

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.12

甲型 H1N1 (2009) 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立与评价

秦智锋^{1,2,3}, 张彩虹^{1,2}, 孙洁^{1,3}, 刘建利¹, 卢体康¹, 阮周曦¹, 林庆燕¹, 吕建强¹,
曹琛福¹, 曾少灵¹, 陈书琨¹, 廖立珊¹, 花群义¹

(1. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001; 2. 深圳市检验检疫科学研究院, 广东 深圳 518001;
3. 深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室, 广东 深圳 518045)

摘要: 自甲型 H1N1(2009) 流感病毒于 2009 年在世界多个国家暴发流行后, 许多国家的猪群中检测到该病毒的存在, 因此建立快速准确的甲型 H1N1 流感病毒的检测方法成为迫切需求。本研究针对甲型 H1N1(2009) 流感病毒 NA 基因设计特异性引物和探针, 建立甲型 H1N1(2009) 流感病毒特异性实时荧光 RT-PCR 快速检测方法。并将该方法与 WHO 推荐美国 CDC 建立的检测方法和美国农业部推荐的检测方法进行比较。通过田间试验验证该方法在实际应用中的效果。结果表明: 本研究建立的方法对检测甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的灵敏度达到 10^6 , 与 WHO 推荐的 A 型流感病毒实时荧光 PCR 检测方法的灵敏度一致, 并且高于美国农业部推荐方法的检测灵敏度(10^5); 该方法特异性强, 与经典型 H1N1 和其他亚型流感病毒株无任何交叉反应。与香港兽医化验所进行了检测比对, 检测灵敏度和特异性完全一致。近 3 800 份的田间试验表明, 所建立的方法准确可靠。本研究所建立检测方法快速灵敏, 检测结果准确可靠, 适合用于甲型 H1N1 (2009) 流感病毒的分子生物学检测和监测。

关键词: 甲型 H1N1(2009) 流感病毒; 实时荧光 RT-PCR; 快速检测

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0048-06

Development and evaluation of real time RT-PCR for pandemic H1N1(2009) influenza virus

QIN Zhi-feng^{1,2,3}, ZHANG Cai-hong^{1,2}, SUN Jie^{1,3}, LIU Jian-li¹, LU Ti-kang¹, RUAN Zhou-xi¹, LIN Qing-yan¹,
LV Jian-qiang¹, CAO Chen-fu¹, ZENG Shao-ling¹, CHEN Shu-kun¹, LIAO Li-shan¹, HUA Qun-yi¹

(1. Shenzhen Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China; 2. Shenzhen City Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518001, China; 3. Shenzhen Key Laboratory of Inspection Research & Development of Alien Pests, Shenzhen 518045, China)

Abstract: Pandemic H1N1 2009 influenza virus has been detected in pig herds on more than one continent since it outbreak in human in 2009. It is potential for this pandemic virus to resort or mutate in pigs. The rapid diagnosis is crucial to any control program. A TaqMan real-time RT-PCR (pH1N1(2009)-rRT-PCR) test based on the NA gene of Pandemic H1N1 2009 was developed in the present study. The evaluation results indicated that the sensitivity of the pH1N1(2009)-rRT-PCR was 10^6 which was equal to the CDC-InfA-rRT-PCR recommended by World Health Organization and superior to the USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR recommended by United State Department Agriculture. The specificity test showed that the pH1N1(2009)-rRT-PCR had no cross reactions with other virus. Comparing with Hongkong developed assay for 3,800 field sample detections indicated that the pH1N1(2009)-rRT-PCR was a specific, sensitive and rapid assay. pH1N1(2009)-rRT-PCR is a promising method for routine

*Corresponding author

收稿日期: 2011-10-12

基金项目: 深圳市地方性标准制订项目(2010 年安全类 46); 深圳出入境检验检疫局青年科技计划(SZ2011201)

作者简介: 秦智锋(1975-), 男, 河南林州人, 博士研究生, 主要从事动物疫病的检疫和研究工作。

E-mail: bioit@163.com

detection of Pandemic H1N1 2009 and could be used to monitor and survey Pandemic H1N1 2009 influenza virus.

