

461 份外环境标本中禽流感病毒污染状况研究

王奕雯, 叶炜, 吴雪, 顾时平

安吉县疾病预防控制中心, 浙江 湖州 313300

摘要: **目的** 了解安吉县外环境禽流感病毒的污染水平与分布特征, 为人感染禽流感疫情防控提供科学依据。 **方法** 采集 2017—2019 年安吉县外环境监测场所样本, 采用实时荧光定量 RT-PCR 法对其进行流感病毒 A 型及其亚型 (H5、H7、H9、N9) 病毒核酸检测。 **结果** 共采集外环境样本 461 份, 共检出 A 型阳性样本 156 份, A 型总阳性率为 33.84%。各亚型及混合型中, H9 亚型阳性率最高 (7.59%), 其次为混合型 (6.72%), N9 型最低 (0.87%)。不同场所中, 农贸市场 (100.00%) 和屠宰加工厂 (45.99%) 阳性率较高, 不同标本类型中粪便标本阳性率较高 (34.33%), 不同季度则以第一季度 (43.05%)、第四季度 (38.35%) 阳性率较高。 **结论** 安吉县外环境中存在不同程度、不同型别的禽流感病毒污染, 持续的外环境禽流感监测与分析, 对防控人感染高致病性禽流感具有重要意义。

关键词: 禽流感; 外环境; 监测

中图分类号: R511.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2021)09-1142-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.09.032

禽流感是禽流行性感冠的简称, 不仅可在禽类间快速传播造成家禽养殖业的重大损失, 也能传染人引起严重的临床症状甚至死亡, 对人类社会产生极大威胁^[1]。禽流感的病原体为禽流感病毒, 根据病毒血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抗原性的不同可分为若干亚型, 其中 H5、H7、H9 亚型感染人的报道较多^[2-4]。安吉县自 2013 年 4 月首次确诊了 2 例由 H7N9 亚型感染的人禽流感本地病例后^[5], 2013—2017 年间每年均有相同病例报告, 迄

作者简介: 王奕雯 (1984-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事微生物检验工作。

今为止该地区一共报告人禽流感病例 12 例, 均为 H7N9 亚型感染 (数据来自中国疾病预防控制中心传染病监测系统)。本研究对 2017—2019 年安吉县外环境样本中的禽流感病毒及其亚型污染状况进行监测与研究, 旨在了解近年来该地区外环境禽流感病毒的分布特征与流行趋势, 为该地区感染禽流感疫情防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源 按照《浙江省人感染禽流感职业暴露人群和外环境监测方案 (2017 版)》^[6] 的计划和要求, 以全县家禽规模养殖场、家禽屠宰加工厂及乡镇农贸

