

江西遂川地区禽流感和新城疫病毒的监测研究

耿海东^{1,2}, 金洪梅¹, 张廷君³, 张小林¹, 张佳洁¹, 李祥¹, 周长宇¹, 丁圆英¹, 高光雨¹, 王卓乐¹, 乔丹¹, 李吟雪¹, 翟熙文¹, 华育平¹, 张国钢^{4*}, 柴洪亮^{1*}

(1. 东北林业大学野生动物资源学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 国家林业局野生动物疫源疫病监测总站, 辽宁沈阳 110034; 3. 中国野生动物保护协会, 秦皇岛野生动物救护中心, 河北秦皇岛 066100; 4. 全国鸟类环志中心, 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

摘要 [目的] 了解江西遂川地区野生鹭科鸟类携带禽流感和新城疫病毒的感染情况。[方法] 于2014年10月在江西省遂川地区采集鹭科鸟类的肛拭子110份、咽拭子110份, 采用SPF鸡胚进行病毒分离, 通过血凝试验筛选出疑似阳性样品, 然后再用RT-PCR进行鉴定。[结果] 在110份被检样品中, 除4份样品外, 其余样品的血凝效价均为0。经RT-PCR检测, 所有样品禽流感和新城疫病毒检测结果均呈阴性。这表明2014年秋季江西遂川地区野生鹭科鸟类发生禽流感和新城疫病毒感染的风险较小。[结论] 该研究可为了解江西各地区野生水禽禽流感和新城疫的感染情况提供基础数据。

关键词 禽流感; 新城疫; 监测

中图分类号 S855 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)27-129-02

Monitoring of Avian Influenza and Newcastle Disease Virus in Suichuan Region of Jiangxi Province

GENG Hai-dong^{1,2}, JIN Hong-mei¹, ZHANG Yan-jun³, ZHANG Guo-gang^{4*}, CHAI Hong-liang^{1*} et al (1. College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. General Monitoring Station for Wildlife-borne Infectious Diseases, State Forestry Administration, Shenyang, Liaoning 110034; 3. Qinghuangdao Center for Wildlife Rescue and Protection, China Wildlife Conservation Association, Qinghuangdao, Hebei 066100; 4. National Bird Tagging Center, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection of Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Beijing 100091)

Abstract [Objective] The research aimed to investigate the epidemiological characteristics of avian influenza and newcastle disease virus of wild Ardeid birds in Suichuan Region of Jiangxi Province. [Method] 110 oropharyngeal and 110 cloacal swabs of Ardeid birds were collected from Suichuan Region of Jiangxi Province in October of 2014. The viruses were separated by using SPF chicken embryos and suspected positive samples were screened out by hemagglutination test and identified by RT-PCR. [Result] Among 110 detected samples, hemagglutination titer of other samples was 0 except 4 samples. The detection results of RT-PCR showed that the detection samples of avian influenza and newcastle disease virus of all samples were negative. This indicated that the infection risk of avian influenza and newcastle disease of Ardeid birds in Suichuan Region of Jiangxi Province in the summer of 2014 was small. [Conclusion] The research could provide basic data for understanding the infection situations of avian influenza and newcastle disease of wild water birds in each region of Jiangxi Province.

Key words Avian influenza; Newcastle disease; Monitoring

新城疫(Newcastle disease, ND), 也称亚洲鸡瘟或伪鸡瘟, 是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的以禽类消化道、呼吸道损伤为主要特征的一种急性、高度接触性、烈性传染病, 常呈败血症经过。鸡、鸭、鹅、鸽子、鹌鹑等多种家禽及野禽均易感染, 人类也可以感染此病毒^[1]。可以引起易感鸡群呼吸困难、甩头、流涎、神经紊乱、产蛋率下降等症状以及气管出血、腺胃乳头出血、肠道淋巴组织有枣核状溃疡灶等病理变化^[2-3]。该病流行于世界各国, 给养禽业造成了巨大的经济损失, 严重危害和威胁世界的养禽业, 被世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)列为A类疫病, 我国将其列为一类动物疫病。目前, 新城疫已成为严重危害我国养鸡业的重要疾病之一, 给养鸡业