Key words: Pandemic H1N1 2009; rRT-PCR; rapid detection

在甲型流感病毒 H1N1(2009)暴发流行期间, 许多国家均有人源病毒感染猪的报道^[1]。甲型 H1N1 (2009)病毒在猪体内可以发生变异和重组, 进而产生具有潜在危害的新毒株。加强猪群中猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV)、尤其是甲型 H1N1 (2009)流感病毒 (Pandemic H1N1 2009)的检测和监测显得非常迫切。WHO、OIE 和 FAO 联合要求对猪群中甲型 H1N1(2009)流感病毒进行监测, 并能够与其他病毒株进行鉴别, 以评估甲型 H1N1 (2009)病毒株与其他病毒株重组的风险^[1]。

WHO 连续推出多个流感参考实验室的常规 RT-PCR 检测方法和实时荧光 RT-PCR 检测方法等系列 SIV 的分子生物学检测标准^[2], 包括美国疾病控制中心(CDC)推荐的 A 型流感病毒、SIV、H1 亚型 SIV 的实时荧光 RT-PCR (Real time RT-PCR, rRT-PCR)检测方法。尽管猪流感不是 OIE 必须呈报的重大动物疫病, OIE 也在 2009 年专门重新制订了 SIV 检测标准^[3], 但其中缺少详细的快速分子生物学检测技术。美国农业部(USDA)也推荐了一种甲型 H1N1(2009) [pH1N1(2009)]流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法^[4]。

实际应用表明, 美国 CDC 推荐的 rRT-PCR 方法存在特异性低的问题。USDA 推荐的检测方法具有较高的特异性, 但灵敏度较低。因此, 本研究在 USDA 推荐的引物和探针基础上, 重新设计了探针和其他改进, 建立特异性快速检测甲型 H1N1(2009)流感病毒的 rRT-PCR 方法 [rRT-PCR for Pandemic H1N1(2009), pH1N1(2009)-rRT-PCR], 并在大量田间样本中进行验证实验。

1 材料和方法

1.1 病毒株 甲型 H1N1 流感裂解疫苗 A/California/7/2009 NYMC X-179A 购自北京科兴生物制品有限公司; A/Human/shenzhen/0716/2009(H1N1)、A/Human/shenzhen/0804/2009 (H1N1) 由疾病控制中心惠赠; A/Human/shenzhen/02/2009 (H1N1) 和 A/Human/shenzhen/03/2009(H1N1)均由深圳儿童医院分离、鉴

定; A/Swine/huanan/szciq-1/2006 (H1N1) 和 A/Swine/huanan/szciq-2/2006(H3N2)均由深圳出入境检验检疫局实验室分离、鉴定; A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1) (禽流感病毒(AIV)H5 亚型 HI 检测抗原)由香港实验室惠赠; AIV H5、H7 和 H9 亚型标准抗原均购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 主要试验试剂及仪器 一步法 rRT-PCR 试剂盒(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit)购自 ABI 公司; 病毒核酸抽提试剂盒(Qiagen Viral RNA Mini Kit)购自 Qiagen 公司; USDA 推荐的甲型 H1N1(2009) (pH1N1-2009)流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测引物探针^[5]均由上海基康公司合成。

1.3 引物与探针的设计 引物与探针的设计参考 USDA 推荐的甲型 H1N1(2009)(pH1N1(2009))流感病毒 rRT-PCR 检测的引物和探针。参照 Bao 等流感序列分析方法^[5], 对甲型 H1N1(2009)流感病毒序列与 GenBank 中登录的经典型 H1N1 SIV、人季节性流感 H1N1 病毒不同年代、不同国家地区、不同宿主的 NA 基因进行序列比对分析。以 Clustal 方式进行比对, 以 NA 基因中最保守的 20 个寡核苷酸序列作为探针, 在探针两侧保守区域设计特异性的上下游引物, 并在反转录引物处设计了简并引物, 以避免漏检。上游引物 FP: 5'-CAACACCAACTTTGCTGC-3', 反转录引物 RP: 5'-GGAACCGATTCTTA (C/T)ACT GTTGTC-3', 探针 Pb: 5'-FAM-CAGTCAGTGGTTT CCGTGAAATTAGC-BHQ-3'。

