

· 呼吸系统疾病 · 论著 ·

2015—2021 年云南省禽流感环境监测分析

陈瑶瑶 赵晓南 周洁楠 张美玲 孙艳红 罗春蕊

云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所,昆明 650022

通信作者:罗春蕊,Email:773689762@qq.com

【摘要】 目的 了解 2015—2021 年云南省涉禽环境中禽流感病毒的污染状况。方法 从云南省 16 个地区选择 5 类涉禽场所,并采集 6 种环境样本(笼具表面擦拭样本、案板表面擦拭样本、禽类粪便样本、清洗禽类的污水样本和禽类饮水样本),采用 Real-time PCR 法开展禽流感病毒 A 型核酸检测,核酸阳性样本进一步开展 H5、H7 和 H9 亚型检测。结果 2015—2021 年云南省共检测环境样本 11 033 份,禽流感病毒 A 型核酸阳性样本 2 951 份,阳性率为 26.75%,以 H9 亚型为主(2 164 份)。城乡活禽市场和活禽批发市场的样本阳性率均较高,分别为 36.08% 和 35.06%。6 种环境样本中清洗禽类污水阳性率最高(45.50%),其次为案板表面样本(35.06%)。保山、文山和怒江为云南省禽流感病毒核酸阳性率前 3 位的地区。结论 云南省涉禽环境中禽流感病毒污染较为严重。

【关键词】 禽流感; 环境样本; H5/H7/H9 亚型; 监测

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10103010-001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220324-00064

Surveillance of avian influenza virus in poultry environment in Yunnan Province, 2015-2021

Chen Yaoyao, Zhao Xiaonan, Zhou Jienan, Zhang Meiling, Sun Yanhong, Luo Chunrui

Institute of Acute Communicable Disease Control and Prevention, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China

Corresponding author: Luo Chunlei, Email:773689762@qq.com

【Abstract】 Objective To understand the environmental contamination with avian influenza virus (AIV) in Yunnan Province from 2015 to 2021. **Methods** Six types of environmental samples(cage swabs, chopping board swabs, poultry faeces, sewage for cleaning poultry and drinking water for poultry) were collected from five types of bird related sites in 16 areas. The nucleic acid of avian influenza virus type A (flu A) was detected by Real-time PCR. The H5, H7 and H9 subtypes were further detected in flu A nucleic acid positive samples. **Results** A total of 11 033 environmental samples were detected from 2015 to 2021 in Yunnan, and 2 951 (26.75%) of these samples were positive for flu A with the majority of H9 subtype (2 164 samples). The positive rates of samples in urban and rural live poultry markets and live poultry wholesale markets were both high (36.08% and 35.06%). Among the six types of external environment samples, the positive rate of the sewage for cleaning poultry was the highest(45.50%), followed by chopping board swabs(35.06%). The top three areas of positive rates for flu A were Baoshan, Wenshan and Nujiang in Yunnan Province. **Conclusions** The pollution of avian influenza virus in the external environment is still serious in Yunnan.

【Key words】 Influenza in birds; Environmental specimens; H5/H7/H9 subtype; Surveillance

Fund program: National Science and Technology Major Project of China(2017ZX10103010-001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220324-00064

禽流感是由禽流感病毒(AIV)引起各种家禽及野生禽类发生疫病的传染性疾病。某些 AIV 亚型可以突破宿主屏障感染人类,我国先后出现人感染 H5N1、H7N9、H10N8、H5N6 和 H7N4 等禽流感病例

的报道^[1-7],对人类健康和公共卫生安全构成严重威胁。云南省自 2005 年首次发生人感染 H5N6 高致病性禽流感病例以来^[8],先后出现人感染 H5N6、H5N1、H7N9 和 H9N2 等病例,疫情防控形势严峻。研究表

明,禽类接触史是人感染 AIV 的重要因素^[9],涉禽环境是 AIV 传播及重配产生新亚型的主要场所^[10]。长期监测涉禽环境中的 AIV 污染状况,有利于相关部门了解 AIV 的流行状况和变异情况,对本地人感染禽类流感的预警提供重要参考。为此,本文分析了 2015—2021 年云南省涉禽环境中 AIV 的污染状况,现报道如下。

