

湖南省湘西自治州首例人感染 H5N6 禽流感病例的实验室结果分析

杨婵¹, 黄一伟², 赵路¹, 吴周建¹, 谷冠军¹, 张红²

1. 湖南省湘西自治州疾病预防控制中心, 湖南 吉首 416000; 2. 湖南省疾病预防控制中心

摘要: **目的** 对一例不明原因重症肺炎病例进行 H5N6 禽流感病毒实验室诊断。 **方法** 采集患者呼吸道标本, 利用两种核酸提取方法, 使用实时荧光 RT-PCR 技术进行检测。 **结果** H5 和 N6 亚型引物的检测结果均为阳性, 其中仪器提取法扩增曲线较手工提取法扩增曲线结果典型。 **结论** 该病例经实验室检测, 为湖南省湘西自治州首例 H5N6 禽流感病例。为提高 H5N6 禽流感病毒的检出率, 建议在可疑病例使用药物之前, 及早采集下呼吸道标本送实验室检测。

关键词: H5N6 禽流感; 实时荧光 RT-PCR; 实验室检测

中图分类号: R511.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2017)11-1391-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.11.033

高致病性禽流感 H5N_x 病毒家族变异株在亚太地区的暴发流行, 给中国 (H5N1、H5N6 和 H5N8 等)、韩国 (H5N8)、日本 (H5N8)、老挝 (H5N8) 和越南 (H5N1、H5N6) 等国家造成了巨大的损失^[1-2]。2014 年 5 月以来, 四川省、广东省、云南省先后发现了人感染高致病性 H5N6 禽流感病毒的病例^[3]。2016 年 5 月 27 日, 湘西州疾病预防控制中心在 1 例不明原因重症肺炎患者病例标本中检测出甲型 H5 亚型流感病毒阳性。5 月 28 日, 经湖南省疾病预防控制中心复核检测, 确诊该病例为 H5N6 禽流感病毒阳性患者。现将实验室检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例信息和标本采集 患者, 男, 50 岁, 湖南省湘西自治州古丈县断龙乡溪龙村人。5 月 23 日自觉发热和咳嗽症状, 随后症状迅速加重。5 月 26 日转入湘西州民族中医院 ICU 病房, 入院时体温 37.5 °C。5 月 27 日上午 9:30, 州民族中医院传染病管理科诊断报告该患者为“重症肺炎, 急性肾损伤, 应激性溃疡, 精神病”, 湘西州疾控中心对该名重症肺炎患者开展疑似流感和禽流感病毒检测。采集该患者临床标本 2 份, 1 份上呼吸道咽后壁拭子, 1 份下呼吸道吸取液。

1.2 试剂 仪器提取病毒 RNA 核酸提取试剂盒 (MagMAX™-96 viral RNA isolation kit) 购自美国 Ambion 公司, 手工提取病毒 RNA 核酸提取试剂盒 (QIAamp viral RNA mini kit) 购自德国 QIAGEN 公司, 筛查实验甲型、乙型流感病毒核酸测定试剂盒, 季

节性流感病毒 H1、H3 亚型核酸测定试剂, 甲型 H1N1 流感病毒 (2009) RNA 检测试剂盒, 禽流感 H5、H7、H9、N1 和 N6 亚型病毒核酸测定试剂盒购自上海之江生物科技有限公司。

1.3 仪器 7300、7500 型 Real-time 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems), MagMAX™ Express 核酸提取仪 (Applied Biosystems), NU-425-400E 型生物安全柜 (美国 NUAIR 公司), 5430R 型低温高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), 微量加样器 (Thermo) 均经校准, 仪器性能稳定。

1.4 方法 实时荧光 RT-PCR 法。具体按照 WS 284-2008 《人感染高致病性禽流感诊断标准》以及 7300、7500 型 Real-time 定量 PCR 仪的 SDS 操作软件进行检测。

1.4.1 核酸提取 用 MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit 试剂盒和 QIAamp Viral RNA Mini kit 试剂盒分别进行仪器和手工提取核酸, 具体步骤参考试剂盒说明书。

1.4.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系建立 筛查甲型、乙型以及季节性 H1、H3, 禽流感 H5、H7、H9、N1 和 N6 亚型病毒反应体系配置参考试剂盒说明书, 具体方法如下: 甲型 (乙型, H1、H3、H5、H7、H9、N1 和 N6 亚型) 核酸荧光 PCR 检测混合液 18 μl, RT-PCR 酶 1 μl, 内对照 1 μl, 处理好的样本 5 μl, 反应体系为 25 μl。反应条件设定: 45 °C 10 min, 95 °C 15 min → 95 °C 15 s → 60 °C 60 s, 40 个循环。荧光通道设定为 FAM, 内标荧光通道设定为 VIC。甲型 H1N1 流感病毒 (2009) 反应体系配置: H1N1 (2009) 核酸荧光 PCR 检测混合液 19 μl, RT-PCR 酶 1 μl, 处理好的样本 5 μl, 反应体系为

作者简介: 杨婵 (1984-), 女, 本科学历, 主管检验师, 主要从事病毒分子生物学检测工作。

25 μl 。反应条件设定:45 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,40 个循环。荧光通道设定为 FAM。

1.4.3 实时荧光 RT-PCR 结果分析 在 SDS 操作软件上,基线确定取 6~15 个循环的荧光信号。根据甲型、乙型,季节性流感病毒 H1、H3,甲型 H1N1 流感病毒以及 H5、H7、H9、N1 和 N6 亚型流感病毒核酸诊断试剂盒说明书判定:CT \leq 38 为阳性,CT $>$ 40 为阴性。

