

北京市花鸟市场常见留鸟流感病毒携带情况调查

姚艳丰, 许黎黎, 鲍琳琳, 李枫棣, 吕琦, 谷松至, 袁静, 于品, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 阐明 H7N9 爆发季节北京市禽流感的流行现状, 为流感防控提供依据。方法 对北京市花鸟市场开展流感监测, 使用 SPF 鸡胚进行病毒分离。结果 病毒分离显示从鸽子中分到 1 株高致病性新城疫病毒, 从麻雀中分到 1 株禽副黏病毒 2 型, 并未分离到 H7N9 流感病毒。结论 初步掌握了北京花鸟市场留鸟的病毒流行情况, H7N9 流感病毒在此尚未流行, 为流感防控提供第一手的材料。

【关键词】 花鸟市场; 留鸟; 流感; 流行病学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0091-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.019

Epidemiology investigation of avian influenza from flower & bird markets in Beijing

YAO Yan-feng, XU Li-li, BAO Lin-lin, LI Feng-di, LV Qi, GU Song-zhi, YUAN Jing, YU Pin, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence of avian influenza in birds in the flower & bird markets in Beijing, and to provide basic evidence for prevention and control of influenza. **Methods** An influenza surveillance was carried out in two bigger flower & bird markets in Beijing, and 161 anal samples were obtained from 100 sparrows, 50 swallows, 10 pigeons, and one parrot. Their virus isolation was performed in SPF embryonated chicken eggs. **Result** No avian influenza virus was isolated from these bird samples. However, Newcastle disease virus was detected in one pigeon, and avian paramyxovirus type 2 was isolated in tree sparrows. **Conclusions** The basic data of epidemiological evidence of avian influenza is obtained from flower & bird markets in Beijing. H7N9 influenza virus has not been detected in birds in two flower & bird markets in Beijing. The data are helpful for prevention and control of influenza.

【Key words】 Flower & bird markets; Resident birds; Influenza; Epidemiology; Newcastle disease virus

禽流感是由禽流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病, 传染性强, 发病率高, 容易引起暴发流行或大流行。依据其外膜血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 蛋白抗原性不同, 可分为 17 个 HA 亚型 (H1-H17) 和 10 个 NA 亚型 (N1-N10)^[1-3]。当今世界禽流感防控和监测主要聚焦在 H5N1、H9N2 和 H7N7 等病毒, 主要是因为此病毒可以跨越种属障碍, 感染

包括人在内的哺乳动物^[4-6]。截止 2013 年 3 月 12 日, 全世界已经有 622 人感染 H5N1 病毒, 371 人死亡, 死亡率几乎达 60%^[7]。流感的高突变率, 致使流感重组株不断出现, 引起人感染和不定期的流感爆发。2013 年 3 月底在上海和安徽两地, 就出现了 H7N9 亚型感染人的爆发疫情, 该亚型病毒全球首次出现, 并逐渐蔓延。基因组分析表明该病毒基因

【基金项目】 十二五科技重大专项 (2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8); 国家自然科学基金 (31370203); 科技部 H7N9 禽流感应急防控专项 (KJYJ-2013-01-04); 协和青年教师培养项目 (2012Y2, 2012D15)。

【作者简介】 姚艳丰 (1981 年 -), 男, 博士后。E-mail: yaoyanfeng1981@aliyun.com

【通讯作者】 秦川。E-mail: chuanqin@enilas.org

组 8 个片段均来自禽类,提示禽类可能将此病毒传播给人类,但仍需要更多的证据加以证实。2013 年 4 月 4 日,国家禽流感参考实验室从上海市送检的松江区沪淮农副产品批发市场的鸽子样品中检测到 H7N9 禽流感病毒,基因序列分析结果表明,该毒株为低致病力禽流感病毒,与 H7N9 禽流感病毒人分离株高度同源,证实禽类可能会将此病毒传播给人类。

由于高致病性禽流感(H5N1)的出现,北京 2004 年起禁止活禽交易,此举无疑对流感的防控起到积极的作用。然而北京一些花鸟市场仍存在零星的留鸟(麻雀、鸽子等)交易,并且在市场中人与鸟类接触密切、频繁,感染风险极大。特别是在 H7N9 爆发季节,对这些鸟类进行流感的监测具有积极的现实意义。我们对北京地区花鸟市场留鸟的流感病毒监测过程中,并未检测到流感病毒的存在,但是分离到 2 株其他病毒,1 株是从鸽子中分到的高致病性新城疫病毒,另 1 株是从麻雀上分到的禽副黏病毒 2 型。本文为 H7N9 爆发季节禽流感的防控提供了基础的流行病学资料,为北京地区更好的预防和控制禽流感的发生、流行提供实验数据。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 培养基、双抗(购自 Gibco 公司,美国),ExTaq DNA 聚合酶、dNTPs(购自大连宝生物工程公司,中国),RNeasy Mini Kit 提取试剂盒(Qiagen 公司,美国),Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒(Invitrogen 公司,美国),生理盐水、阿氏液(均为本实验室保存),离心机(Sigma 公司,美国)。