1.4 实时荧光 RT-PCR 检测方法(rRT-PCR)的建立 参照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 操作说明书, 于全自动核酸抽提工作站中抽提 A/California/7/2009 NYMC X-179A、A/Human/shenzhen/0716/2009(H1N1)、A/Human/shenzhen/0804/2009 (H1N1)、A/Human/shenzhen/02/2009 (H1N1)、A/Human/shenzhen/03/2009 (H1N1)、A/Swine/huanan/szciq-1/2006 (H1N1)、A/Swine/huanan/szciq-2/2006 (H3N2)、A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1)和 AIV H5、H7 和 H9 亚型标准 HI 检测抗原等 11 株流感病毒的与阴性对照鸡胚尿囊液中的核酸。

参照 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit 操作说明

书配制荧光 RT-PCR 反应体系：2×RT-PCR 12.5 μL、酶混合物 1 μL、10 μM 的 pH1N1 (2009)-FP 1 μL 和 pH1N1(2009)-RP 各 1 μL、5 μM pH1N1(2009)-Pb 1 μL、无核酸酶的水 2.5 μL、RNA 模板 5 μL。

PCR 反应程序为：45 °C 30 min；95 °C 10 min；95 °C 10 s、60 °C 30 s，40 个循环；设置 60 °C 时收集荧光信号。

1.5 5 种实时荧光 RT-PCR 检测方法灵敏度比较 选取 A/California/7/2009 NYMC X-179A 裂解疫苗株作为灵敏度的研究对象，该病毒株的 HA 滴度为 1:640，鸡胚半数致死量为 $10^{8.5}$ EID₅₀/mL。以无核酸酶的水 10 倍系列稀释成 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-10}$ ，采用 EZ1 抽提核酸。按照 WHO 推荐美国 CDC 建立的检测方法和美国农业部推荐的检测方法，与本研究建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 方法进行灵敏度检测比较，确定所建立方法的灵敏度。

1.6 5 种实时荧光 RT-PCR 检测方法特异性比较 采用建立 pH1N1(2009)-rRT-PCR 方法对 11 株流感病毒株进行检测，确定本研究建立的检测方法与经典型 SIV H1N1 及其他亚型之间的交叉反应。采用本研究建立的方法对实验室保存的鸡肉正常组织、鸡血清、火鸡肌肉组织、鸽组织、猪肉组织、猪血清、正常鸡胚尿囊液、其他家禽病毒和细菌共 16 份非流感毒株样品进行检测，进一步确定所建立方法的特异性。

采用抽提的核酸，同时评估 WHO 推荐的美国 CDC 建立的 CDC-InfA-rRT-PCR、CDC-SW-InfA-rRT-PCR、CDC-SW-H1-rRT-PCR 和 USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的特异性。

1.7 pH1N1(2009)-rRT-PCR 重复性试验 将建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 方法组装成试剂盒，测定其稳定性。对 A/California/7/2009 NYMC X-179A 裂解疫苗株原液进行 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释后，分别抽提核酸，进行 3 次重复检测，确定所建立方法的组内差异。将 3 个梯度抽提的核酸，分别用保存 1 周、1 个月和 3 个月的试剂盒进行检测，确定组间差异。

1.8 深港实验室之间的比对 为了进一步确证所建立 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的准确性和可靠性，将 A/Human/shenzhen/0716/2009(H1N1)、A/Swine/huanan/szciq-1/2006 (H1N1)、A/Swine/huanan/szciq-2/2006(H3N2)株和本研究建立方法的相关试剂，在香

