

三江自然保护区野生迁徙水禽携带禽流感病毒和新城疫病毒状况的监测

曾祥伟^{1, 2}, 华育平^{1*}, 李晓冰¹, 张智明¹

(东北林业大学,¹野生动物资源学院,²博士后科研工作站, 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】为了对途经三江保护区的野生迁徙水禽携带禽流感病毒(AIV)和新城疫病毒(NDV)的状况进行有效监测。【方法】在2005年10月、2006年4月、2006年10月3个候鸟的迁徙季节从三江保护区采集了158只野鸟的咽拭子和肛拭子样本。应用SPF鸡胚盲传、血凝和血凝抑制试验和RT-PCR等方法进行了病毒的分离和鉴定。【结果】结果共分离到20株AIV和13株NDV。20株AIV均来自2006年10月采集的样品,经常规血清学分型鉴定分为12个亚型,11个亚型来源于绿头鸭,分别为H2N2(2/20), H2N6(2/20), H3N4(1/20), H3N6(2/20), H3N7(2/20), H3N8(2/20), H6N2(2/20), H11N2(1/20), H11N3(1/20), H11N5(2/20), H11N6(1/20), 另外一株来源于白眉鸭,为H5N2(1/20)。13株NDV则来自3个迁徙季节的5种不同水禽采,其中包括绿头鸭(8/13), 豆雁(1/13), 白额雁(1/13), 绿翅鸭(1/13)和鸳鸯(2/13)。【结论】这一结果表明,拥有极大种群数量、在世界范围内广泛分布的绿头鸭,被认为可能是AIV和NDV最重要的自然宿主之一,并在病毒的传播上比其他野生鸟类具有更为重要的生态学意义。

关键词: 迁徙水禽; 禽流感病毒; 新城疫病毒; 监测

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)10-1403-05

禽流感(Avian influenza, AI)和新城疫(Newcastle disease, ND)是世界公认的危害最为严重的两种禽类的烈性传染病,常给养禽业带来毁灭性的打击。如何对这两种疾病有效地防控,已经成为全世界面临的一个问题。野生鸟类,特别是野生水禽被认为是禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)和新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)等病毒的天然宿主^[1~4]。加强监测尤其是对野生鸟类的携带AIV和NDV的状况的监测是许多国家经常使用的防控手段,而我国在全国野生动物疫源疫病监测网络建立后,也逐渐开展了相关的工作。

本研究分别于2005年秋季、2006年春季和2006年秋季这3个迁徙季节在三江自然保护区重点对野生

水禽样本进行了采集,并对样本进行病毒的分离鉴定,着重对迁徙到达保护区的水禽的AIV和NDV携带状况进行了调查。旨在了解AIV和NDV在一些水禽种群中的流行状况并进一步探讨水禽在AIV和NDV的传播中所起的作用,同时为这两种病毒的生态学深入研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: Marker(DL2000)、*Taq*酶、AMV反转录酶购自TaKaRa公司;TRIzol Reagent RNA提取试剂盒购自Invitrogen公司。PCR仪为PCR

基金项目: 国家林业局野生动物疫源疫病监测专项资金(020-413239); 黑龙江省博士后基金(LBH-Z06153); 黑龙江省青年科技专项金(QC07C33)

*通讯作者。Tel: +86-451-82191734; E-mail: yuping_hua@126.com

作者简介: 曾祥伟(1976-), 男, 山东黄县人, 讲师, 在站博士后, 主要从事野生动物疫源疫病的研究。E-mail: xiangwei_zeng@163.com

收稿日期: 2008-04-06; 修回日期: 2008-05-26

System 2700, 购自美国 Applied Biosystems 公司; Purifier Class II 生物安全柜购自美国 Labconco 公司。

1.1.2 鸡胚和血清: 10 日龄 SPF 鸡胚、1% SPF 鸡 RBC 溶液、NDV 标准阳性血清均由中国农科院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供; AIV 血凝素和神经氨酸酶分型单因子血清由中国农科院哈尔滨兽医研究所禽流感国家参考实验室提供。

1.1.3 引物 P1: 5'-ATCACTCACTGAGTGACATC-3'、P2: 5'-CCTCCAGTTTCTTAGGATC-3'、Un12: 5'-AGCAAAGCAGG-3'、P3: 5'-GGCCATGACTGC-ATATGAGA-3'、P4: 5'-ATCCGATATAAACGCATGA-G-3'。其中 P1、P2 用于扩增 AIV 的核蛋白基因, Un12 为反转录引物; P3、P4 用于扩增 NDV 的核蛋白基因, P4 为反转录引物。

