

2011年6月~2012年4月巴布亚新几内亚禽间 禽流感病毒监测

Marinjho Jonduo^a, Sook-San Wong^b, Nime Kapo^c, Paskalis Ominipi^c, Mohammad Abdad^a, Peter Siba^a, Pamela McKenzie^b, Richard Webby^b和Paul Horwood^a

通讯作者: Paul Horwood (paul.horwood@pngimr.org.pg)

为明确巴布亚新几内亚禽间禽流感病毒的流行状况,以评估其对家禽业和人类健康的风险,2011年6月至2012年4月的11个月间,在巴布亚新几内亚的14个省份采集537只禽的咽拭子、泄殖腔拭子和血清标本,进行病毒和血清抗体检测。所有标本均未检出A型流感病毒或抗体。研究表明,在调查之时,巴布亚新几内亚禽间检测不出有禽流感病毒流行的存在。但是,考虑到本国与先前报道有高致病性禽流感病毒的国家邻近,并且禽类养殖生物安全防范条件差的情况,对巴布亚新几内亚来说,高致病性禽流感仍然是一个重要的风险。

流感病毒是重要的呼吸道感染疾病的病原体,全球每年平均有5%~15%的人口感染,并导致约50万人死亡^[1]。水禽为目前已知的所有A型流感病毒的自然宿主^[2]。A型流感病毒偶尔可发生跨种传播,感染其他鸟类和/或哺乳动物,如人类、猪和马。高致病性禽流感(HPAI)的跨种传播往往会造成灾难性的疾病暴发。

1996年,H5N1高致病性禽流感在东南亚地区出现,并扩散到亚洲、中东、非洲和欧洲的若干国家和地区。2003年疫情再次重现,仅在泰国即导致62万余只禽鸟死亡,其中近一半是家养禽类^[3]。因H5N1高致病性禽流感病毒感染而导致的家禽死亡以及所采取的预防控制措施(如扑杀染疫禽类),对疫情发生国家造成了相当大的社会经济负担^[4]。2013年3月在中国新出现的H7N9病毒,增加了人们对这种具有大流行潜力的禽流感病毒扩散的担忧^[5]。像巴布亚新几内亚这样具有大量家禽养殖且缺乏良好生物安全防范条件的国家,十分担心该病毒通过候鸟的远距离传播输入本国。

巴布亚新几内亚养禽业产值占总畜牧业产值的45%,禽类消费量仅次于猪肉消费居第二位^[6]。禽养殖业具备饲养周期短、易于饲养、市场需求量大和收入高的特点,相比其他畜牧养殖经济效益更高。巴布亚新几内亚的禽绝大多数是在半封闭区域养殖,或在农村散养。禽类养殖场很少具备商业化运作,因此多缺乏良好的生物安全防范条件,不足以预防流感病毒感染家禽。农村散养或庭院式饲养的鸡通常与其他动物(如猪、鸭)一起混养。村里散养的鸡也可以随意接

触到野生鸟类同样利用的水和食物来源,从而增加外来疾病传入的风险。

本文中,笔者通过横断面调查,检测禽间禽流感病毒和血清中和抗体,以明确巴布亚新几内亚禽流感病毒的流行状况。

材料和方法

2011年6月~2012年4月间,研究者在巴布亚新几内亚14个省份选择82个点,采集536只禽(466只鸡和70只鸭子)的咽拭子、泄殖腔拭子和血清标本(表1和图1)。标本通过巴布亚新几内亚国家农业检疫与监督局的常规监测项目进行采集,采样者具备合格资质,标本采集方法参照联合国粮农组织(FAO)的禽流感标本采集指南^[7]。

按照禽类养殖生物安全防范条件分为高、中、低三个生物安全等级进行采样。分类依据为目标禽类既往暴露于其他鸟类和/或动物的数量。因此,当禽类很少或没有暴露于其他动物或鸟类时,生物安全等级为高(如商业化的饲养场);当禽类有少量暴露于其他动物或鸟类时,生物安全等级为中(如半封闭的养殖场);当禽类暴露于其他动物或鸟类不受限制时,生物安全等级为低(如农村禽类自由放养)。

采集禽类的咽拭子、泄殖腔拭子和血清,在4°C条件下运送到实验室。到达实验室后,标本立即保存于-80°C(血清为-20°C)。使用QIAamp病毒RNA迷你试剂盒(德国希尔登市Qiagen公司)提取口咽和泄殖腔