材料与方法

一、监测点的设置及样本类型

在云南省 16 个地区选择辖区内城乡活禽市场、活禽批发市场、家禽规模养殖户、家禽散养户集中地区和野生禽鸟栖息地 5 类场所开展监测。根据《职业暴露人群血清学和环境高致病性禽流感监测方案(2011 年版)》的要求,组织全省 16 个地区在辖区范围内,选取曾经发生过人和/或动物禽流感疫情;水体分布比较密集,水禽养殖业发达;候鸟栖息地或候鸟迁徙路线的地区作为监测地区,每个监测地区选择城乡活禽市场、活禽批发市场、家禽规模养殖户、家禽散养户集中地区和野生禽鸟栖息地 5 类场所开展监测。监测时间为每年 10—12 月。

采集样本类型包括监测点的笼具表面擦拭样本、案板表面擦拭样本、禽类粪便样本、清洗禽类的污水样本及禽类饮水样本等。少量的禽类咽、肛拭子列入其它类别。

二、样本的采集、处理及运输

1. 样本采集

水样本:在禽类活动或笼具旁的水沟或水池、清洗禽类的污水盆或桶、禽类饮水槽的不同部位收集水样本 5~10 mL 置于 15 mL 外螺旋盖的管内。水样本到实验室后应在采样管中加入抗生素和 0.5% 牛血清白蛋白(BSA),再进行分装。笼具表面擦拭样本:每个笼具采集 1 份样本放在单独的采样管中。用蘸有采样液的带有聚丙烯纤维头的拭子擦拭笼具表面禽类最常接触的 3~5 个不同部位(包括笼具底部),然后将擦拭过的拭子放入含 5 mL 采样液的采样管中,尾部弃去;也可以用多个拭子充分擦拭

笼具表面后放到一个采样管中。案板表面擦拭样本:如果宰杀或摆放禽肉使用不同的案板,可采集擦拭样本放到不同的采样管中。粪便样本:从禽舍或环境中采集新鲜禽类粪便样本 3~5 g,放入含 5 mL 采样液的采样管中。

以上采集的样本在无菌条件下反复吹打,以便打碎固体物质,置 4 ℃待其自然沉淀 30 min,也可 3 000 r/min(离心半径为 16.8 cm)离心 10 min,取上清进行分装。

2. 样本运输

样本采集后在 4 ℃条件下 24 h 内运送至实验室。实验室收到样本后立即进行样本处理,将样本分为 3 份,1 份用于核酸检测,1 份留样,1 份备用送检(至少 1.5 mL)。留样样本要求在-70 ℃或以下保存。样本运输时遵守国家生物安全的有关规定。

3. 实验室检测

实验室接收样本后 48 h 内进行核酸提取和 Real-time PCR 核酸检测。样本置于振荡器充分振荡,离心后吸取上清,使用江苏硕世全自动核酸提取仪和核酸提取试剂盒(SDK60104)进行核酸提取,使用国家流感中心提供的 A、H9、H7、H9 引物探针进行进一步分型^[11]。

三、统计学分析

将监测数据录入 Excel2007 建立数据库,SPSS20.0 软件进行统计分析,计数资料采用份数和率表示,组间率的比较采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

一、检测基本情况

2015—2021 年全省共检测环境样本 11 033 份,AIV 核酸阳性样本 2 951 份,平均阳性率为 26.75%。2021 年的核酸阳性率最高,为 37.46%(354/945);2015 年核酸阳性率最低,为 21.90%(230/1 050)。不同年份的 AIV 核酸阳性率差异具有统计学意义($\chi^2=387.21, P < 0.001$)。从亚型分型结果来看,阳性数由高到低分别是:H9 亚型、未分型、H5 亚型、混合型和 H7 亚型。具体结果见表 1。

