

猪流感病毒 H3N2 亚型的分离鉴定与全基因组序列测定

孙志勇¹, 郭万柱^{1*}, 韩国全¹, 陈进会², 王小玉¹, 徐志文¹

(1. 四川农业大学动物生物技术中心, 雅安 625014; 2. 东莞出入境检验检疫局综合技术中心, 东莞 523072)

摘要: 通过鸡胚接种、MDCK 细胞培养、血凝及血凝抑制试验、RT-PCR 等方法, 笔者在四川首次分离并鉴定了 1 株既能在鸡胚上稳定传代又能在 MDCK 细胞上稳定产生 CPE 的 H3N2 亚型猪流感病毒, 命名为 A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂); NS 基因的测序结果表明: 该病毒分离株与 A/swine/Hong Kong/4361/99(H3N2)、A/New York/429/2003(H3N2)、A/Queensland/6/2000(H3N2)、A/New South Wales/4/1999(H3N2) 等具有代表性的标准毒株的同源性都达到 99%; 从 MDCK 细胞中抽提流感病毒基因组进行全基因克隆, 构建了 11 个包含全基因 8 个基因片段的文库。全基因测序结果表明, A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂) 共 8 个片段, 全基因序列共计 13 577 bp; 基于 HA、NA 推导蛋白的无根进化树结果显示, 四川分离株与人流感标准株 A/Queensland/6/2000(H3N2)、A/South Australia/81/2000(H3N2) 有较近的亲缘关系, 而与猪流感标准株 A/swine/Spain/42386/2002(H3N2) 的亲缘关系较远。

关键词: 猪; 流感病毒; 分离; 鉴定; 全基因

中图分类号: S852.65⁺9.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)02-0195-06

Isolation and Identification of Swine Influenza A Subtype H3N2 Strain and Sequencing of the Virus Genome

SUN Zhi-yong¹, GUO Wan-zhu^{1*}, HAN Guo-quan¹,

CHEN Jin-hui², WANG Xiao-yu¹, XU Zhi-wen¹

(1. Animal Biotechnology Centre of Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

2. Dongguan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dongguan 523072, China)

Abstract: A influenza virus strain was isolated from a pig farm in Sichuan province and identified by HA, HI and RT-PCR and some other methods, then it was named A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂). The virus could not only passage stably in SPF embryonated eggs but also multiply in MDCK cell line and induce conspicuous pathological changes. The sequence analysis indicated that the nucleotide sequence of A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂) strain shared 99% homology with standard strains A/swine/Hong Kong/4361/99(H3N2), A/New York/429/2003(H3N2), A/Queensland/6/2000(H3N2) and A/New South Wales/4/1999(H3N2). The results of sequence analysis indicated that the genome of A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂) strain includes 8 fragments and the total sequence is 13 577 bp. Phylogenetic trees based on HA and NA protein gene deduced amino acid sequence showed that A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂) have close relationship with the standard strains A/Queensland/6/2000(H3N2) and A/South Australia/81/2000(H3N2).

Key words: swine; influenza virus; isolation; identification; genome

收稿日期: 2007-05-17

基金项目: “教育部长江学者和创新团队发展计划”项目(IRTO555)