1.2 样品的采集

2005 年 10 月、2006 年 4 月和 2006 年 10 月在中国黑龙江省三江国家自然保护区主要候鸟栖息地以网捕的方式重点对野生水禽进行捕捉, 捕获后采集咽喉棉拭子和泄殖腔棉拭子放入盛有甘油盐水的采样管中, 迅速投入液氮容器中保存。

1.3 病毒分离鉴定

1.3.1 鸡胚接种: 将采集咽喉棉拭子和泄殖腔棉拭子反复冻融 3 次, 经滤膜除菌后, 尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚。每个样品接种 3 枚 SPF 鸡胚, 连续盲传 3 代后无菌收取尿囊液, -20℃ 保存备用。

1.3.2 血凝试验: 按常规的血凝实验方法对收获的每个样品的 F3 代尿囊液进行血凝性的检测, 血凝效价大于 2^3 判定为阳性。

1.3.3 病毒 RNA 的提取和 RT-PCR: 取血凝检测为阳性的各样品的 F3 代尿囊液, 按 TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒的说明操作来提取病毒 RNA。

分别以 Un12、P4 为反转录引物对病毒 RNA 进行反转录, 按照禽源反转录酶使用说明书进行操作。反转录出病毒的 cDNA 直接用于 PCR 反应: 取反转录产物 3 μ L 作为模板, 加入 10 \times Buffer 2.5 μ L、10 mmol/L dNTP 2 μ L、20 mmol/L 上下游引物各 1 μ L (检测 AIV 用 P1、P2; 检测 NDV 用 P3、P4), Taq 0.5 μ L, 灭菌纯水补足到 25 μ L。反应条件为: 95℃ 5 min, 94℃ 50 s, 54℃ 50 s, 72℃ 50 s, 30 个循环, 72℃ 10 min。取 PCR 产物 5 μ L, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果。

1.4 AIV 亚型的鉴定

对血凝试验和 RT-PCR 检测均呈 AIV 阳性的鸡胚尿囊液样品, 进一步在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽流感国家参考实验室用 AIV 血凝素和神经

氨酸酶分型单因子血清鉴定病毒的亚型。

1.5 NDV 的血凝抑制试验

对血凝试验和 RT-PCR 检测均呈 NDV 阳性的鸡胚尿囊液样品, 按常规的血凝抑制试验进一步验证。

2 结果

2.1 野鸟样品的采集

3 次共捕获野鸟 158 只, 包含 8 个目的 10 个科的 25 个种, 其中 94% (150/158) 为水禽, 具体见表 1。

2.2 AIV 分离鉴定

在 2006 年 10 月 (秋季) 采集到的样本中, 共分离出 20 株 AIV, 其中 19 株为绿头鸭源, 1 株来自白眉鸭, 而 2005 年 10 月 (秋季) 和 2006 年 3 月 (春季) 采集的样本中均未分离到 AIV (表 1)。在这 20 个分离株当中, 鉴定出 12 个 AIV 亚型, 其中 11 个亚型来自于绿头鸭: H2N2 (2/20), H2N6 (2/20), H3N4 (1/20), H3N6 (2/20), H3N7 (2/20), H3N8 (2/20), H6N2 (2/20), H11N2 (1/20), H11N3 (1/20), H11N5 (2/20), H11N6 (1/20); 1 个亚型来自于白眉鸭: H5N2 (1/20), 具体见表 1。

2.3 NDV 分离鉴定

经 SPF 鸡胚接种后收获的尿囊液样品经血凝和血凝抑制试验和 RT-PCR 等方法检测, 共有 13 例呈阳性。这 13 个样本分别采集于 3 个不同季节的 5 种水禽, 其中包括绿头鸭 (8/13)、豆雁 (1/13)、白额雁 (1/13)、绿翅鸭 (1/13) 和鸳鸯 (2/13), 具体见表 1。

3 讨论

众所周知, 目前共有 8 条候鸟迁徙路线遍布全球, 其中主要有 3 条路线覆盖了我国的全部领域, 而其中的“东亚- 澳大利亚迁徙线”就通过样品采集地——三江自然保护区。该保护区坐落于中国黑龙江省东北部的三江平原, 东经 133°43'2"~134°46', 北纬 47°26'~48°22'。三江自然保护区拥有广阔的沼泽湿地, 工作重点是湿地生态系统的保护。基于如此好的自然环境, 保护区成为许多迁徙水禽的繁殖地和停歇地。每年 4~5 月份, 一部分水禽在这里繁殖, 大部分则选择这里为停歇地, 继而到更北部的地方繁殖, 可能是亚北极和北极地区的水体生境, 大多数会选择到西伯利亚。每年 9~10 月份, 水禽从北向南迁徙, 它们途中停歇在三江自然保护区, 并继而迁徙到我国南方, 或者更远的东亚地区。因此, 三江自然保护区是非常重要的监测点。

