

长沙市家禽市场环境 H5N1 亚型禽流感病毒传播风险研究

张如胜 欧新华 宋克云 袁洁 陈田木 肖姗 孙边成

【摘要】 目的 对长沙市家禽市场职业暴露人群进行禽流感病毒(AIV)H5N1 亚型抗体水平和环境 AIV 核酸检测,并对环境中 AIV H5N1 亚型的血凝素(HA)基因进行测序分析。**方法** 抽取长沙市 1 个区和 1 个县,各选择 2 个城区或乡镇家禽市场进行职业暴露人群 H5N1 抗体和环境 AIV 核酸检测。利用单放射免疫扩散溶血实验(SRH)对 102 份家禽市场职业暴露人员血清标本进行 H5N1 抗体检测,real-time PCR 方法检测 160 份家禽市场环境标本(污水、禽类粪便、羽毛和禽类笼具表面涂抹标本)AIV 核酸,对 4 份污水 H5N1 亚型 AIV 核酸阳性标本进行 HA 基因 RT-PCR 扩增和 TA 克隆测序,测序结果利用 Lasergene 和 Mega 5.0 软件进行氨基酸比对和进化树构建。**结果** AIV H5N1 抗体监测结果显示,家禽市场职业暴露人群血清 H5N1 抗体阳性率为 25.5%(26/102),其中乡镇和城区家禽市场职业暴露人群阳性率分别为 50.0%(9/18)和 25.4%(17/67),乡镇家禽市场职业暴露人群阳性率高于城区。长沙市家禽市场环境 H5 亚型 AIV 核酸阳性率为 31.3%(50/160),其中乡镇家禽市场阳性率为 37.3%(31/83),高于城区家禽市场 24.7%(19/77);不同标本 H5 亚型 AIV 核酸阳性率不同:污水(50.0%,24/48)、羽毛(44.5%,4/9)、禽类粪便(29.8%,14/47)和禽类笼具表面涂抹(14.3%,8/56);差异均有统计学意义($P < 0.01$)。TA 克隆测序得到 4 个 AIV H5N1 亚型 HA 基因序列,进化树显示 4 个 AIV H5N1 亚型 HA 基因与中国内地和香港禽来源的 AIV 分离株为同一分组,属于欧亚分支;4 个 AIV H5N1 亚型 HA 基因受体结合位点氨基酸序列仍然为禽源(QSG)、HA1 和 HA2 蛋白之间连接肽为多个碱性氨基酸序列(RERRRKK 或 RERRGKK),与人源 AIV H5N1 亚型具有相同的受体结合位点和高致病性的分子特征。**结论** 长沙市家禽市场环境中存在较多数量的 AIV H5N1 亚型,是导致职业暴露人群抗体阳性率达 25.5%的原因之一;环境中存在的 AIV H5N1 亚型 HA 基因表现出来的高致病性分子特征,增加了家禽市场环境发生 AIV 传播的风险。

【关键词】 环境;禽流感病毒;职业暴露;H5N1 抗体

Risk related to the transmission of H5N1 subtype avian influenza virus in the environment of poultry markets in Changsha, China ZHANG Ru-sheng, OU Xin-hua, SONG Ke-yun, YUAN Jie, CHEN Tian-mu, XIAO Shan, SUN Bian-cheng. Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410006, China

Corresponding author: ZHANG Ru-sheng, Email: zhangrusheng111@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Medical Scientific Research Foundation of Hunan province, China (No. B2011-121).

