

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.10.019

2009—2011年环洞庭湖区主要活禽批发市场 低致病禽流感监测情况

黄建龙¹, 王昌建¹, 邓国华², 谭丹^{1,2}, 范仲鑫¹, 何世成¹, 朱春霞¹, 汪洪冰¹, 刘道新¹

摘要:目的 了解环洞庭湖区主要活禽批发市场低致病性禽流感病毒的分布和流行情况,为该地区活禽批发市场低致病性禽流感的防控措施提供一些依据。方法 对在活禽批发市场上采集的拭子样品先由尿囊腔接种 SPF 鸡胚,然后用血凝试验(HA)测定所收集的尿囊液,对 HA 测定有滴度的再进行血凝抑制试验(HI)和 RT-PCT 方法相结合鉴定病毒的亚型。结果 2009—2011年冬春季节,我们在环洞庭湖地区主要活禽批发市场上共分离到 627 株低致病性禽流感病毒,总的分离率为 22.2%,其中鸭拭子低致病性禽流感病毒的分离率最高,达到 24.6%,其次是鸡拭子,达到 21.5%,鹅拭子为 11%。在所监测的 5 家活禽批发市场中分离到 H3、H4、H6、H9、H10 型和 H11 等 6 种亚型的低致病性禽流感病毒,其中 H9、H6 和 H4 亚型比较高,其分离率分别可达到 11%、6.3%和 3.4%。结论 活禽批发市场中低致病性禽流感隐性带毒的情况普遍存在,其发生禽流感疫情的威胁较大。建议整顿规范市场经营管理,特别是要建立活禽交易市场定期休市制度。

关键词:低致病性禽流感;活禽批发市场;监测

中图分类号:S852.6

文献标识码:B

文章编号:1002-2694(2014)10-1075-04

Surveillance of low pathogenicity avian influenza viruses in major live poultry wholesale markets around Dongting Lake Region, China, 2009—2011

HUANG Jian-long¹, WANG Chang-jian¹, DENG Guo-hua², TAN Dan^{1,2}, FAN Zhong-xin¹,
HE Shi-cheng¹, ZHU Chun-xia¹, WANG Hong-bing¹, LIU Dao-xin¹

(1. Hunan Provincial Animal Disease Prevention and Control Center, Changsha 410014, China;

2. Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agricultural, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Heilongjiang 150001, China)

ABSTRACT: The distribution and prevalence of low pathogenic avian influenza virus in major live poultry wholesale markets around the Dongting Lake region, China were investigated in our study to propose prevention and control measures on low pathogenic avian flu in the area of live poultry wholesale market. The samples were injected to SPF chicken embryos by allantoic cavity, and then the allantoic fluid were harvested and used for hemagglutination (HA). If it was positive by HA, subtypes of the virus would be determined by hemagglutination inhibition (HI) and RT-PCT. We isolated 627 low pathogenic avian influenza viruses in major live poultry wholesale market around Dongting Lake region systematically in winter and spring during 2009-2011, and the total separation rate was 22.2%. The duck swab separation rate of low pathogenic avian influenza was the highest, which was 24.6%, and the following was chicken swab that reached 21.5%, and the goose swab separation rate was 11%. We isolated 6 HA subtypes including H3, H4, H6, H9, H10, and H11 in every live poultry wholesale market, and the separation rate of H9, H6 and H4 subtypes was relatively high, which could reach 11%, 6.3% and 3.4%, respectively. Those results indicated that recessive infection of low pathogenic avian influenza virus was serious in live poultry wholesale market around the Dongting Lake area, and it was a great threat to the occurrence of avian flu.

