

华东地区家禽低致病性禽流感的病原学检测与带毒情况的分析

赵 国,赵坤坤,鹿欣伦,徐全刚,彭大新,刘秀梵*

(扬州大学兽医学院 农业部畜禽传染病学重点开放实验室,扬州 225009)

摘要:从2008年10月到2009年9月采集不同家禽的泄殖腔拭子共2420个,禽流感阳性样品178个,分离到AIVs毒株83株,总分离率7.36%。所分离到的亚型及各亚型分离率从高到低依次为H6、H3、H4、H9、H11、H1、H8。禽流感的分布季节性非常明显,以冬、春为高,各亚型又有其不同分布特点。水禽被认为是流感病毒的重要宿主,尤其是家鸭。到目前为止,作者已经从家鸭中分离到8种HA亚型,依次为H1、H3、H4、H6、H8、H9、H10、H11,7种NA亚型,包括N1、N2、N3、N4、N5、N6、N8。两者之间有18种组合,与野鸭的带毒情况十分相似。家鸭还很容易发生混合感染,并以H6亚型为主,很多亚型都可与其混合感染,尤其是H3、H9亚型,这为基因重组产生新的亚型及毒力的变异提供了好的载体。

关键词:低致病性禽流感;流行病学;家禽

中图分类号:S852.695.5

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2010)09-1133-05

Infection of Low Pathogenic Avian Influenza in Poultry in Eastern China

ZHAO Guo, ZHAO Kun-kun, LU Xin-lun, XU Quan-gang, PENG Da-xin, LIU Xiu-fan*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture,
Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: From October 2008 to September 2009, 2420 cloaca swab samples were collected from domestic poultry in the LPMs (live-poultry markets), and 83 strains of AIVs were isolated with an isolation rate of 7.36%. These strains of AIV belonged to 7 HA subtypes, from high to low, the order of the isolation rate was H6, H3, H4, H9, H11, H1, H8. The isolation rate of AIVs was distributed with significant seasonal variations, higher in winter and spring and lower in summer. The distribution of HA subtypes of AIVs was also uneven in different month. Waterfowl are considered as the important host of influenza A viruses, especially domestic ducks. So far, 8 HA subtypes (H1, H3, H4, H6, H8, H9, H10 and H11) and 7 NA subtypes (N1, N2, N3, N4, N5, N6 and N8) were isolated from domestic ducks. Strains of HA and NA subtypes assembled 18 subtypes. Domestic duck is still the most prone to mixed infections, and H6 subtypes played the main role, H3 and H9 were the other main mixed infection subtypes, providing a good carrier to generate a new subtype and virulence variation.

Key words: low pathogenic avian influenza; epidemiology; poultry

禽流感(Avian Influenza, AI)是由A型流感病毒感染禽类后引起的各种综合征,从无临床症状感

收稿日期:2010-04-14

基金项目:十一五国家科技支撑计划资助(2006BAD06A01);国家科技重大专项课题(2008ZX10004-013);国家蛋鸡产业技术体系(nycytx-41-G07)

作者简介:赵 国(1983-),男,山东泰安人,博士生,主要从事动物分子病毒学研究,E-mail:zhaodaguo2007@163.com

* 通讯作者:刘秀梵,Tel:86-514-7991416,E-mail:xfliu@yzu.edu.cn

染到呼吸道疾病和产蛋下降,到死亡率接近 100% 的严重全身性疾病。根据疫情发生的严重程度,可将其分为高致病性禽流感(HPAI)、低致病性禽流感(LPAI)。在科学高度发达的今天,随着生物学、医学的发展,许多烈性传染病被相继攻克,然而流感却是一个例外,它不但没有得到有效的控制,反而伴随着疫苗的普遍应用,毒力不断增强、变异异常活跃,这不得不让我们反思目前的防控措施。华东地区水网密集、人口稠密、猪禽混养、水禽众多,同时又是世界 2 条候鸟迁徙路线的必经之地,加强该地区的禽流感流行病学监测,对于追踪传染源、分析传播途径与影响因素,及制定正确的防控措施有重要意义。从 2002 年起我们对华东地区部分省市的家禽进行低致病性禽流感(LPAIV)的病毒学监测,主要从鸡、鸭、鹅中 AIVs 的感染率、亚型分布、分布的时间规律等方面进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准阳性血清 H1~H11 亚型禽流感和鸡新城疫(ND)标准血清均由中国扬州农业部畜禽传染病学重点开放实验室制备并提供。

