

环洞庭湖区活禽批发市场和水禽场 H6 亚型禽流感监测

黄建龙¹, 王昌建¹, 邓国华^{2*}, 范仲鑫¹, 何世成¹, 朱春霞¹, 唐小明¹, 刘道新^{1*}

(1.湖南省动物疫病预防控制中心, 湖南 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, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 为了解环洞庭湖区活禽批发市场和水禽场 H6 亚型禽流感病毒的分布和流行情况, 分别于 2009—2011 年对环洞庭湖地区活禽批发市场、2011—2013 年对水禽场的 H6 亚型禽流感进行了系统监测。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), 并与 RT-PCT 方法相结合鉴定病毒的亚型。检测结果显示: 在环洞庭湖区的 5 个活禽批发市场上都分离到 H6 亚型禽流感, 并且在鸡、鸭、鹅拭子中都分离到该病毒, 总的分离率为 6.49%; 水禽场 H6 亚型禽流感病毒群体阳性率达 3.6%, 拭子的 H6 亚型病毒分离率为 0.29%, 活禽批发市场鸭拭子 H6 亚型禽流感病毒分离率为 9.58%, 表明市场环节水禽 H6 亚型禽流感的隐性带毒率比养殖环节高, 在一定程度上说明禽流感在活禽批发市场存在水平传播的风险。

关键词: 活禽批发市场; 水禽场; H6 亚型禽流感病毒; 洞庭湖区

中图分类号: S851.347.201

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0299-04

Surveillance of subtype avian influenza viruses of H6 in wholesale markets of live poultry and waterfowl fields around the Dongting Lake

Huang Jianlong¹, Wang Changjian¹, Deng Guohua^{2*}, Fan Zhongxin¹, He Shicheng¹, Zhu Chunxia¹, Tang Xiaoming¹, Liu Daoxin^{1*}

(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, Harbin 150001, China)

Abstract: In order to understand the distribution and prevent the prevalence of subtype avian influenza virus of H6, surveillance for H6 virus was implemented in the wholesale markets of live poultry and waterfowl fields around the Dongting Lake. Samples were firstly injected to embryos of SPF chicken by allantoic cavity, and then the allantoic fluid was collected and tested using hemagglutination (HA). If a positive result was gotten, then subtypes of the virus would be determined by hemoagglutination inhibition (HI) and RT-PCT. The surveillance demonstrated that H6 virus was isolated from chickens, ducks and geese sampled at all wholesale markets of live poultry with a total separation rate of 6.49%. The positive rate of subtype virus of H6 in the waterfowl fields was 3.6%, and the separation rate from swabs was 0.29%, while, the separation rate from duck swabs was 9.58% in the wholesale markets of live poultry. These results indicated that the hidden risk of H6 virus in the wholesale markets of live poultry was higher than that of in waterfowl fields.

Keywords: The wholesale market of live poultry; waterfowl field; subtype avian influenza virus of H6; Dongting Lake area

2000年以来,美国多次暴发H6亚型禽流感,从散养的家禽和商品鸡均分离出了禽流感病毒^[1-2]。在中国,H6亚型是禽流感流行病学调查研究中分离数量最多的亚型之一,占有禽流感病毒亚型的17.8%^[3]。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、猪和人^[4-6],表明H6亚型禽流感病毒具有跨越种属障碍而感染哺乳动物甚至感染人的潜在危险,因此,加强H6亚型禽流感病毒的监测和研究具有重要的公共卫生学意义。笔者于2009—2013年对环洞庭湖区活禽批发市场和水禽场进行H6亚型禽流感监测,分析该地区H6亚型禽流感的分布和流行趋势,旨在为该地区科学制定H6亚型禽流感的防控措施,保护人体健康和公共卫生安全提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Taq DNA聚合酶、dNTPs和DNA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。

1.2 鸡胚

SPF鸡胚购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

1.3 样品采集

在活禽批发市场上采用随机抽样的方法,于2009—2011年每年的冬季和春季到长沙市杨家山家禽批发市场、长沙市石马家禽批发市场、益阳学门口市场、常德美江市场和岳阳枫桥湖蛋禽批发市场分别抽取10个经营户,每户采10对咽喉拭子和泄殖腔拭子,共采集2819对拭子。