KEY WORDS: low pathogenic avian influenza; live poultry wholesale market; surveillance

国家重点实验室国家开放基金(SKLVBP201003)

通讯作者:刘道新, Email: xdl64@tom.com

作者单位:1. 湖南省动物疫病预防控制中心,长沙 410014;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室/兽医生物技术国家重点实验室,哈尔滨 150001

Supported by the National Open Fund of the State Key Laboratory (No. SKLVBP201003)

Corresponding author: Liu Dao-xin, Email: xdl64@tom.com

禽流感是由正黏病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的一种禽类(家禽和野禽)传染病,迄今为止,共有 16 种 HA(H1-H16)亚型和 9 种 NA(N1-N9)亚型被鉴定,根据禽流感病毒致病性和毒力的不同,将禽流感分为高致病性、低致病性和非致病性禽流感。高致病性禽流感的危害很大,大家对其高度关注,但近年来不断有国家和地区有低致病性禽流感疫情的报道^[1-6],其流行和传播呈上升趋势。很多报道显示 H9 亚型禽流感是影响我国养禽业的主要禽流感病毒亚型,且对禽的危害越来越严重,除引起上呼吸道感染、产蛋量严重下降外,个别毒株可引发较大的死亡。近年来我国南方地区和香港均出现了人感染 H9N2 亚型 AIV 的病例^[7]。有报道称 H6 亚型禽流感病毒不仅可以向 H5 亚型高致病性禽流感病毒和 H9N2 亚型禽流感病毒提供内部基因片段,而且还可以感染鼠、水貂和人^[8-9]。

为了加强活禽经营市场管理,规范活禽经营行为,为了解环洞庭湖地区主要活禽批发市场低致病性禽流感病毒的分布和流行情况,从而有效预防和控制禽流感,保护人体健康和公共卫生安全。2009—2011 年冬春季节,我们对环洞庭湖活禽批发市场家禽进行低致病性禽流感监测,为该地区活禽批发市场低致病性禽流感的防控措施提供一些依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集 按随机抽样的方法,每年的冬季和春季到每个市场抽取 10 个经营户,每户采 10 对咽

喉拭子和泄殖腔拭子,采样时详细记录家禽产地、日龄、采样数量等信息。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和分子量 Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;反转录酶、LS TRIzol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司。

1.3 鸡胚 SPF 鸡胚购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

1.4 病原分离和鉴定 拭子样品 1 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,以每胚 0.2 mL 的注射剂量由尿囊腔接种 9~10 d 龄 SPF 鸡胚,每个样品接种 2~3 枚 SPF 鸡胚,37 °C 孵育,每天观察 2 次,弃去 24 h 内死亡的鸡胚,及时收集之后死亡鸡胚,至 96 h 收集所有鸡胚,置于 4 °C 过夜,收获鸡胚尿囊液,用血凝试验(HA)测定,阴性者再盲传 1 代,如果 HA 认为阴性,则终定为阴性样品。对 HA 测定有滴度的再进行血凝抑制试验(HI)和 RT-PCT 方法相结合鉴定病毒的亚型。

2 结 果

2.1 总体检测情况 2009—2011 年,对环洞庭湖区主要活禽批发市场禽流感进行监测,共采集 2 819 对拭子,经病原分离和鉴定发现,有 627 对拭子为低致病性禽流感阳性拭子,总的分离率为 22.2%,其中鸭拭子低致病性禽流感的分离率最高为 24.6%,其次是鸡拭子,达 21.5%,鹅拭子为 11%,见表 1。

表 1 总体检测结果

Tab. 1 Test results

Year	Chickens		Ducks		Geese	
	Isolated no.	Separation rate	Isolated no.	Separation rate	Isolated no.	Separation rate
2009	60	16.9%	107	21.3%	0	0%
2010	165	26.5%	100	34.6%	9	22.5%
2011	135	19.3%	49	19.6%	2	5.0%
Total	360	21.5%	256	24.6%	11	11.0%

2.2 各个活禽批发市场低致病性禽流感分离率 在所监测的 5 家活禽批发市场中都检出阳性样品,其中益阳市学门口市场、长沙市石马家禽批发市场和岳阳市枫桥胡蛋禽批发市场低致病性禽流感分离率较高,分别为 27.4%、27.3%和 23.0%。

