

· 现场调查 ·

广州市 2004 年某野生动物市场动物
携带 SARS-CoV 监测

王鸣 景怀琦 徐慧芳 蒋秀高 阚飙 刘起勇 万康林 崔步云 郑翰
崔志刚 闫梅英 梁未丽 王洪霞 齐小保 李振军 李马超 陈凯 张恩民
张守印 海荣 俞东征 徐建国

【摘要】 目的 了解广州市某野生动物市场动物携带严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 的动态变化, 预测 2004 - 2005 年冬季当地发生动物源性 SARS 的危险性。方法 在 SARS 发病相关月份采集广州市某野生动物市场动物的肛拭子和咽拭子标本, 使用实时荧光聚合酶链反应 (PCR) 初筛, 使用 RT-PCR 和序列分析方法核实。结果 在 2004 年 1 月 5 日广东省开始清除野生动物行动前采集的 31 只动物 (5 只赤狐、20 只猫、6 只黄毛鼠) 中, 有 8 只动物 SARS-CoV 检测阳性 (25.8%), 包括 3 只赤狐、4 只猫、1 只黄毛鼠。在 2004 年 1 月 20 日采集的 119 只动物 (6 只兔、13 只猫、46 只原鸡、13 只斑嘴鸭、10 只灰雁、31 只鹧鸪) 中, 仅 1 只灰雁的肛拭子检测阳性。2 - 11 月份采集的 102 只动物 (14 只灰雁、3 只猫、5 只兔、9 只斑嘴鸭、2 只鹧鸪、8 只雉鸡、6 只鸽、9 只黄麂、19 只山猪、16 只黄毛鼠、5 只犬、1 只水貂、3 只山羊、2 只绿孔雀) 中, 仅 4 月份采集的 1 只山猪的肛拭子标本阳性。11 - 12 月份在广东省采集的 22 只果子狸标本均为阴性。结论 和 SARS 流行或出现散发病例 2003 年 5 月、2004 年 1 月 5 日某野生动物市场动物的 SARS-CoV 的 RT-PCR 检测情况相比, 2004 年 1 月 20 日至 12 月广州市某野生动物市场的动物携带 SARS-CoV 的比例显著降低。11 - 12 月份采集的 12 只果子狸标本 RT-PCR 检测也为阴性。提示 2004 - 2005 年冬季发生动物源性 SARS-CoV 感染的危险性很小。

【关键词】 冠状病毒, 严重急性呼吸综合征; 果子狸; 野生动物市场

Surveillance on severe acute respiratory syndrome associated coronavirus in animals at a live animal market of Guangzhou in 2004 WANG Ming*, JING Huai-qi, XU Hui-fang, JIANG Xiu-gao, KAN Biao, LIU Qi-yong, WAN Kang-lin, CUI Bu-yun, ZHENG Han, CUI Zhi-gang, YAN Mei-ying, LIANG Wei-li, WANG Hong-xia, QI Xiao-bao, LI Zhen-jun, LI Ma-chao, CHEN Kai, ZHANG En-min, ZHANG Shou-yin, HAI Rong, YU Dong-zheng, XU Jian-guo. *Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujg@public.bta.net.cn State Key Laboratory for Infectious Diseases, National Institute of Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To study the prevalence of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) like virus in animals at a live animal market of Guangzhou in 2004 before and after culling of wild animal action taken by the local authority, in order to predict the re-emerging of SARS from animal originals in this region. **Methods** Animals at live animal market were sampled for rectal and throat swabs in triplicate. A single step realtime reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) diagnostic kit was performed for screening SARS-CoV like virus, the manual nested RT-PCR and DNA sequencing were performed for confirmation. Only specimens which tested positive for both of the N and P genes by nested RT-PCR were scored as positive. **Results** In 31 animals sampled in January 5 2004 before culling of wild animals at Guangdong Province, including 20 cats (*Felis catus*), 5 red fox (*Vulpes vulpes*) and 6 Lesser

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划专项基金资助项目 (2003AA208407)

