

文章编号:1003-8701(2012)05-0062-04

# 禽流感研究进展

王家敏<sup>1</sup>, 沈武玲<sup>1</sup>, 于国伟<sup>2\*</sup>

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030; 2. 西北民族大学西部环境健康研究所, 兰州 730030)

**摘要:**近年来禽流感的大范围流行,造成了巨大的经济损失并严重威胁着人类健康,因此禽流感的研究越来越被人们重视。本文就目前禽流感流行状况、检测方法进行综述。

**关键词:**禽流感; 经济损失; 研究进展

中图分类号: S858.3

文献标识码: A

## Advances in Studies on Avian Influenza

WANG Jia-min<sup>1</sup>, SHEN Wu-ling<sup>1</sup>, YU Guo-wei<sup>2\*</sup>

(1. Gansu Provincial Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou 730030;

2. Institute of Environment and Health, Northwest Nationality University, Lanzhou 730030, China)

**Abstract:** In recent years, the pandemic avian influenza caused a huge economic losses and serious threat to human health, so people pay more and more attention to the study of avian influenza. In this paper, the advance on epidemic condition, detection methods and prevention measures of avian influenza were reviewed.

**Keywords:** Avian Influenza; Economic damages; Advance in studies

### 1 禽流感概述

禽流感(Avian Influenza, AI)是由正黏病毒科、流感病毒属、A型流感病毒引起的禽类感染和/或疾病综合征。该病发生已经有近130年的历史,可引起鸡、火鸡以及其它禽类,特别是迁徙水禽的感染,主要侵害各种鸟类的呼吸系统、消化系统及神经系统等,产生从无症状或温和症状到高度致死性的感染。根据禽流感病毒对易感禽的致病性将其分为高致病性(HPAI)、低致病性(LPAI)和无致病性3种。HPAI被世界动物卫生组织(OIE)列为法定必须上报的A类传染病,HPAI在我国也为一类动物疫病<sup>[1]</sup>。HPAI表现为高发病率和高死亡率的全身感染,该病毒血清型多,变异性强,严重威胁世界各地的养禽业,常常造成巨大的经济损失,尤其是H5、H7亚型引起的高致病力禽

流感,一旦爆发即可导致感染鸡的全群覆没,是养禽业的一类灾难性疾病<sup>[2]</sup>。近几年来多次发生的禽流感病毒直接感染人并导致人死亡的事件,使该病具有更重要的公共卫生学意义<sup>[3-4]</sup>。

禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)是有包膜的RNA病毒,形态不规整,外观形态为直径80~120 nm的球状或长达数千纳米的丝状,其基因组由8条单股负链RNA组成,共编码10种蛋白质,包括血凝素(Hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)、核蛋白(Nucleoprotein, NP)、基质蛋白(Matrix protein, MP)、聚合酶蛋白(PB1、PB2、PA)、非结构蛋白(Nonstructural proteins, NS)和其他蛋白(HE、M2、M3、NB)。AIV根据病毒核蛋白(NP)和膜蛋白(MS)抗原及其基因特性的不同分为A、B、C三型,而根据外膜血凝素和神经氨酸酶的不同,可分为15个H亚型(H1-H15)和9个N亚型(N1-N9)<sup>[5]</sup>,它们之间可以相互构成若干血清亚型,亚型之间没有交叉保护作用。AIV的基因突变率很高,尤其是HA、NA基因极易发生点突变。AIV众多的血清亚型是其遗传变异频

收稿日期:2012-02-29

作者简介:王家敏(1987-),女,在读硕士,主要从事细胞培养、生物制品的研究。

通讯作者:于国伟,女,教授,博士,E-mail:yxygw@xbmu.edu.cn

繁的有力证据,其机理涉及分子水平的抗原漂移(Antigenic drift)和抗原转变(Antigenic shift)<sup>[6]</sup>。实验证明,不同亚型病毒同时感染一个细胞时,病毒基因组可发生节段的交换。同时,由于其 RNA 聚合酶缺乏校正功能,复制时容易出现差错,从而导致抗原成分的多样性<sup>[7]</sup>。