2.3 不同 HA 亚型低致病性禽流感分离率 3 年的持续监测过程中,在活禽批发市场的禽拭子中分离出了 6 种亚型的低致病性禽流感病毒,有 H3 亚

型、H4 亚型、H6 亚型、H9 亚型、H10 亚型和 H11 亚型。其中 H9 亚型、H6 亚型和 H4 亚型比较高,其分离率分别可达到 11%、6.3%和 3.4%。

2.4 活禽批发市场低致病性禽流感隐性带毒种群分布情况 在对所采集的鸡、鸭、鹅拭子中都检测到禽流感病毒。在鸭拭子中可以分离到有 H3、H4、H6、H9、H10 和 H11 等 6 种亚型的低病性禽流感病毒,并且 AIV H6 亚型隐性带毒率最高,达到

10.2%。在鸡拭子中可以分离到有 H3、H4、H6 和 H9 型等 4 种低致病性禽流感病毒,其 AIV H9 亚型隐性带毒率最高,达到 15.1%。在鹅拭子中可以分离到有 H4、H6 和 H9 等 3 种亚型低致病性禽流感病毒,见图 1。

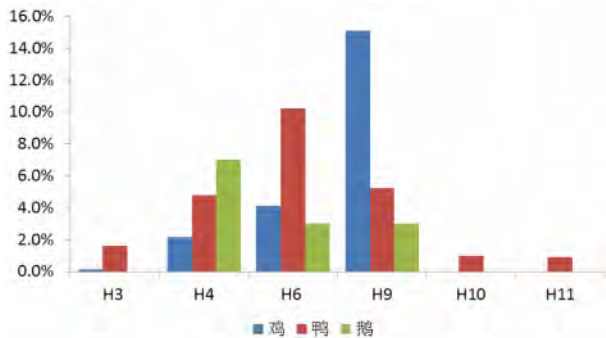


图 1 活禽批发市场中鸡、鸭、鹅不同 HA 亚型低致病性禽流感分离率

Fig. 1 Positive rate of different HA subtypes of low pathogenic avian influenza in chickens, ducks and geese in live poultry wholesale market

3 讨论

这 3 年的持续监测过程中,每年环洞庭湖区主要活禽批发市场低致病性禽流感病毒分离率都不低。并在所监测的 5 家活禽批发市场中都分离到低致病性禽流感病毒,分离出有 H3、H4、H6、H9、H10 型和 H11 等 6 种亚型的禽流感病毒。表明在活禽批发市场中低致病性禽流感隐性带毒的情况普遍存在,活禽批发市场发生禽流感疫情的威胁比较大。目前,我们市场的禽流感检测水平不是很高,这就需要我们加强对活禽批发市场中家禽特别是水禽的病原学监测和家禽的抗体水平监测。

水禽特别是家鸭是禽流感病毒的储存库和传染源,由于家鸭经常同时被多个亚型的禽流感病毒混合感染,这为各亚型的基因重组提供了很好的载体,禽流感病毒在水禽与陆禽间传播,可加快表面蛋白的变异,不断丰富内部基因的重配,并加速了种间传播的机会^[10-11]。因此,其在流感病毒的进化和生态分布的重要地位已经得到广泛认可。在对洞庭湖区活禽批发场所采集的鸡、鸭、鹅拭子检测中发现,鸭拭子低致病性禽流感的分离率最高,达到 24.6%,并且在鸭拭子中可以检测到的低致病性禽流感病毒亚型最多,有 H3、H4、H6、H9、H10 和 H11 等 6 种亚型。通过问卷调查发现省内低致病性禽流感隐性带毒鸭拭子主要来源于长沙、益阳、岳阳和常德,表明洞庭湖区的水禽低致病性禽流感隐性带毒是很高的,从而较大地威胁该地区发生禽流感疫情。因此,

