

H7 亚型禽流感病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立

包红梅, 王秀荣, 陶启蒙, 蔡东东, 王馥梅, 陈化兰

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/农业部动物流感重点开放实验室, 哈尔滨 150001

摘要: 通过分析流感数据库 45 个 H7 亚型禽流感病毒的 HA 序列, 在保守区内设计并合成引物, 建立了一步法 RT-PCR 检测方法, 扩增片段大小为 501 bp。通过对 H7 亚型禽流感病毒尿囊液和棉拭子浸出液不同滴度检测, 证实病毒尿囊液最低检出量为 $10^{5.5}$ EID₅₀/mL; 阳性棉拭子最低检出量为 10^3 EID₅₀/mL。用该方法检测 H1~H15 亚型禽流感病毒和鸡新城疫病毒等其他 14 种禽病病原进行检测, 仅有 H7 亚型 AIV 有特异性目的条带, 与其他均无交叉反应。从脏器及咽喉、泄殖腔棉拭子样品的病毒分离和 RT-PCR 方法比较, 表明在 10^{-1} 的样品浓度下, 两者可以达到相同的检出量。表明该一步法 RT-PCR 方法具有特异性强、敏感性高和准确率高的特点。

关键词: 禽流感病毒, 反转录聚合酶链反应, H7N1, 亚型鉴别

Development of one step RT-PCR technique for detection of H7 subtype avian influenza

Hongmei Bao, Xiurong Wang, Qimeng Tao, Dongdong Cai, Fumei Wang, and Hualan Chen

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China

Abstract: According to 45 hemagglutinin (HA) gene sequences of H7 subtype of avian influenza virus (AIV), a pair of specific oligonucleotide primers was designed. We developed one step RT-PCR for detecting AIV subtype H7. Sensitivity to detection of allantoic fluid by one step RT-PCR reached $10^{5.5}$ EID₅₀/mL and detection of swab samples reached 10^3 EID₅₀/mL. We simultaneously detected the tissue and swab samples infected with H7 subtypes AIV by one step RT-PCR and virus isolation method. The results showed that the sensitivity of the assay gave an excellent correlation with the conventional virus isolation method. H1-H15 subtypes of avian influenza and other avian diseases were detected by the one step RT-PCR. The results showed the assays were high specific, without cross-reaction with other subtypes or other avian diseases. Development of one step RT-PCR will provide effective technical support for the rapid diagnosis and surveillance of molecular epidemiology of AIV subtype H7.

Keywords: avian influenza virus, RT-PCR, H7N1, subtype differentiation

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)为单股负链 RNA 病毒, 由 8 个独立的 RNA 节段组成^[1], 显著的生物学特征之一是亚型众多, 变异频繁。迄今

为止从禽类体内已经分离到上千种毒力各异的毒株, 根据其病毒粒子表面的囊膜糖蛋白—血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的抗原性差异, 分为 16 个 HA 亚型

Received: June 18, 2009; **Accepted:** September 7, 2009

Supported by: Development of Effectively Biological Preparation for Preventive Avian Influenza Virus (No. 2007DFR30360).

Corresponding author: Xiurong Wang. Tel: +86-451-85935080; Fax: +86-451-82733132; E-mail: wxr68@yahoo.com.cn

防禽流感高效生物制剂试生产开发项目(No. 2007DFR30360)资助。

和 9 个 NA 亚型^[2-3]。野生水禽是流感病毒的原始贮存库,所有 16 个 HA 亚型流感病毒在水禽中均有发现^[4]。不同亚型毒株对宿主的致病力差异显著,在所有 HA 亚型中,只有 H5 和 H7 亚型对禽是高致病性的^[5],称为高致病性禽流感(High pathogenic avian influenza, HPAI),该类病毒可引起鸡群 100%死亡,被国际兽疫局确定为 A 类传染病^[6]。近年来时有 H7 亚型流感病毒爆发,如 1999~2000 年在意大利爆发的 H7N1 病毒导致 1300 多万羽鸡死亡,造成重大经济损失。2003 年荷兰^[6]爆发了 H7N7 亚型禽流感,不仅造成了重大的经济损失,而且感染 89 人^[7-8]。这些事件表明禽流感的危害已不仅是对养禽业的破坏,更主要的是它对人类健康构成潜在的威胁。

因此,为了对疫情快速采取应对措施,对疑似病例做出快速有效的诊断具有重要意义。本研究针对家禽中流行较为广泛、危害较大的 H7 亚型禽流感病毒的血凝素基因建立了一种一步法 RT-PCR 诊断方法,具有用样少、特异性强、敏感性高、快速准确等特点。该方法为我国禽流感的防控预警机制提供了简捷、先进、有效的早期快速诊断技术。