2011—2013年,在水禽场采用多级抽样的方法,通过WinEpiscope 2.0软件中的Samples-Estimate Percentage计算(随机抽样;置信水平为90%,可接受误差为7%,预期场群间阳性率为10%),每次需抽取50个水禽场(群)。根据洞庭湖在湖南的分布特点(分为东洞庭湖、南洞庭湖和西洞庭湖),每次选取靠近东洞庭湖、南洞庭湖和西洞庭湖各1个县进行取样,每个县每次需要采集15~17个水禽场。再通过ProMES软件中的Detect-Sample Size-Simple Random Sample计算(随机抽样;置信水平为

95%,发生II类错误的可能性为5%,预期个体阳性率为10%,检测方法的敏感性和特异性都为95%),如发现1个阳性样品,则需要每个场采集29份水禽拭子样品进行检测,同时每个场抽取10份环境拭子进行检测。

1.4 病原分离和鉴定

将拭子样品1000 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日龄SPF鸡胚,每个样品接种2~3枚SPF鸡胚,37℃孵育,每天观察2次,弃去24 h内死亡的鸡胚,及时收集孵育24 h之后死亡的鸡胚,孵育至96 h时收集所有鸡胚,置于4℃过夜,收获鸡胚尿囊液,用血凝试验(HA)检测是否有禽流感病毒^[7]。测定为禽流感阴性(无滴度)的尿囊液再盲传一代。HA测定为阴性的定为阴性样品。对HA测定为禽流感阳性(有滴度)的再进行血凝抑制试验(HI)和RT-PCR检测,以鉴定该病毒是否为H6亚型禽流感病毒。

1.5 阳性场判定标准

采用国家推荐的RT-PCR检测方法,将场内至少检出1个H6亚型禽流感阳性个体的定为阳性场。

1.6 数据统计与分析

试验数据应用Microsoft Excel软件进行统计分析。

群体阳性率=阳性群体数/采样场数;病毒分离率=病毒分离数/采集的拭子样品数。

2 结果与分析

2.1 活禽批发市场H6亚型禽流感监测及分离情况

2009—2011年,对环洞庭湖区主要活禽批发市场禽流感进行监测,对采集的2819对拭子,采用HI和RT-PCR鉴定,共分离到183株H6亚型禽流感病毒,总的分离率为6.49%。分别在鸡、鸭、鹅拭子中分离到H6亚型禽流感病毒69、106、8株,其分离率分别为4.11%、9.58%和23.53%。

在所监测的5家活禽批发市场中都分离出了H6亚型禽流感病毒,其中长沙市石马家禽批发市场、益阳学门口市场和常德美江市场的H6亚型禽流感分离率较高,分别为10.17%、8.82%和8.05%,具体情况见表1。

表 1 各个活禽批发市场 H6 亚型禽流感的分离情况

市场名称	样品数/份	分离数/株	分离率/%
长沙市石马家禽批发市场	590	60	10.17
益阳市学门口市场	442	39	8.82
常德市美江市场	658	53	8.05
岳阳枫桥胡蛋禽批发市场	530	25	4.72
长沙市杨家山家禽批发市场	599	6	1.00

2.2 洞庭湖区水禽场 H6 亚型禽流感检测及分离情况

先后于 2011 年 11 月、2012 年 3 月和 11 月、2013 年 6 月对东洞庭湖、南洞庭湖和西洞庭湖区的水禽场进行禽流感监测的结果表明,在 195 个水禽场中,有 7 个水禽场检测到 H6 亚型禽流感病毒,群体阳性率为 3.6%。在采集的鸭拭子和环境拭子 7 311 对中,有 13 对鸭拭子和 8 对环境拭子分离到 H6 亚型禽流感病毒,拭子的病毒分离率为 0.29%,具体见表 2。

表 2 水禽场 H6 亚型禽流感的监测情况

监测时间	采样群体数	阳性群体数	群体阳性率/%
2011-11	54	0	0.00
2012-03	47	1	2.10
2012-11	48	5	10.40
2013-06	46	1	2.20

2.3 洞庭湖区水禽场混合感染情况

在 4 次持续监测过程中,在 7 个水禽场检测到 H6 亚型禽流感病毒,其中发现 1 个水禽场为 H4 和 H6 两种亚型禽流感病毒混合感染。

3 结论与讨论

2009—2011 年连续 3 年都在环洞庭湖区活禽批发市场上分离到 H6 亚型禽流感,总的分离率为 6.49%,并在所监测的 5 家活禽批发市场中都有检出 H6 禽流感阳性样品,表明在活禽批发市场中家禽隐性带毒 H6 亚型禽流感的情况普遍存在。活禽批发市场鸭拭子的 H6 亚型禽流感病毒分离率为 9.58% 水禽场拭子的 H6 亚型病毒分离率为 0.29%,表明市场环节水禽 H6 亚型禽流感隐性带毒率比养殖环节高。彭宜等^[8]的研究显示,在活禽批发市场