作者单位: 510080 广州市疾病预防控制中心 (王鸣、徐慧芳); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室 (景怀琦、蒋秀高、阚飙、刘起勇、万康林、崔步云、郑翰、崔志刚、闫梅英、梁未丽、王洪霞、齐小保、李振军、李马超、陈凯、张恩民、张守印、海荣、俞东征、徐建国)

王鸣、景怀琦、徐慧芳和蒋秀高同为第一作者

通讯作者: 徐建国, Email: xujg@public.bta.net.cn

rice field rats (*Rattus losea*), 8(25.8%) animals were tested positive for SARS-CoV like virus by RT-PCR methods, of which 4 cats, 3 red fox and one Lesser rice field rats were included. However, two weeks after culling of animals and disinfection of the market were implemented, in 119 animals sampled in January 20 2004, including 6 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), 13 cats, 46 red jungle fowl (*Gallus gallus*), 13 spotbill duck (*Anas platyrhynchos*), 10 greylag goose (*Anser anser*), 31 Chinese francolin (*Francolinus pintadeanus*), only rectal swab from one greylag goose was tested positive for SARS-CoV like virus. Furthermore, in 102 animals that including 14 greylag geese, 3 cats, 5 rabbits, 9 spotbill duck (*Anas platyrhynchos*), 2 Chinese francolin (*Francolinus pintadeanus*), 8 common pheasant (*Phasianus colchicus*), 6 pigeons, 9 Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*), 19 wild boar (*Sus scrofa*), 16 Lesser rice field rats, 5 dogs, 1 mink (*Mustela vison*), 3 goats, 2 green peafowl (*Pavo muticus*) sampled in April, May, June, July, August and November, only rectal swab from one pig was tested positive. However, of 12 and 10 palm civets sampled in November and December including five of which had been at the live animals market for 2 days, none of them was tested positive. **Conclusion** This findings revealed that animals being sampled in April, May, June, July, August and November of 2004, only one rectal swab from a pig was tested positive as SARS-CoV like virus, much lower than the results from the previous year, suggesting that the possibility of re-emerging of human infection from animal origins is low for the winter of 2004-2005.

【Key words】 Coronavirus, severe acute respiratory syndrome; *Paguma larvata*; Live animal market

2003 年 5 月,管轶等^[1]从深圳东门市场的果子狸(*Paguma larvata*)、貉(*Nyctereutes procyonoides*)等动物检测分离到严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV),提示果子狸等野生动物是 SARS-CoV 样病毒的重要宿主。一些研究使用聚合酶链反应(PCR)等检测方法,发现可能携带 SARS-CoV 的动物还包括鼬獾(*Melogale moschata*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、铅色水蛇(*Enhydryis plumbea*)、犬面果蝠(*Cynopterus sphinx*)、中国穿山甲(*Manis pentadactyla*)、猫(*Felis catus*)、鸽子(*Columba livia*)等。发现果子狸、貉等动物是 SARS-CoV 的宿主具有重要意义。因为随着经济的高速发展,珠江三角洲地区对野生动物的需求不断增加,全国各地饲养的野生动物大多销往广东省。广州市野生动物市场是全国各种养殖野生动物的重要集散地,对动物进行 SARS-CoV 监测是有效控制 SARS 的关键^[2]。为了消除 SARS 的传染源,2003 年 5 月广东省将果子狸等清理出野生动物市场,8 月下旬多种野生动物重新进入市场^[3]。2003 年 12 月至 2004 年 1 月在广州市出现新的 SARS 病例时,管轶等发现野生动物市场的果子狸携带 SARS-CoV 的比例很高,且 S 基因序列和从患者标本检测的 S 基因序列高度同源^[4]。这些研究结果直接导致了广东省开展清除果子狸等野生动物的行动。我们于 2004 年 1 月 5 日在清除果子狸等动物的行动开始前,以及此后和 SARS 发病相关的月份,在广州市某野生动物市场多次采集动物样本,进行 SARS-CoV 检测^[5],结果报道如下。

材料与方法

1. 动物标本采集:使用病毒采样拭子采集动物的肛门拭子和咽部拭子标本,一式 3 份,以备核实。将采集标本拭子置于含 1 ml 病毒标本采集保存液的带螺口冷冻管中,立即置于 4℃ 保存。同时记录动物的品种、来源、饲养方式等资料。对每个采集样品的动物拍照,并剪取毛发,必要时进一步鉴定。动物种类的选择取决于市场有无和摊主的配合程度。采取随机方法选择动物个体。

