流感,季节性H1N1、季节性H3N2和

H1N1pdm)病毒核酸检测及判定标准按照相应的检测试剂说明进行。H7及N9 real-time RT-PCR检测及判定方法按世界卫生组织推荐方案^[2]进行。RNase P扩增用于对标本采集和病毒RNA提取过程的质量控制。

1.2.3 病毒基因扩增 按试剂盒说明,一步法扩增病毒的HA、NA、MP、NS4个节段。反应体系含10μL 5×RT-PCR buffer、2μL dNTPs(10mmol/L each)、2μL正向引物(10μmol/L)、2μL反向引物(10μmol/L)、2μL RT-PCR酶混合物、5μL RNA模板、27μL RNase-free H₂O。按以下程序扩增:50℃30min;95℃15min;30×(94℃30s,50℃30s,72℃1.5min);72℃10min;4℃保温。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳,根据预期分子量,切胶并按QIAquick gel extraction kit说明回收4个DNA产物,最终用50μL去离子水洗脱。取2μL洗脱后的DNA进行第二轮的扩增。按以下配置反应体系:5μL 10×Pyrobest Buffer、4μL dNTP(2.5mmol/L each)、2μL正向引物(10μmol/L)、2μL反向引物(10μmol/L)、5μL DNA模板、1μL Pyrobest DNA polymerase、去离子水补足50μL。反应程序为:95℃5min;30×(94℃30s,50℃30s,72℃1.5min);72℃10min;4℃保温。

1.2.4 扩增产物的回收和测序 扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳,按试剂盒说明切胶回收目的片段,回收后的DNA用去离子水洗脱并测定其浓度。各取10ng DNA,按BigDye Terminator v3.1试剂盒说明做测序反应。

1.2.5 序列分析 已知H7N9禽流感病毒序列(A/shanghai/1/2013、A/shanghai/2/2013、A/an-hui/1/2013、A/chicken/shanghai/S1053/2013、A/enviroment/shanghai/S1088/2013、A/pigeon/shanghai/S1069/2013、A/hanzhou/1/2013)从GISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)下载;其它H7亚型禽流感病毒从GenBank下载。应用Mega 5.0软件做DNA多重排列(Cluster W)后,比较目标序列与已知序列的距离,并对HA和NA节段做进化分析(neighbor joining法)。

2 结 果

2.1 real-time RT-PCR检测 使用包括甲、乙型及H1N1、H3N2、H1N1pdm等季节性流感病毒核酸检测试剂盒对提取的RNA做real-time RT-PCR反应,结果除甲型通用阳性外(图1A),其它流感病

毒核酸检测均为阴性。人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测为阳性(图 1B 和 C),RNase P 检测为阳性(图 1D)。上述结果表明,病例呼吸道标本中含有人感染 H7N9 禽流感病毒特异性核酸。

2.2 人感染 H7N9 禽流感病毒基因扩增 应用实验室自行设计的引物,成功扩增出 4 种分子量不同的 DNA 产物,分别与流感病毒的 HA、NA、MP、NS 节段的大小相符(见图 2)。

2.3 病毒基因的序列测定与分析 对上述扩增产物进行序列测定、拼接校正后获得 4 个节段完整的

编码序列(HA: 1 683 bp; NA: 1 421 bp; MP: 982 bp; NS: 864 bp),序列已上传至 GenBank(Accession No. KC994453~56)。与已知的 7 株 H7N9 禽流感病毒序列进行比对,结果表明,上述 4 个节段的病毒序列与人感染 H7N9 禽流感序列具有高度的一致性(HA: 99.28% ~ 100%; NA: 99.35% ~ 99.86%; MP: 99.45% ~ 100%; NS: 99.64% ~ 99.88%)。系统进化分析表明,所测定的 HA 和 NA 序列均与已知 H7N9 禽流感病毒高度同源。

