

刘永宏, 亚克甫·玉苏普, 玉苏普·卡斯木, 等. 新疆鸡群感染 H9N2 亚型 AIV 诊断分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 303–305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.096

新疆鸡群感染 H9N2 亚型 AIV 诊断分析

刘永宏, 亚克甫·玉苏普, 玉苏普·卡斯木, 图拉妮萨·吐尔逊,

努尔古再丽·库尔班, 阿卜杜热扎克·塔希, 赵丽

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:为了证实新疆鸡群感染了 H9N2 亚型 AIV, 对 2 个鸡场 6 份疑似 H9N2 亚型 AIV 感染病鸡组织病料, 进行 H9N2 亚型 AIV HA 和 NA 基因部分片段扩增、测序及序列分析。结果表明, 新疆该鸡场感染了 H9N2 亚型 AIV。因此, 新疆地区养殖场应重视该病的预防和控制。

关键词:新疆; 禽流感; H9N2 亚型

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0303-03

流感病毒(influenza virus, IV)是正黏病毒科流感病毒属成员, 根据病毒粒子中 NP 和 M 蛋白的抗原差异, 分为甲(A)、乙(B)和丙(C)3 型, 其中 A 型流感病毒的抗原变异性最强, 常引起世界性大流行。A 型流感病毒基因组为 8 个分节段负链 RNA, 编码 12~13 种病毒蛋白。A 型流感病毒根据 2 种表面蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的抗原性特点分为不同的亚型, 已证明

有 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[1-5]。HA 和 NA 基因可作为 RT-PCR 方法的靶序列基因, 用于 AIV 的亚型鉴别。

1966 年 Homme 等分离到第 1 株 H9N2 亚型 AIV^[6], 此后 H9N2 亚型 AIV 在世界各地广泛流行。1988 年, 香港在亚洲范围内第 1 次从陆禽中分离到 3 株 H9N2 亚型 AIV^[7]。1994 年陈伯伦等分离到中国第 1 株 H9N2 亚型 AIV^[8], 后来发现 H9N2 亚型 AIV 在我国各地普遍存在, 2009 年新疆报道从野生灰雁中分离到 H9N2 亚型 AIV^[9], 新疆也报道了个体养殖户麻花鸡感染 H9 亚型 AIV^[10]。H9N2 亚型 AI 多呈低致病性感染, 但由于分布广泛且呈蔓延之势, 有重组为强毒的可能性, 因此给养禽业造成的威胁不容忽视。本研究对新疆发病疑似 H9N2 亚型 AIV 感染鸡组织病料, 进行 RT-PCR 扩增 HA 和 NA 基因部分片段, 并测序确定其亚型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 6 份病鸡组织病料, 来自 2013 年新疆地区 2

plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate[J]. Avian Diseases, 2002, 46(2): 342–352.

[7] 王晶钰, 鱼艳荣, 张彦明, 等. 鸡源大肠杆菌某些生物学特性与致病力相关性研究[J]. 中国家禽, 1999, 21(11): 10–12.

[8] 陈祥, 赵李祥, 高崧, 等. 禽源大肠杆菌的生物表型特性[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 770–774.

[9] 牛明福, 皇甫和平. 多杀性巴氏杆菌的血清抗性及毒力比较研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2003(1): 16–17.

[10] 邵华斌, 杨峻, 黎秋华, 等. 湖北省鸡大肠杆菌病流行情况调查及病原分离鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(9): 14–16.

[11] 常新耀, 谢红兵, 魏刚才, 等. 鸡大肠杆菌的生化特性·致病性及药敏试验研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4536–4538.

[12] 赖平安, 杜春辉. 鸡大肠杆菌致病力与某些生物特性的相关性探讨[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(8): 27–30.

[13] 刘静, 贺生中, 陈祥, 等. 中国部分地区禽源性大肠杆菌分离株的致病性试验[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 230–231.

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31460655); 华中农业大学塔里木大学科研联合基金(编号: HNTDLH1404); 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(编号: HS2014011); 新疆生产建设兵团博士资金(编号: 2012BB023); 塔里木大学高教研究项目(编号: TDGJ1409); 国家大学生创新创业训练计划(编号: 20140757023)。

作者简介: 刘永宏, 男, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 研究方向为传染病与免疫病理学。E-mail: lyhdky@126.com。

通信作者: 赵丽。

血清抵抗力与对动物的毒力有关^[9]。本试验结果显示, 大肠杆菌的补体抗性与其致病力具有相关性。

参考文献:

[1] 卡尔尼可. 禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 158–171.