二、不同场所及样本 AIV 检测结果

表 2 显示,不同监测场所中,样本阳性率由高至低分别为:城乡活禽市场(36.08%,2 717/7 531)、活禽批发市场(35.06%,149/425)、家禽散养户集中地区(4.26%,37/869)、家禽规模养殖户(2.60%,44/1 690)和野生禽鸟栖息地(0.77%,4/518)。不同监测场所 AIV 核酸阳性率差异具有统计学意义($\chi^2=63.87, P<0.001$)。各个监测场所中均为 H9 亚型检出数量最多。

6 种不同类型的外环境样本检测结果显示,清洗禽类污水样本的核酸阳性率最高,达 45.50%(825/1 813);其次是案板表面样本,阳性率为 34.32%(592/1 725);其他类型的样本(禽类咽、肛拭子等)阳性检出率最低,为 13.65%(68/498)。6 种类

型样本 AIV 核酸阳性率差异具有统计学意义($\chi^2=97.68, P<0.001$)。具体结果见表 2。

三、不同州(市)禽流感外环境检测结果

表 3 显示,云南省 16 个地区 AIV 核酸阳性率差异具有统计学意义($\chi^2=764.28, P<0.001$)。AIV 核酸阳性率前 3 位的州(市)分别为保山市(45.27%,263/581)、文山州(39.68%,269/678)和怒江州(36.30%,212/584)。

讨 论

禽流感的流行给养禽业和人类健康均带来了巨大损失。人感染高致病性禽流感时有发生,有必要进行涉禽环境样本监测,以便及时发现当前 AIV 污染现状,更深入地了解目前监管的薄弱环节。

表 1 云南省禽流感外环境检测结果(2015—2021 年)

年份	检测数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)	H5(份)	H7(份)	H9(份)	混合型(份)					未分型(份)
							H5+H7	H5+H9	H7+H9	H5+H7+H9	小计	
2015	1 050	230	21.90	38	0	146	0	18	0	0	18	28
2016	865	221	25.55	55	0	99	0	42	0	0	42	25
2017	5 692	1 427	25.07	91	44	988	2	60	18	11	91	213
2018	784	229	29.21	6	0	193	0	13	0	0	13	17
2019	894	251	28.08	9	0	215	0	11	0	0	11	16
2020	803	239	29.76	12	0	198	1	15	0	2	18	11
2021	945	354	37.46	5	0	325	0	20	0	0	20	4
总计	11 033	2 951	26.75	216	44	2 164	3	179	18	13	213	314

表 2 云南省不同场所、不同样本禽流感病毒检测结果(2015—2021 年)

项目	检测数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)	H5(份)	H7(份)	H9(份)	混合型(份)					未分型(份)
							H5+H7	H5+H9	H7+H9	H5+H7+H9	小计	
采样场所												
城乡活禽市场	7 531	2 717	36.08	197	36	2 011	2	168	17	11	198	275
活禽批发市场	425	149	35.06	16	5	101	1	8	1	2	12	15
家禽规模养殖户	1 690	44	2.60	2	3	23	0	0	0	0	0	16
家禽散养户集中区	869	37	4.26	1	0	27	0	3	0	0	3	6
野生禽鸟栖息地	518	4	0.77	0	0	2	0	0	0	0	0	2
样本类型												
笼具表面样本	2 503	721	28.81	26	5	563	0	45	6	3	54	73
案板表面样本	1 725	592	34.32	64	11	406	0	32	4	3	39	72
粪便样本	3 613	549	15.20	30	14	400	1	25	2	4	32	73
清洗禽类污水	1 813	825	45.50	71	12	587	2	70	6	1	79	76
禽类饮水	881	196	22.25	10	1	160	0	6	0	1	7	18
其他	498	68	13.65	15	1	48	0	1	0	1	2	2

表 3 云南省各地区禽流感外环境检测结果(2015—2021 年)