1.1.2 运输液 根据 OIE 推荐的配方配制运输液。

1.1.3 鸡胚 9~10 日龄 SPF 鸡胚购自山东省家禽研究所 SPF 种鸡场。

1.1.4 SPF 鸡红细胞 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室制备。

1.1.5 测序试剂 T4 DNA 连接酶、pGEM-T easy vector、dNTPs($10 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、Agrose Gel DNA Extraction Kit、AMV 及相关试剂、Taq 聚合酶、RNasin($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、限制性内切酶 *EcoR* I 和大肠杆菌 DH5 α 、IPTG、X-gal、RNA 提取试剂 Trizol reagent、DEPC 等。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 从 2008 年 10 月至 2009 年 9 月,每月定期在华东地区扬州活禽市场(LBMs)采集健康家禽 150~212 份泄殖腔拭子。将棉拭子头折断放入含 1 mL 的运输液的 1.5 mL 指形管中,置 $-75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。共采集 2 420 个家禽泄殖腔拭子。

1.2.2 病毒分离 取家禽泄殖腔拭子处理液按文献[1]方法尿囊腔接种 10 日龄 SPE 鸡胚,每个样

品接种 3 枚鸡胚,接种剂量为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{胚}^{-1}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 h,每天观察 2 次鸡胚死亡情况,将 120 h 后未死亡的鸡胚置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻死,收获所有鸡胚尿囊液,检测血凝价,有血凝价的样品置 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。用 pH7.2 的 PBS 溶液作 1:10 稀释,进行传代接种($0.2 \text{ mL} \cdot \text{胚}^{-1}$)。收获鸡胚的尿囊液。每份样品都盲传 2 代。

1.2.3 病毒鉴定 将有血凝价的样品分别与抗 NDV 和抗 EDS-76 特异性血清做 HI 试验,按文献[2]的方法进行,HI 滴度 $\geq 2^4$ 即判为阳性。从有血凝价的样品中排除新城疫病毒、类 EDS-76 的腺病毒。经 HI 试验鉴定为 AIVs 的样品用抗 H1~H11 阳性血清做禽流感病毒 HA 亚型的鉴定,HI 滴度 $\geq 2^4$ 即判为阳性。对已知 HA 亚型 AIVs 的 NA 基因,按文献[2]方法设计引物进行序列测定,并将结果与网上公布的基因序列进行比对,确定其 NA 亚型。

2 结果

2.1 禽流感病毒各亚型病毒分离率

从 2008 年 10 月到 2009 年 9 月采集不同家禽泄殖腔拭子共 2 420 个,阳性样品 178 个,分离 AIVs 毒株 83 株,总分离率 7.36%。各亚型 AIVs 分离率从高到低依次为 H6、H3、H4、H9、H11、H1、H8。其中 H6 阳性样品 71 个,分离 AIVs 毒株 19 株,分离率 2.93%;H3 阳性样品 70 个,分离 AIVs 毒株 24 株,分离率 2.89%;H4 阳性样品 21 个,分离 AIVs 毒株 10 株,分离率 0.87%;H9 阳性样品 19 个,分离 AIVs 毒株 8 株,分离率 0.79%;H11 阳性样品 14 个,分离 AIVs 毒株 8 株,分离率 0.59%;H1 阳性样品 12 个,分离 AIVs 毒株 11 株,分离率 0.50%;H8 阳性样品 3 个,分离 AIVs 毒株 3 株,分离率 0.12%,详情见表 1。

2.2 禽流感病毒分离率的季节性分布

按公历气象划分法一般以 1 月份为最冷月,7 月份为最热月,3—5 月为春季,6—8 月为夏季,9—11 月为秋季,12 月至翌年 2 月为冬季。作者在冬季采集不同家禽泄殖腔拭子 636 个,其中阳性样品 84 个,分离毒株 61 株,分离率为 13.21%;春季样品 582 个,其中阳性样品 46 个,分离毒株 20 株,分离率为 7.90%;夏季样品 595 个,其中阳性样品 39 个,分离毒株 9 株,分离率为 6.55%;秋季样品 607 个,其中阳性样品 22 个,分离毒株 9 株,分离率为