【Abstract】 Objective To investigate the risk of H5N1 subtype avian influenza virus (AIV) transmission in the poultry market environment in Changsha city. H5N1 antibody levels among the groups related occupational exposure and AIV nucleic acid in the environment of poultry markets were detected. The characteristics of hemagglutinin (HA) genes of H5N1 AIV in the environment were analyzed. **Methods** One district and one county from Changsha city were selected randomly and two poultry markets at inner city or township levels were selected in the same district or county respectively. H5N1 antibody of the occupational exposure groups in the poultry market was tested and AIV nucleic acid in the poultry market environment monitored. One hundred and two blood samples of the occupational exposure groups were tested for H5N1 antibody with single radioimmunoassay

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.08.003

基金项目:湖南省医药卫生科研计划项目(B2011-121)

作者单位:410006 长沙市疾病预防控制中心

通信作者:张如胜, Email: zhangrusheng111@yahoo.com.cn

diffusion hemolysis (SRH) while 160 environment samples (from sewage, birds stools, feathers and smearing samples of poultry cages) in the poultry market were also detected for AIV nucleic acid with real-time PCR method. Four sewage samples of H5N1 subtype AIV were collected from poultry markets in Changsha, and the HA genes of H5N1 subtype AIV amplified by RT-PCR and then sequenced with TA cloning. Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis were conducted by Lasergene and Mega 5.0 software. **Results** The results through H5N1 antibody monitoring program showed that H5N1 antibody positive rates from workers were 25.5% (26/102), 50.0% (9/18) and 25.4% (17/67) respectively in the poultry markets of township and inner cities. H5N1 antibody positive rate in the township poultry markets was higher than in the inner cities poultry markets. Results from the surveillance on AIV nucleic acid showed that the overall H5 subtype positive rate in Changsha poultry markets was 31.3% (50/160), and the positive rate of townships poultry markets was 37.3% (31/83), which were both higher than those from the inner cities poultry markets (24.7%, 19/77). H5 subtype AIV positive rate was different in the tested specimens, with ranking of positive rates were sewage (50.0%, 24/48), feathers (44.5%, 4/9), birds stools (29.8%, 14/47) and smearing samples of poultry cages (14.3%, 8/56), with statistically significant differences ($P < 0.01$). Four H5N1 HA genes TA cloning were successfully constructed and identified as Eurasian branch, similar to viruses isolated in mainland China and Hong Kong in the same group, according to genetic analysis. Sequence data of the four HA genes showed the same feature of high pathogenicity, compared to the H5N1 AIV from mainland China of human origin. The receptor specificities were still with avian influenza origin (QSG) and the connecting peptide between HA1 and HA2 possessing the polybasic motif (RERRRKK or RRRGKK). **Conclusion** One of the reasons for H5N1 antibody positive rate of 25.5% among poultry markets workers was that there were large numbers of H5N1 subtype AIV detected in the environment of poultry markets and HA genes of H5N1 subtype AIV in the poultry markets environment carried molecular characteristics of highly pathogenic which could increase the risk for H5N1 subtype AIV transmission in the environment of poultry markets.

【Key words】 Environment; Avian influenza virus; Occupational exposure; H5N1 antibody

A 型流感病毒根据其表面蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同,目前可分为 16 个 HA 亚型(H1~H16)和 9 个 NA 亚型(N1~N9)^[1]。近年来,A 型禽流感病毒(AIV)的某些亚型(如 H5N1)已突破种间屏障,导致人感染高致病性禽流感,WHO 数据显示,自 2003 年 11 月至 2010 年 3 月,全球共有 15 个国家和地区出现人禽流感疫情,其中,2010 年人感染高致病性 H5N1 禽流感实验室诊断病例 48 例,死亡 24 例^[2,3]。2009 年 1 月,长沙市出现首起人感染禽流感疫情,实验室检测结果和流行病学调查均支持家禽市场为可疑感染源^[4]。为此本研究对长沙市家禽市场职业暴露人群血清 AIV H5N1 抗体水平和环境 AIV 进行病原学监测、基因序列测定和分子特征分析。

材料与方 法

1. 仪器和试剂: 7300 Real Time PCR System, GeneAmp PCR System 9700 (美国 AB 公司), Centrifuge 5415R (德国 Eppendorf 公司), Powerpac™ Universal (美国 BIO-RAD 公司), SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq, SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR System (美国 Invitrogen 公司), Rneasy® Mini Kit (德国 Qiagen 公司); 禽流感灭活抗原 A/Anhui/1/05