带来了严重损失。

禽流感(Avian influenza, AI) 又称欧洲鸡瘟或者真性鸡瘟, 是由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的以感染禽类为主的高度接触性传染病, 均属于A型流感病毒^[4-5]。按照病原体类型的不同, 禽流感可分为高致病性、低致病性和非致病性禽流感三大类。其中, 高致病性禽流感被国际兽医局(OIE)定性为A类烈性传染病, 我国农业部也将其列为甲类监测传染病, 而且被列入国际生物武器公约动物源传染病名单^[6-7]。禽流感的每次爆发都带来了极其巨大的经济损失, 严重危害了世界各国禽类养殖业的发展。据报道, 2005年12月15日江西省遂川县曾发生H₅N₁亚型高致病性禽流感疫情。江西遂川县泉江镇上溪村某农户饲养的鸭出现死亡, 共死亡鸭1640只, 而这一疫情带来的相继扑杀工作给当地人造成了严重的经济损失。2013年12月江西省出现了人感染H₁₀N₈的病例。因此, 对江西遂川地区野鸟携带和感染禽流感病毒和新城疫病毒的调查就显得尤为重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 SPF鸡胚。SPF鸡胚, 购自维科生物技术开发公司。

1.1.2 主要试剂。Trizol, 购自Invitrogen公司; M-MLV反转录酶, 购自PROMEGA公司; Taq酶与dNTP, 购自GenStar公

基金项目 林业公益性行业科研专项(201404404); 国家林业局野生动物疫源疫病监测项目。

作者简介 耿海东(1960-), 男, 辽宁大连人, 高级工程师, 从事野生动物病理学研究。金洪梅(1990-), 女, 吉林通化人, 硕士研究生, 研究方向: 野生动物流行病学。张廷君(1986-), 男, 河北秦皇岛人, 助理工程师, 硕士, 从事野生动物救护工作。耿海东、金洪梅和张廷君为同等贡献作者。*通讯作者, 柴洪亮, 副教授, 博士, 从事动物病毒学研究。*通讯作者, 张国钢, 副研究员, 博士, 从事鸟类生物学研究。

鸣谢 湖北省野生动物疫源疫病监测中心及黑龙江省林业厅等为该研究提供了相关试验和技术支持, 特此致谢。

收稿日期 2015-07-29

司;RRI,购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品来源。在江西遂川地区主要采用活捕法(包括网捕法和笼捕法)捕捉到 110 只野生鹭科鸟类。每只鹭都采集咽拭子和肛拭子样品,样品共 220 份。置于拭子病毒保存液中 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 病毒的分离。采用鸡胚尿囊腔接种法进行病毒增殖。同一样品编号的处理后的咽拭子、肛拭子保存液上清各取 0.1 ml,混合接种于 9~11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每个样品接种 1 枚 SPF 鸡胚,37 $^{\circ}\text{C}$ 全自动孵化器内孵育 72 h,每隔 12 h 照胚观察 1 次。弃去 24 h 以内的死亡鸡胚,无菌环境下收获 24~72 h 内的死胚及活胚的尿囊液。所有样品经过鸡胚传代 3 次后,对收集的尿囊液进行血凝(HA)试验,测定血凝效价,并对 HA 阳性样品进行 AIV 和 NDV 的 RT-PCR 检测。

1.2.3 病毒 RNA 的提取。①取 200 μl HA 阳性样品的尿囊液于离心管中,加入 600 μl 裂解液,混合振荡 90 s;②静置 5 min 后加入 200 μl 三氯甲烷,混匀振荡,静置 2 min 后 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min;③取 450 μl 上清液于新的离心管中,加入 450 μl 异丙醇,混匀,室温沉降 10 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min;④弃上清,加入 1 000 μl 75% 酒精,12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min;⑤弃上清,干燥沉淀,加 10 μl DEPC 水进行溶解;⑥加 2 μl 反转录引物,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,冰上冷却 5 min。⑦加入 M-MLV 反转录酶 0.5 μl ,RNA 酶抑制剂 0.5 μl ,DEPC 水 3 μl ,2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μl 和 5 \times buffer 5 μl 后进行反转录。⑧反转录后的核酸存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下。