- [2] 许桢, 杨婷婷, 陈永春, 等. 体检人群成分与高血压患病风险关系研究[J]. 实用预防医学, 2020, 27(3): 266-269.
- [3] Wang Z, Chen Z, Zhang L, et al. Status of hypertension in China: results from the China hypertension survey [J]. Circulation, 2018, 137(22): 2344-2356.
- [4] 杨学涛, 周亮, 刘方洲, 等. 高血压发病的性别差异及机制[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(4): 327-334.
- [5] 王家威, 樊琼玲, 罗园园等. 哈萨克族牧民新发高血压影响因素的 Cox 比例风险模型分析[J]. 中国全科医学, 2019, 22(30): 3672-3678.
- [6] 程旻娜, 王玉恒, 严青华, 等. 2013 年上海市年龄 ≥ 18 岁居民高血压流行现状[J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(5): 451-455.
- [7] Vinyoles E, Rodriguez-Blanco T, de la Sierra A, et al. Isolated clinic hypertension: diagnostic criteria based on 24-h blood pressure definition[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2407-2413.
- [8] 张洋, 何建成, 黄品贤, 等. 原发性高血压中医证素分布及其与影响因素的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5664-5668.
- [9] De Silva TM, Li Y, Kinzenbaw DA, et al. Endothelial PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) is essential for preventing endothelial dysfunction with aging[J]. Hypertension, 2018, 72(1): 227-234.
- [10] Booth JN, Li J, Zhang L, et al. Trends in prehypertension and hypertension risk factors in US adults: 1999-2012 [J]. Hypertension, 2017, 70(2): 275-284.
- [11] 余纪会, 唐兰, 赵文苹, 等. 重庆地区体检人群脂肪肝与其他常见代谢性疾病患病情况及相关性分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(3): 87-90.
- [12] Ononamadu CJ, Ezekwesili CN, Onyeukwu OF, et al. Comparative analysis of anthropometric indices of obesity as correlates and potential predictors of risk for hypertension and prehypertension in a population in Nigeria[J]. Cardiovasc J Afr, 2016, 28(2): 92-99.
- [13] 朱星梦, 贺悦, 盛杰, 等. 合肥市 45~60 岁人群的膳食模式与肥胖和高血压的关联性研究[J]. 营养学报, 2019, 41(2): 129-134.
- [14] 李碧汐, 李耘, 刘力松. 高血压病合并高尿酸血症与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 心肺血管病杂志, 2019, 38(8): 830-832, 837.
- [15] Wang WC, Chiu YF, Chung RH, et al. IGF1 gene is associated with triglyceride levels in subjects with family history of hypertension from the SAPHIRE and TWB projects [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(10): 1035-1042.
- [16] 吴小艳, 李强, 严惠, 等. 陕西省汉中市农村居民高血压与家族史的相关性分析[J]. 中华高血压杂志, 2018, 26(6): 600.
- [17] Foulds HJA, Giacomantonio NB, Bredin SSD, et al. A systematic review and meta-analysis of exercise and exercise hypertension in patients with aortic coarctation [J]. J Hum Hypertens, 2017, 31(12): 768-775.

收稿日期: 2020-07-30

市场作为监测场所,每月随机选取 3~4 个场所,每个场所随机采集 3~8 份外环境样本,3 年共采集外环境样本 461 份。样本类型分为粪便样本(包括鸡粪样本、鸭粪样本)和物体表面与污水样本(包括笼具表面擦拭样本、案板表面擦拭样本、禽类饮水样本)两大类。所有样本采集完毕后均在 4℃条件下于 2 h 内送往中心网络实验室,样本的运输遵守国家生物安全相关规定。

1.2 样本检测 检测方法均严格按照《浙江省人感染禽流感职业暴露人群和外环境监测方案(2017 版)》^[6]、《流行性感 冒诊断标准 WS 285-2008 附录 D》^[7]及《人感染 H7N9 禽流感疫情防控方案(第三版)》^[8]的要求进行。提取样本中禽流感病毒核酸(RNA)后,采用实时荧光定量 RT-PCR 法进行 A 型流感病毒核酸检测,并进一步对 A 型阳性样本进行 H5、H7、H9、N9 分型检测,最终以荧光强度、临界循环数值和曲线平滑度为标准来确定结果。收样当天未能检测的样本保存于-70℃以下,并于 1 周内完成检测。所有 A 型阳性样本分装后送至湖州市疾病预防控制中心,并由浙江省疾病预防控制中心进行复核。

1.3 仪器与试剂 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪由 ABI 公司生产,SSNP-2000A 全自动核酸提取仪由江苏硕世生物科技有限公司生产。A 型流感病毒核酸及 H5/H7/H9/N9 亚型核酸检测试剂盒由江苏硕世生物

科技有限公司、深圳生科原生物股份有限公司生产,病毒核酸提取试剂盒(磁珠法)由江苏硕世生物科技有限公司生产。所有试剂均在有效期内使用,所有仪器均定期校准与检定,符合实验室资质认定要求。

1.4 统计学分析 数据整理采用 Excel 2013 软件,统计分析采用 SPSS 25.0 软件,计数资料采用例数(%)表示,阳性率的差异比较根据样本条件采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外环境禽流感监测总体情况 2017—2019 年共采集并检测该地区外环境样本 461 份,检出 A 型流感病毒阳性 156 份,总阳性率为 33.84%。各亚型及混合亚型均检出阳性,其中 H9 型阳性率最高,为 7.59%,其次为混合亚型(6.72%)、H7 型(1.30%)、H5 型(1.08%),N9 型阳性率最低,为 0.87%。检出阳性的混合亚型多达 8 种,其中阳性率最高的是 H7 型+H9 型+N9 型(1.95%)。不同年份 A 型阳性率 2017 年最高(46.15%),2019 年次之(30.93%),2018 年最低(23.08%),检出的不同亚型及混合亚型中 2017 年以混合亚型为主(14.84%),2018 年与 2019 年均以 H9 型为主(3.30%和 14.43%)。各年度禽流感阳性率差异有统计学意义($\chi^2=22.111,P=0.000$),见表 1。