1 材料和方法

1.1 病毒株

禽流感病毒 H1~H15 亚型参考毒株: A/Duck/Alberta/35/76(H1N1); A/Duck/Germany/1215/73(H2N3); A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8); A/Duck/Czech/56(H4N6); A/Turkey/England/N28/73(H5N2); A/Turkey/Canada/63 (H6N8); A/African Starling/ England/983/79(H7N1); A/Turkey/Ontario/6118/68(H8N4); A/Turkey/Wisconsin/1/66(H9N2); A/PD 384/79(H10N4); A/Duck/Memphis/546/76(H11N9); A/Duck/Alberta/60/76(H12N5); A/Gull/Maryland/704/77(H13N6); A/Mallard/Gurjev/263/82 (H14N5); A/Duck/Australia/341/83(H15N8)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存并提供;敏感性研究的 H7 亚型 AIV 病毒分离株 A/African Starling/England/983/79(H7N1)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物流感重点实验室保存并提供;特异性试验的病原:鸡新城疫病毒(NDV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)、鸡马立克氏病病毒(MDV)、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽呼肠孤病毒

(REOV)、鸡痘病毒(FPV)、禽霍乱多杀性巴氏杆菌(FC)、鸡败血支原体(MG)、鸡传染性贫血病毒(CIAV)、鸡白痢沙门氏菌(SP)、鸡白血病病毒(ALV)、鸡付嗜血杆菌(HP)、鸡减蛋综合征病毒(EDSV-76),由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.2 引物

分析了流感数据库中 45 个 H7 亚型流感病毒 HA 基因序列和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室测定的 2 个 H7 亚型禽流感病毒 HA 序列,找出 HA 基因保守区,在保守区内设计引物, H7 Up: 5'-AATGCACAAGGAGA GGGAACTGC-3'; H7 Low: 5'-TGATGCCCCGAAGC TAAACCA-3'扩增片段大小为 501 bp。引物由英骏公司合成。

1.3 试剂与鸡胚

RNA gents® Total RNA Isolation 系统和 Access RT-PCR 系统均购自 Promega 公司。10 日龄 SPF 鸡胚、6 周龄 SPF 鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 SPF 实验动物中心提供,所有 SPF 鸡都在负压隔离器内饲养。pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.4 H7 亚型禽流感病毒增殖与病毒含量测定

H7 亚型毒株的种毒 10^{-3} 倍稀释后接种于 9 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,收集 24~96 h 死亡及未死亡鸡胚尿囊液,测定血凝价,分装于 250 μ L 管, -70°C 冻存备用。将病毒 10 倍倍比稀释至 10^{-10} ,然后选择 $10^{1.5}$ EID₅₀/mL~ $10^{-2.5}$ EID₅₀/mL 滴度接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每枚接种 0.1 mL,每个稀释度接种 5 枚,36 h 后收集鸡胚尿囊液测定血凝价,计算病毒尿囊液中的病毒含量。泄殖腔棉拭子做 10^0 ~ 10^{-4} 稀释,接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每枚接种 0.1 mL,每个稀释度接种 5 枚,36 h 后收集鸡胚尿囊液测定血凝价,计算病毒尿囊液中的病毒含量。

1.5 样品的采集与处理

取病死或扑杀禽的脑、肺或肌肉等组织;待检活禽,用棉拭子蘸取气管分泌物或泄殖腔排泄物,放于含抗生素的生理盐水中。取待检病料置研磨器中剪碎并研磨,再按照每克重量加入 1 mL PBS,混匀,按 10^{-1} 比例稀释后用于 RNA 的提取。棉拭子直接加入 1 mL PBS,混合后取溶液用于 RNA 的提取。

1.6 总 RNA 的提取

参照 Promega 公司 RNA gents® Total RNA Isolation System 说明书进行。具体方法如下: 取 1.5 mL DEPC 处理过的离心管, 加入待检样品 100 μ L, 加 300 μ L 变性液, 继续加入 30 μ L 2 mol/L 醋酸钠(pH 4.0)。颠倒离心管 4~5 次, 加入酚/氯仿/异戊醇混合液 300 μ L, 混合离心管 3~5 次, 置冰上静置 15 min; 12 000 r/min、4°C 离心 20 min, 转移上清于另一个干净的 1.5 mL 离心管中; 加入等体积的异丙醇, 于-20°C 静置至少 10 min, 沉淀 RNA。12 000 r/min 4°C 离心 10 min; 弃上清, 加入 75%的冰乙醇, 颠倒离心管 3~5 次, 12 000 r/min、4°C 离心 5 min; 弃上清, 真空抽干或者 37°C 烘干 20 min; 加入 10 μ L DEPC 处理水, 溶解 RNA。