港与兽医化验所进行检测方法比较。其中香港提供了 3 株病毒(2 株为经典型猪流感 H1N1、1 株为香港分离的甲型 H1N1 流感病毒株)。

1.9 田间试验 自 2009 年 5 月份开始，从大型猪场和养禽场采集样品进行甲型 H1N1 流感病毒的监测。按照 CDC-InfA-rRT-PCR 方法进行流感病毒的筛选检测，如果检出阳性样品，再按 CDC-SW-H1-rRT-PCR 和 pH1N1(2009)-rRT-PCR 方法进行检测。

2 结果

2.1 rRT-PCR 的建立 以设定的反应条件，于荧光 PCR 仪上进行 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测。在阴性对照成立的情况下，5 株甲型 H1N1(2009)流感病毒株出现特异性实时扩增，AIV 和 SIV 均没出现特异性扩增，相互之间无相关交叉反应(图 1)。

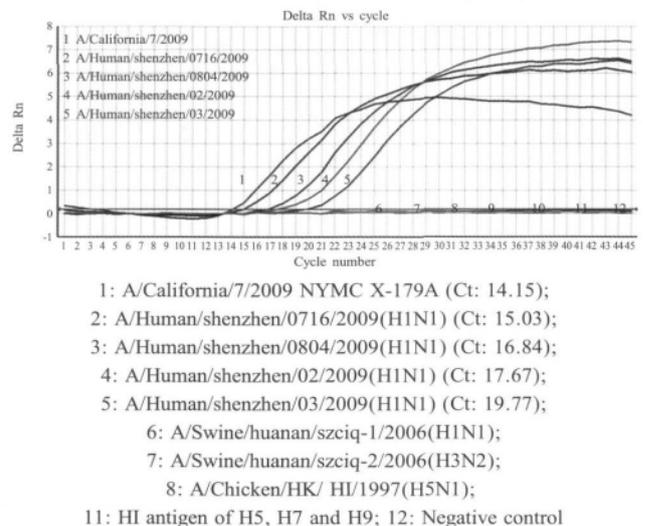


图 1 11 株流感毒株 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测结果
Fig.1 The result of 11 influenza A strains with pH1N1(2009)-rRT-PCR

2.2 5 种实时荧光 RT-PCR 检测方法灵敏度试验结果 将 10 倍系列稀释的 A/California/7/2009 NYMC X-179A 的 RNA 同时进行 CDC-InfA-rRT-PCR、CDC-SW-InfA-rRT-PCR、CDC-SW-H1-rRT-PCR、USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 和 pH1N1(2009)-rRT-PCR 灵敏度测定。结果显示，所建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的灵敏度为 10^6 ，即 4.51 EID₅₀ (图 2)。CDC-InfA-rRT-PCR (图 3)、CDC-SW-InfA-rRT-PCR(图略)和 CDC-SW-H1-rRT-PCR (图略)的灵敏度为 10^6 ，即 4.51 EID₅₀。美国农业部推荐的 USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的灵敏度为

10⁵, 即 45.1 EID₅₀ (图 4)。pH1N1(2009)灵敏度与 CDC-InfA- rRT-PCR 的灵敏度相当, 比 USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 灵敏度高 10 倍, 并且荧光增幅也较高。所建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法检测 5 株甲型 H1N1(2009)流感病毒的灵敏度为 100 % (5/5), 无漏检现象。

