

2009~2013年我国活禽市场环境样本中 禽流感病毒的检测

张焯, 李晓丹, 邹淑梅, 薄洪, 董丽波, 高荣保, 王大燕, 舒跃龙*

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 流行性感冒室,
卫生部医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 102206)

摘要:为了解中国活禽市场环境样本中禽流感病毒分布情况,对全国2009~2013年采自活禽市场的环境样本进行流感病毒核酸检测,并利用无特殊致病原鸡胚(SPF鸡胚)对A型流感病毒核酸阳性标本进行病毒分离。结果显示,环境标本中禽流感病毒核酸阳性率的波动呈明显的季节性趋势,冬春季核酸阳性率较高;我国南方地区活禽市场环境样本的禽流感病毒核酸阳性率高于北方。市场中清洗禽类的污水和宰杀或摆放禽肉案板表面的擦拭样本核酸阳性率高于其它类型的样本。2009~2013年环境样本中分离到的禽流感病毒以H5和H9亚型为主,2013年之前H5亚型多于H9亚型,而2013年H9亚型超过了H5亚型。研究表明,对城乡活禽市场中禽流感病毒的实时监测具有重要的公共卫生意义,可为我国人感染禽流感病毒的防控和预测预警提供依据。

关键词:禽流感病毒;流行;活禽市场

中图分类号:S851.34+7.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2015)06-0615-05

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002820

禽流感是由A型流感病毒引起的一种禽类的感染性疾病^[1]。禽流感病毒根据表面血凝素蛋白和神经氨酸酶的不同,可以分为不同亚型,目前发现有18种HA亚型和11种NA亚型^[2]。1997年中国香港地区首次报道人感染H5N1亚型禽流感病毒^[3],此后近二十年内世界各地先后出现H9N2、H7N2和H7N3等亚型禽流感病毒感染人类,仅在2013年,中国就先后报道H7N9、H6N1和H10N8等禽流感病毒感染病例^[4-6]。研究表明,活禽市场是人感染禽流感病毒的主要来源地^[7],活禽市场中禽类交易频繁,流通迅速,而禽流感病毒依然能够持续存在,提示活禽市场环境中存在禽流感病毒污染。对此,自2009年开始在全国开展了活禽相关环境禽流感病毒病原学监测工作,并制定了全国《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案》。本文在此首次对全国各地活禽市场环境样本中禽流感病毒检测情况进行系统分析。

材料与方 法

1 标本采集 根据我国《职业暴露人群血清学和环

收稿日期:2015-02-06;修回日期:2015-05-27

作者简介:张焯(1973-),女,主要从事禽流感病毒病原学监测研究,Tel:010-58900853,E-mail:zhangye@cnic.org.cn

*通讯作者:舒跃龙(1971-),研究员,博士生导师,主要从事流感病毒研究,Tel:010-58900850,E-mail:yshu@cnic.org.cn

境高致病性禽流感监测方案》,2009年1月至2013年12月31日,全国各省、自治区、直辖市的疾病预防控制中心开展了城乡活禽市场环境样本采集工作,每个监测点可包括2~3个采样点,采集的环境标本可包括禽类粪便和笼具表面擦拭标本等多个种类。

2 环境标本核酸检测 依据上述监测方案,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流感室对省级疾病预防控制中心送检的初筛A型流感病毒核酸阳性标本,提取核酸进行复核检测,即:取标本液200 μ l,使用RNeasy mini Kit(购自德国Qiagen公司)提取核酸,利用Agpath IDTM Onestep RT-PCR Kit(购自美国Life Technology公司)进行一步法Real-time RT-PCR扩增,利用MxPro-3005P荧光定量PCR仪(购自美国安捷伦公司)进行扩增。操作按试剂盒说明书进行。

3 病毒分离及亚型鉴定 A型禽流感病毒核酸复核阳性的标本接种9日龄SPF级鸡胚(购自梅里亚维通实验动物有限公司)尿囊腔,于37 $^{\circ}$ C培养箱培养进行病毒分离,48h后收获鸡胚尿囊液,采用红细胞凝集(HA)实验检测病毒滴度,具体方法参见流行性感冒诊断标准(WS285-2008)。经HA实验检测阳性的病毒分离物提取核酸,进行病毒HA及NA的亚型鉴定,病毒核酸亚型鉴定方法同环境样本核酸检测。

4 统计分析 用SPSS 19.0软件进行 χ^2 ,并计算P值。

结 果

1 活禽市场环境样本中 A 型流感病毒核酸阳性标本地区分布情况

2009~2013 年,全国共有 29 个省(自治区、直辖市)开展了城乡活禽市场环境样本禽流感病毒监测,共采集 33409 份活禽市场环境标本,采集自 142 个地市。经中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流行性感冒室 Real-time RT-PCR 复核检测,A