作者简介: 孙志勇(1977-), 男, 四川泸县人, 博士生, 主要从事动物传染病及病原分子生物学研究

* 通讯作者: 郭万柱, 教授, E-mail: wzguo@126.com

猪流感病毒属于正黏病毒科流感病毒属的 A 型病毒,其基因组包含了 8 个单股负链的 RNA。猪流感(Swine influenza, SI)是由猪流感病毒(SIV)引起的一种急性高度接触传染性的群发性猪呼吸道疾病^[1],临床以突发、高热、咳嗽、呼吸困难、衰竭、高发病率、低死亡率为特征,单纯 SI 的病理变化主要表现为病毒性肺炎及其他呼吸器官的炎性变化,有其他病原继发或混合感染时,病理变化更为严重而复杂^[1-2]。目前已发现的 SIV 至少有 H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N6、H4N6、H9N2 7 种不同血清亚型,广泛流行于猪群中的主要有古典型猪 H1N1、类禽型 H1N1 和类人型 H3N2 毒株^[3]。研究表明,猪的种间屏障相对较低,是禽、猪、人流感病毒唯一的共同易感宿主,是人流感病毒和禽流感病毒(AIV)双重感染的“混合器”或活载体,一个细胞同时被两种流感病毒感染,可能导致基因重配,从而产生抗原性改变的混合型流感病毒重组株,引起新的大流行^[4-5]。1976 年 1 月,美国新泽西州佛迪狄克斯 5 名新兵因感染猪源 H1N1 病毒而死于肺炎的事件,赋予 SIV 全新的公共卫生意义^[6]。本文从四川部分养猪场采集的病料中分离和鉴定了一株 H3N2 亚型病毒,并对其全基因进行克隆测序。

1 材料与方法

1.1 材料

2006 年 3 月采集四川某猪场疑似“感冒”的仔猪鼻液;SPF 鸡胚购于哈尔滨兽医研究所,MDCK 细胞及 *E. coli* DH5 α 由本室保存;High Pure RNA Isolation Kit 为罗氏(Roche)公司产品;TakaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0, pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司;Gel Extraction Kit 为 OMEGA BIO-TEK 公司产品;流感病毒血清为四川省疾病预防控制中心提供;BALB/c 小白鼠购自四川大学华西医学院。

1.2 病毒分离与传代

使用棉签拭子于 2006 年春在四川某猪场取疑似猪流感病猪鼻液,迅速将所采集的病料用 MEM 稀释,经一次性过滤器过滤后加入双抗保存备用。取 9~11 日龄的 SPF 鸡胚,于尿囊腔接种病料 0.2 mL,每传代一次做一次血凝试验,盲传 3 代,保留具有血凝特性的尿囊液^[7]。此外,将 1 mL 处理的病料接种 MDCK 细胞,于 37℃ CO₂ 细胞培养箱中培养,每天观察细胞病变(CPE)。无细胞病变则于接

毒后 5 d 收毒,继续盲传;出现 CPE 后收冻细胞培养物备用^[1]。

1.3 病毒鉴定

1.3.1 血凝及血凝抑制试验 血凝试验采用常规微量法进行^[8],取收获的培养物尿囊液进行 HA 试验,测定其对 0.1% 的公鸡红细胞的凝集活性;将有血凝活性的培养物送四川省疾病预防控制中心,使用 NDV 标准血清、H1N1 标准血清、H3N2 标准血清等进行血凝抑制试验。

1.3.2 SIV 亚型鉴定 将 1.3.1 中具备血凝抑制特性的尿囊液处理后送国家流感鉴定中心,使用 H1~9 和 N1~5 抗血清,采用常量半加敏法进行亚型鉴定。

1.3.3 病毒核酸类型和理化试验^[1] 按照 Reed-Muench 法,用 96 孔板中致密单层的 MDCK 细胞测定所分离病毒的 TCID₅₀。采用 IUDR(5-碘脱氧尿核苷)法,以病毒效价下降 2 个滴度为对 IUDR 敏感的判定标准,方法见参考文献^[9]。取病毒液,用 96 孔板中致密单层的 MDCK 细胞分别进行病毒对有机溶剂(氯仿)的敏感试验、病毒的耐热性试验(56℃, 30 min),具体方法见文献^[1]。

1.3.4 动物试验^[1] 用 10 倍 TCID₅₀^{-6.68}/0.2 mL 的细胞毒液分别滴鼻感染 3 只家兔,相同的方法以 0.1 mL 病毒液感染 6 只小白鼠,同时分别设 1 个感染同等剂量生理盐水的空白对照,观察并记录每天的临床表现。

