

# 鸭肉、鸭肝及鸭蛋中人畜共患病毒的检测与分析

傅光华<sup>1</sup>, 侯东军<sup>2</sup>, 陈雷<sup>1,3</sup>, 程龙飞<sup>1</sup>, 万春和<sup>1</sup>, 陈红梅<sup>1</sup>, 施少华<sup>1</sup>,  
陈翠腾<sup>1,3</sup>, 林建生<sup>1</sup>, 林芳<sup>1</sup>, 黄瑜<sup>1\*</sup>

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125;  
3. 福建农林大学, 福州 350002)

**摘要:** **目的** 对福建省部分地区的鸭肉、鸭肝和鸭蛋开展人畜共患病毒的检测。**方法** 应用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术对2011年3月至2012年4月间从不同采样点采集的鸭肝、鸭肉等样品开展禽流感病毒、新城疫病毒及鸭坦布苏病毒的检测。**结果** 对所采集的529份样品检测结果表明, 样品中禽流感病毒、新城疫病毒和鸭坦布苏病毒检出率分别为0%、0.76%和1.1%。**结论** 所采集的鸭肉等样品的人畜共患病毒污染情况很轻, 但农村早市等地方来源样品的阳性率明显高于其他地方, 应进一步完善和健全鸭粗加工制品的食品安全质量检测工作。

**关键词:** 鸭肉; 鸭肝; 鸭蛋; 人畜共患病毒; 食品安全

## Detection and analysis of viral zoonotic pathogens in meat, liver and eggs from ducks

FU Guang-Hua<sup>1</sup>, HOU Dong-Jun<sup>2</sup>, CHEN Lei<sup>1,3</sup>, CHENG Long-Fei<sup>1</sup>, WAN Chun-He<sup>1</sup>,  
CHEN Hong-Mei<sup>1</sup>, SHI Shao-Hua<sup>1</sup>, CHEN Cui-Teng<sup>1,3</sup>, LIN Jian-Sheng<sup>1</sup>, LIN Fang<sup>1</sup>, HUANG Yu<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;*  
2. *China Animal Diseases Control Center, Beijing 100125, China;*  
3. *Fujian Agriculture and Forestry university, Fuzhou 350002, China*)

**ABSTRACT: Objective** To detect and analyze the viral zoonotic pathogens contamination in meat, liver and eggs from ducks in Fujian province. **Methods** A total of 529 samples of meat, liver and eggs from ducks were collected from different sampling points of Fujian province from March 2011 to April 2012. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) were used to detect three pathogens of viral zoonosis: avian influenza viruses (AIVs), Newcastle disease virus (NDV) and Duck Tembusu virus (DTMUV) in these samples. **Results** The detection rate of these three zoonotic pathogens, AIVs, NDV and DTMUV in ducks roughing products were 0%, 0.76% and 1.1%, respectively. **Conclusion** The situation of pathogens contamination of these meat, liver and eggs from duck was light on the whole, the pathogen detection rates of samples collected from rural morning market were higher than those of samples collected from other sampling points. It is very important to further improve and strengthen the surveillance work of food safety and quality.

**KEY WORDS:** duck meat; duck liver; duck egg; viral zoonotic pathogens; food safety

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-43)、国家自然科学基金项目(30972203、31201936)、福建省种业创新专项(2011FJZY-9)、福建省农业科学院科技下乡“双百”行动项目(SBMX1224)