2. SARS-CoV 检测:对采集的动物肛拭子和咽拭子标本进行病毒灭活处理,使用 QIAamp viral RNA mini kit 提取病毒 RNA 核酸。将 140 μl 标本中所提的 RNA 洗脱于 60 μl 无 RNA 酶的蒸馏水中。以上操作在生物安全 3 级实验室完成。使用深圳市匹基生物工程股份有限公司研制的新型冠状病毒核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒进行初筛,阳性标本使用手工巢式 RT-PCR 复核,并分离扩增片段,进行序列分析。匹基公司试剂盒的扩增引物和荧光探针是根据 SARS-CoV 序列(AI27874)的 pol 基因区设计的,反应体系中包括两组引物和探针,覆盖 pol 基因的两个不同位点,扩增片段长度分别为 192 bp 和 151 bp。所用仪器为 Roche Light Cycler 荧光 PCR 检测仪。按照说明书的规定判断结果:Ct 值 ≤ 37 为阳性;无 Ct 值或 Ct 值为 40 判断为阴性;Ct 值 > 37 的标本需要重复,重复的 Ct 值 < 40 则判断为阳性,否则为阴性^[6,7]。巢式 RT-PCR 的扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察拍照。

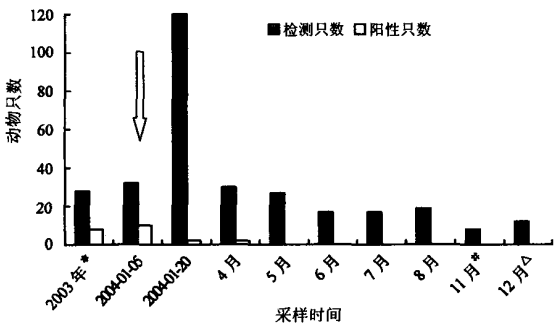
3. DNA 序列测定及分析:将巢式 RT-PCR 扩增

的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳回收并纯化,标本送国家人类基因组北京中心,利用 3730A 核酸自动测序仪进行序列测定。每个 PCR 扩增片段均双向测定 4 次,保证序列的准确性。利用 DNASTAR 软件进行序列拼接,对碱基变异较大的位点进行重复测序确证。所有序列均使用 MegAlign 软件进行多序列比对和分析。

4. SARS-CoV 基因阳性标本的判定标准:对使用匹基公司新型冠状病毒核酸扩增荧光检测试剂盒初筛阳性的动物标本,进行 SARS-CoV N、P 基因的手工 RT-PCR 检测,同时检测到 N、P 两个基因片段的标本,判断为 PCR 检测阳性,并进行序列分析。

结 果

2004 年 1 月 5 日广东省开始清除果子狸等野生动物行动前,我们在广州市某野生动物市场采集 31 只动物的标本,包括 5 只赤狐 (*Vulpes vulpes*)、20 只猫 (*Felis catus*)、6 只黄毛鼠 (*Rattus losea*),其中 8 只动物的标本 SARS-CoV RT-PCR 检测阳性 (25.8%)。包括 3 只赤狐的咽拭子标本 (阳性率 60%)、2 只猫的肛拭子和咽拭子标本 (20%)、1 只黄毛鼠的咽拭子标本 (表 1, 图 1)。所有检测的阳性标本均进行了 P 和 N 基因的测序,序列和发表的 SARS-CoV 序列一致。结果提示广州市某野生动物市场的动物携带 SARS-CoV 的情况严重。