地区	检测数 (份)	阳性数 (份)	阳性率 (%)	H5 (份)	H7 (份)	H9 (份)	混合型(份)				未分型 (份)	
							H5+H7	H5+H9	H7+H9	H5+H7+H9		小计
保山市	581	263	45.27	22	0	205	0	26	0	0	26	10
文山州	678	269	39.68	19	10	186	0	4	6	0	10	44
怒江州	584	212	36.30	0	0	197	1	9	0	2	12	3
昆明市	1 226	436	35.56	52	27	252	2	76	8	11	97	8
丽江市	615	203	33.01	13	0	123	0	1	0	0	1	66
西双版纳州	479	137	28.60	18	0	107	0	12	0	0	12	0
楚雄州	708	191	26.98	3	1	173	0	7	1	0	8	6
玉溪市	702	184	26.21	0	0	163	0	0	0	0	0	21
德宏州	484	123	25.41	15	0	90	0	11	0	0	11	7
红河州	753	188	24.97	3	3	145	0	8	3	0	11	26
临沧市	608	143	23.52	0	0	105	0	0	0	0	0	38
昭通市	823	159	19.32	25	2	113	0	0	0	0	0	19
迪庆州	805	141	17.52	7	0	124	0	9	0	0	9	1
曲靖市	596	99	16.61	7	0	59	0	9	0	0	9	24
普洱市	728	118	16.21	12	1	64	0	6	0	0	6	35
大理州	663	85	12.82	20	0	58	0	1	0	0	1	6

一、云南省涉禽环境中 AIV 污染情况仍需关注

2015—2021 年云南省涉禽环境样本中 A 型禽流感病毒核酸的平均阳性率为 26.75%，表明涉禽环境中 AIV 污染仍较为严重。近年，云南省环境样本中 AIV 阳性率整体呈上升趋势，可能与监测敏感性和试剂灵敏度提升有关，另外各年份各地区的监测点和样本类型的变化，也会导致阳性率的改变。全省 H9 亚型阳性构成比占 73.33%，在各种样本类型中均有分布，提示 H9 亚型在云南省的涉禽环境中分布广泛，提高了与其他流感病毒发生重配的可能性，也为新的人感染 AIV 的形成奠定了基础^[12]。H5、H7 亚型的阳性率均较 H9 亚型低，特别是 2018 年以来，全省 H5 亚型阳性率均维持在较低水平，H7 亚型均未检出，这得益于我国 2017 年起统一开展的重组 AIV(H5+H7)二价灭活疫苗(H5N1 Re-8 株+H7N9 H7-Re1 株)秋季集中接种。H5 亚型低水平流行可能是由于 H5N1 RE-8 株对应的是 2.3.4.4 b 分支，而我国 H5 亚型的主要流行株——H5N6 亚型主要对应 2.3.4.4 d 分支和 2.3.2.1 d 分支^[13]，提示应加强禽类外环境市场监测结果分析并及时更新禽流感疫苗组分。

二、不同监测场所和不同环境样本的 AIV 阳性率有差异

本研究显示，城乡活禽市场和活禽批发市场的样本 AIV 阳性率均较高，分别为 36.08%和 35.06%。这两类场所是禽类贸易最频繁的场所以，售卖的活禽既有本地禽类也有从其他省份或地区采购的禽类，如不严加管理可能会加速疫情向非疫区扩散^[14]，例如 2016—2017 年暴发的全国范围内人感染 H7N9 疫情^[15]。逐渐复杂的活禽采购销售渠道可能是 AIV 污染严重化的主要原因，切断疫区和其他地区之间的活禽交易是阻止禽流感疫情的有效手段。

本研究 6 种不同类型的外环境样本中，清洗禽类污水阳性率最高(45.50%)，其次为案板表面样本(35.06%)，提示 AIV 可能通过宰杀环节污染案板，并通过污水污染周边环境，成为人群感染禽流感的高风险因素^[16]。建议将案板及清洗禽类的污水作为活禽市场常规清洁消毒的重点对象，同时还应做好禽类粪便的处理和笼具、饮水器皿的清洁消毒工作。