表 1 采集的野鸟样品和禽流感病毒和新城疫病毒的分离
Table 1 Samples of wild birds and isolates of AIV and NDV

Collection time	Order	Family	Species		Number of samples	Number of AIV isolates	Number Of DV isolates
			English name	Latin name			
October 2005	Anseriformets	Anatidae	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	9		5
			Baikal Teal	<i>Baikal Teal</i>	4		
			Common Teal	<i>Anas crecca</i>	2		
			Bean Goose	<i>Anser fabalis</i>	3		
	Gruiformets	Rallidae	White-fronted Goose	<i>Anser albifrons</i>	2		
			Common Coot	<i>Fulica atra</i>	1		
	Ciconiiformets	Ardeidae	Grey Heron	<i>Ardea cinerea</i>	1		
			Rough-legged Buzzard	<i>Buteo lagopus</i>	2		
	Falconiformets	Accipitridae	Common Kestrel	<i>Falco tinnunculus</i>	1		
			Falconidae	Eurasian Hoopoe	<i>Upupa epops</i>	1	
Upupiformets	Upupidae						
April 2006	Anseriformets	Anatidae	Bean Goose	<i>Anser fabalis</i>	12		1
			Swan Goose	<i>Anser cygnoides</i>	1		
			White-fronted Goose	<i>Anser albifrons</i>	3		1
			Greylag Goose	<i>Anser anser</i>	1		
			Lesser White-fronted Goose	<i>Anser erythropus</i>	2		
			Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	11		1
			Shoveller	<i>Anas clypeata</i>	1		
			Garganey	<i>Anas querquedula</i>	1		
			Common Goldeneye	<i>Bucephala clangula</i>	1		
			Common Teal	<i>Anas crecca</i>	1		1
	Ciconiiformets	Ardeidae	Baikal Teal	<i>Baikal Teal</i>	2		
			Falcated Duck	<i>Anas falcate</i>	1		
	Charadriiformets	Charadriidae	Mandarin Duck	<i>Aix galericulata</i>	4		2
			Heron	<i>Ardea cinerea</i>	1		
	Gruiformets	Gruidae	Northern Lapwing	<i>Vanellus vanellus</i>	1		
			Red-crowned Crane	<i>Grus japonensis</i>	1		
	Falconiformets	Accipitridae	Demoiselle Crane	<i>Grus virgo</i>	1		
			Rough-legged Buzzard	<i>Buteo lagopus</i>	2		
Galliformets	Phasianidae	Red-footed Falcon	<i>Falco vespertinus</i>	1			
		Common Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	1			
Passeriformets	Corvidae	Azure-winged Magpie	<i>Pica pica</i>	1			
October 2006	Anseriformets	Anatidae	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	79	19	2
			Common Teal	<i>Anas crecca</i>	2		
			Garganey	<i>Anas querquedula</i>	1	1	
			Gadwall	<i>Anas strepera</i>	1		
Total	8	10	25	158	20	13	

国内有记载表明^[5], 绿头鸭是一种常见的、分布广泛的迁徙鸟类, 夏季它们在中国的东北、内蒙古和西北地区以及俄罗斯的西伯利亚地区的湿地进行繁殖, 然后在秋季集群, 沿不同的迁徙路线迁至南方, 大多数在中国的黄河以南地区越冬, 西至西藏的东南部, 东至东部沿海地区。本研究中, 63% (99/158)的样品、95%的(19/20)AIV 分离株和 61.5% (8/13) NDV 分离株是从绿头鸭当中采集和分离到的。在三江自然保护区的前期调查表明, 绿头鸭作为当地的优势物种, 其数量占有野生鸭类总数的一半以上, 它们在维持自然栖息地中 AIV 和 NDV 的持续存在可能起着更重要的作用^[6]。因此, 种群数量庞大、在世界范围内具有广泛的分布同时又与家鸭有着最为密切的亲缘关系的绿头鸭, 被认为可能是