1.3.5 病毒命名 根据世界卫生组织(WHO)规定的命名原则进行命名。

1.4 SIV 病毒 RT-PCR 检测^[10]

根据 GenBank 报道的 H3N2 亚型 SIVNS 基因设计了 1 对检测引物(5'-AACATCCTGGCGTCT-CAA-3'; 5'-CCCGACTCCCTTTACTGC-3'),参照 High Pure RNA Isolation Kit 说明书从原始鼻液病料、盲传 3 代的鸡胚尿囊液、MDCK 细胞培养物中分别提取病毒 RNA,使用 TakaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 按说明书步骤分别进行 RT-PCR 反应。电泳检测后使用 Gel Extraction Kit 回收目的片段,与 pMD18-T Vector 连接后转化 *E. coli* DH5 α ,经质粒和菌落 PCR 双重筛选阳性克隆后,将阳性克隆的穿刺菌送宝生物工程(大连)有限公司测序后将核苷酸序列在 BLAST 里进行同源性分析。

1.5 SIV 全基因克隆和序列分析^[10]

1.5.1 引物设计 参照流感病毒广东株、香港株等

设计 11 对分别包含 8 个基因节段的引物,其中片段 1~3 是分两段设计,引物序列、位置及分段情况见表 1。

表 1 全基因扩增引物一览表
Table 1 Primers used in experiment

片段 Segments	引物 Primers	引物序列 Sequence	退火温度 T _m /°C	引物位置/bp Position
NS	F1	5'-AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAA-3'	54	1-27
	R1	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATTAT-3'	51.5	864-891
M	F2	5'-AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGAT-3'	47	1-27
	R2	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTACTCC-3'	48	1 000-1 027
NA	F3	5'-AGCGAAAGCAGGGGTTTAAAATGAATC-3'	47	1-27
	R3	5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAACAG-3'	46	1 387-1 413
HA	F4	5'-AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAAACAA-3'	53.5	1-27
	R4	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTCCTCAT-3'	55	1 751-1 778
NP	F5	5'-AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCA-3'	56	1-27
	R5	5'-AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTTAA-3'	54.5	1 538-1 565
PA1	F6	5'-AGCGAAAGCAGGTACTGATTCGAAATG-3'	56	1-27
	R6	5'-TATCCAGATTGAATCAGTCAGCTCGCA-3'	57	1 267-1 293
PA2	F7	5'-TGCGAGCTGACTGATTCAATCTGGATA-3'	57.5	1 220-1 246
	R7	5'-AGTAGAAACAAGGTACTTTTTTGGACA-3'	57	2 195-2 221
PB1-1	F8	5'-AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATG-3'	58	1-27
	R8	5'-AATCGAGACTCCCAAACACTGTACTTAG-3'	58.5	1 267-1 293
PB1-2	F9	5'-AACATGCTAAGTACAGTTTTGGGAGTC-3'	55	1 258-1 284
	R9	5'-AGTAGGAACAAGGCATTTTTTCATGAA-3'	56	1 234-1 261
PB2-1	F10	5'-AGCAAAAGCAGGTCAATTATATTCAAC-3'	57	1-27
	R10	5'-GATCACCTCTAACTGCTTTTATCATGC-3'	57.5	1 252-1 279
PB2-2	F11	5'-GCTGATAGTGAGTGGAAGAGACGAACA-3'	56	1 149-1 176
	R11	5'-AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAACTATTC-3'	56.5	2 311-2 341

1.5.2 病毒 RNA 的抽提、RT-PCR、克隆测序^[10]