1.1.2 实验动物

9~10 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通公司【SCXK(京)2009-0003】。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

2013 年 4 月从北京花鸟市场采集留鸟(鸽子、麻雀、榆林燕等)肛拭子样品,拭子浸入到 DMEM 中,置于随身携带的冰盒中,至实验室于 -80℃ 冻存备用。

1.2.2 病毒分离

将采集的肛拭子样品,6000 r/min 离心 10 min,上清接种于 9~10 日龄鸡胚中,37℃ 培养 48~72 h,每 24 h 观察鸡胚死亡情况。弃去 24 h 内死亡的鸡胚,收集 24~72 h 死亡和未死亡的鸡胚尿囊液,进

行 HA 血凝实验。有血凝价的尿囊液收集分装后冻存于 -80℃ 备用,没有血凝价的尿囊液盲传 3 代,结果仍为阴性的弃去。所有病毒分离在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级实验室进行(CNAS BLO010)。

1.2.3 1% 火鸡红细胞悬液

采集健康火鸡血与等体积的阿氏液混合,4℃,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,并充分除去鸡血中的白细胞和血清。加入 10 倍体积的灭菌生理盐水重悬红细胞,4℃,1500 r/min 离心 10 min。洗涤 3~5 次。最后根据红细胞压积,用灭菌生理盐水制备成终浓度为 1% 的红细胞悬液,置 4℃ 保存备用。

1.2.4 病毒基因组 RNA 提取及反转录

病毒 RNA 的提取采用 RNeasy Mini Kit 提取试剂盒,具体步骤参照说明书。RNA 反转录采用 Superscript III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) 试剂盒。合成的 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。

1.2.5 病毒特异性片段的 PCR 扩增以及序列测定

禽流感特异性鉴定引物采用农业部推荐的 M229 引物,引物序列如下 M229-F-(5'-TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'), M229-R-(5'-AAGCGCTC-TACGCTGCAGTCC-3')。

新城疫病毒特异性鉴定引物采用 F 基因切割位点序列引物,引物序列如下 NDV-F-(5'-GCAGCTGCAGGGATTGTGGT-3'), NDV-R-(5'-TCTTTGAGCAGGAGGATGTT G-3')^[8]。引物由上海英骏公司合成。PCR 产物纯化回收并测序。

2 结果

2.1 病毒分离

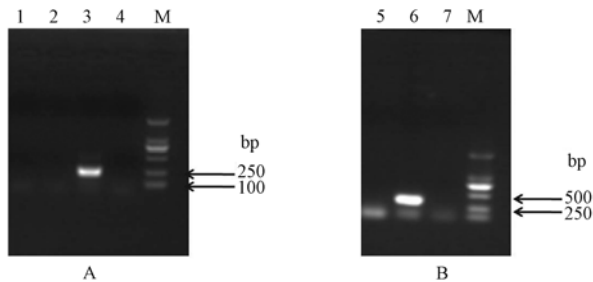
2013 年 4 月,我们对北京花鸟市场留鸟进行流感监测,共采集了 161 份肛拭子样品,其中麻雀 100 份,榆林燕 50 份,鸽子 10 份,鹦鹉 1 份。所有的样品均采自表面正常的鸟。对采集的样本进行处理后接种鸡胚,72 h 收集鸡胚尿囊液,进行血凝检测。总共检测到 2 份血凝阳性样品。一个来自鸽子,一个来自麻雀。

2.2 特异性鉴定引物 PCR 扩增结果

对血凝阳性的样品进行了基因组 RNA 提取,使用 random hexamers 进行反转录为 cDNA。利用针对禽流感病毒 M 基因的特异性鉴定引物对两个血凝阳性样品 cDNA 进行 PCR 扩增。经检测并未获得特异性条带(如图 1A),表明这两个血凝阳性样品,不是由禽流感病毒引起的血凝反应。