AIV 和 NDV 最重要的自然宿主, 并在病毒的传播上比其他野生鸟类具有更为重要的生态学意义。

全球八条候鸟迁徙路线存在着复杂的重叠交汇区, 但均集中于北极圈附近, 形成了较大范围的候鸟迁徙交汇区, 因而可导致出现不同候鸟种群间的相互感染和远距离跨洲传播。Dany 指出^[7]北极的湖水的确构成了一个理想的非生命源性储蓄库, 可以长期地保存一些型别多样、能在水环境中生存的、有遗传交换性的病毒, 如 A 型流感病毒。这为解释 AIV 为什么能在野生水禽中年复一年、周而复始的循环提供了假定的模式。目前, 所有的 16 种 HA 和 9 种 NA 的各种组合的 AIV 亚型都已在水生鸟类种群中找到^[8]。本研究在采集的水禽中分离到的 20 株 AIV 鉴定为 12

个亚型, 分别是 5 个 HA 亚型和 7 个 NA 亚型, 如此高比例的 AIV 携带率或分离率, 多种 HA 和 NA 亚型的分布和二者的复杂组合也表明野生水禽是 AIV 的重要储存库。国外的一些学者对候鸟携带 AIV 的长期监测数据表明, 某一地区某条迁徙路线上都表现出 AIV 优势亚型, 如 H3、H4 和 H6 的 3 个 H 亚型是北美地区的优势亚型^[9]。而本研究的监测时间不长, 样品数量也比较少, 要获得优势亚型的数据还需要更长期的监测工作。2005 年青海湖自然保护区发生了候鸟感染 H5N1 型 AIV 而大规模死亡的事件^[10,11], 使人们认识到野生水禽不仅仅是 AIV 的携带者, 而且可能已成为流感的高度易感动物, 并趋于成为其他家禽流感的传染源; 但关于野生水禽在传播 H5N1 型 AIV 的作用一直存在争议^[12]。本研究没有分离 H5N1 型 AIV, 3 次采样都未见到野生水禽大规模非正常死亡的现象。

NDV 则在三江自然保护区的 3 个迁徙季节中均分离到了, 在所有的 158 个样本中, 共分离到 13 株 NDV。新城疫作为一种高度传染性的病毒性疾病可以感染几乎所有的鸟类。由于动物的易感性, NDV 可以引起家禽非常严重的临床症状和大量的死亡。然而从野鸟中分离到的绝大多数 NDV, 尤其是来源于水禽的, 是无致病性的, 不引起明显的临床症状。先前我们对其中的 1 株 NDV 分离株的 F 基因片段进行了克隆和测序, 结果表明其 F 基因裂解点氨基酸组成与 NDV 强毒株的完全一致^[13]。这与 Takakuwa 早期的研究结果一致, 并且进一步证实了自然状态下在迁徙的野生水禽中存在潜在的 NDV 致病性毒株^[14]。当然, 家禽可能是所有这些 NDV 分离株最初的来源。实际上, 在一些国家和地区新城疫的流行情况仍然非常严重, 这都会影响到 NDV 在野鸟中的流行和生态分布。

本研究中, 分离出 NDV 和 AIV 的阳性感染鸟都没有发现任何明显的临床症状, 但是这些分离株的毒力仍然需要进一步测定。总共的 158 份样品中除了绿头鸭, 其它种类的鸟类有限, 这看上去还不能充分了解途经三江保护区的野鸟感染 AIV 和 NDV 的流行情况, 但所获结果为进一步的研究提供了一些有价值的信息和基础数据。而且连续的长期监测和对迁徙水禽病毒分离株的序列分析仍然是为更深入了解 AIV 和 NDV 的生态学所做的重要工作。

致谢 感谢三江自然保护区为样品采集提供的帮助。感谢中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽流感国家参考实验室在 AIV 亚型鉴定中给予的大力支持。