## 2 禽流感流行病学概况

AIV 能感染家禽(鸡、火鸡、家鸭、鹅、鹌鹑等)、野禽(野鸭、野鹅、雉鸡、鹰、鸵鸟、鸥等)、鸟(鸽子、鹦鹉、燕雀等)等禽类,其中火鸡最易感,鸡次之。

自 1878 年 Perroncito 首次报道意大利鸡群暴发禽流感以来,全球范围内报道了 20 多起严重的高致病性禽流感的暴发和流行,其主要病毒亚型为 H5N1、H5N2、H5N8、H5N9、H7N1、H7N3、H7N4、H7N7。HPAI 以突然死亡和高死亡率为主要特征,导致了感染禽类的大量死亡,几次损失巨大的禽流感暴发主要有:1983 年 10 月美国宾夕法尼亚州、泽西州和弗吉尼亚州暴发禽流感,共计 1 250 万只家禽被扑杀,防疫费总额高达 3 867 万美元;1995 年 1 月在墨西哥发现的低致病性 H5N2 亚型流行株突变成高致病力毒株,并在普埃布拉州和克雷塔罗州的家禽中流行,随后波及了 12 个州,为控制这一疫情,共有 1 800 万只鸡被淘汰,3 200 万只鸡被封锁,1.3 亿只鸡被紧急接种疫苗,直接经济损失达 10 亿美元<sup>[8]</sup>;2003 年,在荷兰暴发了 H7N7 亚型的高致病性禽流感,大约有 3 千多万只禽类被捕杀,不只在荷兰国内,该次禽流感还传播到了比利时和德国,在这两国捕杀的禽类也共有 310 多万只;2003 年底至 2004 年初,韩国、泰国、日本、越南和中国等 10 余个国家相继暴发 H5N1 禽流感,在短短的几个月时间里,共有一亿多禽类死于此种疾病或是被捕杀,这个比过去全球的 6 次大规模暴发中受到感染的禽类总数还要多,每一次禽流感的暴发都给流行区的养禽业带来毁灭性的打击,造成巨大的经济损失<sup>[9]</sup>。近日,卫生部表示,卫生部和农业部有关专家就今年的动物禽流感及人禽流感疫情进行了风险评估,认为今年发生动物禽流感的可能性大。

1997 年,我国香港地区相继有 18 人感染 H5N1 病毒,其中 6 人死亡,此次感染人的病毒与香港鸡场暴发的 HPAIV 密切相关。2003 年 2 月我国香港再次发生 H5N1 直接感染人事件,感染 2 例,1 例死亡<sup>[10]</sup>。2003 年 2 月,荷兰 Gelderland

省暴发高致病性禽流感(H7N7)。令人关注的是,此次 AIV 暴发中确认的 83 例,绝大多数是在杀鸡过程中感染的兽医和农场工作人员。从 1 例死于急性呼吸窘迫症的患者体内分离到 H7N7 病毒,未发现其他呼吸道病原。在该次禽流感感染人的事件中,有 2 名农场工作人员的 3 名家属没有与鸡接触过也感染了 H7N7 病毒,怀疑 H7N7 感染人后可能发生人与人之间传播。特别是 2003 年 12 月以来,越南、韩国和日本等亚洲国家先后暴发了大规模 H5N1 高致病性禽流感,在整个流行期间,越南共有 22 人确诊感染了 H5N1 高致病性禽流感,其中 15 人死亡,泰国 12 人感染,其中 8 人死亡,在越南还出现了人与人之间传染禽流感的疑似病例。2007 年,印度尼西亚再一次暴发了 H5N1 高致病性禽流感感染人事件,死亡人数高达 64 人。AIV 作为是否可有引起人类流感大暴发及其对人类健康的潜在威胁<sup>[11]</sup>是值得研究的热点问题。