注:①2003 年度的动物检测情况为管轶等^[1]报道。②2004 年 4-12 月份动物采集情况:4 月份猫 3 只、绿孔雀 (*Pavo muticus*) 2 只、灰雁 3 只、斑嘴鸭 3 只、鸽 3 只、山猪 5 只、犬 (*Canis familiaris*) 5 只、水貂 (*Mustela vison*) 1 只、山羊 3 只;5 月份灰雁 3 只、斑嘴鸭 3 只、鸽 3 只、黄毛鼠 4 只、山猪 2 只、黄鹿 (*Muntiacus reevesi*) 3 只、雉鸡 (*Phasianus colchicus*) 6 只;6 月份灰雁 3 只、斑嘴鸭 3 只、黄毛鼠 3 只、黄鹿 2 只、山猪 3 只;7 月份灰雁 2 只、山猪 6 只、黄鹿 2 只、鹧鸪 2 只、雄鸡 2 只;8 月份灰雁 3 只、山猪 3 只、黄毛鼠 9 只、黄鹿 2 只;11 月份兔 5 只、果子狸 12 只;12 月份果子狸 10 只。1 月 5 日和 20 日采集动物的种类和数量见文中结果。③箭头为广东省开始加强管理野生动物行动的日期。* 深圳市动物市场;# 广州市果子狸;△ 深圳市果子狸

图1 2003-2004 年广州市某野生动物市场动物携带 SARS-CoV 监测

表1 2004 年 1 月 5 日广州市某野生动物市场采集动物标本 SARS-CoV 检测结果

动物品种	编号	咽拭子	肛拭子
赤狐 (<i>Vulpes vulpes</i>)	CF1	+	-
	CF2	+	-
	CF3	+	-
	其余 2 只	-	-
家猫 (<i>Felis catus</i>)	D006	-	+
	D019	-	+
	D013	+	-
	D007	+	-
	其余 16 只	-	-
黄毛鼠 (<i>Rattus losea</i>)	B021	+	-
	其余 5 只	-	-

注: + 为 SARS-CoV 检测阳性; - 为 SARS-CoV 检测阴性

广东省对野生动物进行清理和消毒后,于 1 月 20 日我们在同一市场采集了 119 只动物的标本,包括 6 只兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、13 只猫、46 只原鸡 (*Gallus gallus*)、13 只斑嘴鸭 (*Anas platyrhynchos*)、10 只灰雁 (*Anser anser*)、31 只鹧鸪 (*Franclinus pintadeanus*)。除了 1 只灰雁的肛拭子的 RT-PCR 检测阳性外,其余 118 只动物均为阴性 (图 1)。另于 4-8 月和 11 月采集了各种动物 102 只 (图 1)。除了 4 月份采集的 1 份山猪 (*Sus scrofa*) 的肛拭子标本 RT-PCR 检测阳性外,其余标本均为阴性。

为了解 2004-2005 年冬季广东省野生动物市场外可能存在的果子狸携带 SARS-CoV 的情况,我们 11 月份在广州市采集了 12 只果子狸标本,其中来自湖南省 5 只、湖北省 4 只、福建省 3 只,而来自湖南省的 5 只果子狸曾在广州市某野生动物市场停留 2 天。所有 12 只果子狸的肛拭子和咽拭子标本的 RT-PCR 检测均为阴性。我们还于 2004 年 11 月 30 日至 12 月 2 日在深圳市采集了 10 只果子狸标本,其中来自陕西省 4 只、湖南省 6 只,RT-PCR 检测结果也为阴性。

讨 论

流行病学调查资料提示,果子狸是 SARS-CoV 的重要宿主之一^[8-10]。果子狸携带的 SARS-CoV 有可能传染给人^[11]。2003-2004 年冬季广州市发生的 4 例 SARS 患者中,第 2 例为经营果子狸餐馆的服务员,第 4 例在发病前 7 天曾经在该餐馆就过餐,第 3 例患者发病前也曾在经营果子狸的餐馆就过餐。因此,提供果子狸服务的餐馆可能属于高危场所^[12]。调查发现,餐馆的果子狸是从野生动物市场

购买的。我们认为,可能是某种目前还不明确的动物把 SARS-CoV 带进了野生动物市场,感染了果子狸。果子狸对 SARS-CoV 非常敏感,病毒可在果子狸体内迅速繁殖、传播、进化、排泄,感染其他动物。野生动物市场可能被 SARS-CoV 严重污染,成为传染源^[5]。因此,对野生动物市场的动物进行长期监测,有可能了解野生动物携带 SARS-CoV 情况,起到疫情预警作用,即使是已经将果子狸等清除出市场的情况下,仍存在其他动物把病毒带进市场的可能性。