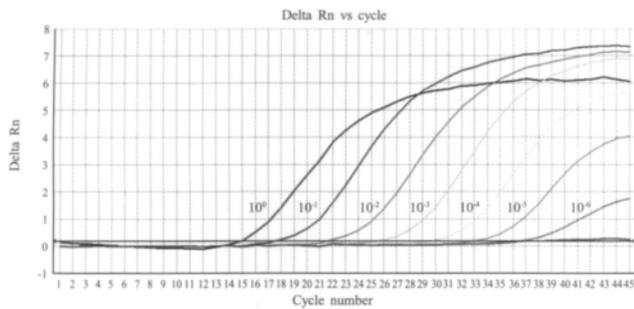


图 2 pH1N1(2009)-rRT-PCR 灵敏度测定结果
Fig.2 Sensitivity of the pH1N1(2009)-rRT-PCR

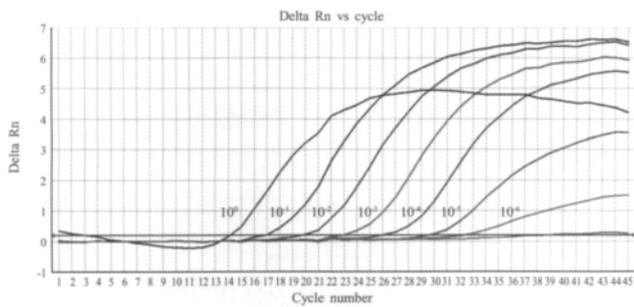


图 3 CDC-InfA-rRT-PCR 灵敏度测定结果
Fig.3 Sensitivity of the CDC-InfA-rRT-PCR

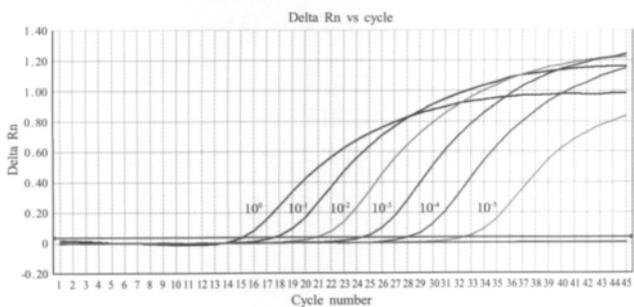
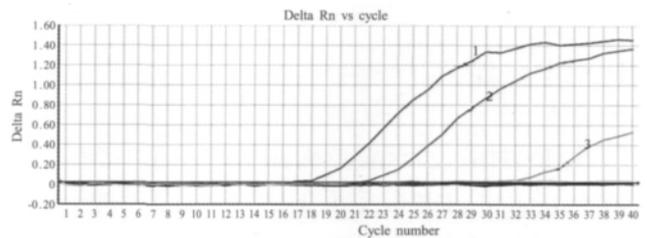


图 4 USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 灵敏度测定结果
Fig.4 Sensitivity of the USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR

2.3 5 种实时荧光 RT-PCR 检测方法特异性试验结果 对 11 株流感病毒株进行特异性检测, 5 株甲型 H1N1(2009)流感病毒株结果为阳性, 其他 6 株非甲型 H1N1(2009)流感病毒株均无扩增结果。表明本研究建立的方法特异性强, 在流感病毒亚型之间无交叉反应(图 1)。通过对 16 份非流感病毒株阳性样品的检测, 结果均为阴性(图略), 表明本研究建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的特异性为 100 % (27/27)。表明该方法特异性强, 与其他检测对象无

交叉反应。

针对所有亚型的流感病毒, 通用型检测方法 CDC-InfA-rRT-PCR 特异性较好, 能够全部扩增出 11 株流感病毒株, 与其他非流感病毒株的 16 份核酸样品无交叉。CDC-SW-InfA-rRT-PCR 主要是用来检测 SIV, 但试验表明, 该方法不但可以检测出 SIV A/Swine/huanan/szciq-1/2006 (H1N1), 而且能够检测出 AIV A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1)和 AIV H5、H7 和 H9 亚型标准抗原, 但却不能检测出 SIV A/Swine/huanan/szciq-2/2006 (H3N2)。CDC-SW-H1-rRT-PCR 可以特异性检测所有经典型的 H1N1 流感和甲型 H1N1(2009)流感病毒, 但不能将两者区分开来。USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 特异性较差, 在检测 A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1)株时有微弱的扩增信号(图 5)。