## 3 禽流感的主要检测方法

禽流感的临床症状变化较大,除了典型禽流感的临床症状稍具诊断意义外,大部分禽流感无法以临床症状作出准确诊断。所以,确诊 HPAI 要依靠实验室诊断,其实验室诊断方法主要包括病原学、血清学和分子诊断 3 种类型。

### 3.1 AIV 的分离鉴定

用无菌拭子采集气管或泄殖腔病料或病变组织,经过常规处理后接种于 9~10 日龄鸡胚(也可用敏感细胞如 MDCK、Vero 等),收获尿囊液,测定血凝效价,若为阴性则应继续盲传 2~3 代。对具有血凝价的尿囊液需先用新城疫抗血清做 HI 试验,判断是否为新城疫病毒,若新城疫抗体阳性还应采用中和法继续传代,以确诊是否为新城疫和禽流感混合感染,然后用免疫扩散试验等方法检测特异性核心抗原-核糖蛋白(NP)或基质蛋白(MP),用血凝抑制试验(HI)和神经氨酸酶抑制试验(NIT)鉴定病毒的亚型。同时,进行致病性试验确定毒力的强弱。病毒的分离鉴定对禽流感的诊断比较准确,是目前国际兽疫局诊断禽流感确诊的方法,但是这种方法从病毒的分离培养到最后型,特异性,毒力鉴定需要 21 d。不适用于快速检验。

### 3.2 血清学鉴定

#### 3.2.1 血凝(HA)试验和血凝抑制(HI)试验

HA 和 HI 试验是诊断 AIV 和血清样品检疫

中最常用的方法之一。由于家禽血清中存在一些非特异性血凝抑制因子,在 HI 试验中常会造成一定数量的假阳性,因此进行 HI 试验前,血清样品除了需灭活外,还应该用高碘酸钠除去非特异性血凝抑制因子。

### 3.2.2 琼脂扩散(AGP)试验

AGP 试验的原理是利用可溶性抗原与抗体特异性结合,在琼脂中扩散形成浓度梯度来检测 AIV 群特异性血清抗体的一种试验方法。该方法具有操作简单、准确性高等特点,但是试验受反应物浓度和时间的影响较大,容易出现假阳性的结果。邓国华等<sup>[12]</sup>通过杆状病毒表达的禽流感病毒核蛋白建立了琼脂扩散诊断方法,该方法特异性地检测出 15 个禽流感病毒亚型的抗血清,且和中国流行的禽类和其他病原体的抗血清无交叉反应。

### 3.2.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

用酶标记抗原或抗体,通过显色反应来检测相应抗体或抗原的一种方法。本法具有快速、敏感度高(其敏感度要高于 AGP 试验和 HI 试验)的特点,因此,本法也常用于大批样品和血清学检疫<sup>[13]</sup>。目前,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所已经建立了一系列 ELISA 方法,如建立了禽流感病毒重组核蛋白 ELISA 诊断技术、禽流感间接 ELISA 诊断试剂盒、禽流感 Dot-ELISA 方法等<sup>[14]</sup>。