[2] 陈文静, 韩先干, 何亮, 等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(2): 34–40.

[3] 王双山, 张敬礼, 刘庆昌, 等. 豫鲁冀接壤地区肉鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(1): 119–122.

[4] 杨滴, 王耀兵, 李冬梅, 等. 粪便中大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 1–5.

[5] 樊琛, 刘桂芹, 王宇, 等. 鸡源致病性大肠杆菌 *iss* 基因原核表达产物的免疫保护作用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(11): 84–86.

[6] Johnson T J, Giddings C W, Horne S M, et al. Location of in-cresed serum survival gene and selected virulence traits on a conjugal R

个鸡场, -20 ℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂 Trizol invitrogen™ (编码: 15596-026), 购自 Invitrogen 生物工程有限公司; TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (编码: DRR019A), Premix Taq® Version 2.0 (编码: D331A) 和 DNA Marker 2000, 购自宝生物工程(大连)有限公司; TIANgel Midi Purification Kit (编码: DP209), 购自天根生化科技(北京)有限公司等。

1.1.3 引物 按照引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 分子生物学软件, 以 GenBank 数据库中国内外已发表的 H9N2 亚型 AIV 的 HA 和 NA 基因全序列为参照设计特异性引物。引物序列为 HA: 5′-TGCAACAAATCTGGGACA-3′, 5′-AGGCGACAGTCGAATAAA-3′; NA: 5′-TTGCGACAA-TATGTTTCC-3′, 5′-GCTATTTGAAGTCC ACCAC-3′。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 预期大小约为 1 420、1 270 bp。

1.1.4 仪器 PCR 仪: TC-5000, 比比科技有限公司; 小型高速冷冻离心机: R134a, 密封式制冷系统; 电泳仪: DYY-12, 北京市六一仪器厂; 紫外分析仪: JY02S, 北京君意东方电泳仪设备有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 从病鸡组织病料中提取总 RNA, 按 Trizol invitrogen™ 试剂盒说明书操作。

1.2.2 RT-PCR 反应 总 RNA 按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒, 利用已设计的特异性引物, 进行一步法扩增 HA 或 NA 基因片段, 退火温度均为 51 ℃。cDNA 同时加 HA 和 NA 特异性引物, 作为阴性对照。

1.2.3 PCR 产物纯化回收 取 HA 或 NA 基因片段 RT-PCR 扩增产物电泳切胶后, 按照 TIANgel Midi Purification Kit 试剂盒说明进行回收纯化。

1.2.4 测序 将纯化产物标记后送生工生物工程(上海)有限公司测序, 测序引物为 HA 或 NA 基因扩增引物。

1.2.5 序列分析 利用 BLAST 在线平台分析与本研究获得的 HA 或 NA 基因片段同源性较高的序列, 判断本研究毒株的亚型。

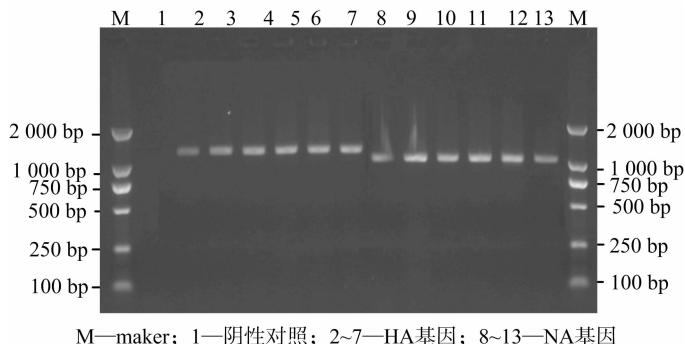
2 结果与分析

2.1 AIV HA 和 NA 基因片段 RT-PCR 扩增结果

本研究的 6 例样品, 根据 HA 和 NA 特异性引物 RT-PCR 扩增相应基因片段, 结果均为阳性, 2 个片段产物均与预期扩增长度一致, 阴性对照成立(图 1)。