参 考 文 献

- [1] Alexander DJ. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J Comp Pathol*, 2005, 112(2): 105–126.
- [2] Deibel R, Emord DE, Dukelow W, *et al.* Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977–1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Dis*, 1985, 29: 970–985.
- [3] Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Micro*, 1980, 26: 622–629.
- [4] Maldonado A, Arenas A, Tarradas MC, *et al.* Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*, 1995, 31(1): 66–69.
- [5] 张孚允, 杨若莉. 中国鸟类迁徙研究. 北京: 中国林业出版社, 1997.
- [6] Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, *et al.* Disease of Poultry. 11th ed. Ames: IA Iowa State University Press, 2003, 147–166.
- [7] Danny S. Review: Molecular evolution and the feasibility of an avian influenza virus becoming a pandemic strain—a conceptual shift. *Virus Genes*, 2006, 33: 127–132.
- [8] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype(H16)obtained from black-headed gulls. *Virology*, 2005, 79(5): 2814–2822.
- [9] Hansen BA, Stallknecht DE, Swayne DE, *et al.* Avian influenza virus in Minnesota ducks 1998–2000. *Avian Dis*, 2003, (47): 867–871.
- [10] Liu J, Xiao H, Lei F, *et al.* Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 2005, 309(5738): 1206.
- [11] Chen H, Smith GJ, Zhang SY, *et al.* Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 2005, 436(7048): 191–192.
- [12] Chris J Feare. The role of wild birds in the spread of HPAI H5N1. *Avian Dis*, 2007, 50: 440–447.
- [13] 张智明, 华育平, 李晓冰, 等. 一株野鸭源新城疫病毒 F 基因的克隆及序列分析. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2007, 29(10): 773–776.
- [14] Takakuwa H, Ito T, Takada A, *et al.* Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn J Vet Res*, 1998, 45(4): 207–215.

Monitoring Influenza A virus and Newcastle disease virus in migratory waterfowls in Sanjiang natural Reserve of Heilongjiang Province

Xiangwei Zeng^{1, 2}, Yuping Hua^{1*}, Xiaobing Li¹, Zhiming Zhang¹

⁽¹⁾College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

⁽²⁾Post-Doctorate Scientific Mobile Station, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: [Objective] In order to monitor the present situation of Avian influenza virus(AIV) and Newcastle disease virus(NDV) in migratory waterfowls effectively, 158 tracheal and cloacal swab samples for wild birds were collected from Sanjiang natural reserve during migratory seasons in October 2005, April 2006 and October 2006. [Methods] Serial passages in specific pathogen free embryonated chicken eggs, haemagglutination activity (HA) test, hemagglutination inhibition (HI) test and RT-PCR detection were used to isolate and identify AIV and NDV. [Results] Twenty AIV isolates and 13 NDV isolates were collected in the test. Twenty AIV isolates were all from aquatic birds in October 2006, and among these isolates, 12 AIV subtypes were identified definitely, 11 subtypes were found in mallards-H2N2 (2/20), H2N6 (2/20), H3N4 (1/20), H3N6 (2/20), H3N7 (2/20), H3N8 (2/20), H6N2 (2/20), H11N2 (1/20), H11N3(1/20), H11N5 (2/20), H11N6 (1/20), and 1 subtype was found in garganey-H5N2 (1/20). Thirteen NDV isolates were collected in all three migratory seasons from 5 different species of waterfowls, including mallard (8/13), bean goose (1/13), white-fronted goose (1/13), common teal (1/13) and mandarin duck (2/13). [Conclusion]The results indicated that mallard, which possesses huge population size and world wide distribution, could be considered one of the most important natural carrier of AIV and NDV and may have more important ecological significance on viruses transmission than other species of wild birds.

Keywords: migratory waterfowls; avian influenza virus;X Newcastle disease virus; monitoring

Supported by the Major Program on Wildlife Diseases Surveillance of State Forestry Administration (020-413239), the Postdoctoral Foundation of Heilongjiang Province (LBH-Z06153) and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province for Young Scholars (QC07C33)

*Corresponding author. Tel: +86-451-82191734; E-mail: yuping_hua@126.com

Received: 6 April 2008/ Revised: 26 May 2008

科学出版社生物分社新书推介 (2008-07)

代谢组学——方法与应用 (译)

许国旺 等著

978-7-03-021528-4 ¥88.00 2008年7月31日出版

内容简介

本书是国内第一部集基本理论和实际应用于一体的、极有价值的关于代谢组学的专著,对学科的发展现状、面临问题、应用前景、未来趋势和学科本身的价值都做了客观、科学的描述。除简要回顾代谢组学的发展历史、特点外,重点介绍了代谢组学技术平台及其在健康疾病、药物毒性、植物、微生物、营养科学和环境科学研究中的应用,使读者能在短时间内对最新的技术和国内外进展有一全面了解。为适应不同层次人员对代谢组学知识的需求,本书在全面阐述色谱、质谱、核磁共振谱和多变量数据分析方法在代谢组学中的应用的同时,图文并茂地剖析了代谢组学在不同领域内的应用,使读者能很容易地应用本书解决相关领域中的问题。本书既可作为从事代谢组学研究的专业人员的参考书,也可作为相关领域研究生的教材。对代谢组学感兴趣或具备一定的生物化学和分析化学背景的读者也可根据自己所从事的专业有选择地阅读部分章节。