## 3.3 分子生物学检测

除经典的血清学诊断方法外,随着近年来分子技术的迅猛发展,许多分子生物学方面的诊断技术逐渐也被应用起来。

### 3.3.1 RT-PCR 技术

RT-PCR 技术从基因水平检测 AIV RNA 基因,具有高度敏感性和特异性,大大缩短了对 AIV 的检出时间。包红梅等人通过分析流感数据库中 123 个 HA 序列,根据 HA 保守区序列设计并合成了 1 对引物,建立了一步法 RT-PCR 检测方法,预期扩增片段大小为 732 bp;通过对 H9 亚型禽流感病毒(AIV)不同稀释度的尿囊液和棉拭子浸出液进行检测,证实病毒尿囊液的最低检出量为  $1 \times 10^{4.7}$  EID<sub>50</sub>/mL;阳性棉拭子的最低检出量为  $1 \times 10^{2.5}$  EID<sub>50</sub>/mL;用该方法检测 H1-H15 亚型 AIV 和鸡新城疫病毒等其他 14 种禽病病原,结果仅有 H9 亚型 AIV 出现特异性目的条带,而其他均未出现目的条带。脏器及咽喉、泄殖腔棉拭子样品在 1:10 稀释度下,病毒分离和 RT-PCR 方法可以达到相同的阳性检出率。表明建立的 AIV

H9 亚型 RT-PCR 方法具有较好的特异性和敏感性<sup>[15]</sup>。因此,多重 RT-PCR 快速检测方法对 AIV 高致病性 H5、H7 亚型感染的诊断及制定有效的防治措施具有实用价值和指导意义<sup>[16-18]</sup>。

### 3.3.2 逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)

RT-LAMP 是针对靶基因的 6 个区域,设计 4 种特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶(BstDNA polymerase)在恒温(65℃左右)中 1 h,即可完成核酸扩增反应。国外有报道用 RT-LAMP 技术检测人流感 H1、H2 和 H3 亚型流感病毒<sup>[19]</sup>,还用于鉴定流感 A、B 型的诊断<sup>[20]</sup>。Chen 等<sup>[21]</sup>建立了诊断 H9 亚型的逆转录环介导等温扩增技术,该方法比传统的 RT-PCR 方法敏感性高 10 倍,并且和 H5N1、H3N2 等亚型没有交叉反应性,在对 112 份临床病料的检测对比中,用病毒分离的方法检测出来为阳性结果的病料用该方法得到的结果完全一致,而 RT-PCR 有 7 个阳性结果没有检测出来。这些结果提示该体系提供了检测 H9 亚型禽流感病毒的一种新方法。侯佳蕾等<sup>[22]</sup>根据 H5 亚型血凝素基因设计了一套特异识别 HA 基因序列中 6 个不同区段的引物,并建立了基于 LAMP 技术诊断禽流感病毒的诊断方法。结果表明,该反应灵敏性高于 RT-PCR 方法,在反应体系中添加 SYBR GREEN I 染料后,可通过肉眼观察结果,该方法具有灵敏度高、特异性好等特点,可作为 H5 亚型禽流感病毒快速诊断方法。

## 4 禽流感防治

### 4.1 综合防治

防治禽流感首先应防止该病毒传播至鸡群中,早检测并防止其传播对防止该病发生是十分重要的。这就要作好该病的流行病学调查,建立健全疾病监测与预报体系。一旦发现疫情,应立即将感染鸡群及其分泌物和排泄物隔离。为了更好地防治该病,在疫情被证实的情况下,目前普遍采用的手段主要还是疫苗接种,且疫苗免疫已成为当今用来控制日益严重的禽流感疫情的关键环节、主要措施和最后防线。

### 4.2 药物治疗

目前对禽流感还没有特效的治疗方法,在发现早期用一些抗病毒药物,如盐酸金刚烷胺、盐酸金刚乙胺、毒哇等进行防治。一些免疫促进剂,可增强鸡群对病毒感染的抵抗,对促进鸡群的恢复有较好的作用。