表 1 2017—2019 年安吉县外环境禽流感病毒监测结果

检测项目	2017 年($n=182$)		2018 年($n=182$)		2019 年($n=97$)		合计($n=461$)	
	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)
H5 型	0	0.00	2	1.10	3	3.09	5	1.08
H7 型	6	3.30	0	0.00	0	0.00	6	1.30
H9 型	15	8.24	6	3.30	14	14.43	35	7.59
N9 型	3	1.65	1	0.55	0	0.00	4	0.87
混合型	27	14.84	4	2.20	0	0.00	31	6.72
H5 型+H9 型	2	1.10	0	0.00	0	0.00	2	0.43
H5 型+N9 型	1	0.55	0	0.00	0	0.00	1	0.22
H7 型+H9 型	4	2.20	0	0.00	0	0.00	4	0.87
H7 型+N9 型	1	0.55	4	2.20	0	0.00	5	1.08
H9 型+N9 型	2	1.10	0	0.00	0	0.00	2	0.43
H5 型+H7 型+N9 型	1	0.55	0	0.00	0	0.00	1	0.22
H7 型+H9 型+N9 型	9	4.95	0	0.00	0	0.00	9	1.95
H5 型+H7 型+H9 型+N9 型	7	3.85	0	0.00	0	0.00	7	1.52
未分型	33	18.13	29	15.93	13	13.40	75	16.27
合计(A 型)	84	46.15	42	23.08	30	30.93	156	33.84

2.2 不同监测场所样本禽流感病毒监测结果 在纳入监测的 3 种不同场所中,有 2 种检测到 A 型阳性,分

别是农贸市场(100.00%)和屠宰加工厂(45.99%),规模养殖场标本病毒核酸均为阴性。屠宰加工厂阳性结果覆盖所有亚型及混合型,其中 H9 型最高(10.80%),其次是混合型(9.57%),N9 型最低

(1.23%)。农贸市场结果仅代表 2017 年,7 份 A 型阳性样本均未能分型。各类监测场所禽流感阳性率差异有统计学意义(*Fisher* 精确检验值为 135.585, $P=0.000$),见表 2。

表 2 2017—2019 年安吉县外环境不同监测场所样本禽流感病毒监测结果

监测场所	样本数 (份)	H5 型		H7 型		H9 型		N9 型		混合型		未分型		合计	
		阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)
规模养殖场	130	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
屠宰加工厂	324	5	1.54	6	1.85	35	10.80	4	1.23	31	9.57	68	20.99	149	45.99
农贸市场	7	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	7	100.00	7	100.00
合计	461	5	1.08	6	1.30	35	7.59	4	0.87	31	6.72	75	16.27	156	33.84

2.3 不同类型样本禽流感病毒监测结果 粪便样本(包括鸡粪样本、鸭粪样本)和物体表面与污水样本(包括笼具表面擦拭样本、案板表面擦拭样本、禽类饮水样本)均检测到 A 型阳性结果,阳性率分别为 34.44% 和 25.93%。粪便样本中的鸭粪样本阳性率高达 72.34%,是鸡粪样本(23.82%)的 3 倍。在分型检测中,粪便样本在所有亚型及混合型中均有阳性检

出,其中 H9 型最高(7.14%),混合型(6.91%)次之,物体表面与污水样本则仅在 H9 型(14.81%)和混合型(3.70%)中检出。各类型样本禽流感阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.803$, $P=0.370$),粪便样本中的鸡粪与鸭粪样本间阳性率差异有统计学意义($\chi^2=76.887$, $P=0.000$),见表 3。