(H5N1)HA: 25 610/12/08、冻干标准参考血清 A/Anhui/1/2005(H5N1)效价 >1280 等由国家流感中心提供;补体由湖南省疾病预防控制中心流感实验室提供;1%鸡血球由本实验室制备。

2. 职业暴露人群血清 H5N1 抗体水平监测: 以长沙市辖区活禽批发市场和城乡家禽市场直接与禽类接触的人员为研究对象,参照《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案》^[5]监测点选择要求,选择长沙市 1 个区和 1 个县,各分别选择 1 个城区街道或乡镇中按照禽类市场规模和曾经是否发生禽流感疫情等要求将 4 个家禽市场和 102 名禽类职业暴露人员全部纳入监测,采集职业人员血液标本 5 ml,利用单放射免疫扩散溶血技术(SRH)进行 H5N1 抗体检测;SRH 操作步骤参照《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案》和文献方法^[5,6]。

3. 环境 AIV 病原学监测: 按照《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案》环境标本采集要求^[5],将长沙市 4 个家禽市场(2 个乡镇、2 个城区)AIV 病原学监测点中的家禽销售摊位作为采样点,于 1、4、7—12 月共采集家禽市场环境标本 160 份(污水、禽类粪便、禽类笼具表面涂抹和羽毛标本),其中乡镇家禽市场环境标本 83 份,城区家禽市场环境标本 77 份。利用国家流感中心提供的引物、探针

和 real-time PCR 方法进行检测,具体检测步骤参照《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案》进行^[5]。

4. 环境中 AIV H5N1 亚型 HA 基因核苷酸序列测定:从家禽市场环境检出的 AIV H5N1 亚型阳性标本中选择4份污水标本进行 RNA 提取,然后利用 SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq 进行 HA 基因扩增,反应体积(25 μl):不含核酸酶的水 6.0 μl;2×PCR 反应缓冲液 12.5 μl; Platinum® Taq 酶混合液 1.0 μl; RNA 标本 5.0 μl; 20 μmol/L Bm-HA-1、Bm-NS-890R 引物各 0.25 μl (引物序列参考文献[7], Bm-HA-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G; Bm-NS-890R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT), HA 基因预期扩增片段长度为 1800 bp; 反应条件^[7]: 60 °C 60 min, 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 68 °C 6 min, 35 个循环; 68 °C 6 min。取约 10 μl RT-PCR 产物与 2.0 μl 上样缓冲液混匀后进行 90 V 琼脂糖凝胶电泳 40 min, 随后将目的 DNA 片段切胶、纯化回收, 然后与 pMD18-T (Promega) 载体连接, 转化感受态细胞 DH5α, 涂布含氨苄青霉素的 LB 选择平板, 37 °C 培养后进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司完成核苷酸序列测定。

5. 环境中 H5N1 亚型 AIV HA 基因分子特征分析: HA 基因测序结果提交至美国国立生物信息中心 (NCBI) 后进行在线 BLAST 同源性分析, 利用 Lasergene 和 Mega 5.0 软件进行同源性分析并构建进化树。

结 果

1. 职业暴露人群血清 H5N1 抗体水平监测: SRH 方法的判断标准为: 溶血圈直径 ≥ 4 mm (溶血圈面积 ≥ 9.42 mm²) 判断为阳性。102 名职业暴露人员中 H5N1 抗体阳性 26 名 (25.5%), 其中乡镇家禽市场职业暴露人员阳性率为 50.0% (9/18), 城区家禽市场职业暴露人员阳性率为 25.4% (17/67), 结果表明, 乡镇家禽市场职业暴露人员 H5N1 抗体阳性率明显高于城区家禽市场职业暴露人员^[6], 经统计学检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=11.51, P=0.003 17$)。

2. 环境 AIV 病原学监测: 对 160 份家禽农贸市场的环境标本进行 AIV 核酸检测, 其中 83 份乡镇家禽市场环境检出 H5 亚型 AIV 阳性标本 31 份, 阳性率为 37.3%; 从 77 份城区家禽市场环境检出 H5