2.2 BLAST 在线比对结果

本研究将 6 例样品经 RT-PCR、胶回收纯化和测序得到 HA 和 NA 部分基因序列, 利用 BLAST 在线平台分析, 在线结果显示, 与其同源性由高到低的 100 个序列均为 H9 或 N2。



M—maker; 1—阴性对照; 2~7—HA 基因; 8~13—NA 基因

图1 HA 和 NA 基因 RT-PCR 扩增结果

3 结论与讨论

禽流感分为高致病性禽流感和低致病性禽流感。高致病性禽流感主要由 H5 或 H7 亚型 AIV 引起, 发病率和病死率均高, 全球对其高度重视。另外, 全球人感染 H5N1 亚型 AIV 病例至少 649 例, 死亡 385 例, 病死率达到 59.32%^[11]。2013 年, 中国十几个城市百余人感染 H7N9 亚型 AIV, 死亡 40 余人, 研究表明, H7N9 流感病毒能够发生有限的人传人^[12]。因此, 全球对高致病性禽流感更加重视。低致病性禽流感往往致死率较低, 表现为轻度呼吸道症状和产蛋率下降等, 而未被重视。对养殖业危害最严重的低致病性禽流感亚型主要为 H9N2, 1996—2000 年, 中国 H9N2 亚型 AI 的发病率占 AI 总发病率的 93.89%^[13]。1999 年以来, H9N2 亚型 AIV 感染人事件的多次发生, 严重威胁了世界公共卫生^[14]。另外, AIV 变异性较强较快, 当 2 种低致病性毒株同时感染鸡, 可能会发生毒株变异和重组, 产生强毒株, 导致鸡群遭受严重损伤。因此, H9N2 亚型 AI 应该被高度重视。

目前, 中国对禽流感的防控措施主要是疫苗接种, 但现在不同公司选用的 H9N2 亚型疫苗株不同, 导致疫苗株繁多, 某些地区不清楚当地流行株是什么, 不清楚选用哪个毒株预防效果最好, 且免疫程序混乱。此外, 养殖户对禽流感, 尤其低致病性禽流感认识不够, 防疫意识不够, 对免疫监测更是一无所知。所以, 导致 H9N2 亚型 AI 在国内控制效果一直不能令人满意。2009—2010 年, 在新疆部分地区蛋鸡、肉鸡、家养水禽的养殖场, H9 免疫抗体合格率为 62.4%~100.0%, 20%~33% 蛋鸡场存在 100% 的零效价现象, 活禽市场 H9 抗体合格率为 21.70%~67.14%^[15]。2013 年, 发现新疆和田县未免疫 H9 疫苗养殖户 HI 抗体感染率为 35.29%, 意味着和田县存在 H9 亚型禽流感发病的风险^[16]。

2009—2011 年, 新疆野鸟检出了禽流感 H1~H16 全部亚型, 不同野鸟各亚型检出率不同, 其中野鸭类 H9 检出率最高^[17]。野鸟带毒却很少发病或死亡, 往往成为重要的病原携带者, 随着候鸟的迁徙, 与留鸟及家禽的接触, 而将疫情进一步扩散。因此, AI 的暴发流行除了与禽及禽产品贸易流通因

素有关之外,野生鸟类被认为是最有可能的传染来源之一。研究表明,湿地和水栖野鸟,如雁形目和鸽形目是 AIV 主要的天然储存者^[17]。新疆湿地资源丰富,每年数以万计的迁徙性鸟类途经新疆,并在南北疆地区栖息和繁殖。因此,野生鸟类的迁徙对新疆地区乃至我国 AI 的防控造成潜在的威胁和巨大的压力。1994 年,新疆石河子报道了国内外首次从鸡中分离出的 H14 亚型禽流感分离株^[18],证实了新疆 AIV 毒株的丰富。

近年来,不同动物流感病毒跨越种间屏障感染的报道越来越多,目前已经从多种家禽,如水禽、猪、马、狗、猫科动物、海洋哺乳动物以及人类中分离到 AIV。猪是 AIV“禽—猪—人”传播链的重要中间宿主。2009—2011 年,新疆报道猪、狗 H9 亚型抗体阳性^[19],加之猪、狗与人类的密切关系,这无疑对新疆地区流感的防控构成一定的潜在威胁,对流感的发生与流行发出了重要的预警。