型流感病毒核酸阳性 2612 份,分布于全国 93 个地市,其中南方地区 57 个地市,北方地区 36 个地市,2009 年和 2011 年我国南方和北方活禽市场环境样本禽流感病毒核酸阳性率无显著差别,2010 年、2012 年及 2013 年南方和北方活禽市场环境样本禽流感病毒核酸阳性率存在显著性差别,南方明显高于北方($\chi^2 \geq 20.14, a = 0.5, v = 2, P < 0.01$)。总体来讲,我国南方活禽市场环境样本的禽流感病毒核酸阳性率高于北方($\chi^2 = 115.7, a = 0.5, v = 2, P < 0.01$)。

表 1 2009~2013 年我国城乡活禽市场环境禽流感病毒核酸阳性环境样本地区分布情况

Table 1 The geographic distribution of avian influenza environmental samples collected during 2009-2013

Year	Positive rate(%)		Total	χ^2	P
	(Flu A positive samples/Samples collected)				
	South China	North China			
2009	0.16(3/1921)	0.52(2/400)	0.22(5/2321)	1.83	>0.05
2010	2.86(161/4496)	0.69(6/868)	3.11(167/5364)	20.14	<0.01
2011	6.04(279/4618)	5.45(63/1154)	5.92(342/5772)	0.56	>0.05
2012	13.84(646/4667)	6.28(148/2375)	11.27(794/7042)	91.25	<0.01
2013	11.7(1099/9361)	5.77(205/3549)	20.10(1304/12910)	100.8	<0.01
Total	8.73(2188/25063)	5.08(424/8346)	6.47(2612/33409)	115.72	<0.01

2 活禽市场环境样本中 A 型流感病毒核酸阳性标本时间分布

我国活禽市场中环境标本中,禽流感病毒核酸

阳性率具有明显的季节性趋势,每年冬春季节核酸检测阳性率较高,而夏季则相对较低,即在每年的 10 月至次年的 4 月份左右形成高峰(图 1)。

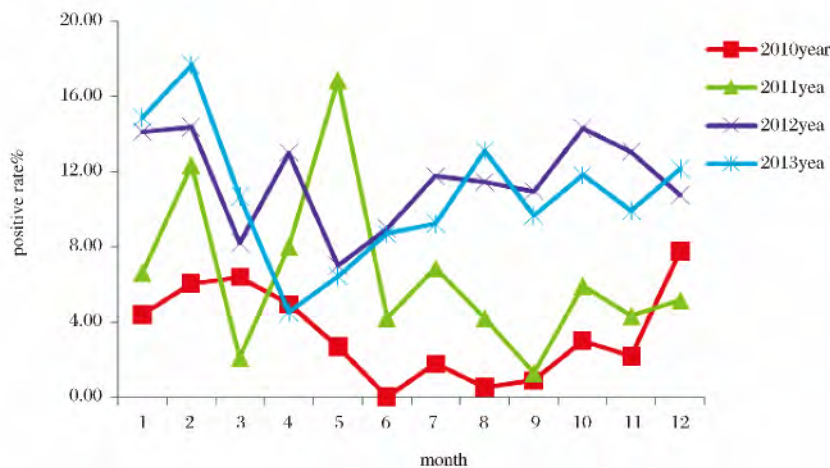


图 1 我国活禽市场环境样本中禽流感病毒核酸阳性标本时间分布
Figure 1 The collection time of influenza A virus nucleic acid positive environmental samples

3 不同环境样本类型禽流感病毒核酸阳性分布情况

根据方案要求,环境样本主要采集城乡活禽市场中的禽类粪便样本、笼具表面擦拭样本、禽类饮水、清洗禽类污水、宰杀或摆放禽肉案板表面的擦拭

样本等样本。共采集粪便样本 8940 份、笼具表面擦拭样本 10915 份、禽类饮水 2831 份、清洗禽类污水 5191 份、宰杀或摆放禽肉案板表面的擦拭样本 3974 份及其他种类样本 1558 份。不同样本类型的 A 型禽流感核酸阳性分布见表 2。根据统计学分析,清

洗禽类的污水和宰杀或摆放禽肉案板表面的擦拭样本核酸阳性率明显高于其他样本类型($\chi^2=581.2, a=0.5, v=5, P<0.01$)。

表 2 2009~2013 年城乡活禽市场 A 型流感病毒核酸阳性标本类型分布情况

Table 2 Distribution of the type of influenza A virus nucleic acid positive environmental samples collected in 2009-2013