表 1 华东地区 AIVs 各亚型各月份的分离率分布情况

Table 1 Distribution of the different HA subtypes of AIVs in different month of Eastern China

日期 Date	H3 分离率 Isolation rate of H3	H6 分离率 Isolation rate of H6	H9 分离率 Isolation rate of H9	H1 分离率 Isolation rate of H1	H4 分离率 Isolation rate of H4	H8 分离率 Isolation rate of H8	H11 分离率 Isolation rate of H11
2008.10	0	0	0	0	0	0	0
2008.11	0.12	0.12	0.12	0.04	0	0	0
2008.12	0.21	0.37	0.25	0.21	0	0.04	0.08
2009.01	0.5	0.62	0.04	0.08	0.21	0.04	0.04
2009.02	0.7	0.21	0.04	0.17	0.12	0	0.33
2009.03	0.08	0.5	0.04	0	0.33	0.04	0
2009.04	0.29	0.21	0.08	0	0.21	0	0
2009.05	0	0	0.21	0	0	0	0
2009.06	0.04	0.87	0	0	0	0	0
2009.07	0.08	0	0	0	0	0	0.04
2009.08	0.37	0	0	0	0	0	0.08
2009.09	0.5	0.04	0	0	0	0	0
合计 Total	2.89	2.93	0.79	0.5	0.87	0.12	0.59

3.62%。可以看出禽流感的季节性分布非常明显,以冬、春为高,其中 1 月份分离率最高,达 18.87%。禽流感各亚型又有其不同分布特点,H1、H4、H8、H9 主要集中在冬季及与春秋季节的临界处,不同的是 H9 亚型在春秋气温不稳定时分离率更高一些;H3、H6 在全年都可分离到,且分离率较高。各亚型的季节性分布表见图 1。

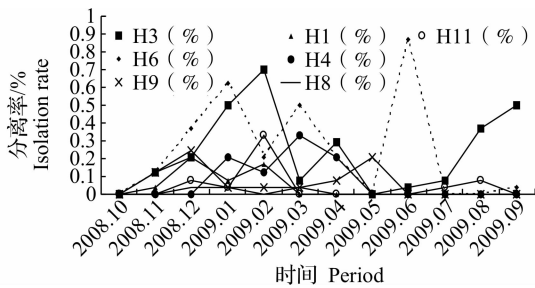


图 1 华东地区 AIVs 各亚型的季节性分布情况

Fig. 1 Distribution of the different HA subtypes of AIVs in different season of Eastern China

2.3 禽流感病毒在不同家禽中的分布特点

家禽中以家鸭中 AIVs 的分离率最高,其次是鸡和鹅,分离率依次为 13.12%、3.83% 和 0.54%。从家鸭中共分离到 7 种 HA 亚型的 AIVs,按分离率从高到低的顺序依次为 H6、H3、H4、H9、H11、H1、H8 亚型;从鸡体内分离到 5 种 HA 亚型的 AIVs,按分离率从高到底依次为 H9、H1、H3、H6、

H4 亚型;从鹅体内共分离到 3 种 HA 亚型,按分离率从高到底依次为 H3、H6、H1 亚型。从以上数据可以看出家鸭体内的 AIVs 以 H6 亚型为主,鸡体内的 AIVs 以 H9 亚型为主,鹅体内的 AIVs 以 H3 亚型为主,3 种家禽共有的亚型有 H3、H6、H1,各亚型病毒在家鸭的分离率都远远高于其它 2 种家禽。通过对已知 HA 亚型的部分毒株的 NA 基因进行测序,初步鉴定有 7 种 NA 亚型,分别为 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N8,和 HA 亚型有 18 种组合。