具体方法参照试剂盒和引物的 T_m 值进行。

1.5.3 SIV 全基因序列分析 使用 BLAST 对所得的序列进行同源序列比对,同时下载了 7 株同亚型不同分离株序列通过 DNASTar 软件构建了基于 HA 蛋白基因和 NA 蛋白基因的进化树。

2 结果

2.1 病毒分离与传代

接种 11 日龄鸡胚,经连续传代至 3 代 HA 试验阳性,血凝效价为 2⁹。在 MDCK 细胞上,通过同步接毒的方法,在盲传至第 4 代时,于接毒后 44 h 开始产生明显 CPE,即以细胞变圆变亮、内颗粒增多、漂落、细胞肿胀、细胞融合并形成旋涡状为特征。在传至第 7 代后,细胞于接毒后 32 h 可出现稳定的

CPE。

2.2 病毒血凝及血凝抑制试验

接种 11 日龄鸡胚,盲传至第 3 代,48 h 后收集尿囊液进行血凝试验,血凝效价为 2⁶~2⁹。

选择血凝效价为 2⁹ 的尿囊液稀释 16 倍进行血凝抑制试验。结果显示,NDV 为阴性,H1N1 也为阴性,H3N2 为阳性,且血凝抑制效价为 2⁴。

2.3 亚型鉴定及命名

经国家流感中心对其亚型鉴定,确定为 H3N2 亚型。根据世界卫生组织的命名规则,命名为 A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂)

2.4 病毒核酸鉴定结果及理化试验结果

按照 Reed-Muench 法,计算该病毒 TCID₅₀ 为 10^{-6.68}/50 μL。经 IUDR 试验,处理组与对照组的 TCID₅₀ 分别为 10^{-5.81}/50 μL 和 10^{-6.23}/50 μL,由此

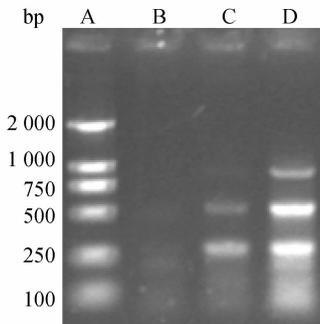
说明该病毒是一种 RNA 病毒。病毒经有机溶剂氯仿处理后,处理组与对照组的 TCID₅₀ 分别为 $10^{-1.80}/50 \mu\text{L}$ 和 $10^{-6.38}/50 \mu\text{L}$,病毒的感染滴度下降 4.58,说明病毒对有机溶剂氯仿敏感。与对照相比,病毒经 56℃ 30 min 作用后病毒滴度由 6.43 下降到 1.24,表明病毒不耐热。

2.5 动物试验结果

家兔和小白鼠试验结果表明,2 种动物对本株病毒的敏感性不一致。2 只家兔在接种病毒 5 d 后仅有轻微打喷嚏的现象,无明显的病理变化,对照组正常。而 6 只攻毒组小白鼠中有 4 只出现较明显的临床症状,即出现体温升高、喷嚏、呼吸急促、精神萎靡;解剖发现其呼吸道严重充血,并伴有炎症。另 2 只小白鼠病情较轻,仅有轻微喷嚏。对照组小白鼠均表现正常。

2.6 病毒的 RT-PCR 检测

对从原始鼻液病料、盲传 3 代的鸡胚尿囊液、MDCK 细胞培养物中抽提的 RNA 进行 RT-PCR 扩增,经电泳检测条带发现原始病料没有检测出预期 560 bp 的条带,仅有较淡的非特异性条带;从鸡胚尿囊液里检测出了预期大小的条带,但条带较淡,DNA 量较少,有较大的非特异条带;而从 MDCK 细胞培养物中扩增出与预期相符且量较大的 DNA 条带(图 1)。回收克隆 Ladder D 中的目的条带,经测序和序列分析表明,该序列与猪流感病毒 H3N2 型的序列同源性最大,和 A/swine/Hong Kong/4361/99(H3N2)、A/New York/429/2003(H3N2)、



A. DL2000 分子量标准; B. 原始病料 PCR 产物; C. 鸡胚尿囊液 PCR 产物; D. MDCK 培养物 PCR 产物

A. Marker DL2000; B. PCR Product from primitive materials; C. PCR Product from embryonated eggs; D. PCR Product from MDCK