三、保山、文山和怒江的 AIV 污染较严重

保山市、文山州和怒江州为云南省 AIV 核酸阳性率前 3 位的地区，三地均与其他国家接壤，各类

家禽养殖和贸易活动频繁。同时,由于云南省内河流、湖泊较多,部分地区湿地丰富,候鸟栖息场所分布广泛,涉禽场所持续存在 AIV 污染,也增加了人类感染的风险。

从目前的形势来看,云南省未来活禽市场的监管措施应日趋严格。活禽经营限制区的推广有利于人禽流感的防控,与其他省市前期的研究结果一致^[17-18],提示云南省应逐步扩大活禽经营限制区,开展家禽生鲜上市的销售模式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈瑶瑶:数据统计、论文撰写;赵晓南、周洁楠、张美玲:实验指导、检测结果复核;孙艳红:数据收集整理;罗春蕊:论文撰写、研究指导

参 考 文 献

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013,368(20): 1888-1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1304459.
- [2] Li Q, Zhou L, Zhou M, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China[J]. *N Engl J Med*, 2014,370(6):520-532. DOI: 10.1056/NEJMoa1304617.
- [3] 韩迪迪, 韩春霞, 李璐钰, 等. 中国 2013-2017 年人感染 H7N9 禽流感的流行病学特征[J]. *中华流行病学杂志*, 2018,39(1):44-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.01.009.
- [4] 郑友限, 刘建忠, 李锋平, 等. 泉州地区 2014-2017 年活禽相关外环境禽流感病毒监测及遗传进化特征[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018,32(6):595-598. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.06.007.
- [5] Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study[J]. *Lancet*, 2014, 383(9918): 714-721. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60111-2.
- [6] Pan M, Gao R, Lv Q, et al. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: virological and clinical findings[J]. *J Infect*, 2016,72(1):52-59. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.06.009.
- [7] Tong XC, Weng SS, Xue F, et al. First human infection by a novel avian influenza A(H7N4) virus[J]. *J Infect*, 2018,77(3):249-257. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.06.002.
- [8] 罗春蕊, 向妮娟, 张永杰, 等. 云南省首例 H5N6 人禽流感病例流行病学调查[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2016, 14(4): 274-276.
- [9] Wang X, Jiang H, Wu P, et al. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013-17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017,17(8):822-832. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30323-7.
- [10] Wang X, Wang Q, Cheng W, et al. Risk factors for avian influenza virus contamination of live poultry markets in Zhejiang, China during the 2015-2016 human influenza season[J]. *Sci Rep*, 2017,7: 42722. DOI: 10.1038/srep42722.
- [11] 中国疾病预防控制中心. 全国流感监测方案 (2017 年版)[EB/OL]. [2022-03-15] <http://www.chinaivdc.cn/jbkz/jsfa/201710/P020171018007027472395.pdf>.
- [12] 马红霞, 王若琳, 聂逸飞, 等. 2013—2017 年河南省涉禽环境中禽流感病毒污染状况监测[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(10):721-724. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2018.10.001.
- [13] Peng C, Hou G, Li J, et al. Protective efficacy of an inactivated chimeric H7/H5 avian influenza vaccine against highly pathogenic avian influenza H7N9 and clade 2.3.4.4 H5 viruses[J]. *Vet Microbiol*, 2018, 223: 21-26. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.07.011.
- [14] Teng Y, Bi D, Guo X, et al. Contact reductions from live poultry market closures limit the epidemic of human infections with H7N9 influenza[J]. *J Infect*, 2018,76(3):295-304. DOI: 10.1016/j.jinf.2017.12.015.
- [15] Yang Q, Shi W, Zhang L, et al. Westward spread of highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus among humans, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018,24(6):1095-1098. DOI: 10.3201/eid2406.171135.
- [16] 王笑笑, 程伟, 余昭, 等. 浙江省冬春季涉禽场所禽流感病毒污染特征及影响因素研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2016,50(3): 250-254. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.03.012.
- [17] 谢朝军, 苏文哲, 李魁彪, 等. 禽类生鲜上市减少市场环境禽流感病毒污染的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(3): 353-357. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.03.012.
- [18] Lu J, Liu W, Xia R, et al. Effects of closing and reopening live poultry markets on the epidemic of human infection with avian influenza A virus[J]. *J Biomed Res*, 2016,30(2):112-119. DOI: 10.7555/JBR.30.20150054.

(收稿日期:2022-03-24)