1.7 一步法 RT-PCR 扩增

反应总体积为 25 μ L, 组成成分如下: 5 \times 反应缓冲液 5.0 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L、15 mmol/L 硫酸镁 1.0 μ L、20 pmol H7 Up 0.25 μ L、20 pmol H7 Low 0.25 μ L、AMV 反转录酶 0.5 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L、DEPC 处理的灭菌双蒸水 14 μ L。取 2.5 μ L 提取的 RNA 加入到体系中, 置于 PCR 仪中, 循环参数为: 45°C 逆转录 45 min, 94°C 预变性 2 min, 94°C 30 s、52°C 45 s、68°C 45 s, 35 个循环, 最后 68°C 延伸 8 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.8 敏感性试验

对测定病毒含量的 H7 亚型禽流感病毒尿囊液进行 10 倍倍比稀释, 然后分别提取核酸, 再用 RT-PCR 方法检测; 对测定病毒含量的棉拭子浸出液进行 2 倍倍比稀释, 用 RT-PCR 方法检测。

1.9 特异性试验

对 15 个流感病毒亚型的检测: 用该试剂盒检测 H1~H15 亚型禽流感病毒, 检测不同亚型病毒之间是否存在假阳性结果。交叉试验: 鸡新城疫病毒(NDV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)、鸡马立克氏病病毒(MDV)、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽呼肠孤病毒(REOV)、鸡痘病毒(FPV)、禽霍乱多杀性巴氏杆菌(FC)、鸡败血支原体(MG)、鸡传染性贫血病毒(CIAV)、鸡白痢沙门氏菌(SP)、鸡白血病病毒(ALV)、鸡付嗜血杆菌

(HP)、鸡减蛋综合征病毒(EDSV-76)等其他 14 种禽病病原进行检测, 分析试剂盒对其他疾病的检测情况。

1.10 符合率试验

H7 亚型病毒以每羽份 $10^{6.5}$ EID₅₀/0.1 mL 感染 SPF 鸡, 取心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、法氏囊、咽喉和泄殖腔棉拭子样品, 10^0 ~ 10^{-8} 梯度稀释, 用病毒分离和 RT-PCR 两种方法检测。

2 结果

2.1 病毒的增殖与病毒含量测定结果

收获的尿囊液血凝价为 7log₂, 病毒滴度为 $10^{7.5}$ EID₅₀/mL。阳性棉拭子浸出液病毒含量为 10^4 EID₅₀/mL。

2.2 敏感性试验结果

对病毒含量为 $10^{7.5}$ EID₅₀/mL 的 H7 亚型禽流感病毒尿囊液进行 10 倍倍比稀释, 各取 100 μ L 用 RT-PCR 方法检测, 结果在 10^{-2} 稀释时仍然可以扩增出明显目的条带, 因此该试剂盒的最低检出量为 $10^{5.5}$ EID₅₀/mL (图 1)。

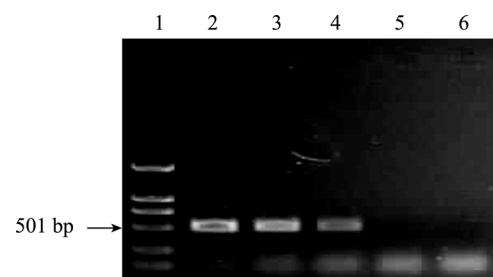


图 1 不同稀释度尿囊液病毒检测结果

Fig. 1 Sensitive analysis of different dilutions of allantoic fluid. 1: DL2000 DNA marker; 2: 10^0 dilution; 3: 10^{-1} dilution; 4: 10^{-2} dilution; 5: 10^{-3} dilution; 6: negative control.

对病毒含量为 10^4 EID₅₀/mL 棉拭子液进行 2 倍倍比稀释, 用 RT-PCR 方法检测, 8 倍稀释时仍然可以获得阳性预期结果(图 2)。

2.3 特异性试验结果

用该试剂盒检测 H1~H15 亚型禽流感病毒, 只对 H7 亚型病毒出现预期大小的 PCR 扩增片段, 其他亚型病毒没有扩增到目的片段(图 3)。为了进一步证实扩增片段为 H7 序列, 将 PCR 扩增产物克隆到 pMD 18-T 载体后送测序。测序结果表明扩增片段为 H7 序列。

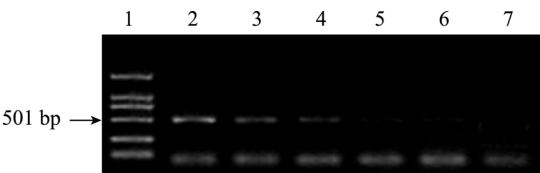


图 2 不同稀释度棉拭子病毒检测结果
Fig. 2 Sensitive analysis of different dilutions of swab samples. 1: DL2000 DNA marker; 2: different of swab samples 2-fold dilution; 3: 4-fold dilution; 4: 8-fold dilution; 5: 16-fold dilution; 6: 32-fold dilution; 7: negative control.