亚型 AIV 阳性标本 19 份, 阳性率为 24.7%, 乡镇家禽市场 H5 亚型 AIV 阳性率高于城区家禽市场。从表 1 可知, 160 份环境标本中, 56 份 AIV 核酸阳性, 阳性率为 35.0%; 50 份 H5 亚型 AIV 阳性, 阳性率 31.3%。不同标本 AIV 核酸阳性率不同。H5 亚型 AIV 的阳性率由高到低依次均为污水、羽毛、禽类粪便、禽类笼具表面涂抹, 经统计学检验, 差异均有统计学意义。

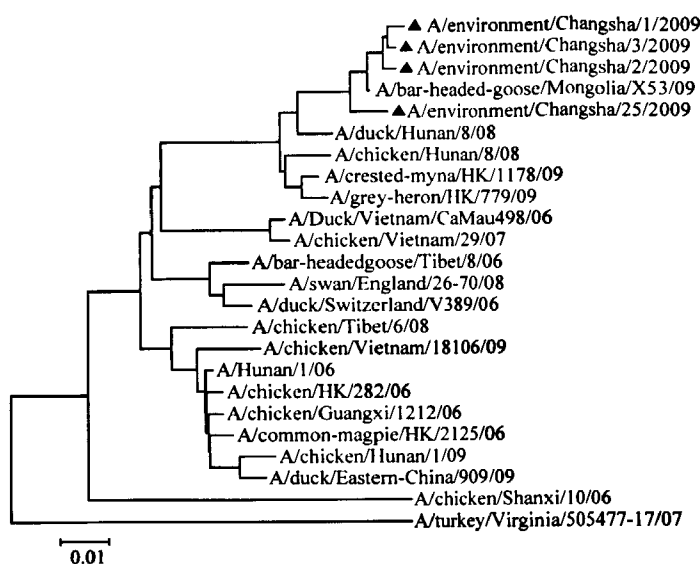
表 1 长沙市 4 个家禽农贸市场不同标本 AIV 核酸阳性情况

标本	份数	AIV 阳性		H5 亚型阳性	
		份数 ^a	率(%)	份数 ^a	率(%)
污水	48	25	52.1	24	50.0
粪便	47	17	36.2	14	29.8
笼具(门)	56	9	16.1	8	14.3
羽毛	9	5	55.6	4	44.5
合计	160	56	35.0	50	31.3

注: ^a AIV: $\chi^2=16.677, P=0.000 82$; ^b H5 亚型: $\chi^2=16.132, P=0.001 07$

3. 环境中 AIV H5N1 亚型 HA 基因核苷酸序列测定: 4 份污水标本 HA 基因序列 (JN543373、JN543374、JN543375、JN543378), 全长 1745 bp, 包含了 HA 完整的开放阅读框架, 共编码 567 个氨基酸。BLAST 同源性比较显示, 3 份环境标本 HA 基因序列 (JN543373、JN543374、JN543375) 与 H5N1 亚型 AIV 分离株 (A/bar-headed goose/Mongolia/X53/2009) 高度同源, 同源性为 99%; 另外 1 份环境标本 HA 基因序列 (JN543378) 与 H5N1 亚型 AIV 分离株 (A/bean goose/Tyva/10/2009) 高度同源, 同源性亦为 99%。本研究选择 2006 年以后公布在 NCBI 的人源或禽源 H5N1 HA 基因序列构建进化树, 进化树显示两个大的主要分支: 欧亚和北美 (图 1), 其中, 本研究中 4 个环境来源的 H5N1 HA 基因序列与中国内地、香港等地 H5N1 分离株为同一分组, 属于欧亚分支, 与分离自湖南地区的 A/duck/Hunan/8/08 H5N1 亚型 AIV HA 基因亲缘关系较近, 证实 H5N1 亚型 AIV 分离株的进化分支存在地域性的特点^[9]。