1: A/California/7/2009 NYMC X-179A (Ct: 18.23);
2: A/Human/shenzhen/0716/2009(H1N1) (Ct: 22.07);
3: A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1) (Ct: 32.18)

图 5 USDA- pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测 A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1)株的非特异性结果
Fig.5 Non-specificity of the USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR with A/Chicken/HK/ HI/1997(H5N1)

2.4 重复性试验结果 采用本研究组装的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测试剂盒测定 A/California/7/2009 NYMC X-179A 裂解疫苗株 10⁴、10⁵ 和 10⁶ 3 个稀释度的组内变异系数 CV ≤ 0.45%, 符合检测试剂盒的要求。不同时期组装的试剂盒测定 3 个稀释度后的组间差异系数为 1.89 % ~ 3.72 %, 初步将检测试剂盒的有效期定为 6 个月(表 1)。

表 1 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测试剂盒的组内和组间重复性实验结果

Table 1 Intra-assay and inter-assay reproducibility test of the pH1N1(2009)-rRT-PCR kit

病毒 Virus	鸡胚半数致死量 The embryo median infectious dose (EID ₅₀ /mL)	n	组内变异试验 Intra-coefficient of variation		组间变异试验 Inter-coefficient of variation	
			平均数 $\bar{X} \pm SD$	变异系数 CV (%)	平均数 $\bar{X} \pm SD$	变异系数 CV (%)
A/California/7/2009 NYMC X-179A	10 ⁴	3	30.51±0.072	0.45	30.97±0.53	1.89
	10 ⁵	3	33.94±0.078	0.36	32.95±0.55	2.95
	10 ⁶	3	38.21±0.085	0.30	38.07±0.84	3.72

2.5 深港实验室之间的比较 本研究建立的 pH1N1

(2009)-rRT-PCR 检测方法与香港实验室同时进行 6 株流感病毒株的检测,可以特异性地检测出两株甲型 H1N1(2009)流感病毒株。检测香港甲型 H1N1(2009)分离株的灵敏度为 10^6 。所建立的方法与香港采用的方法特异性和灵敏度一致,但扩增效率明显高于香港方法(图略)。

2.6 田间试验 采集 2009 年~2011 年注册猪场和注册禽场近 3 800 份混合棉拭子样品进行 3 种 rRT-PCR 检测。其中 CDC-InfA-rRT-PCR 和 CDC-SW-H1-rRT-PCR 两种方法共筛选出 23 例阳性样本,但经 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测全部为阴性。挑选其中 8 例样本送至国家参考实验室进行亚型确定,检测结果全部为经典型猪流感 H1N1,而未检测到甲型 H1N1(2009)流感病毒。pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法与国家参考实验室检测结果一致。

3 讨论

甲型 H1N1(2009)流感病毒在许多洲的猪群中均有检出,同时也进行了人工感染和传播试验^[1]。目前没有证据表明猪在甲型 H1N1(2009)流感病毒的流行病学中具有重要的作用。但香港已经发现甲型 H1N1(2009)流感病毒已经开始与一些经典型的 H1N1 流感病毒和其他亚型发生重组,可能导致新的高传播性病毒株出现。因此,对猪群中的甲型 H1N1(2009)流感病毒进行流行病学调查和普查监测尤为迫切。鉴于 SIV 的危害性,WHO、FAO 和 OIE 均加大了对 SIV 的检测和监测。世界各国对动物及动物进出口产品贸易中甲型 H1N1(2009)流感病毒实施严格的控制和检疫。

实时荧光 PCR 由于具有灵敏、准确、快速的特点而被国内外广泛应用于临床诊断^[6-7]。WHO 在 2009 年 4 月甲型 H1N1(2009)流感病毒株暴发流行期间,将 CDC 所建立的甲型 H1N1(2009)流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法作为国际标准。但本研究在对 WHO 推荐的方法进行评估过程中表明,这些检测方法的特异性存在问题,不能对甲型 H1N1(2009)流感病毒和经典型 SIV H1N1 病毒进行区分。美国 CDC 建立的特异性检测 SIV 的 CDC-SW-InfA-rRT-PCR 检测方法,在检测 H1N1 亚型 SIV 和 AIV 样品时也表现出阳性结果,并且对于 A/Swine/human/szciq-2/2006(H3N2)非 H1N1 亚型病毒株出现漏