必须尽量防止野生水禽、家养水禽及其它野鸟与陆禽间的相互接触,在市场禽流感的防控方面,水禽和其它禽类应分别建立市场,独立经营。

在鸡拭子中可以检测到有 5 种亚型低致病性禽流感病毒,这说明鸡低致病性禽流感隐性带毒也是很严重的。根据我们的调查和分析,活禽批发市场上的鸡低致病性禽流感隐性带毒如此之高,原因可能有以下 2 个方面:第一,市场上的淘汰蛋鸡比较多,蛋鸡感染 H9 亚型的几率比较大,有些养殖场的鸡可能感染了 H9 亚型禽流感导致产蛋下降而紧急淘汰这部分蛋鸡;第二,有些鸡可能来源于运输过程中的感染或市场内阳性带毒鸭把病毒传播给鸡的。有专家预测 H9N2 亚型禽流感病毒可能成为毒力较强的毒株,成为下次流感大流行的亚型^[12]。

本次监测中,鹅拭子的监测数量不是很多,但是在鹅拭子中检测到有 H4、H6 和 H9 等 3 种亚型低致病性禽流感病毒,说明鹅在流感病毒的进化和生态分布的作用同样不可忽视,须继续加强和重视对各种家禽禽流感的监测。

参考文献:

- [1] Peng Y, Zhang W, Xue F, et al. Etiological examination on the low pathogenicity avian influenza viruses with different HA subtypes from poultry isolated in eastern China from 2006 to 2008 [J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(2): 119-121. (in Chinese)
彭宜,张伟,薛峰,等. 2006-2008 年对华东地区家禽不同 HA 亚型低致病性禽流感的病原学监测 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(2): 119-121.
- [2] Zhao G, Zhong L, Zhao KK, et al. Isolation and characterization of H3N2 influenza viruses from ducks [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(10): 1354-1358. (in Chinese)
赵国,钟蕾,赵坤坤,等. 2 株鸭源 H3N2 亚型流感病毒的分离鉴定和遗传进化分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(10): 1354-1358.
- [3] Luo WY, Hu YH, Deng GH, et al. Sequence analysis and pathogenicity of 2 H6N2 subtype AIV isolates from geese in Guangdong [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2012, 34(5): 345-349. (in Chinese)
罗维玉,胡永浩,邓国华,等. 两株鹅源 H6N2 亚型禽流感广东分离株的全序列分析及致病性研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(5): 345-349.
- [4] Zhou JP, Liu J, Li KH, et al. Survey of H9 subtype avian influenza virus in live poultry markets of Shanghai [J]. *Chin J Anim Infect Dis*, 2010, 18(3): 56-61. (in Chinese)
周锦萍,刘健,李凯航,等. 上海地区活禽批发市场 H9 亚型禽流感病毒调查 [J]. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(3): 56-61.
- [5] Li QZ, Cao MH, Jiang X. Research on low pathogenic avian influenza (H9) subtype in the Liaoning Province [J]. *Mod J Anim Husb Vet Med*, 2012, 6: 31-32. (in Chinese)

- 李清竹,曹明慧,姜新. 辽宁省低致病性禽流感(H9)亚型带毒情况调查研究[J]. 现代畜牧兽医, 2012, 6: 31-32.
- [6]Abolnik C, Bisschop S, Gerdes T, et al. Outbreaks of avian influenza H6N2 viruses in chickens arose by a reassortment of H6N8 and H9N2 ostrich viruses[J]. *Virus Genes*, 2007, 34(1): 37-45.
- [7]Butt KM, Smith GJD, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5760-5767. DOI:10.1128/JCM.43.11.5760-5767.2005
- [8]Chen YM, Ge WY, Huang C, et al. Serological survey of antibody to H9 and H6 subtypes of bird flu virus in healthy youths in Guangxi[J]. *China Trop Med*, 2008, 8(6): 985-986. (in Chinese)
- 陈妍梅,葛万运,黄川,等. 广西健康青年 H9、H6 亚型禽流感病毒血清抗体调查[J]. *中国热带医学*, 2008, 8(6): 985-986.
- [9]Gillim-Ross L, Santos C, Chert Z, et al. Avian influenza h6 viruses productively infect and cause illness in mice and ferrets[J]. *J Virol*, 2008, 82(21): 10854-10863. DOI:10.1128/JVI.01206-08
- [10]Songserm T, Jam-on R, Sae-Heng N, et al. Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(4): 575-581. DOI:10.3201/eid1204.051614
- [11]Smith GJ, Fan XH, Wang J, et al. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 103(45): 16936-16941. DOI:10.1073/pnas.0608157103
- [12]Xu KM, Li KS. H9 maybe the next human influenza pandemic subtypes[J]. *Foreign Med (Microbiol Sect)*, 2003(2): 7-9. (in Chinese)
- 徐克敏,李康生. H9 可能是人类下次流感大流行的亚型[J]. *国外医学(微生物学分册)*, 2003(2): 7-9.