将本研究中的 4 个环境来源 H5N1 病毒 HA 基因与湖南地区近年来分离的禽源和人源 H5N1 病毒 HA 基因序列进行比较, 结果显示本地区不同来源 H5N1 病毒 HA 基因之间的氨基酸和核苷酸同源性分别为 92.1% ~ 99.5%、93.3% ~ 99.4%, 其中环境来源的 H5N1 病毒 HA 基因与本地区禽源 H5N1 病毒分离株 (A/duck/Hunan/8/08) 的氨基酸和核苷酸同源性最高, 分别为 97.4% ~ 97.7%、97.5% ~ 97.9%, 高于本地区人源 H5N1 病毒分离株 (A/Hunan/1/2006) 的氨



注:▲:本研究环境标本 H5N1 HA 基因

图 1 长沙市 4 个家禽农贸市场环境标本的 H5N1 HA 基因进化树

氨基酸和核苷酸同源性 (93.7% ~ 94.0%、94.4% ~ 94.6%)。表明长沙市家禽市场环境来源的 H5N1 病毒与湖南地区禽源和人源 H5N1 AIV 分离株 HA 基因同源性高 (表 2)。

4. 环境中 AIV H5N1 亚型 HA 基因分子特征: 因 HA 蛋白在流感病毒感染过程中起识别和吸附宿主细胞受体的作用,故 AIV HA 基因受体结合位点的氨基酸组成在一定程度上可以决定病毒感染的宿主特异性, AIV 的受体结合位点由位于 HA1 上的 98、153、183、190、194、225、226 和 228 位的氨基酸所组成。氨基酸编码序列分析显示 4 个环境来源的 H5N1 HA1 蛋白 98、153、183、190、194、225、226 和 228 位的受体结合位点均相同: N、W、H、E、L、G、Q、

G, 特别是 226 ~ 228 位 (H3 型流感病毒编码氨基酸位点, 对应本研究中 238 ~ 240 位) 氨基酸为 QSG (表 3), 表明其受体特异性是禽源的, 与人源 AIV 相似, 而不是人源流感病毒的 LSS 序列^[10, 11]。同时, 4 个环境来源标本的 H5N1 HA 编码氨基酸的 HA1 和 HA2 之间连接肽 (339 ~ 345 位) 为多个碱性氨基酸 (RERRRKK 或 RERRGKK), 见表 3; 与人源 H5N1 亚型 AIV 具有相同的高致病性特点, 与人源流感病毒只具有一个碱性氨基酸相比完全不同^[12]。

讨 论

H5N1 抗体的检测方法主要有红细胞凝集抑制 (HI) 试验、微量中和试验和 SRH 试验^[13], 其中 HI 试验具有敏感性低且易受血清中非特异性抑制素影响的不足之处; 微量中和试验须用活病毒, 必须在 BSL III 级实验室内进行检测, 应用范围受到限制; 而 SRH 方法具有简便、准确、可靠、特异和敏感性高, 不受血清中非特异性抑制素影响, 血清用量少, 可对大量血清标本进行检测, 在流行病学调查方面应用最为广泛^[14]。如, 利用 HI 试验对 2004 年珠海市禽类从业人员进行 H5 抗体检测^[15], 阳性率仅为 0.4%; 广州市家禽零售和饲养人员进行 H5 抗体检测^[16], 职业人群抗体水平很低甚至未检测出阳性; Bridges 等^[17]采用微量中和实验对香港 1525 名禽类职业人员进行 H5 抗体检测, 阳性率为 10.0%。本研究利用 SRH 方法对长沙市家禽农贸市场职业人群血清标本进行 H5N1 抗体水平监测时发现, 2009 年长沙市职业暴露人群感染率高, H5N1 抗