表 3 2017—2019 年安吉县外环境不同类型样本禽流感病毒监测结果

标本类型	样本数 (份)	H5 型		H7 型		H9 型		N9 型		混合型		未分型		合计	
		阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)
粪便样本	434	5	1.15	6	1.38	31	7.14	4	0.92	30	6.91	73	16.82	149	34.33
鸡粪样本	340	0	0.00	4	1.18	29	8.53	3	0.88	21	6.18	24	7.06	81	23.82
鸭粪样本	94	5	5.32	2	2.13	2	2.13	1	1.06	9	9.57	49	52.13	68	72.34
物体表面与污水	27	0	0.00	0	0.00	4	14.81	0	0.00	1	3.70	2	7.41	7	25.93
合计	461	5	1.08	6	1.30	35	7.59	4	0.87	31	6.72	75	16.27	156	33.84

注:物体表面与污水(包括笼具表面擦拭样本、案板表面擦拭样本、禽类饮水样本)。

2.4 不同季度样本禽流感病毒监测结果 不同年份不同季度均有 A 型阳性结果检出,四个季度阳性率在 20.25%~43.05%之间,其中第一季度阳性率最高(43.05%),第四季度(38.35%)、第二季度(24.49%)

次之,第三季度阳性率最低(20.25%)。各季度禽流感阳性率差异有统计学意义($\chi^2=17.263$, $P=0.001$),见表 4。

表 4 2017—2019 年安吉县外环境不同季度样本禽流感病毒监测结果

季度	2017 年		2018 年		2019 年		合计	
	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)
一	31/49	63.27	18/54	33.33	16/48	33.33	65/151	43.05
二	14/39	35.90	10/40	25.00	0/19	0.00	24/98	24.49
三	8/39	20.51	8/40	20.00	0/0	0.00	16/79	20.25
四	31/55	56.36	6/48	12.50	14/30	46.67	51/133	38.35
合计	84/182	46.15	42/182	23.08	30/97	30.93	156/461	33.84

3 讨论

本次监测结果可以明确,2017—2019 年间安吉县外环境受到不同程度的禽流感病毒污染。A 型总阳性率为 33.84%,高于义乌市(25.81%)^[9],低于温州市(53.30%)^[10],与衢州市接近(34.20%)^[11]。不同年份

间禽流感病毒的污染水平与组成有明显差异。2017 年污染最为严重,不仅 A 型阳性率最高(46.15%,是 2018 年的 2 倍),病毒的组成也最为复杂,除 H5 亚型外,其余 3 种亚型及 8 种混合型均检出阳性。2018 年 A 型阳性率、亚型阳性率及未分型阳性率均有明显下降。

2019 年湖州市对采样方案做出调整,对阳性率最低的第三季度取消采样,对阳性率偏低的第二季度减少采样,而阳性率较高的一、四季度采样计划不变,是 2019 年 A 型阳性率有所回升的重要原因,分型检测结果显示,2019 年仅检出 H5、H9 阳性,其余型别与所有混合型均未检出,提示随着 2017 年来政府采取关闭活禽市场、暂停活禽交易、加强家禽养殖与宰杀环节管控等积极措施的有效实施,外环境禽流感病毒污染情况改善明显,居民感染风险降低。2017 年安吉县报道 1 例人感染禽流感 H7N9 确诊病例,当年该地区外环境中检出 H7N9 亚型核酸,随后 2 年常规监测未检测到该病毒核酸,该地区也无新增确诊病例报道,提示病例的产生与环境因素有关。值得注意的是,仍有 16.27% 的 A 型阳性样本未成功分型,需进一步提高检测能力、拓展检测广度与深度,使基层公共卫生部门得到更为全面的监测结果从而更好地开展疫情防控工作。