^a 巴布亚新几内亚医学研究所,巴布亚新几内亚戈罗卡。

^b 圣裘德儿童研究医院卓越流感研究和监测中心,美国孟菲斯。

^c 国家农业检疫与监督局,巴布亚新几内亚莫尔兹比港。

投稿日期:2013年10月21日;刊发日期:2013年12月19日

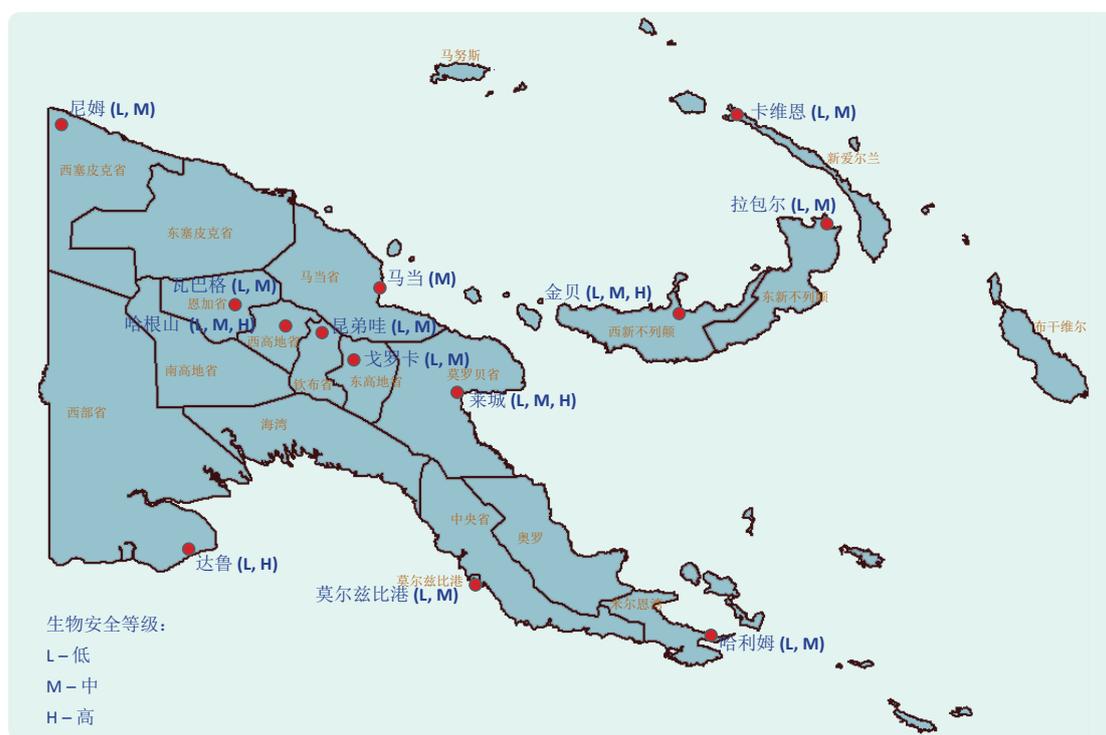
doi: 10.5365/wpsar.2013.4.4.004

表1. 巴布亚新几内亚家禽采样点一览表*

采样区域 (城镇, 省份)	采样点数量	生物安全等级			合计
		低	中	高	
达鲁, 西部省	18	69 (13)	0	43	112 (13)
戈罗卡, 东高地省	5	25	28 (9)	0	53 (9)
哈根山, 西高地省	6	15 (3)	20 (2)	24	59 (5)
门迪, 南部高地省	2	0	6	0	6
莱城, 莫罗贝省	4	27 (4)	36 (8)	25	88 (12)
卡维恩, 新爱尔兰省	7	20	8	0	28
莫尔兹比港, 中央省	4	8	14 (5)	0	22 (5)
马当, 马当省	1	0	22 (9)	0	22 (9)
拉包尔, 东新不列颠省	6	10	10 (2)	0	20 (2)
金贝, 西新不列颠省	8	25	5	2	32
尼姆, 西塞皮克省	1	20 (7)	20	0	40 (7)
孔迪亚瓦, 钦布省	1	2	2	0	4
瓦巴格, 恩加省	8	6 (2)	12	0	18 (2)
阿洛陶, 米尔恩湾省	11	15	17 (6)	0	32 (6)
合计	82	242 (29)	200 (41)	94	536 (70)