为了确定病毒的种类,使用针对新城疫病毒 F 基

因的特异性鉴定引物对这两个 cDNA 进行 PCR 扩增,从鸽子 cDNA 样品中扩增出 356 bp 的特异性片段(如图 1B)。测序发现为新城疫病毒 F 基因切割位点序列,进而确定从鸽子中分离到的是高致病性新城疫病毒。但是在麻雀中并未扩增出特异性片段。然而,我们对该麻雀样品使用流感的 NS 基因通用引物进行复查样品时,意外的扩增出了 650 bp 左右片段,测序鉴定为禽副黏病毒 2 型 HN 基因的片段,从而确定在麻雀中分到的病毒为禽副黏病毒 2 型。



注:A. 流感 M 基因检测结果; B. 新城疫病毒 F 基因检测结果; M. DNA 相对分子质量(DL 2000)。1. 鸽子血凝阳性样品 M 基因的 RT-PCR 产物; 2. 麻雀血凝阳性样品 M 基因的 RT-PCR 产物; 3. M 基因的阳性对照产物; 4. 阴性对照; 5. 阴性对照; 6. 鸽子血凝阳性样品 F 基因的 RT-PCR 产物; 7. 麻雀血凝阳性样品 F 基因的 RT-PCR 产物。

图 1 分离株的基因 RT-PCR 扩增产物

Note: A. PCR products of M gene; B. PCR products of F gene; M: DNA marker (DL2000); 1. PCR products of M gene in the hemagglutination-positive sample of a pigeon; 2. PCR products of M gene in hemagglutination-positive samples of tree sparrows; 3. Positive controls of PCR used with specific identification primers of M gene; 4. Negative controls of PCR used with specific identification primers of M gene; 5. Negative controls of PCR used with specific identification primers of F gene; 6. PCR products of F gene in hemagglutination-positive sample of a pigeon; 7. PCR products of F gene in hemagglutination-positive samples of tree sparrow.

Fig. 1 RT-PCR products of genes of the isolates

3 讨论

近年来,随着禽流感病毒在全世界范围的流行,病毒的变异也日渐加强,对人类的危害性也日益增大。2013 年 3 月 H7N9 疫情的爆发再次引起了人们极大的关注。现有数据表明,在上海的家禽市场已经检测到了与人感染 H7N9 类似的病毒,提示禽类是该病毒的宿主。虽然北京尚未发现 H7N9 感染人的情况,但这并不能表明没有 H7N9 病毒的存在,不能掉以轻心。在此时节,加大对活禽的流感流行病学调查,获得可靠的监测数据,为北京市制定 H7N9 的防控措施提供参考依据。尽管北京市禁止了家禽市场活禽交易,但是花鸟市场仍存在一些留鸟的交

易(麻雀、榆林燕、鸽子以及鹦鹉等一些观赏鸟类),此类鸟与人类存在密切的接触,特别是在流感高发时节极其危险,可见对此进行流感监测必不可少。

H7N9 疫情爆发之初,我们对北京花鸟市场中的留鸟进行了采样和病毒分离。集中采集了北京比较大的花鸟市场(十里河花鸟市场、小武基花鸟批发市场),此市场均与北京市其他花鸟市场存在频繁的留鸟贸易往来,具有广泛的代表性。发现在此花鸟市场留鸟群体中禽流感检测为阴性,表明该地区鸟类群体中并未有流感的流行,这可能与北京市较早禁止活禽贸易有极大的关系,大大减轻了外来活禽输入病毒的可能性。虽然并未在留鸟群体中检测到禽流感病毒,但考虑到采样量和采样次数的局限,尚需进一步研究。在留鸟中检测到流感外其他病毒的存在,并不是本文重点,在此不做详述。

总之,在对花鸟市场留鸟的流感监测过程中并未检测到流感病毒的存在,但我们仍需继续开展对花鸟市场流感病毒的分子流行病学研究,这对可能给人类健康带来的危害尤为重要,并对加强禽流感的综合防控有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza [J]. Lancet 2003, 362(9397):1733-1745.
- [2] Fouchier RA, Munster VJ, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls [J]. J Virol. 2005, 79(5): 2814-2822.
- [3] Zhu X, Yu W, McBride R, et al. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(4):1458-1463.
- [4] Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998 [J]. J Infect Dis. 2002, 185:1005-1010.
- [5] Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses; relationship between H9 N2 and H5N1 human isolates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:9654-9658.
- [6] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. Lancet, 2004, 21:363(9409):587-593.
- [7] WHO March 12, 2013, posting date. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN
- [8] Nanthakumar T, Kataria RS, Tiwari AK, et al. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis [J]. Vet Res Commun. 2000, 24(4):275-286.

[收稿日期] 2013-10-15