1.2.4 RT-PCR 检测。在 PCR 管中依次加入 10 \times Buffer 2 μl ,dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl ,上、下游引物各 1 μl (20 pmol/ μl),Taq DNA 聚合酶 0.5 μl ,反转录产物 1.5 μl ,补双蒸水至 25 μl 进行 PCR(每个血凝阳性样品都要检测禽流感和新城疫病毒)。RT-PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、退火温度下 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;最后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。其中,AIV 的退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,NDV 的退火温度为 53.1 $^{\circ}\text{C}$ 。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

2 结果与分析

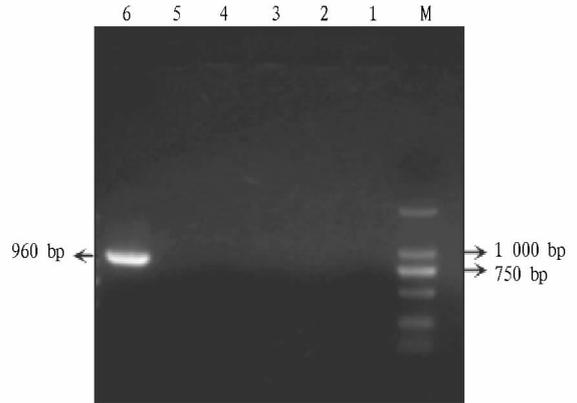
2.1 血凝效价 对采集的尿囊液进行血凝试验。由表 1 可知,在 110 份被检样品中有 4 份有血凝试验结果呈阳性,其余血凝效价均为 0。

表 1 血凝试验结果

样品编号	第 1 代	第 2 代	第 3 代
J18	2 ⁰	2 ⁰	2 ¹
J46	2 ⁰	2 ⁰	2 ³
J60	2 ⁰	2 ⁰	2 ⁴
J69	2 ⁰	2 ⁰	2 ³

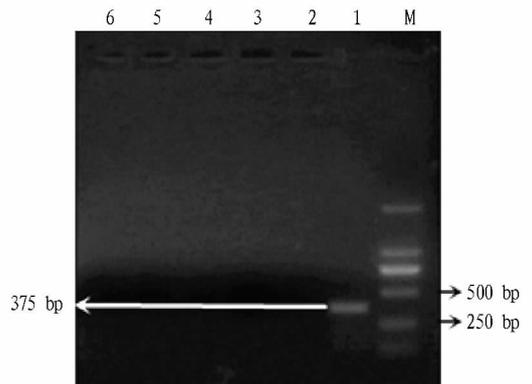
2.2 RT-PCR 检测结果 提取尿囊液中的病毒核酸为模板,使用自己设计的 AIV 鉴定引物和 NDV 鉴定引物分别进行 PCR 扩增。从图 1~2 可以看出,AIV 阳性对照样品的目的片段大小为 960 bp,NDV 阳性对照样品的目的片段大小为

375 bp。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,发现 AIV 阳性对照样品出现 960 bp 的目的片段,NDV 阳性对照样品出现 375 bp 的目的片段,待检的血凝阳性样品未出现相应的目的片段。由此可见,待检的血凝样品的 AIV 和 NDV 检测结果均为阴性。