2 结果

2.1 不同标本类型的实时荧光 RT-PCR 检测结果

5 月 27 日上午 10:00 利用仪器提取核酸的方法,对该病例的两份标本开展实时荧光 RT-PCR 筛查检测,筛查甲型、乙型流感病毒,季节性流感病毒 H1、H3,甲型 H1N1 流感病毒。结果下呼吸道气管吸取液的检测为甲型流感病毒扩增结果阳性(CT 值为 30),乙型流感病毒,季节性流感病毒 H1、H3,甲型 H1N1 流感病毒扩增结果均为阴性。上呼吸道咽后壁拭子的检测结果为甲型流感病毒核酸扩增结果阴性,乙型流感病毒核酸扩增结果阴性。见图 1。

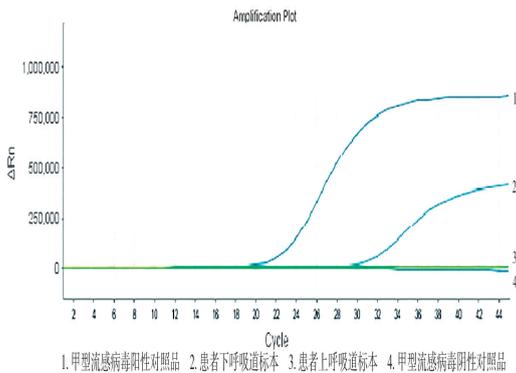


图 1 上呼吸道标本和下呼吸道标本的实时荧光 RT-PCR 扩增曲线

2.2 不同核酸提取方法的实时荧光 RT-PCR 检测结果 结合患者临床症状和湖南省流感/禽流感疫情,利用手工法提取下呼吸道气管吸取液标本,将上午仪器法提取的核酸和下午手工法提取的核酸同时开展甲型流感病毒核酸,禽流感 H5、H7、H9 亚型病毒核酸实时荧光 RT-PCR 检测。结果显示:同一标本 2 份核酸甲型流感病毒核酸扩增结果均为阳性,禽流感 H5 亚型病毒核酸扩增结果均为弱阳性,手工法扩增线性曲线不典型。仪器法的扩增 CT 值为 30,手工法的扩增 CT 值为 32。见图 2。

2.3 同一病例不同实验室的检测结果 湖南省疾病预防控制中心对该呼吸道气管吸取液标本进行禽流感

H5、N1 和 N6 的检测,结果为 H5 和 N6 亚型禽流感病毒阳性,诊断为人感染 H5N6 禽流感病毒病例。

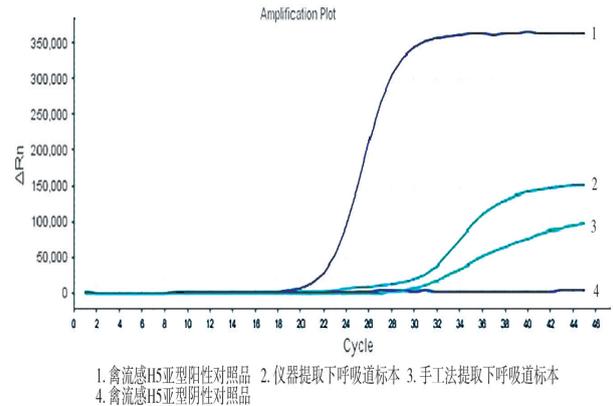


图 2 仪器法提取下呼吸道标本和手工法提取下呼吸道标本的实时荧光 RT-PCR 扩增曲线

3 讨论

流感病毒属正黏病毒科,为单股节段 RNA。甲型流感病毒亚型依据其血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)活性来确定,目前分为 18 个 H 亚型和 11 个 N 亚型。能够感染人的禽流感病毒亚型有 H5、H6、H7、H9 及 H10,其中 H5 和 H7 亚型可为高致病性^[4],多数患者的临床症状较普通流感要严重,比如重症肺炎、呼吸窘迫综合征,甚至出现死亡病例。据中国疾病预防控制中心疾病监测报告:2014 年-2016 年 4 月,全国累计人感染 H5N6 禽流感病例 13 例,死亡 8 例^[5]。本实验确诊病例于 5 月 24 日到村卫生室看病,5 月 26 日被转至湘西州民族中医院 ICU 病房,因不明原因肺炎监测工作发现,入院时已出现呼吸窘迫综合征。5 月 28 日确诊为高致病性 H5N6 禽流感病毒后隔离治疗,6 月 10 日,该病例死亡。截止到该病例死亡时间,全国病例增至 14 例,死亡 9 例,我国死亡率为 64.3%。

本实验采集了同一病例的不同标本类型,1 份为上呼吸道咽后壁拭子,1 份为下呼吸道吸取液。其实验室结果上呼吸道咽后壁拭子检测为阴性,下呼吸道吸取液检出 H5N6 禽流感病毒核酸阳性,说明标本类型对结果存在一定影响因素。新型人感染 HPAI-H5N6 病毒是一种重组病毒,其 HA 基因来源于亚洲禽类 H5 亚型,NA 基因来源于亚洲禽类 H6N6^[6]。流感病毒通过表面 HA 与宿主细胞唾液酸(SA)受体特异性结合而感染宿主,禽类和人类分别表达 SA α -2,3 半乳糖(galactose, Gal)受体和 SA α -2,6Gal 受体为主。Yao 等^[7]发现禽流感病毒受体(α -2,3 唾液酸)可在人体不同的细胞中(包括 II 型肺泡细胞)(下转封三)