Sample types	Positive rate (%)					Total
	(Flu A positive samples / Samples collected)					
	2009	2010	2011	2012	2013	
Feces	0.79(2/252)	0.65(8/1237)	3.63(57/1570)	5.83(117/2008)	3.77(146/3873)	3.69(330/8940)
Poultry cage	0.25(3/1177)	1.71(33/1922)	3.81(73/1915)	10.54(246/2335)	11.19(399/3566)	6.91(754/10915)
Drinking water	0(0/175)	2.37(13/549)	6.85(34/496)	8.65(53/613)	13.13(131/998)	8.16(231/2831)
Cleaning poultry wastewater	0(0/321)	7.6(65/853)	11.77(123/1045)	21.08(218/1034)	14.91(289/1938)	13.39(695/5191)
Chopping board	0(0/201)	6.9(31/449)	5.79(31/535)	17.27(152/880)	15.14(289/1909)	12.66(503/3974)
Others	0(0/195)	4.8(17/354)	11.37(24/211)	4.65(8/172)	7.99(50/626)	6.35(99/1558)
Total	0.22(5/2321)	3.11(167/5364)	5.92(342/5772)	11.27(794/7042)	20.10(1304/12910)	6.47(2612/33409)

4 环境样本禽流感病毒分离情况

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流行性感室对复核 A 型流感病毒核酸阳性的标本开展了病毒分离,分离到流感病毒 517 株。对分离的禽流感病毒,经核酸鉴定 HA 型别有 H2、H3、H4、H5、H6、H7、H9 和 H11。NA 型别有 N1、N2、N6、N8 和 N9。分离的禽流感病毒以 H5 和 H9 亚型

病毒为主,H5 亚型占分离毒株的 50.8%,H9 亚型毒株占分离毒株的 30.6%,其他亚型仅占 18.6%。经统计学分析,2010~2013 年 H5 亚型与 H9 亚型禽流感病毒分离率存在明显差异,2010~2012 年环境样本中 H5 亚型禽流感病毒分离率显著高于 H9 亚型,而 2013 年 H9 亚型禽流感病毒分离率显著高于 H5 亚型(表 3)。

表 3 2010~2013 年环境样本中 H5 和 H9 亚型禽流感病毒分离情况

Table 3 The isolation of avian influenza H5 and H9 subtype from environmental specimen collected in 2010-2013

Year	H5 subtype		H9 subtype		χ^2	P Value
	No. of viruses	Virus isolation rate (%)	No. of viruses	Virus isolation rate (%)		
2010	84	0.45	11	0.06	56.2	<0.01
2011	45	0.27	25	0.15	5.05	<0.05
2012	92	0.5	36	0.19	24.58	<0.01
2013	26	0.1	87	0.34	33.1	<0.01
Total	247	0.3	159	0.2	19.2	<0.01

讨 论

人感染禽流感病例大部分案例有直接接触病死禽或有活禽市场暴露史。以往中国的相关部门通过对家禽的监测,分离到多种禽流感病毒,了解多为家禽感染情况。而对城乡活禽市场环境禽流感病毒的分布情况了解甚少。2009 年以来,我们在全国开展了城乡活禽市场环境禽流感监测,了解禽流感病毒在城乡活禽市场环境感染情况。共从 29 省(自治区/直辖市)城乡活禽市场环境样本检测到 A 型禽流感病毒核酸阳性 2 612 份,检测核酸阳性率 6.47%。清洗禽类污水和宰杀或摆放禽肉案板表面

的擦拭样本核酸阳性率高于其余几种类型的环境样本。提示直接接触城乡活禽市场是人类感染禽流感病毒的危险因素之一,而接触清洗禽类的污水,宰杀摆放禽肉的案板感染禽流感病毒的风险较高。

环境标本中 A 型禽流感核酸阳性率有明显的季节性,冬春季高于夏季。主要分布在中国的南部。中国的南部河流、湖泊,湿地分布广泛家养水禽饲养普遍,又是冬季候鸟的越冬地,家养水禽与候鸟接触机会增多,候鸟会把禽流感病毒带给当地的家养水禽,并在其中流行,导致无症状的感染禽类带到活禽市场。活禽市场中各种禽类饲养集中,接触频繁,病毒污染环境,为禽流感病毒的持续传播提供了条件。事实证明在活禽市场中采取有效措施可以减少禽流

感在活禽市场中的流行^[8]。

从环境样本中分离到禽流感毒株中 H5N1 亚型禽流感病毒 2010 年出现分离高峰,随后开始下降,而 H9N2 亚型禽流感病毒分离率逐年上升,至 2013 年 H9N2 亚型分离率高于 H5N1 亚型。H7N9 亚型禽流感病毒仅在 2013 年的环境样本中首次分离到,有推测人感染禽流感病毒 H7N9 与环境中存在禽流感病毒相应的毒株有关^[9],我们的结果也显示活禽市场环境中的 H7N9 病毒是人感染 H7N9 禽流感病毒的风险因素之一。2013 年 H9N2 亚型禽流感病毒在环境中分布明显高于其他亚型,提示禽类中 H9N2 亚型病毒的活动高于其他亚型,为 H7N9 等新型重配禽流感病毒的出现提供了基因载体^[9]。