注:M. DL2000 Marker;1. 阴性对照;2~5 为血凝阳性样品;6. 阳性对照。

图 1 样品 AIV 的 PCR 检测结果



注:M. DL2000 Marker;1. 阳性对照;2~5 为血凝阳性样品;6. 阴性对照。

图 2 样品 NDV 的 PCR 检测结果

3 讨论

新城疫在世界范围内曾有过 3 次大流行。目前,该病在我国各地普遍存在,并且是我国养禽业危害最大、经济损失最严重的禽病之一^[8]。禽流感也是严重危害和威胁我国乃至全世界养禽业发展的 A 类疫病,每次暴发都会给养禽业带来巨大的经济损失。江西省遂川县被称为“遂川鸟道”,是全国三大候鸟迁徙通道之一,是我国华中地区迁徙鸟类的必经“隘口”,是迁徙鸟类往返俄罗斯、我国北方地区与东南亚,乃至澳大利亚和新西兰等路线上的关键点之一。候鸟在迁徙活动中,存在于候鸟体内的禽流感病毒或新城疫病毒有可能在迁徙过程中进行传播。候鸟群中存在的呈低致病性的禽流感病毒有可能通过家禽与野生鸟类接触,传染给家禽,在家禽中重组和变异,导致高致病性禽流感(HPAI)病毒的产生。自 1959 年以来,在世界范围内这种由野生鸟类中的 LPAI 传染给家禽,在家禽中变异成为 HPAI,最终导致疫情

(下转第 194 页)

恢复工程和水源林保护区等项目的立项和开工建设;加强宣传与执法力度:加大宣传力度,对保护区居民进行教育,增加他们的保护意识,完善执法机制,对一些破坏、偷砍、偷伐的行为要严惩。

2.4.2 多样性保护具体措施。

(1) 有林地生物多样性恢复。保护区林地以云南松纯林、栎类、旱冬瓜针阔混交林为主,林分结构十分单一。阔叶林仅存在于偏远地段及沟谷,且多为人为破坏后形成的萌生林;人工林多分布在海拔较高的地区,以华山松纯林和华山松与旱冬瓜混交林为主。2014年集水区共营造防护林5 811 hm²,其中华山松林4 316 hm²,占73.2%;旱冬瓜林1 391 hm²,占23.9%;其他树种的林分105 hm²,仅占3.8%。通过调查分析得知,保护区林地的主要问题:树种结构单一,林层结构简单,物种多样性差,综合水源涵养功能低下。因此根据保护区不同的气候条件、自然地理环境,结合不同的立地条件与土壤特征,对现有的有林地、灌木林地、疏林地、退耕地、荒地、未利用地进行植物群落构建,以提高生物多样性为目的,并考虑构建的植物群落能最快地发挥群落的生态效应和水土流失防治能力。通过基本的树种配置和封育措施的实施,使保护区林地尽快恢复自身的生态系统和生产功能,然后通过林地自身的物种演替使林地生物多样性得到恢复。

(2) 云龙水库、双化水库湿地植物多样性建设。水源区湿地的建设能有效分解、净化水中的污染物,改善水环境污染。同时,湿地也是众多植物、动物,特别是水禽生长的乐园。因此,云龙水库、双化水库湿地植物多样性的保护与恢复建设,将会对水源保护起到重要作用。根据保护区湿地建设的需要,在云龙水库和双化水库种植荷花、芡实、萍蓬莲、千屈菜、水葱、香蒲、凤眼莲、雨久花、泽泻、慈姑、荇菜、金鱼藻、石菖蒲、菖蒲、芦苇、花菖蒲等水生植物。

(3) 外来物种管理。据水源区管理部门统计,云龙水库保护区现外来入侵生物大约有20余种,近几年新传入的有害生物达数十种。生物入侵正成为威胁保护区生物多样性与生态环境的重要因素之一。保护策略与规划措施:①成立专门管理机构,协同相关部门进行联控管理。防治外来物种