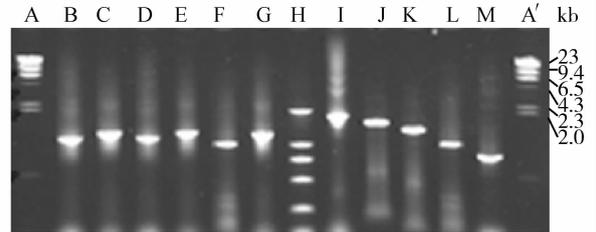
图 1 RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electropherogram of RT-PCR Products

A/Queensland/6/2000 (H3N2)、A/New South Wales/4/1999(H3N2)等具有代表性的标准毒株的同源性都达到了 99%,但与同科的 H1N1、H5N1 以及其他亚型病毒的序列同源性低,结合病毒亚型鉴定及理化性质分析确证所分离病毒即为 A 型猪流感病毒 H3N2 亚型。

2.7 SIV 全基因克隆

用设计的 11 对包含了全基因组的 8 个片段的引物,经 RT-PCR 扩增病毒全基因,通过 1% 的凝胶电泳后照相观察 PCR 结果。结果(图 2)显示,所得到的条带大小与预期相符合。



A and A' are marker λ Hind III; N, L, K, J, I are NS, M, NA, NP, HA protein gene; H is marker DL2000; G and F are PA protein gene; D and E are PB1 protein gene; B and C are PB2 protein gene

图 2 全基因组 RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 2 Electropherogram of RT-PCR products of the virus genome

2.8 序列分析

参考 A 型流感病毒 H3N2 亚型 NS 基因部分保守区设计 1 对检测引物,通过 RT-PCR 扩增和克隆测序,得到部分 NS 序列(560 bp)。序列与 GenBank 中的其他序列比对结果表明,该序列与猪流感病毒 H3N2 型的序列同源性最大,和 A/swine/Hong Kong/4361/99 (H3N2)、A/New York/429/2003 (H3N2)、A/Queensland/6/2000 (H3N2)、A/New South Wales/4/1999 (H3N2)等具有代表性的标准毒株的同源性都达到了 99%,但与同科的 H1N1、H5N1 以及其他亚型病毒的序列同源性低,结合病毒亚型鉴定及理化性质分析确证所分病毒即为 A 型猪流感病毒 H3N2 亚型。

参考 A 型流感病毒 H3N2 各亚型的 8 个节段标准株序列设计特异性引物,扩增得到了包含 8 个节段的 A 型流感病毒的全长 cDNA。测序结果表明其全基因大小为 13 577 bp,8 个节段的 5' 和 3' 端有近 10 bp 的高度保守区,并且 8 个节段的保守碱基基本相同。序列同源性分析结果表明,HA 基因

和 NA 基因在 8 个基因节段中变异相对较大, PB2 基因、PB1 基因、PA 基因变异程度次之, 而 NS 基因、NP 基因、M 基因高度保守。在 GenBank 中检索具有代表性的 7 株 A 型流感病毒 H3N2 亚型已知的序列, 建立了 HA、NA 推导蛋白的无根进化树。HA 蛋白进化树结果显示, 四川分离株与人流

感标准株 A/Queensland/6/2000(H3N2)、A/South Australia/81/2000(H3N2) 处于一大群, 即亲缘关系较近, 而与猪流感标准株 A/swine/Spain/42386/2002(H3N2) 的亲缘性远。同样的, 自 NA 蛋白推导的结果与 HA 蛋白推导的结果基本相似。