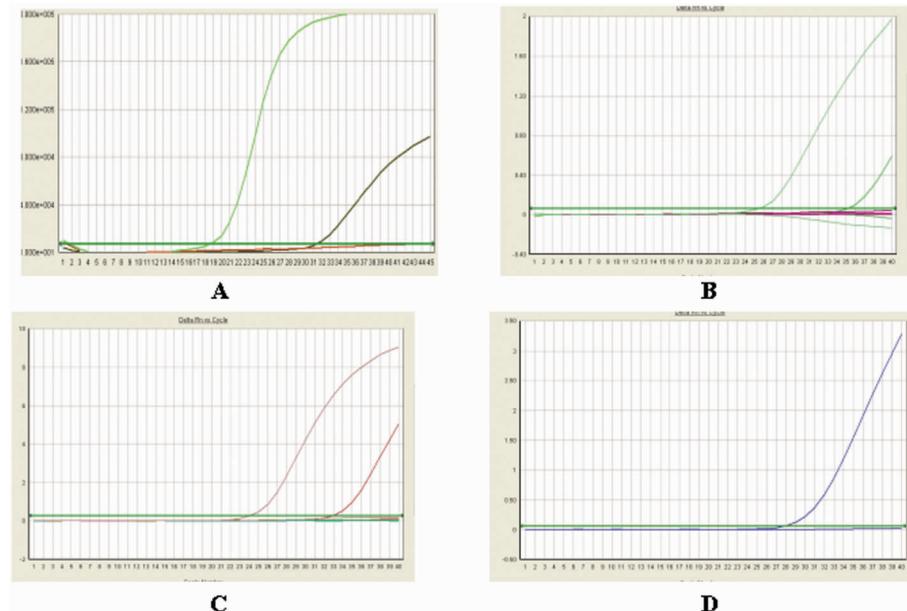


图 1 real-time RT-PCR 检测结果

A: 甲型流感病毒通用检测; B 和 C: H7 和 N9 亚型检测; D: RNase P 检测

Fig. 1 Result of real-time RT-PCR detection of novel A/H7N9

A: Flu A universal nucleic acid detection; B and C: H7 and N9 specific nucleic acid detection; D: RNase P detection for qualify control of specimen collection and RNA extraction

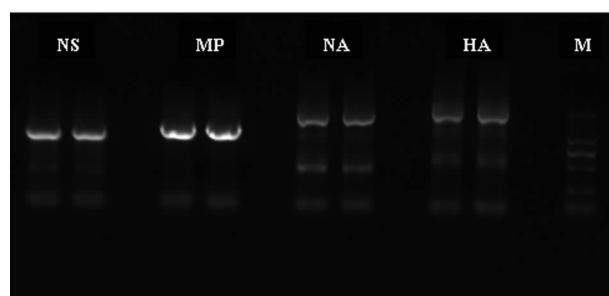


图 2 RT-PCR 扩增病毒 4 个基因节段(每个节段扩增两管)

NS: 非结构蛋白, MP: 基质蛋白; NA: 神经氨酸酶; HA: 血凝素; M: DL2000 DNA marker (TaKaRa)

Fig. 2 Amplification of four viral gene segments by RT-PCR method (duplicate for each segment)

NS: nonstructural protein; MP: matrix; NA: neuraminidase; HA: hemagglutinin; M: DL2000 DNA marker (TaKaRa)

3 讨 论

人感染 H7N9 禽流感病毒系首次从人群中发现的一种新型 H7N9 亚型禽流感病毒^[1],病毒序列分析表明,该病毒可能为三重重配病毒,即病毒的 H7 亚型血凝素基因(HAH7)来源于 A/duck/zhejiang/12/2011 样病毒,神经氨酸酶(NAN9)来源于 A/wild bird/Korea/A14/2011 样病毒,其余 6 个节段的内部基因则来源于 A/brambling/Beijing/16/2012 样病毒,3 者均来源于禽类或野禽^[1]。更精细的序列进化分析表明,病毒内部不同基因阶段可能来源于 4 种不同的禽源病毒^[4]。从核酸序列推导的氨基酸序列分析发现,新型 H7N9 病毒发生了多位点的突变^[1],这些突变可能导致病毒对宿主细胞嗜性的变化和毒力改变,如 HA 基因的 Q226L 变异导致病毒的人上皮细胞受体的亲和力增加,NA 杆部