表 2 长沙市 4 个家禽农贸市场环境、禽源和人源标本 H5N1 AIV 间 HA 基因氨基酸和核苷酸同源性分析

病毒株	CS-1	CS-2	CS-3	CS-25	D0703	D0808	C0808	C0901	H0601	H0801	H0901	H0902
CS-1		99.1	99.5	98.2	97.2	97.5	96.6	92.1	93.7	92.9	92.9	92.6
CS-2	99.4		99.3	98.2	97.2	97.5	96.6	92.1	93.7	92.9	92.9	92.6
CS-3	99.3	99.1		98.4	97.4	97.7	96.8	92.2	93.8	93.1	93.1	92.8
CS-25	98.4	98.2	98.1		97.4	97.4	96.8	92.4	94.0	93.3	93.3	92.9
D0703	97.8	97.6	97.5	97.5		98.8	99.5	94.2	95.8	95.1	94.7	94.7
D0808	97.9	97.8	97.7	97.5	98.5		98.2	93.7	95.2	94.5	94.5	94.2
C0808	97.5	97.4	97.3	97.3	99.3	98.3		93.7	95.2	94.5	94.2	94.2
C0901	93.4	93.3	93.3	93.4	94.6	94.1	94.5		98.2	96.8	97.4	97.4
H0601	94.6	94.4	94.4	94.6	95.8	95.2	95.7	97.8		98.2	98.4	98.4
H0801	93.6	93.5	93.5	93.9	94.8	94.3	94.7	96.8	97.9		97.5	97.4
H0901	93.5	93.5	93.5	93.5	94.7	94.2	94.5	96.2	97.3	96.8		98.2
H0902	93.4	93.3	93.3	93.3	94.5	93.9	94.3	96.4	97.4	96.9	97.9	

注: 黑体数据为氨基酸同源性 (%), 白色数据为核苷酸同源性 (%); CS-1: A/environment/Changsha/1/2009 (H5N1); CS-2: A/environment/Changsha/2/2009 (H5N1); CS-3: A/environment/Changsha/3/2009 (H5N1); CS-25: A/environment/Changsha/25/2009 (H5N1); D0703: A/duck/Hunan/3/2007 (H5N1); D0808: A/duck/Hunan/8/08 (H5N1); C0808: A/chicken/Hunan/8/2008 (H5N1); C0901: A/chicken/Hunan/1/2009 (H5N1); H0601: A/Hunan/1/2006 (H5N1); H0801: A/Hunan/1/2008 (H5N1); H0901: A/Hunan/1/2009 (H5N1); H0902: A/Hunan/2/2009 (H5N1)

表 3 H5N1 病毒受体特异性和连接肽特性分析

病毒来源	连接肽	受体 (AA 226 ~ 228)
A/environment/Changsha/1/2009	QRERRRKKRG	QSG
A/environment/Changsha/2/2009	QRERRGKKRG	QSG
A/environment/Changsha/3/2009	QRERRRKKRG	QSG
A/environment/Changsha/25/2009	QRERRRKKRG	QSG

体阳性率达到 25.5%，乡镇家禽农贸市场职业暴露人群阳性率高达 50.0%，高于城区职业暴露人群阳性率(25.4%)。可见长沙市职业暴露人群 H5N1 抗体阳性率高于国内其他城市职业暴露人群，可能与 H5N1 抗体监测中选择的实验方法有关。本研究血清学监测结果显示，乡镇家禽市场职业暴露人群血清 H5N1 抗体阳性率为 50.0%，高于城区职业人群 25.4% 的阳性率，导致不同区域家禽市场职业暴露人群血清 H5N1 抗体阳性率存在差异的原因除了与家禽市场环境存在较多数量的 AIV H5N1 有关外，可能还与职业暴露人群接触禽类的方式有关，现场调查发现城区家禽市场以禽类批发销售为主，而乡镇家禽市场职业暴露人员需要从事现场宰杀、清洗活禽和拔毛等工作，频繁裸手接触家禽内脏、排泄物等存在 AIV 的部位是其血清 H5N1 抗体阳性率高于城区家禽市场职业暴露人员的可能原因。有研究也发现农贸市场零售人员中禽流感病毒感染阳性率高的原因可能与家禽接触的密切程度有关^[6]。本研究在调查中发现乡镇家禽市场职业暴露人员多为夫妻搭档，捕杀、清洗、拔毛等工作分工不明显，未能进一步分析是什么工作程序与血清 H5N1 抗体阳性率高达 50.0% 有关。