* 括号内样本数来自鸭 (具体种类不详), 其余标本数来自鸡。

图1. 巴布亚新几内亚14个省份禽流感抽样调查点分布图



拭子的RNA, 方法参照厂家说明书。采用实时逆转录聚合酶链反应 (real time RT-PCR) 对提取的RNA进行A型流感病毒检测, 试剂由美国疾病预防控制中心 (美国佐治亚州亚特兰大市) 提供。对于阳性或可疑的标本进行流感病毒A/H5或A/H7检测, 方法参考已发表的文献^[8]。所有标本的等分样品被送往圣裘德儿童研究医院卓

越流感研究和监测中心 (美国田纳西州孟菲斯市) 进一步分离病毒和检测亚型。

总共有36对来自农场和省里的禽咽拭子和泄殖腔标本检测结果为可疑, 这些标本被接种到10日龄鸡胚传代三次。如果传代3次后仍未分离到病毒则认为是

阴性。为了增加检测病毒基因的敏感性，本研究对可疑标本进行了深度基因测序。简而言之，即提取病毒RNA，转录为cDNA，并根据文献发表的方法进行全基因组扩增^[9]。PCR产物在Illumina公司的MiSeq平台（美国加利福尼亚州圣地亚哥市Illumina公司）使用配对末端的化学反应法进行测序。清除MiSeq标记后，使用CLC Genomics Workbench 6.5（丹麦奥胡斯市CLC Bio公司）按下列过程进行分析：序列读取质量修剪的过滤限定阈值为0.05，剔除短读值和超过2个模糊值的读取结果。剩余的读取序列使用快速重叠群映射模式重新组装，最小重叠群长度为200个碱基对，配对读取使用支架(scaffold)法归齐。最后将重叠组装的测序结果在美国国家生物技术信息中心(美国马里兰州贝塞斯达市)的BLASTn数据库中进行病毒序列检索。

使用IDEXX AI Multiscreen ELISA(澳大利亚Rydalmere市IDEXX实验室)检测禽血清标本是否存在A型流感病毒抗体，检测方法参照厂家说明书。所有血清样品均进行3次独立检测以确保结果的可靠性。

结果

在所有禽咽拭子或泄殖腔拭子标本(各536份)中均未检出A型流感病毒。4份标本结果落在临界值36–40之间，为可疑。对这些标本使用实时荧光定量PCR进行了流感病毒A/H5和A/H7的检测，但结果均为阴性。在圣裘德儿童研究医院(美国田纳西州孟菲斯市)对这些标本用鸡胚接种和传代并测序，也未检出A型流感病毒。

每个血清样品都进行了3次独立检测，但未在任何标本中检出A型流感病毒的抗体。试剂盒中提供的阳性和阴性对照检测结果证实检测是可靠的。

讨论

本研究首次调查了巴布亚新几内亚禽间是否存在禽流感病毒及其分布状况。所有标本均未检出流感病毒，血清中无相应抗体，表明巴布亚新几内亚的禽中不存在禽流感病毒或流行强度极低。其他国家如澳大利亚和新西兰在禽和野生鸟类监测项目中也发现当地禽流感处于极低流行状态^[10]。

然而，在禽中未检测出禽流感病毒，并不一定意味着巴布亚新几内亚发生禽流感暴发的风险低。与巴布亚新几内亚有陆地接壤的西巴布亚(印度尼西亚)最近检出了H5N1病毒^[11]，值得关注。近期巴布亚新几内亚西北地区暴发禽新城疫病毒感染^[12]，凸显了外来疾病输入该国的可能。事实上，巴布亚新几内亚

的首起基孔肯雅热疫情也是先在该地区发生^[13]，随后蔓延至全国的大部分地区。

巴布亚新几内亚与有H5N1和H7N9病毒流行的东南亚国家邻近^[3,5]。这些病毒可能通过水禽的迁徙传入既往非流行国家和地区^[14]。虽然澳大利亚野鸟监测研究表明禽流感病毒在澳大利亚的流行率较低，并且没有高致病性禽流感^[10]，但一些野鸭可从这个方向在澳大利亚与巴布亚新几内亚之间迁徙，有可能将禽流感病毒引入^[15]。2003年H5N1重现后，虽在印尼的西巴布亚省已有检出，但该病毒在太平洋地区还没有报告。以往的研究表明，水禽通过华莱士迁徙路线十分少见，使得高致病性禽流感病毒引入太平洋地区的概率较低^[16]。但值得一提的是，开展主动监测可以早期发现病毒入侵并及时采取缓疫措施。未来的监测尤其应侧重于野生水禽，监测通过这些鸟类迁移发生禽流感病毒输入的可能性。