入侵是一项综合工程,应加强同农业、林业、环保、渔业等有关部门的协调联动;②搞好保护区外来物种的家底调查,组织开展外来物种及入侵生物普查工作,摸清保护区外来种的种类、分布情况、危害程度等。在此基础上编制外来物种入侵名单,收集分类,搞清原产地、入侵分布区、生理生态、传播途径、防治方法等全面信息资料^[5];③建立对外来物种引种的风险性评估制度,提倡使用当地物种,加强当地物种的可持续利用。引种时,进行科学风险评估和进行必要的相关试验^[6];④建立完善的外来物种入侵风险检测、评估及快速反应体系。制定科学的控制方案,包括目标物种、控制区域、控制方法和时间;⑤加强宣传教育,提高全民防控意识^[7]。外来物种侵入时,要依靠保护区全民的广泛参与,及时发现、及时上报,以取得良好效果。编辑整理入侵物种及防控教育普及材料,利用刊物、小册子等进行传播宣传教育和培训,提高当地居民防范外来入侵物种的意识。

3 结语

实践案例将生物多样性原理、生态位原理、植物群落演替原理应用于云龙水库水源区生物多样性保护规划当中,重点关注生物多样性当中林分、林地的竖向结构、乡土植物的选择、湿地生态带重点问题。经过案例实践,体会到在水源区生物多样性恢复与建设过程中,要重点关注植物物种的选择应避免大量应用外来物种;关注林分良种率低的问题;必须有效控制经济林的结构与规模,避免经济林比重过大、趋同现象严重等问题。

参考文献

- [1] 车越,杨凯,徐启新. 水源地研究的进展与展望[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(5): 105-107.
- [2] 王超. 张家港水环境保护规划研究[D]. 南京: 河海大学, 2005.
- [3] 方子云. 水资源保护工作手册[M]. 南京: 河海大学出版社, 1998.
- [4] 云龙水库水源保护区总体规划前期环境现状调查及评价报告[R]. 昆明市重点水源区保护委员会办公室, 2007.
- [5] 周卫生, 吴宁, 包维楷. 成都市外来物种及其管理策略[J]. 四川林业科技, 2006, 27(3): 52-56.
- [6] 张晓梅. 从微甘菊入侵德宏浅析对外来物种侵入的防范[J]. 云南农业科技, 2007(1): 56-57.
- [7] 林杨. 主要有害外来植物对长沙市植物群落特征的影响研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2005.

(上接第130页)

的多次暴发^[9]。由此可见,对这个地区禽流感和新城疫病毒的监测将有利于预测与此通道相关地区疫情的暴发情况。

笔者对江西省遂川地区野生鹭科鸟类进行了样品采集,对这批样品禽流感和新城疫病毒的鉴定结果均为阴性。这可能有以下原因:①在采集样品后未能及时放入-80℃冰箱内保存,在运回实验室过程中可能温度过高造成了病毒的损失。②可能是因为采集样品过少,病毒量太低而未能检测出来。虽然通过该试验将不能充分了解江西各地区野生水禽感染禽流感和新城疫流行情况,但可为今后进一步研究提供有价值的信息和基础数据。

参考文献

- [1] 吴建华,秦卓明,孙梅,等. 一株新城疫强毒株的分离鉴定[J]. 动物医

- 学进展, 2005, 26(12): 111-113.
- [2] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 304-309.
- [3] B·M·卜尔尼克. 禽病学[M]. 10版. 北京: 中国农业出版社, 1997: 691-792.
- [4] JAHANGIR A, RUENPHET S, SHOHAM D, et al. Phenotypic, genetic, and phylogeographical characterization of avian influenza virus subtype H5N2 isolated from northern pintail (*Anas acuta*) in Japan[J]. Virus research, 2009, 145(2): 329-333.
- [5] CHAHARAEN B. Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. Microbiological research, 2009, 164: 174-179.
- [6] B·W·卡尔尼克. 禽病学[M]. 9版. 北京: 北京农业大学出版社, 1991.
- [7] 甘孟侯. 全球禽流感的流行形势[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(6): 468-471.
- [8] 由轩, 谢晓峰, 杨鹏飞. 中俄边境地区野生候鸟禽流感的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(11): 117-118.
- [9] 崔治中. 我国新城疫流行现状[J]. 中国家禽, 2002, 24(4): 4-6.