\*通讯作者: 黄瑜, 博士、研究员, 主要从事动物传染病研究。E-mail: huangyu\_815@163.com

随着近年来一系列重大人兽共患病的暴发及动物食物链污染等问题的出现,由食源性疾病和动物传染病引起的动物性食品安全问题已成为世界上各个国家广泛关注的问题之一<sup>[1,2]</sup>。目前在各种人畜共患病病原中,影响各种肉类食品安全的重要病原主要包括禽流感、猪流感、口蹄疫、疯牛病、沙门氏菌、李斯特氏菌和致病性大肠杆菌等,这些病原已被世界卫生组织(WHO)列为影响肉食品安全的重要风险因素,受到世界范围的密切关注<sup>[3]</sup>。鸭粗加工制品是我国尤其是南方地区重要的动物源食品来源之一,含有丰富的优质蛋白质、维生素、矿物质和其他营养成分,鸭肉及其相关制品在人们日常饮食消费中占有极大的比重。禽流感病毒在家禽中的广泛传播严重威胁着包括鸭粗加工制品在内的禽肉制品的食品安全问题<sup>[4]</sup>。现有研究表明,禽流感病毒、新城疫病毒和鸭坦布苏病毒等病原,尤其是 H5 和 H7 亚型禽流感病毒是目前潜在的威胁鸭肉等粗加工制品食品安全的病毒性人畜共患病病原<sup>[5-10]</sup>。本研究应用病原特异性的 RT-PCR 技术对采集自不同地区的鸭肉等粗加工制品开展禽流感病毒、新城疫病毒及鸭坦布苏病毒的感染情况初步调查。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2011年3月至2012年4月,分别从福建省鸭粗加工制品生产企业、福州市大型超市、农贸市场和农村早市等多个地点采集鸭肉、鸭肝等粗加工制品及鸭蛋作为检测对象,共计529份样品。这些样品中包括在2家主要的鸭粗加工制品生产企业中分别采集了5个批次,共计80份鸭肉、80份鸭肝样品;在福州市3个大型超市中采集3个批次,共计60份鸭肉、50份鸭肝样品,40枚鸭蛋样品;在市郊5个农贸市场采集了3个批次,共计56份鸭肉、45份鸭肝样品、30枚鸭蛋样品;在福州市郊区周边的4个农村早市采集了4个批次,共计35份鸭肉、30份鸭肝样品,23枚鸭蛋样品。鸭肉和鸭肝直接冻存 $-80^{\circ}\text{C}$ ,鸭蛋则取适量蛋清冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 备用。

### 1.2 毒株

禽流感病毒 A/Duck/FJ/FQ701/1997(H9N2)株(FQ701)、鸭源新城疫 HN01 株(HN01)及鸭坦布苏病毒 WR 株(WR)均为本实验室分离保存。

### 1.3 试剂

Trizol RNA 抽提试剂盒(广州英韦创津生物科技有限公司); M-MLV 反转录酶、RNase Inhibitor 等(普洛麦格生物技术有限公司); Taq DNA polymerase(北京纽普科技有限公司); DNA Marker 等(福州宝生物工程(大连)有限公司)。

### 1.4 引物设计

禽流感病毒的鉴定引物、H5 亚型及 H7 亚型鉴定引物参照文献<sup>[11]</sup>进行设计,新城疫病毒鉴定引物参照文献<sup>[12]</sup>进行设计,鸭坦布苏病毒鉴定引物参照文献<sup>[10]</sup>进行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.5 样品 RT-PCR 检测

#### 1.5.1 样品的处理及 RNA 的提取

采集的鸭肝和鸭肉样品按样品: PBS=1:3 的比例加入无菌 PBS 缓冲液(pH 7.4)进行匀浆,蛋清样品按样品: PBS=1:3 的比例加入无菌 PBS 缓冲液(pH 7.4)振荡混匀后,随后将样品冻融 3 次备用。样品 RNA 的提取参照 Trizol 提取试剂盒的方案进行,具体为将组织匀浆液或稀释的蛋清于  $4^{\circ}\text{C}$  下 8000 r/min 离心 5 min,取 250  $\mu\text{L}$  上清液与 750  $\mu\text{L}$  裂解液 Trizol 混合,再加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的氯仿,充分混匀后冰浴 5 min,随后于  $4^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 15 min,取上清加入等体积预冷的异丙醇,混匀, $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 h 后  $4^{\circ}\text{C}$ , 13000 r/min 离心 15 min,倒去上清,挥发净乙醇,沉淀用 DEPC 处理的水重悬, $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.5.2 样品的 RT-PCR 扩增

样品 RNA 的反转录使用 6 碱基随机引物进行,然后以获得的 cDNA 为模板,用设计的针对不同病毒的特异性引物进行 PCR 扩增。禽流感病毒的检测参照农业部 2007 年颁布的行业标准《高致病性禽流感防治技术规范》提供的方法进行,先用禽流感病毒的型特异性引物进行扩增,若有阳性样品再用流感病毒 H5 及 H7 亚型鉴定引物进行 PCR 扩增;新城疫病毒的检测参照 2008 年颁布的国家标准《新城疫诊断技术》(GBT 16550-2008)建议的方法进行;鸭坦布苏病毒的检测参照文献<sup>[10]</sup>提供的方法进行。禽流感毒株 FQ701、新城疫毒株 HN01 和鸭坦布苏毒株 WR 分别作为阳性对照。PCR 反应体系均为 50  $\mu\text{L}$ : PCR Master Mix(2X) 25  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 用水补充体积至 50  $\mu\text{L}$ , 反应条件如下:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,

按 94 °C 20 s、53~68 °C 20 s、72 °C 1 min 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min 结束反应, 取产物 5 μL 经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