### 4.3 疫苗接种

由于造成重大经济损失的历次禽流感大暴发都是由 H5 和 H7 亚型引起的,尤其是 1997 年香港禽流感感染人事件发生后,使得在疫苗方面的研究除针对当前流行毒株以外,主要精力投入在了这两个亚型上,从而为避免高致病力禽流感的发生打下坚实的基础。对禽流感而言,最为理想的疫苗是产生免疫效果时不需加强免疫,能提供长期的保护力,并能够保护多个亚型流感病毒的攻击。又由于禽流感病毒的传播效率高,致病力变异较为复杂,任何一株低致病力流感病毒都有突变为高致病力毒株的可能性,所以弱毒流感疫苗的研发尤为重要。目前世界上开发研制的禽流感疫苗主要有全病毒灭活疫苗、亚单位疫苗、重组病毒活载体疫苗和核酸疫苗。其中有些疫苗已在美国和墨西哥 AI 大暴发时为防止疫情的扩散和蔓延发挥了一定作用<sup>[23]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 韦平,秦爱建. 重要动物病毒分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2] Maria Ferrio, Belen Pico, Pascual Fernandez de Cordova. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbitamoschata*) determined by SRAP and AFLPmarker [J]. *Crop Science*, 2004(44): 653- 664.
- [3] Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza Vaccine[J]. 2007, 25(30): 5637- 5644.
- [4] Xian Wenjin, Sherif B, Mossad. Avian influenza: An emerging pandemic threat[J]. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2005, 72(12): 1129- 1134.
- [5] Thanh TY, van Doorn HR, de Jong MD. Human H5N1 influenza: current insight into pathogenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2671- 2674.
- [6] Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution[J]. *Nature*, 2003 (422): 428- 433.
- [7] Hulse Post DJ, Franks J, Boyd K, et al. Molecular changes in the polymerase genes(PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks[J]. *J Virol*, 2007, 81(16): 8515- 8524.
- [8] Alexander D.J. A reviews of avian influenza in different bird-species[J]. *Vet Microbiol*. 2000, 74(1- 2): 3- 13.
- [9] 谷臣君, 阳勇, 李科. 禽流感的研究进展[J]. *中国畜禽种业*, 2010(2): 148- 149.
- [10] Donatelli I, Campitelli L, Di Trani L, et al. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt3): 623- 630.
- [11] 黄京燕, 刘宏伟, 赵海燕, 等. 禽流感的危害及防控措施[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2007(1): 55- 56.
- [12] 邓国华, 马文军, 于康震. 禽流感病毒核蛋白基因在重组杆状病毒中的表达[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(2): 81- 84.
- [13] Qingping Luo, Hongliang Huang, Wei Zou, et al. An indirect sandwich EILSA for the detection of avian influenza H5 subtype viruses using anti-hemagglutinin protein monoclonal antibody[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009(137): 24- 30.
- [14] 王兆鹏, 尚绪增, 刘思莹, 等. 禽流感病毒 M1 抗体间接阻断 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(5): 426- 431.
- [15] 包红梅, 王秀荣, 陶启蒙, 等. H9 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2010(64): 77- 80.
- [16] 庞耀珊, 谢芝勋, 邓显文, 等. 多重 RT-PCR 快速检测鉴别 H7 亚型禽流感病毒方法的建立 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2005(7): 33- 40.
- [17] Chen HT, Zhang J, Sun DH, et al. Rapid discrimination of H5 and H9 subtypes of avian influenza viruses and Newcastle disease virus by multiplex RT-PCR [J]. *VetResCommun*, 2008, 32(6): 491- 498.
- [18] Zambon M, Hays J, Webster A, et al. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic or molecular detection of influenza[J]. *ArchIntern Med*, 2001, 161(17): 2116- 2122.
- [19] Poon L L, Leung C S, Chan KH, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification[J]. *ClinMicrobiol*, 2005, 43 (1): 427- 430.
- [20] Itom, Watananem, Nakagawan, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation[J]. *VirologicalMethods*, 2006(135): 272- 275.
- [21] Chen Hao-tai, Zhang Jie, Sun De-hui, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of H9 avian influenza virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008(151): 200- 203.
- [22] 侯佳蕾, 罗开健, 樊惠英, 等. H5 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立 [J]. *中国兽医科技*, 2008, 38(12): 1070- 1074.
- [23] Graeme Laver, Elspeth Garman. The origin and control of Pandemic influenza[J]. *Science*, 2001(293): 1776- 1777.