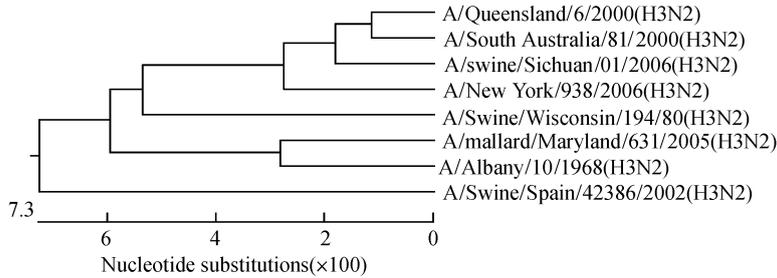


图 3 基于 HA 基因推导氨基酸序列的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic trees based on deduced amino acid sequence of HA gene

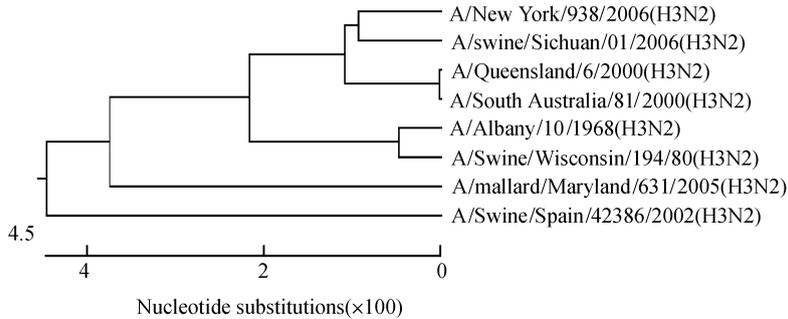


图 4 基于 NA 基因推导氨基酸序列的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic trees based on deduced amino acid sequence of NA gene

3 讨论

近年来, 四川境内常有疑似流感发病的临床病例, 但尚无猪流感病毒的分离鉴定的报告, 即使在中国的西部也几乎没有相关报道。本次试验在病料采集和培养方面及时迅速, 充分优化条件的情况下首次在四川分离到猪流感病毒, 结果表明 A/swine/Sichuan/1/2006(H₃N₂) 为类人型 H3N2 毒株。流感病毒在体外有不耐热、较脆弱、不易培养的特征^[10], 在病料的采集、运输和处理过程中应该尽量在较低的温度下进行, 并且需要及时接种鸡胚或者细胞^[11]。试验结果表明, 过夜病料不能在鸡胚或者 MDCK 细胞上繁殖。采用 RT-PCR 扩增原始鼻液病料、盲传 3 代的鸡胚尿囊液、MDCK 细胞培养物

中抽提的 RNA, 发现原始病料没有扩增出相应的条带, 而培养于 MDCK 细胞的扩增量最大, 证实 MDCK 是流感病毒的最佳培养载体。

目前, 许多 RNA 病毒对人类安全和财产形成现实的威胁, 如禽流感病毒、HIV、口蹄疫病毒、SARS 病毒等, 基因变异使疫苗无效而无法通过疫苗防疫的手段来控制这类疾病的蔓延。研究这类基因变异是人类必须面对的问题, 需通过对其中病毒变异机理的研究, 找到控制其变异的方法, 从而实现对此类病毒的控制^[12]。对此, 笔者选择猪流感病毒作为一个研究的载体, 对分离流感病毒 H3N2 亚型进行全基因克隆, 为今后进一步研究打下基础。鉴于流感病毒基因各片段的 3' 和 5' 端具有相似的结构, 所以在 A/swine/Sichuan/01/2006(H₃N₂) 株

全基因扩增过程中,常出现非特异性片段,因此, PB1、PB2 和 PA 三个较长片段得不到完整的目的条带。对此,笔者采用分段扩增的方法,结果比较容易扩增出目的片段。接下来的工作是将片段连接成完整的片段,为构建流感病毒的感染性克隆奠定基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1997:333-334.
- [2] 斯特劳. 猪病学[M]. 赵德明等译. 第8版. 北京:中国农业大学出版社,2000:665-669.
- [3] OLSEN C W. The emergence of novel swine influenza virus in North America[J]. *Virus Research*,2002,85:199-200.
- [4] JANKE B H. Diagnostic tests for swine influenza[M] //Pig progress (special),respiratory diseases[S. l.]:[s. n.],2001:32-34.
- [5] SHOPE R E. Swine influenza III filtration experiments

and etiology[J]. *J Exp Med*,1931,54:373-385.