## 2 结果

### 2.1 样品人畜共患病毒检测结果

对采集的 529 份鸭肉、鸭肝及鸭蛋等样本进行了禽流感病毒、新城疫病毒及鸭坦布苏病毒等 3 种病毒的污染情况检测。结果表明, 529 份样品未检测出禽流感病毒阳性样品, 新城疫病毒阳性样品 4 份, 占总样品数的 0.76%, 鸭坦布苏病毒样品 6 份, 占总样品数的 1.1%(见表 1)。

### 2.2 不同采集点来源样品人畜共患病毒检测结果

对不同采样点采集的样品进行统计分析发现, 各采样点的病毒性人畜共患病病原检出率不一样(见图 1), 从鸭肉加工制品生产企业采集的 160 份样品及

大型超市采集的 150 份样品中分别检测到 1 份鸭坦布苏病毒阳性的鸭肉样品及 1 份新城疫病毒阳性的鸭肝样品, 检出率分别为 0.62%和 0.67%; 农贸市场共采集了 131 份样品, 经 PCR 检测出 1 份新城疫病毒阳性样品和 2 份鸭坦布苏病毒阳性样品, 3 份阳性样品均为鸭肉; 在农村早市采集的 88 样品中也分别检测出 2 份新城疫病毒阳性样品和 3 份坦布苏病毒阳性样品(见表 1)。

### 2.3 不同样品人畜共患病毒检测结果

对采集的 529 份样品进行分类统计分析表明, 从 231 份鸭肉样品中检测出 7 份病毒阳性样品, 包括 2 份新城疫病毒和 5 份鸭坦布苏病毒样品; 205 份鸭肝样品中检测出 1 份新城疫病毒阳性样品和 1 份鸭坦布苏病毒阳性样品; 而在 93 份鸭蛋中仅检测出 1 份含新城疫病毒的阳性样品, 各种人畜共患病毒在各种样品中的检出比例见图 2。

表 1 鸭粗加工制品病原微生物检测结果

Table 1 Detection results of zoonotic pathogens from ducks roughing products

采样点	样品类型	采样数	禽流感病毒	新城疫病毒	鸭坦布苏病毒
加工企业	鸭肉	80	0	0	1
	鸭肝	80	0	0	0
超市	鸭肉	60	0	0	0
	鸭肝	50	0	1	0
	鸭蛋	40	0	0	0
农贸市场	鸭肉	56	0	1	2
	鸭肝	45	0	0	0
	鸭蛋	30	0	0	0
农村早市	鸭肉	35	0	1	2
	鸭肝	30	0	0	1
	鸭蛋	23	0	1	0
总计		529	0	4	6

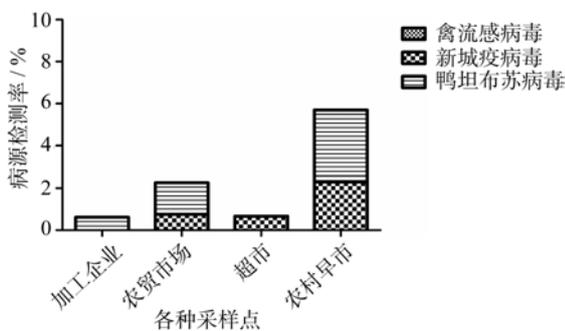


图 1 不同采集点来源的样品人畜共患病病原检测率

Fig. 1 Detection rate of zoonotic pathogens in samples from different sampling points