禽流感对新疆乃至中国潜在威胁巨大,提醒相关人群应足够重视该病的防控^[20-21]。本研究根据流行病学调查、临床症状检查和病鸡剖检,疑似南疆 2 个鸡场鸡群感染低致病性禽流感。影响我国养禽业的低致病性 AIV 主要为 H9N2 亚型,针对已发表的 H9N2 亚型 AIV 毒株序列,设计扩增 HA 和 NA 基因部分片段的特异性引物,并将扩增产物纯化测序分析。本研究所得的 HA 基因片段序列,经 BLAST 在线分析,与其同源性由高到低的 100 个序列,均为 H9 亚型;本研究所得的 NA 基因片段序列,经 BLAST 在线分析,与其同源性由高到低的 100 个序列,均为 N2 亚型。研究表明,2 个鸡场鸡均感染 H9N2 亚型 AIV。虽然 2 个鸡场常年发生类似症状疾病,但附近相似饲养管理、饲养技术、饲养环境和免疫标准条件下饲养的和田黑鸡,通过多次试验并未检出感染 H9N2 亚型 AIV。和田黑鸡是否具有 H9N2 亚型 AIV 抗性,需要进一步观察研究,如果研究证实,和田黑鸡可能会成为抗 AIV 研究的良好材料。

参考文献:

- [1]殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:704-735.
- [2]侯云德. 分子病毒学[M]. 北京:学苑出版社,1990:313-326.
- [3]郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997.
- [4]Saif Y M. 禽病学[M]. 11 版. 苏敬良,高福,索勋,译. 北京:中国农业出版社,2005:147-166.
- [5]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]. Journal of Virology, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [6]Homme P J, Easterday B C. Avian influenza virus infections. IV. Response of pheasants, ducks, and geese to influenza A - turkey - Wisconsin - 1966 virus[J]. Avian Diseases, 1970, 14(2): 285-290.
- [7]Perez D R, Lim W, Seiler J P, et al. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens[J]. Journal of Virology, 2003, 77(5): 3148-3156.
- [8]陈伯伦,张泽纪,陈伟斌,等. 鸡 A 型 AIV 的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [9]成进,沙依兰古丽,夏俊,等. 一株野生灰雁禽流感 H9 亚型病毒全基因序列的测定与分析[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(10): 1002-1006.
- [10]汪萍,沙依兰古丽,成进,等. 麻花鸡混合感染禽流感 H9 亚型、新城疫的病原分离与鉴定[C]//中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第七届全国会员代表大会暨第十三次学术研讨会论文集:下册, 2009: 971-973.
- [11]刘延,霍细香,刘琳琳,等. 人感染 H5N1 禽流感的流行与防治[J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(4): 66-69.
- [12]资海荣,李伟,周丹,等. 新型甲型 H7N9 流感病毒 PB1-F2 蛋白基因进化和变异分析[J]. 东南大学学报:医学版, 2014, 33(4): 416-421.
- [13]Guo Y J, Krauss S, Senne D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. Virology, 2000, 267(2): 279-288.
- [14]郭元吉,李建国,程小雯,等. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 5-8.
- [15]成进,彭晓玲,夏俊,等. 2009—2010 年新疆地区家禽禽流感免疫抗体监测与分析[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(7): 51-53.
- [16]张丽. 古力萨伊普罕·热杰甫. 新疆和田县 2011—2013 年禽流感血清学调查与分析[J]. 新疆畜牧业, 2014(7): 28-29.
- [17]成进,沙依兰古丽,夏俊,等. 2009—2011 年新疆雁形目野生鸟类禽流感血清流行病学调查与分析[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(12): 3-6.
- [18]汪萍,夏俊,参都哈什,等. 新疆哺乳动物流感病毒血清学监测与分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(9): 767-769.
- [19]唐秀英,田国斌,赵传删,等. 中国禽流感流行株的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1): 2-6.
- [20]谭丹,黄建龙,王昌建,等. 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒的致病性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 187-188.
- [21]陆吉虎,唐应华,田摇震,等. 人工合成禽流感 M2e/HA0 多肽的免疫原性分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 150-155.

更正:《江苏农业科学》2015 年第 6 期 199-201 页所刊论文《杂交狼尾草青贮草料饲喂新西兰兔的效果》,基金项目中的“江苏省农业科技自主创新资金”的编号“CX(13)3035”有误,更正为“CX(13)3053”。

《江苏农业科学》编辑部