收稿日期:2013-10-15;修回日期:2014-06-06

(上接第 1070 页)

- [24]Zhou BY, Chen YT, Li WG, et al. Construction and identification of the recombinant fusion gene vaccine Bb-Eg95-EgA31 of *Echinococcus granulosus*[J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(6): 502-506. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2009.06.002 (in Chinese)
- 周必英,陈雅棠,李文桂,等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合基因疫苗构建及鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(6): 502-506.
- [25]Hu XC, Xu J, Lu JH, et al. Cloning the *Echinococcus granulosus* Eg95 complete gene and expressing in yeast *Pichia methanolic*[J]. *J Tropical Med*, 2003, 3(1): 28-31. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2003.01.010 (in Chinese)
- 胡旭初,徐劲,陆家海,等. 细粒棘球绦虫 EG95 全长基因的克隆与在甲醇酵母中的表达[J]. *热带医学杂志*, 2003, 3(1): 28-31.
- [26]Yu LL, Jia H, Hou SH, et al. Tandem expression and identification of EG95s gene of *Echinococcus granulosus* and C3d gene using baculovirus expression system[J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2010, 37(11): 44-49. (in Chinese)
- 于琳琳,贾红,侯绍华,等. 羊 C3d 基因与细粒棘球绦虫 EG95s 基因在杆状病毒中的串联表达[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(11): 44-49.
- [27]Tan JL, Ueda N, Heath D, et al. Development of orf virus as a bifunctional recombinant vaccine; surface display of *Echinococcus granulosus* antigen EG95 by fusion to membrane structural proteins[J]. *Vaccine*, 2012, 30: 398-406. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.079
- [28]Scheerlinck JP, Casey G, McWaters P, et al. The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy[J]. *Vaccine*, 2011, 19: 4053-4060. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00133-5
- [29]Lin RY, Ding JB, Lu XM, et al. Transient expression of *Echinococcus granulosus* Eg95 DNA vaccine and induction of immune response in mice[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2007, 25(4): 320-324. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7423.2004.04.003 (in Chinese)
- 林仁勇,丁剑冰,卢晓梅,等. 细粒棘球绦虫 EG95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2002, 22(4): 204-208.
- [30]Ding JB, Ma XM, Wei XL, et al. Comparison on the immune responses induced by the EG95 hydatid vaccine and the recombinant EG95 antigen in mice[J]. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(4): 347-351. (in Chinese)
- 丁剑冰,马秀敏,魏晓丽,等. 细粒棘球绦虫 EG95 基因疫苗和重组蛋白诱导小鼠免疫应答的比较研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(4): 347-351.
- [31]Yang JF, Wang ZG, Gao LS, et al. Construction of nucleic acid vaccine of EG95 and expression in sheep fetal fibroblasts[J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 11: 134-136. (in Chinese)
- 杨娇馥,王志钢,高连山,等. 核酸疫苗 pcDNA3.1-EG95 的构建及在绵羊胎儿成纤维细胞中的表达[J]. *生物技术通报*, 2010, 11: 134-136.
- [32]Woollard DJ, Heath DD, Lightowlers MW. Assessment of protective immune responses against hydatid disease in sheep by immunization with synthetic peptide[J]. *Parasitology*, 2000, 121(2): 145-143. DOI: 10.1017/S0031182099006186
- [33]Chow C, Gauci CG, Cowman AF, et al. *Echinococcus granulosus*: oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen[J]. *Exp Parasitol*, 2004, 106: 183-186. DOI: 10.1016/j.exppara.2004.03.009

收稿日期:2013-10-21;修回日期:2014-04-24