管轶等^[1]报道,2003 年 5 月 SARS 流行期间在深圳市某野生动物市场检测的 25 只野生动物中,有 5 只使用 RT-PCR 方法检测到 SARS-CoV (阳性率 20%)。该研究包括 6 只果子狸,其中 2 只 RT-PCR 检测阴性,但分离到了 SARS-CoV。果子狸携带 SARS-CoV 可能具有季节性特点,5 月份可能不是果子狸 SARS-CoV 携带率最高的月份。这也许能够解释,2003 年 5—7 月份一些研究机构在对果子狸携带 SARS-CoV 的调查中,为什么出现了截然不同的结果。能够反映野生动物携带 SARS-CoV 的情况和发生 SARS 关系的月份可能不是在 5 月份,而是 11、12、1 月份。因为 2002—2003 年和 2003—2004 年冬季, SARS 早期病例均出现于 12 月份左右。2004 年 1 月 5 日,在广东省开始清理野生动物前,广州市某野生动物市场动物的 SARS-CoV PCR 检测阳性率为 25.8% (共检测 31 只动物,不包括果子狸)。应该说在消除果子狸等野生动物前采集的标本,能够反映野生动物市场动物携带 SARS-CoV 的真实情况,及其与发生 SARS 的关系。

广东省采取清除果子狸行动 2 周后,在 2004 年 1 月 20 日至 11 月采集的 223 只动物中仅 2 只动物的 SARS-CoV RT-PCR 检测阳性。2004 年 11—12 月份采集的 22 只果子狸的检测结果也为阴性。说明加强野生动物管理对消除 SARS-CoV 的动物传染源是有效的。虽然在该野生动物市场已经不能够获得果子狸的标本,我们采集标本的种类和数量也取决于市场有无,以及摊主的配合程度。但是,这些标本应该在一定程度上反映市场是否仍然存在污染或者污染的程度。

如果 SARS 发生和果子狸等野生动物携带

SARS-CoV 的状况有关,与 2002—2003 年、2003—2004 年发生 SARS 时的野生动物市场动物的 SARS-CoV RT-PCR 检测阳性率相比,2004—2005 年冬季发生动物源性 SARS-CoV 感染的危险性明显降低。但我们的资料并不排除发生 SARS 病例的可能性。应继续寻找 SARS-CoV 的宿主动物,加强野生动物市场和养殖场野生动物携带 SARS-CoV 的监测,特别应注意 SARS-CoV 的其他途径来源,防患于未然^[11]。

参 考 文 献

- 1 Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 2003, 302: 276-278.
- 2 Normile D. Infectious diseases. SARS experts in China urge wider animal testing. *Science*, 2003, 301: 1303-1304.
- 3 Normile D, Yimin D. Infectious diseases. Civets back on China's menu. *Science*, 2003, 301: 1031.
- 4 Normile D. Infectious diseases. Viral DNA match spurs China's civet roundup. *Science*, 2004, 303: 292.
- 5 Webster RG. Wet markets — a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet*, 2004, 363: 234-236.
- 6 Lau LT, Fung YW, Wong FP, et al. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 1290-1296.
- 7 Wu X, Cheng G, Di B, et al. Establishment of a fluorescent polymerase chain reaction method for the detection of the SARS-associated coronavirus and its clinical application. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116: 988-990.
- 8 Xu RH, He JF, Evans MR, et al. Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 1030-1037.
- 9 徐慧芳,王鸣,张周斌,等.广州市野生动物批发市场从业人员 SARS 冠状病毒感染的流行病学研究. *中华预防医学杂志*, 2004, 38: 81-83.
- 10 王鸣,徐惠芳,张周斌,等.广州市动物市场从业人员 SARS 冠状病毒感染的危险因素分析. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 503-505.
- 11 Poon LL, Guan Y, Nicholls JM, et al. The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4: 663-671.
- 12 Liang G, Chen Q, Xu J, et al. Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong Province, China. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 1774-1781.

(收稿日期:2004-12-31)

(本文编辑:张林东)