检。美国农业部推荐的 USDA-pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法可以区分经典型 SIV H1N1 和甲型 H1N1(2009)流感病毒,但检测灵敏度较低(10^5),并且对检测 A/Chicken/HK/HI/1997(H5N1)株有微弱非特异性反应。Blast 分析表明,其探针位点有 4 个碱基缺失。根据理论推算,探针中每一个碱基的错配可导致降低约一个 Ct 值^[8]。另外其上游引物也出现了一个碱基的错配和一个碱基的缺失。本研究在美国农业部推荐的引物和探针基础上,重新设计了探针,确保 100%相符率,并且在反转录引物处设计了简并引物,以避免漏检^[9-10]。在扩增反应中提高了退火温度,以确保检测方法的特异性^[11]。

本研究建立的 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法对检测甲型 H1N1 流感裂解疫苗的灵敏度可以达到 10^6 ,与 WHO 推荐的 A 型流感病毒实时荧光 PCR 检测方法的灵敏度相同,而高于美国农业部推荐方法的检测灵敏度(10^5)。pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法与经典型 H1N1 和其他亚型流感病毒株无任何交叉反应,可以有效区分经典型 SIV H1N1 和甲型 H1N1(2009)流感病毒,保证了检测的特异性。与香港兽医化验所进行了检测比较,检测灵敏度和特异性完全一致。田间试验对 3 800 份猪和禽类样品进行检测, CDC-InfA-rRT-PCR 和 CDC-SW-H1-rRT-PCR 方法检测到的 23 份阳性样品,经 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测均为阴性。抽样送国家参考实验室进行检测,结果也均为阴性,证实了 pH1N1(2009)-rRT-PCR 检测方法的在田间试验中具有较高的特异性。本研究建立的检测方法灵敏度高、特异性好,适合于甲型 H1N1 流感病毒的分子生物学检测和田间样品的大规模普查监测。

参考文献:

- [1] Hana M, Weingartl, Yohannes B, et al. Genetic and pathobiologic characterization of Pandemic H1N1 2009 influenzae from a naturally infected swine herd [J]. *J Virol*, 2010, 84(5): 2245-2256.
- [2] WHO. CDC protocol of real time RT-PCR for influenza A (H1N1) [EB/CD]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/>, 2009.
- [3] OIE, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2008 [EB]. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>, 2011.

- [4] David S, Erica S. SEPR L V. 051209 real time RT-PCR for the detection of H1N1 2009 N1 gene [S]. National Veterinary Serv Lab Test Protoc, 2009.
- [5] Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, et al. The influenza resource at the national center for biotechnology information [J]. J Virol, 2008, 82(2): 596-601.
- [6] Mackay I M, Arden K E, Nitsche. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 1292-1305.
- [7] 秦智锋, 吕建强, 肖性龙, 等. 禽流感 H5、H7、H9 亚型多重实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 病毒学报, 2006, 22(2): 131-136.
- [8] 秦智锋, 吕建强, 肖性龙, 等. 禽流感 H5、H7、H9 亚型多重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒灵敏性试验 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(03): 336-340.
- [9] Van Elden L J, Nijhuis M, Schipper P, et al. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 196-200.
- [10] Spackman E, Senne D A, Myers T J, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9): 3256-3260.
- [11] Van Borm S, Suarez D L, Boschmans M, et al. Rapid detection of Eurasian and American H7 subtype influenza A viruses using a single TaqMan MGB real-time RT-PCR [J]. Avian Dis, 2010, 54(1 Suppl): 632-638.

(本文编辑: 张朝霞)