2.4 混合感染的特点

2 420 个样品有 182 个 AIVs 阳性样品,其中有 50 个混合感染样品,混合感染率为 2.07%,其中家鸭的样品为 41 个,鸡的样品为 8 个、鹅的样品为 1 个,混合感染率分别为 3.81%、1.33% 和 0.13%。亚型混合感染最多为 4 种亚型,其中 2 个亚型的混合感染样品有 36 个,3 个亚型的混合感染样品有 11 个,4 个亚型的混合感染样品有 3 个,而鸡的混合感染都是 2 个亚型,4 个亚型混合感染都于家鸭中发现。50 个混合感染的样品所包含的亚型从多到少依次为 H6、H4、H3、H11、H1、H9、H8,所占比例分别为 33/50、19/50、18/50、10/50、10/50、8/50、2/50;各亚型的混合感染样品占各自所分离的阳性样品比例的数据见表 2。由表 2 可见所分离的各亚型混合感染率都很高,其中 H4、H1、H11、H8 多存在于混合感染样品中。H9 亚型的混合感染有 8 个样

品,且都是鸭源的,其中 89% 的都与 H6 混合感染, 详细情况见表 3。

表 2 华东地区 AIVs 各亚型的混合感染分布情况

Table 2 Distribution of mixed infection of the different HA subtype of AIVs in Eastern China

亚型 Subtype	H1	H3	H4	H6	H8	H9	H11	合计 Total
阳性样品 Positive samples	12	70	21	71	3	19	14	182
混合感染数 Number of mixed infection	10	18	19	33	2	8	10	50
所占比例/% Ratio	83.33	25.71	90.47	46.48	66.67	42.11	71.43	27.48

表 3 鸭 AIVs 各亚型的混合感染分布情况

Table 3 Distribution of mixed infection of the different HA subtype of AIVs in duck

来源 Source	H9	H6	H11	H3
江苏鸭 Jiangsu duck	*	*	*	*
安徽鸭 Anhui duck	*	*		
江都鸭 Jiangdu duck	*	*	*	
江都鸭 Jiangdu duck	*	*		*
江都鸭 Jiangdu duck	*	*	*	
江都鸭 Jiangdu duck	*	*		
江都鸭 Jiangdu duck	*	*		
南京鸭 Nanjing duck	*			

* 代表样品中含有的禽流感病毒亚型

* denote the subtypes of avian influenza virus in samples

3 讨论

流感病毒在自然界中广泛存在,从人、猪、马等哺乳动物以及水生哺乳动物到鸟类都能分离到。其中野生水禽是 A 型流感病毒的天然存储库,尤其是野鸭,其带毒情况更为普遍。人类从 20 世纪 70 年代便开始对 A 型流感病毒的生态学进行系统的研究,已经鉴定出 16 个 HA 亚型和 10 个 NA 亚型^[3]。除 H13、H16 亚型的流感病毒只从海鸟分离到^[4-5]外,其它各亚型都可以从野鸭分离到。值得注意的是,A 型流感病毒在野生水禽宿主体内似乎达到生态的平衡,因此在野生水禽中分离的 AIVs 几乎都是低致病性的,不引起野生水禽的临床症状或仅有轻微的症状^[6-8]。家鸭和野鸭的亲缘关系最近,也最容易与野鸭发生交往,同时又经常与其它家禽混养,所以其在 AIVs 的生态学中意义重大。本研究中,家鸭禽流感病毒分离率最高,其次是鸡和鹅,分离率依次为 13.12%、3.83% 和 0.54%。到目前为止,作者已经从家鸭体内分离到 8 种 HA 亚型,依次为 H1、H3、H4、H6、H8、H9、H10、H11,7 种 NA 亚型,包括 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N8。两者之间有 17 种组合,分别为 H1N1、H3N1、H3N2、H3N5、

H3N8、H4N2、H4N6、H6N1、H6N2、H6N8、H8N4、H9N2、H10N1、H10N3、H10N5、H11N1、H11N2,与野鸭的带毒情况十分相似。原因可能有 2 个,一是家鸭管理粗放,易与野生水禽接触;二是世界上有 2 条候鸟迁移路线途经华东地区,由于候鸟喜欢沿着海岸线飞行,因此山东、江苏、浙江沿海一带成为候鸟迁徙中一条较窄的通道,鸟的飞行范围窄,密度大,传播禽流感的概率也增大^[9]。