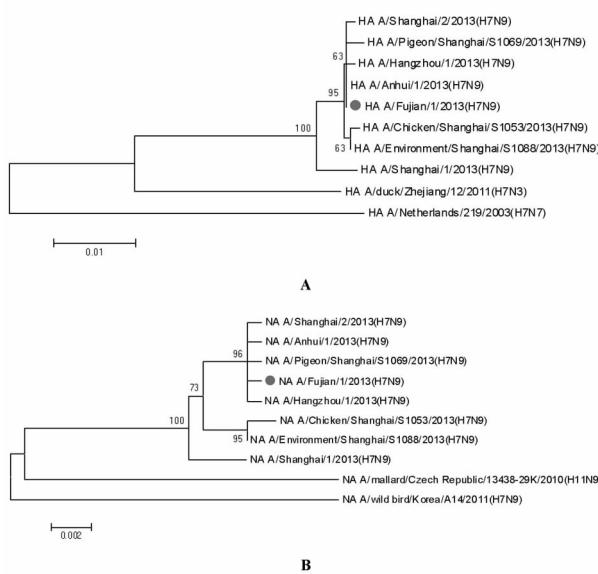


图 3 A/H7N9 病毒 HA 和 NA 节段的系统进化分析
A: 血凝素; B: 神经氨酸酶; 红色标记为来源于福建省 A/H7N9 病例序列

Fig. 3 Phylogenetic reconstruction of HA & NA segments of A/H7N9

A: 血凝素; B: 神经氨酸酶; Sequences from the first case of human infection with A/H7N9 virus in Fujian province marked in red solid circles.

5aa 的缺失导致病毒在人呼吸道细胞中的复制能力增强等。由于流感病毒型别多样,因此上述特征对于实验诊断人感染 H7N9 禽流感病例具有重要的意义。在本病例的实验室诊断中,除了应用 real-time RT-PCR 法获得 H7N9 病毒的特异性扩增外,还对病毒的内部 4 个节段的近全长基因进行了序列分析。序列分析结果显示,除了与已经报道的人感染 H7N9 病毒序列高度相似外,HA 基因中同样具有 Q226L 变异,而 NA 蛋白的杆部同样具有 5aa 的缺失。上述特征为进一步确诊福建省首例人感染 H7N9 病例提供了可靠的依据。

自 2013 年 3 月 31 日国家卫生计生委首次公布了 3 例人感染 H7N9 禽流感病例后,国内已有 10 省市陆续报告了人感染 H7N9 禽流感病例。与以往 H7 亚型禽流感病毒感染通常仅引起结膜炎或者轻微的呼吸道症状^[5]不同,此次新型 H7N9 禽流感病毒所致的临床症状主要以高热、严重下呼吸道感染等表现为特征^[6],且病死率高。从病例的地理分布看,病例呈高度散发状态。目前对病毒来源的研究表明,新型 H7N9 禽流感病毒可能来源于禽类,并从禽类直接跨物种传播而导致人感染,其主要依据包括(1)多数病例有禽类从业史或接触史^[6-7];(2)人感染病例高度散发,绝大多数病例之间没有流行病学

联系^[6];(3)从禽类、外环境等分离的毒株与人感染 H7N9 病例分离的毒株具有高度的一致性^[7-8];(4)病例的地理分布与候鸟季节性迁徙路线相吻合^[4]。基于上述原因,目前研究者普遍认为,新型 H7N9 病毒人间传播的可能性小。但我们认为,由于变异所导致的病毒适应人类宿主的能力增强,有可能使病毒进一步获得具有人间传播的能力^[8],此外,发生在上海和江苏的家庭聚集性病例^[6]也提示不能忽略病毒具有人间传播的可能性。因此,对于当前人感染 H7N9 禽流感的防控而言,除了加强人间疫情的监测外,在禽类中加强 H7N9 病毒的监测和控制,并密切关注病毒变异至关重要。

参考文献:

- [1] Gao RB, Cao B, Hu YW, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. N Engl J Med, 2013, 368: 1888-1897. DOI: 10.1056/DEJMoa1304459.
- [2] WHO. Real-time RT PCR (rRT-PCR) Protocol for the Detection of Avian Influenza A(H7N9) Virus[EB/OL]. (2013-04-15)[2013-05-05]. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf
- [3] Jindal N, Chandera Y, de Abina M, et al. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method[J]. J Virol Methods, 2009, 160(1/2): 163-166. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.05.003
- [4] Liu D, Shi WF, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic structural, and coalescent analyses [J]. Lancet, 2013, pii: S0140-6736(13)60938-1. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60938-1
- [5] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5): 1356-1361. DOI: 10.1073/pnas.0308352100
- [6] Li Q, Zhou L, Zhou MH, et al. Preliminary report: Epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in China[J]. N Engl J Med, 2013, April 24. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1056/NEJMoa1304617
- [7] Chen Y, Liang WF, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterization of viral genome[J]. Lancet, 2013, pii: S0140-6736(13)60903-4. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60903-4
- [8] Shi JZ, Deng GH, Liu PH, et al. Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets-implication of the source of current H7N9 infection in human[J]. Chin Sci Bull, 2013, DOI: 10.1007/s11434-013-5873-4