本研究提示没有证据表明巴布亚新几内亚家禽中存在禽流感流行。但是本研究也有一些局限性。当病毒流行水平很低的时候，横断面调查结果可能不够敏感，或许难以检测到阳性结果。家禽饲养周期短，每个养殖点采集的样本数量较少，可能也会导致无法检出病毒或者抗体。因此，建议在巴布亚新几内亚有禽流感输入风险的地区(如在邻近边境口岸和迁徙水禽栖息的湖泊)开展长期的定点监测。

虽然野生水禽迁徙路线不太可能是巴布亚新几内亚禽流感输入的来源，但由于巴布亚新几内亚与西巴布亚(印度尼西亚)接壤，且本地的禽类饲养生物安全防范条件较差，故禽流感输入的风险仍较高。如果高致病性禽流感病毒输入巴布亚新几内亚，对当地可能造成巨大的社会经济负担。在许多农村地区，家禽是食物中提供动物蛋白质的唯一来源，大规模疫情暴发可能对健康造成深远的影响。国家层面诊断能力^[17]以及疫情应对和控制能力不足，将难以遏制禽流感的暴发。

利益冲突

未申报。

基金

无。

致谢

本研究工作是由美国国立卫生研究院国家过敏和传染病研究所提供资金支持，合同号HHSN2662007

00005C。Marinjho Jonduo由卫生研究培训项目支持，该项目由巴布亚新几内亚Esso Highlands有限公司提供资助。

引用本文地址：

Jonduo M et al. Surveillance of avian influenza viruses in Papua New Guinean poultry, June 2011 to April 2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2013, 4(4):11–15. doi:10.5365/wpsar.2013.4.4.004

参考文献：

1. *Influenza (Seasonal) Fact Sheet No. 211, 2009*. Geneva, World Health Organization, 2009 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>, accessed 15 August 2013).
2. Webster RG et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 1992, 56:152–179. pmid:1579108
3. Tiensin T et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11:1664–1672. doi:10.3201/eid1111.050608 pmid:16318716
4. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 2007, 25:5637–5644. doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.051 pmid:17126960
5. Gao R et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A(H7N9) virus. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368:1888–1897. doi:10.1056/NEJMoa1304459 pmid:23577628
6. Bourke RM, Harwood T (Eds). *Food and Agriculture in Papua New Guinea*. ANU E Press, The Australian National University, Canberra, 2009.
7. Whitworth D et al (Eds). *Wild Birds and Avian Influenza: an introduction to applied field research and disease sampling techniques*. *FAO Animal Production and Health Manual, No. 5*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2007 (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1521e/a1521e.pdf>, accessed 10 August 2013).
8. Spackman E et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:3256–3260. doi:10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002 pmid:12202562
9. Zhou B et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and swine origin human influenza A viruses. *Journal of Virology*, 2009, 83:10309–10313. doi:10.1128/JVI.01109-09 pmid:19605485
10. Hansbro PM et al. Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16:1896–1904. doi:10.3201/eid1612.100776 pmid:21122219
11. Takano R et al. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003–2007. *Virology*, 2009, 390:13–21. doi:10.1016/j.virol.2009.04.024 pmid:19464724
12. Newcastle Disease – Papua New Guinea: (Sandaun) poultry. ProMed, 1 May 2013, archive no. 20130502.1685877 (<http://www.promedmail.org/?archiveid=20130502.1685877>, accessed 10 August 2013).
13. Horwood PF et al. Outbreak of chikungunya virus infection, Vanimo, Papua New Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19:1535–1538. doi:10.3201/eid1909.130130 pmid:23965757
14. Olsen B et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 2006, 312:384–388. doi:10.1126/science.1122438 pmid:16627734
15. Roshier DA et al. Biogeographic models of gene flow in two waterfowl of the Australo-Papuan tropics. *Ecology and Evolution*, 2012, 2:2803–2814. doi:10.1002/ece3.393 pmid:23170215
16. Dingle H. The Australo-Papuan bird migration system: another consequence of Wallace's Line. *Emu*, 2004, 104:95–108. doi:10.1071/MU03026
17. Greenhill A et al. Improved laboratory capacity is required to respond better to future cholera outbreaks in Papua New Guinea. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2012, 3:30–32. doi:10.5365/wpsar.2011.2.4.016 pmid:23908909