在已经报道的可感染人的禽流感病毒亚型中, H5N1、H7N9 毒力强,可引起严重的呼吸系统疾病,有较高的致死性^[12];H9N2 毒力较弱,感染人的能力相对局限,但前两种高致病性 H5N1、H7N9 病毒中均有部分基因源自 H9N2 病毒,推测 H9N2 可能在病毒进化中充当孵化器的角色,提供内部基因片段产生高致病性的新型禽流感病毒^[13],不断威胁禽类与人类健康。近年来该地区 H7 及 H7+N9 亚型阳性占比逐渐下降, H5、H9 亚型阳性占比上升,所有阳性亚型均来自屠宰加工厂,提示在永久关闭主城区活禽交易市场、暂停全县所有活禽交易后,禽类屠宰加工厂应成为重点关注场所。本次监测显示,与流感病毒一样,外环境禽流感病毒的分布具有明显的季节性特征,寒冷的冬春季病毒被大量检出,与其他地区结果一致^[14-16],需重点防控。

浙江省是禽流感高发省,安吉县位于浙江省西北部,是全球较早报告人感染禽流感新亚型 H7N9 病例的地区之一^[5,17]。该县三面环山,森林覆盖率达 72%,家禽产业发达,鸟类与家禽接触频繁,增加了不同株间禽流感病毒基因重配的机会,而该地区人口密度、家禽贸易与人类活动的不断升级,又为外环境中潜伏的已知或新型禽流感病毒感染人提供了重要条件,因此科学制定监测方案,持续开展外环境禽流感监测,及时评估感染风险,对该地区人感染已知禽流感乃至新型禽流感疫情预警和防控具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Bui CM, Gardner L, MacIntyre CR. Highly pathogenic avian influenza virus, Midwestern United States[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(1): 138-139.
- [2] Cheng VCC, Chan JFW, Wen X, et al. Infection of immune compromised patients by avian H9N2 influenza A virus[J]. J Infect, 2011, 62(5): 394-399.
- [3] Chea N, Yi SD, Rith S, et al. Two clustered cases of confirmed influenza A(H5N1) virus infection, Cambodia, 2011[J]. Euro Surveill, 2014, 19(25): 6-13.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the field: highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus infection in two poultry workers-Jalisco, Mexico, July 2012[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012, 61(36): 726-727.
- [5] 顾时平, 吴雪, 叶炜, 等. 涉禽场所 H7N9 禽流感病毒污染状况调查[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(12): 1223-1228.
- [6] 浙江省疾病预防控制中心. 浙江省人感染禽流感职业暴露人群和外环境监测方案(2017 版)[Z]. 2017-09-20.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 流行性感冒诊断标准: WS 285-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-25.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 人感染 H7N9 禽流感疫情防控方案(第三版)[Z]. 2014-01-27.
- [9] 陈步青, 陈波, 陈劲华, 等. 2014—2017 年浙江省义乌市外环境禽流感病毒监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(12): 1531-1536.
- [10] 孙宝昌, 吴矛矛, 朱传新, 等. 2011—2016 年浙江省温州地区活禽场所禽流感病毒监测分析[J]. 疾病监测, 2017, 32(4): 328-331.
- [11] 黄世腾, 杨瑞军, 吕磊, 等. 2013—2018 年浙江省衢州地区外环境禽流感病毒监测分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(9): 835-838.
- [12] 祁宇, 窦悦, 陈明涛, 等. H5N1 亚型禽流感病毒核蛋白的原核表达与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(5): 508-517.
- [12] 叶瑞国, 黄佐妮, 庞晓泸, 等. 2 例人感染 H7N9 禽流感治愈病例检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(20): 2463-2465.
- [13] 梁正林, 杨忠秀, 邓星超, 等. 2014—2018 年贵港市活禽市场外环境禽流感病毒检测和职业暴露人群血清学监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(2): 138-141.
- [14] 刘玉霞, 李红叶, 郭景霞. 2012—2015 年新疆兵团禽流感外环境监测[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(2): 241-244.
- [15] 韩志国, 薛娜, 樊旭成, 等. 乌鲁木齐市外环境标本禽流感病毒监测情况及相关因素分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(2): 135-137.
- [16] 王璐璐, 孙海波, 孙佰红, 等. 辽宁省外环境禽流感病毒监测结果[J]. 预防医学, 2019, 31(3): 221-224.
- [17] 吕华坤, 龚震宇, 孙继民, 等. 浙江省人感染 H7N9 禽流感疫情特征与活禽市场休市的影响分析[J]. 疾病监测, 2014, 29(9): 700-703.