以上结果表明,监测环境样本中禽流感病毒的变化情况可以间接提示禽类中禽流感病毒的分布情况,同时,城乡活禽市场是人类接触禽类的重要途径,被禽流感病毒污染的环境增加了人类感染禽流感的风险。因此,对城乡活禽市场中禽流感病毒的实时监测具有重要的公共卫生意义,能为我国人感染禽流感病毒的防控和预测预警提供科学依据。

参考文献:

- [1] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R G, Perez D R. Universal primer set for the full length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 2275-2289.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Types of Influenza Viruses. 2014; Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393-396.
- [4] Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao G F, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Y. Severe Human Infections with a Novel Reassortant Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus[J]. *NEJ*, 2013, 368: 1888-1897.
- [5] Shi W, Shi Y, Wu Y, Liu D, Gao G F. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan[J]. *Protein cell*, 2013; 4(11): 846-853.
- [6] Chen H, Yuan H, Gao R, Zhang J, Wang D, Xiong Y, Fan G, Yang F, Li X, Zhou J, Zou S, Yang L, Chen T, Dong L, Bo H, Zhao X, Zhang Y, Lan Y, Bai T, Dong J, Li Q, Wang S, Zhang Y, Li H, Gong T, Shi Y, Ni X, Li J, Zhou J, Fan J, Wu J, Zhou X, Hu M, Wan J, Yang W, Li D, Wu G, Feng Z, Gao GF, Wang Y, Jin Q, Liu M, Shu Y. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study [J]. www.thelancet.com Published online February 5, 2014.
- [7] Chen Y, Liang W, Yang S, Wu N, Gao H, Sheng J, Yao H, Wo J, Fang Q, Cui D, Li Y, Yao X, Zhang Y, Wu H, Zheng S, Diao H, Xia S, Zhang Y, Chan K H, Tsoi H W, Teng J L, Song W, Wang P, Lau S Y, Zheng M, Chan J F, To K K, Chen H, Li L, Yuen K Y. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. *Lancet*. 2013; 381(9881): 1916-1925.
- [8] Kung N Y, Morris R S, Perkins N R, Sims L D, Ellis T M, Bissett L, Chow M, Shortridge KF, Guan Y, Peiris M J. Risk for infection with highly pathogenic influenza virus A (H5N1) in chickens, Hong Kong, 2002 [J]. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 412-8.
- [9] Lu J, Wu J, Zeng X, Guan D, Zou L, Yi L, Liang L, Ni H, Kang M, Zhang X, Zhong H, He X, Monagin C, Lin J, Ke C. Continuing reassortment leads to the genetic diversity of Influenza H7N9 in Guangdong China [J]. *J Virol*. 2014 May 14. pii: JVI.00630-14.

Detection of Avian Influenza Virus in Environmental Samples Collected from Live Poultry Markets in China during 2009–2013

ZHANG Ye, LIXiaodan, ZOU Shumei, BO Hong, DONG Libo, GAO Rongbao,
WANG Dayan, SHU Yuelong*

*(Chinese Center for Disease Control and Prevention, National Institute for Viral Disease
Control and Prevention, Department of Influenza . Key Laboratory for Medical Virology,
National Health and Family Planning Commission, Beijing, 102206, China)*

Abstract: To investigate the distribution of avian influenza virus in environmental samples from live poultry markets (LPM) in China, samples were collected and tested by nucleic acid during 2009–2013 season. Each sample was tested by real-time RT PCR using flu A specific primers. If any real-time PCR was positive, the sample was inoculated into specific-pathogen-free (SPF) embryonated chicken eggs for viral isolation. The results indicated that the positive rate of nucleic acid in environmental samples exhibited seasonality. The positive rate of nucleic acid was significantly higher in Winter and Spring. . The positive rate of nucleic acid in LPM located in the south of China was higher than in northern China. Samples of Sewage for cleaning poultry and chopping board showed that higher positive rate of nucleic acid than other samples. The Subtype identification showed that H5 and H9 were main subtypes in the environmental samples. Viral isolation indicated H5 subtypes was more than H9 subtypes between 2009 and 2013 while H9 subtypes increased in 2013. Our findings suggested the significance of public health based on LPM surveillance and provided the basis of prevention and early warning for avian flu infection human .

Key words: Avian influenza virus; Epidemic; Live poultry market

* Corresponding author : SHU Yuelong , E-mail : yshu@cnic.org.cn