本研究显示，长沙市家禽市场环境中 H5 亚型 AIV 核酸阳性率为 31.3%，其中乡镇家禽市场阳性率为 37.3%，高于城区家禽市场阳性率(24.7%)，原因可能与采样时间存在关系，乡镇家禽市场采样时间(08:00—10:00)均在营业高峰期，未进行消毒和清扫工作，而城区家禽批发市场部分商家的营业时间在凌晨 03:00—06:00，采样时部分商家已进行过消毒清扫工作，导致环境标本中的病毒量相应减少。家禽市场环境中不同标本 AIV 核酸阳性率也存在差异，H5 亚型 AIV 的阳性率由高到低依次均为污水(50.0%)、羽毛(44.5%)、禽类粪便(29.8%)、禽类笼具表面涂抹(14.3%)。可见家禽市场环境中存在较多数量的 AIV H5 亚型，也是导致职业暴露人群 H5N1 抗体阳性率达 25.5% 的原因之一^[8]。

以往研究表明^[18]，AIV 在地理上可分为两个分支——欧亚和北美。Chen 等^[9]对 2003—2005 年分

离自亚洲的 121 株 AIV H5N1 亚型 HA 基因构建进化树，分析显示，2006 年以前的毒株基本上是按照其来源的地理区域分成若干谱系。本研究中家禽市场环境来源的 4 个 H5N1 亚型 AIV HA 基因与中国内地、香港等地的禽类 H5N1 分离株为同一分组，属于欧亚分支，与分离自湖南的 A/duck/Hunan/8/08 和蒙古的 A/bar-headed goose/Mongolia/X53/2009 H5N1 亚型 AIV 分离株 HA 基因亲缘关系近，既证实了 H5N1 亚型 AIV 分离株的进化分支存在地域性的特点^[10]，又表明随着禽类贸易的密切和候鸟的迁徙造成了 AIV 的跨地域性^[19]。高致病性 AIV 在 HA 裂解位点处有多个碱性氨基酸，能被广泛分布在全身各组织和器官的蛋白酶所识别，造成全身感染^[20,21]，故高致病性 AIV 致病力的分子基础是 HA1 和 HA2 连接肽处的多个碱性氨基酸序列。同源性比较显示 4 个家禽市场环境来源的 H5N1 HA 基因与湖南地区近年来分离的禽源和人源 H5N1 病毒相比不但序列同源性高，而且还具有相似的分子特征：HA1 和 HA2 裂解位点处有多个碱性氨基酸，证实环境中的 H5N1 亚型 AIV 具有高致病性的基因特征，表明家禽市场环境中的 H5N1 亚型 AIV 具备发生传播的风险。

综上所述，家禽农贸市场环境中持续存在高致病性的 AIV H5N1 亚型，是职业暴露人群 H5N1 抗体阳性率达 25.5% 的原因之一，同时也增加了家禽市场 H5N1 亚型 AIV 传播至普通人群的风险。

参 考 文 献

- [1] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Viol*, 2005, 79(5):2814-2822.
- [2] Guo YJ. An overview of human influenza research. *Chin J Exp Clin Virol*, 2004, 18(3):294-296. (in Chinese)
郭元吉. 人禽流感研究现状. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(3):294-296.
- [3] Gong ZY, Yang XP. Case reports of human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in global in 2010. *Dis Surveill*, 2011, 26(11):923-924. (in Chinese)
龚震宇, 杨小平. 2010 年全球人感染高致病性禽流感(H5N1)病例的报告. *疾病监测*, 2011, 26(11):923-924.
- [4] Liu RC, Wang XZ, Chen TM, et al. Epidemiological survey of first influenza H5N1 infection in Changsha city. *Chin Trop Med*, 2010, 10(10):1209-1210, 1248. (in Chinese)
刘如春, 王晓之, 陈田木, 等. 长沙市首起人感染 H5N1 疫情流行病学调查. *中国热带医学*, 2010, 10(10):1209-1210, 1248.
- [5] Monitoring program for blood serum of occupational exposure