禽流感的流行有很强的季节性,但各血清亚型又有不同的特点。流行病学调查结果显示,当前华东地区禽流感的流行状况以 H6 亚型为主,其次是 H3 亚型,它们一年四季都能分离到,分布相对较均匀;H1、H4 多在冬季及与春秋交界处分离到,且多与其它亚型混合感染;H9 较往年分离率要高,主要集中在冬季及与春秋的临界处,但在春秋气温不稳定时分离率更高一些;H11 与 H6 亚型相似,但夏季多分离不到;H8 亚型分离率一直较低;H10 亚型 AIVs 在 2002 年 7 月到 2008 年 9 月分离率约 0.82%,但此后到 2009 年 10 月没有分离到一株(结果另报)。这说明低致病性禽流感病毒多是条件性病原微生物,易在气候突变、禽体抵抗力下降时感染家禽,但同时对不同气候也有很强的适应性。

抗原转变是禽流感病毒产生新亚型并造成疫病

大流行的重要机制。在自然条件下不同的流感病毒混合感染的频率较高,当 2 个不同的流感病毒感染同一细胞时就可以发生基因重组,从而发生抗原转变。本研究表明鸡、鸭、鹅都可以发生不同程度的混合感染,但在家鸭中更为普遍。目前,在家鸭中以 H6 亚型为主,各亚型都可与其混合感染,尤其是 H3、H9 亚型病毒,这为抗原转变产生新的亚型及毒力的变异提供了很好的载体,可以说家鸭与猪一样是不同流感病毒的“混合器”。鸡常被认为是 AIV 的异常宿主,作者却从 120 群健康鸡的 600 个泄殖腔拭子中分离到 13 株 AIVs,分离率从高到底依次为 H9、H1、H3、H6、H4 亚型。对已经发生的 HPAI 的流行病学研究认为:家禽的 HPAI 发生的方式之一就是野生水禽中的一些低致病性 AIVs 通过某种方式进入家禽后发生突变转变为 HPAI。1983 年的宾夕法尼亚禽流感^[10]、1994 年的墨西哥禽流感^[11]就是很好的例子。在当前以免疫接种为主的禽流感防控过程中,鸡的各种免疫抑制病与多病因呼吸道疾病存在的条件下,疫苗的接种并不能达到理想的保护水平,即不带毒、不排毒。高致病性毒株限制在黏膜上很可能与其它亚型一起混合感染,并在体液抗体的压力下加快其抗原漂移与抗原转变的速度。因此加强该地区的低致病性禽流感流行病学检测,对于追踪高致病性禽流感病毒的基因来源、分析传播途径与影响因素,及制定正确的防控措施有重要意义。

参考文献:

[1] BOOY F P, RUIGROR R W, BRUGGEN E F. Electron microscopy of influenza virus. A comparison of negatively stained and ice-embedded particles[J]. *J Mol Biol*, 1985, 184: 667-676.

- [2] HOFFMANN E, STECH J, GUAN Y, et al. Universal primer set the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 2275-2289.
- [3] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 第 5 版. 北京:中国农业出版社, 2008: 80-81.
- [4] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [5] 郑光美. 鸟类学[M]. 北京:北京师范大学出版社, 1995.
- [6] WEBSTER R G, BEAN W J, GORMAN O T, et al. Evolution and ecology of influenza A virus[J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1):152-179.
- [7] ALEXANDER D J. A review of avian influenza in different bird species[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 74(1-2):3-13.
- [8] SÜSS J, SCHÄFER J, SINNECKER H, et al. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany[J]. *Arch Virol*, 1994, 135(1-2):101-114.
- [9] 赵学敏. 中国大陆野生鸟类迁徙动态与禽流感[M]. 北京:中国林业出版社, 2006: 6-7.
- [10] BEAN W J, KAWAOKA Y, WOOD J M, et al. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in nature[J]. *J Virol*, 1985, 54(1): 151-160.
- [11] HORIMOTO T, RIVERA E, PEARSON J, et al. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico[J]. *Virology*, 1995, 213(1): 223-230.

(编辑 白永平)