- [6] STEPHEN C. H4N6 influenza virus isolated from pigs in Ontario[J]. *Can Vet J*,2000,41:938-939.
- [7] 郭元吉,程小霞. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997.
- [8] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1999:1 005-1 020.
- [9] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 金东雁译. 第3版. 北京:科学出版社,2002:566-568.
- [10] CHOI C, HA S K, CHAE C. Detection and isolation of H1N1 influenza virus from pigs in Korea[J]. *Vet Rec*,2004,154:274-275.
- [11] FOUCHIER R A V, MUNSTER A, WALLENSTEN T M, et al. Characterization of a novel influenza virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *J Virol*,2005,79:2 814-2 822.
- [12] 李海燕. SIV 分离株的生物学特性及分子流行病学与遗传演化研究[D]. 广州:华南农业大学,2002.

动物疫情速递

英国发生高致病性禽流感

2008年1月11日,英国向 OIE 报告了高致病性禽流感疫情。疫情始于2007年12月27日,于2008年1月10日得到确诊。本次疫情非临床病例,依靠实验室检测作出诊断。病原是 H5N1 血清型高致病性禽流感病毒。英国 VLA Weybridge 实验室(OIE 参考实验室)的实时 PCR 和核酸测序结果均呈阳性。疫区位于英格兰 Dorset 地区 Abbotsbury,感染动物为3只野鸟,已经死亡。从2007年12月27日到2008年1月4日,在 Dorset 的 Abbotsbury 天鹅饲养地和邻近沿海地区发现3只天鹅。初步报告显示在被发现时2只天鹅仍存活,但因受伤而被施行安乐死。英国按照欧盟和国家法律设立了野鸟控制区(疫点周围3 km)和监测区(疫点周围10 km)。没有家禽患病的证据。流行病学调查正在进行中。感染来源尚不清楚。英国采取的控制措施有国内控制移运、区域化、筛检,英方禁止免疫,未对动物进行治疗。英国上一次发生高致病性禽流感是在2007年11月。

印度发生高致病性禽流感

2008年1月15日,印度政府书记官 Pradeep Kumar 博士向 OIE 报告了西孟加拉邦的高致病性禽流感疫情。疫情始于2008年1月4日,于2008年1月15日得到确诊。本次疫情属于临床病例,依靠实验室检测(基础、高级)作出诊断。病原是 H5N1 血清型高致病性禽流感病毒。印度国家病毒研究所(浦那)的 RT-PCR 和实时 PCR 结果均呈阳性,印度高等安全动物疾病实验室(博帕尔)的 RT-PCR、实时 PCR、血凝抑制试验、血凝试验和病毒分离结果均呈阳性。疫区一位于比尔宾的 Rampurhat、Nalhati 和 Mayureswar 村,感染动物为3个村小型农场的后院家禽,有易感禽 819 078 只,病例 35 525 只,死亡 35 525 只。疫区二位于南迪奈普 Balurghat 的一个存栏 2 000 只家禽的农场,有易感禽 1 710 只,病例 261 只,死亡 261 只,未销毁,未宰杀。流行病学调查正在进行中。正在对疫点周围 5 km 范围内的家禽进行采样。印度在疫点周围 10 km 范围内进行了监测,内容包括:在疫区关闭禽类市场,禁止禽类产品的销售和运输;感染场所消毒。感染来源尚不清楚。印度采取的控制措施有扑杀、检疫、国内控制移运、筛检,即将采取感染房舍/设施消毒、浸洗/喷雾措施,印度未禁止免疫,未对感染动物进行治疗。印度上一次发生高致病性禽流感是2007年8月。

(摘译自 OIE 网站)