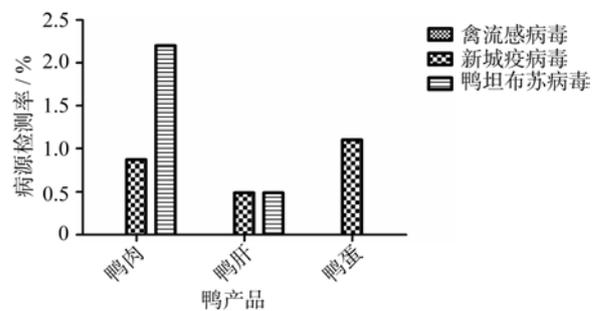


图 2 不同类型样品人畜共患病病原检测率

Fig. 2 Detection rate of zoonotic pathogens from different samples

### 3 讨论

人畜共患病毒引起的动物性食品安全问题已成为世界上各个国家广泛关注的问题之一,而对鸭肉等食品安全具有潜在威胁的病毒性人畜共患病毒主要包括禽流感、新城疫和鸭坦布苏病毒等。禽流感病毒,尤其是 H5 亚型高致病性禽流感病毒,具有广泛的宿主嗜性,可感染野生鸟类、海鸟、家禽、哺乳动物和人,感染人可引起严重的细胞因子炎症反应和急性呼吸窘迫症,甚至导致死亡<sup>[13]</sup>。据 WTO 统计表明,自 2003 年至 2011 年 10 月 10 日,全球已报告了 566 例人感染 H5N1 禽流感病例,其中 332 例死亡<sup>[4]</sup>。新城疫病毒感染人的病例报道较少,早在 1942 年就有学者报道该病毒可感染人引起轻度的结膜炎。2007 年美国学者 Goebel 研究发现新城疫病毒感染人后也可以引起严重的呼吸道症状,最后因重度肺炎而死亡<sup>[7]</sup>。鸭坦布苏病毒是 2010 年 4 月份开始引起我国种蛋鸭出现急速大幅产蛋下降的病原,随后也在肉鸭中检测出该病毒的感染。鸭坦布苏病毒与我们熟悉的乙型脑炎病毒、黄热病毒及登革热病毒等人畜共患病毒同属黄病毒科黄病毒属成员,在遗传进化上与蚊子中分离到坦布苏病毒亲缘关系最近<sup>[8-10]</sup>。有学者认为,尽管目前还未见人感染该病毒报道,但因鸭肉及其相关产品在亚洲,尤其是中国的消费量非常大,该病毒的潜在的食品安全和公共卫生意义不容忽视<sup>[8]</sup>。

本研究应用 PCR 技术对采集自不同地方的鸭肉及其他相关副产品开展禽流感病毒、新城疫病毒和鸭坦布苏病毒的感染情况的初步调查。检测结果表明,所采集的样品的人畜共患病毒检出均较低,所有样品中未检测到禽流感病毒阳性样品,新城疫病毒及鸭坦布苏病毒阳性样品的检出比例分别为 0.76% 和 1.1%,这些阳性样品主要来自鸭肉和鸭肝。对阳性样品的来源进行统计分析表明,检测出的 10 份阳性样品中有 8 份来自于农贸市场和农村早市采集的样品,这可能与这些地方市场环境不规范,市场经营群体不稳定、不易监管等诸多因素有关。

动物性食品安全问题不仅影响公共卫生健康,随着近几年来一系列食品中毒事件、重大人兽共患病如禽流感病毒和 2 型猪链球菌感染人,非典型性肺炎全球爆发等事件、以及动物食物链污染等问题的出现,动物性食品安全问题也极大影响了农业和工业产业链以及国家出口贸易的健康发展。进一步加强动物性食品安全的长期性安全质量监测,将为生产销售优质

安全放心动物源性食品提供可靠的质量安全及卫生保障,对提高我国畜禽产品在国内国际市场的竞争力和保护人体健康都具有十分重要的意义。

### 参考文献

- [1] 李凯年. 加强动物疫病防治实行全程检疫监管是确保动物源性食品安全的关键[J]. 中国物检疫, 2003, 20(4): 7-9.
- [2] 汤慧民, 胡小静, 杨爱民. 影响食品安全的因素分析[J]. 中国食物与营养, 2009, (8): 14-16.
- [3] [http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal\\_health\\_in\\_the\\_world/docs/PDF/highly\\_pathogenic\\_avian\\_influenza.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal_health_in_the_world/docs/PDF/highly_pathogenic_avian_influenza.pdf).
- [4] 孙佳善, 熊永忠, 包红梅, 等. 禽流感对食品安全的影响[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 115-119.
- [5] Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, et al. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat[J]. J Virol, 2002, 76: 6344-6355.
- [6] Mase M, Eto M, Tanimura N, et al. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China[J]. Virology, 2005, 339: 101-109.
- [7] Goebel SJ, Taylor J, Barr BC, et al. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia[J]. J Virol, 2007, 81: 12709-12714.
- [8] Su J, Li S, Hu X, et al. Duck Egg-Drop Syndrome Caused by BYD Virus, a New Tembusu-Related Flavivirus[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.
- [9] Cao Z, Zhang C, Liu Y, et al. Tembusu virus in ducks, China[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1873-1875.
- [10] 刘友生, 彭春香, 傅光华, 等. 2010-2011 年中国部分地区禽坦布苏病毒感染调查及分子变异分析[J]. 中国动物传染病学报, 2012, (1): 47-53.
- [11] 农业部. 高致病性禽流感防治技术规范-2007716151735[S]. 2007.
- [12] GBT 16550-2008, 新城疫诊断技术[S]. 2008.
- [13] Sambhara S, Poland GA. H5N1 Avian Influenza: Preventive and Therapeutic Strategies Against a Pandemic[J]. Annu Rev Med, 2010, 61: 187-198.

(责任编辑: 孙媛媛)

### 作者简介



傅光华, 副研究员, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学研究。

E-mail: fuyuan1981@gmail.com



黄瑜, 博士、研究员, 主要从事动物传染病研究。

E-mail: huangyu\_815@163.com