的鸭中 H6 亚型低致病性禽流感占的比例最高,在一定程度上说明禽流感在活禽批发市场存在水平传播的风险,但是市场中的风险因素是什么?是怎么传播的还需进一步研究。这同时也提示我们需要对活禽批发市场中家禽的病原学加强监测,做好市场内车辆等运输工具及市场内环境的消毒工作,提高家禽批发市场的禽流感防控水平,防止禽流感疫情的发生和传播。

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便利。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,并加大种间传播的机会^[9-10]。张曦等^[11]在 H6N8 亚型禽流感 SPF 鸡感染试验中发现,H6N8 亚型禽流感有能力在水禽和家禽间跨种传播,增加鸭源 H6 亚型 AIV 在种家禽之间发生重组和传播的机会。笔者对洞庭湖区水禽场 H6 亚型禽流感监测的结果显示,水禽场 H6 亚型禽流感病毒场间阳性率达到 3.6%,拭子的 H6 亚型病毒分离率为 0.29%,说明水禽场 H6 亚型禽流感的隐性带毒率较高。在宿主混合感染 AIV 的条件下,有可能引起 AIV 发生基因突变和重组,改变其生物学特性^[12]。笔者在 1 个鸭场监测到有 H4 和 H6 两种禽流感病毒混合感染,这提示洞庭湖区的水禽场禽流感基因重组的几率增高,可能加大种间传播的机会,加大禽流感防控的难度。

H6 亚型禽流感病毒主要宿主是野鸟。湖南洞庭湖地区作为“东亚-澳大利亚迁徙线”上候鸟和中国候鸟迁徙主要停歇地,野鸟的迁徙对 H6 亚型禽流感的散播起到很大作用^[13]。有研究^[14]显示,在湖水中禽流感病毒在 22℃,4 d 以内或 0℃,30 d 以内仍具有感染性,表明禽流感病毒可通过被污染的水在家禽与野禽之间相互传播。笔者在水禽场的环境拭子中也监测到 H6 亚型禽流感病毒,因此,要加强洞庭湖区水禽和野鸟的 H6 亚型禽流感的监测,并且要做好水禽场环境的消毒工作。

参考文献:

- [1] Cardona C J, Charlton B R, Woolcock P R, et al. Persistence of immunity in commercial egg-laying hens following vaccination with a killed H6N2 avian influenza vaccine[J]. *Avian Dis*, 2006, 50(3): 374-379.
- [2] Woolcock P R, Suarez D L, Kuney D. Low-pathogenicity avian influenza virus(H6N2) in chickens in California, 2000-02[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(3): 872-881.
- [3] 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] 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.
- [5] Gillim-Ross L, Santos C, Chen Z, et al. Avian influenza h6 viruses productively infect and cause illness in mice and ferrets[J]. *J Virol*, 2008, 82(21): 10854-10863.
- [6] Zhang G H, Kong W H, Qi W H, et al. Identification of an H6N6 swine influenza virus in southern China[J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 11(5): 1174-1177.
- [7] GB18936-2003 高致病性禽流感诊断技术[S].
- [8] 彭宜, 张伟, 薛峰, 等. 2006—2008年华东地区家禽不同 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.
- [9] Smith G J, Fan X H, Wang J, et al. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 103(45): 16936-16941.
- [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.
- [11] 张曦, 崔鹏飞, 朱占松, 等. 两株H6N8亚型禽流感病毒分离株的分离与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(3): 177-180.
- [12] 丁晴微, 邓国华, 施建忠, 等. 两株鸭源H6N2亚型禽流感病毒的序列分析及对鸡的致病性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(4): 270-275.
- [13] 张玉稳, 柴洪亮, 张苗, 等. 一株野鸭源H6N1亚型禽流感病毒HA基因的克隆及分子进化分析[J]. *野生动物*, 2010, 31(6): 327-330.
- [14] Webster R G, Yakhno M, Hinshaw V S, et al. Intestinal influenza replication and characterization of influenza viruses in ducks[J]. *Virology*, 1978, 84(2): 268-276.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 王 库