- groups and highly pathogenic avian influenza in environmental. <http://www.cnic.org.cn/chn/down/showdown.php?downid=662>. (in Chinese)
- 职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案. <http://www.cnic.org.cn/chn/down/showdown.php?downid=662>.
- [6] Yuan J, He F, Su L, et al. Risk analysis of avian influenza virus H5N1 subtype infection in different occupation groups. *Chin Trop Med*, 2011, 11(5): 573-574. (in Chinese)
- 袁洁, 贺锋, 苏良, 等. 不同职业暴露人群感染 H5N1 禽流感病毒风险性分析. *中国热带医学*, 2011, 11(5): 573-574.
- [7] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [8] Chen TM, Liu RC. A study on the infection level of H5N1 virus in the birds-exposure population in Changsha. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(2): 233-234. (in Chinese)
- 陈田木, 刘如春. 长沙市禽类暴露职业人群 H5N1 病毒感染水平现况研究. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(2): 233-234.
- [9] Chen H, Smith GJ, Li KS, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2845-2850.
- [10] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 2006, 312(5772): 404-410.
- [11] Shu YL, Lan Y, Wen LY, et al. Analysis of human H5N1 virus hemagglutinin gene isolated from the mainland of China. *Chin J Exp Clin Virol*, 2006, 20(2): 8-10. (in Chinese)
- 舒跃龙, 蓝雨, 温乐英, 等. 我国分离人 H5N1 禽流感病毒血凝素基因特性的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(2): 8-10.
- [12] Lee CW, Suarez DL, Tumpey TM, et al. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *J Virol*, 2005, 79(6): 3692-3702.
- [13] Laboratories Diagnosis of influenza. Sino-Danish Postgraduate Training Center Beijing, China October 12-15 and October 17-20, 1999: 53-66.
- [14] Guo YJ, Wang M, Zhang Y, et al. Application of single radial hemolysis technique for diagnosis of influenza A (H5N1). *Chin J Exp Clin Virol*, 2006, 20(2): 3-7. (in Chinese)
- 郭元吉, 王敏, 张烨, 等. 单扩溶血技术在禽 H5N1 流感诊断中的应用. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(2): 3-7.
- [15] Sun H, Ma HB, Yang WL, et al. Serological surveillance on antibody to avian influenza subtype H5, H9 virus in poultry breeding workers. *Chin J Public Health*, 2004, 20(8): 989-990. (in Chinese)
- 孙虹, 马洪波, 杨卫路, 等. 禽类养殖场人员禽流感病毒抗体水平调查. *中国公共卫生*, 2004, 20(8): 989-990.
- [16] Liu Y, Wang M, Wang YL, et al. Analysis of avian influenza antibodies in poultry retailing and breeding workers. *Chin J Public Health*, 2009, 24(9): 1120-1121. (in Chinese)
- 柳洋, 王鸣, 王玉林, 等. 家禽零售及饲养人群禽流感病毒抗体检测分析. *中国公共卫生*, 2009, 24(9): 1120-1121.
- [17] Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis*, 2002, 185(8): 1005-1010.
- [18] Donis RO, Bean WJ, Kawaoka Y, et al. Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. *Virology*, 1989, 169(2): 408-417.
- [19] Pereira HG, Tůmová B, Law VG. Avian influenza A viruses. *Bull WHO*, 1965, 32(6): 855-860.
- [20] Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol*, 1992, 33(1-4): 303-310.
- [21] Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, et al. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol*, 1993, 130(1-2): 209-217.

(收稿日期: 2012-04-08)

(本文编辑: 尹廉)