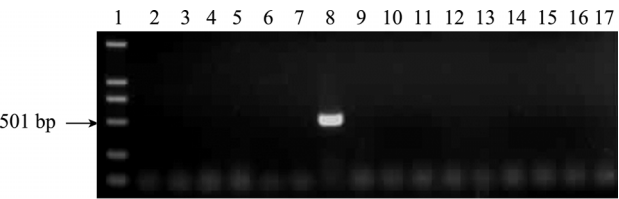


图 3 一步法 RT-PCR 检测 H1~H15 亚型 AIV 结果
Fig. 3 Detection of H1~H15 subtypes AIV with one step RT-PCR. 1: DL2000 DNA marker; 2: H1 subtype AIV; 3: H2 subtype AIV; 4: H3 subtype AIV; 5: H4 subtype AIV; 6: H5 subtype AIV; 7: H6 subtype AIV; 8: H7 subtype AIV; 9: H8 subtype AIV; 10: H9 subtype AIV; 11: H10 subtype AIV; 12: H11 subtype AIV; 13: H12 subtype AIV; 14: H13 subtype AIV; 15: H14 subtype AIV; 16: H15 subtype AIV; 17: negative control.

交叉试验: 对鸡新城疫等其他 14 种禽病进行检测, 没有扩增出目的片段, 表明试剂盒能特异性扩增 H7 亚型禽流感病毒, 有很好的特异性(图 4)。

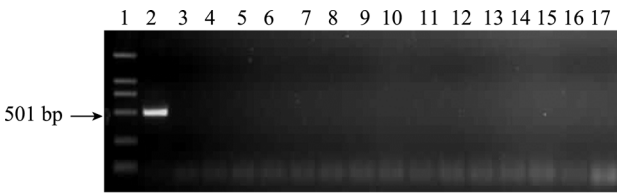


图 4 一步法 RT-PCR 对其他鸡病的检测结果
Fig. 4 Detection of other avian diseases with one step RT-PCR. 1: DL2000 DNA marker; 2: H5N1 subtype AIV; 3: negative control; 4: NDV; 5: IBV; 6: IBDV; 7: MDV; 8: ILTV; 9: REOV; 10: FPV; 11: FC; 12: MG; 13: CIAV; 14: SP; 15: ALV; 16: HP; 17: EDSV-76.

2.4 符合率试验结果

通过同时对病料进行病毒分离和 RT-PCR 检测发现, 从心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、法氏囊、咽喉和泄殖腔棉拭子样品中均可以用 RT-PCR 方法检出, 但是其灵敏度比病毒分离要低一些, 大约低 10~1000 倍左右(表 1)。

表 1 棉拭子样品和不同脏器样品浓度的病毒分离和一步法 RT-PCR 的检测结果

Table 1 Results of detection of swab and different tissue samples with virus isolation method and one step RT-PCR

Samples	Methods	Dilution titer								
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Heart	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Liver	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Spleen	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lung	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Kidney	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Tonsil	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bursa	Virus isolation	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	RT-PCR	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Tracheal	Virus isolation	+	+	+	-	-	N	N	N	N
	RT-PCR	+	+	-	-	-	N	N	N	N
Clacoca	Virus isolation	+	+	+	-	-	N	N	N	N
	RT-PCR	+	+	-	-	-	N	N	N	N

+: positive; -: negative; N: unwrought

3 讨论

从 1959 年起到现在共爆发了数十次的禽流感,总的趋势是爆发越来越频繁,越来越复杂,范围也越来越广,而其中 H7 亚型所占的比例也呈日趋上升之势。例如 1979 年在德国^[9]、澳大利亚^[10-11]和英国^[12]爆发的 H7N7(HPAI); 1992、1995 在澳大利亚^[13]爆发的 H7N3(HPAI), 1997 年澳大利亚^[14]的 H7N4(HPAI); 1994~1995 年巴基斯坦^[15]的 H7N3(HPAI); 从 1999~2004 年,先后有多个国家爆发 H7 亚型禽流感十多起,主要以高致病力的为主^[16-18]: 2003 年 4 月 16 日,比利时公共卫生食物链安全环境局报告,在比利时东部的林堡省 Meeuwen Gruitrode 地区在种用蛋鸡中发生了 1 起疑似 AI。可疑的有 10 500 只鸡, 550 只发病,其余的被销毁。经兽医与农业化学研究中心进行 RT-PCR 试验初步证实为 AI,分离毒株的核酸序列结果属 H7 亚型 AIV。之后在林堡省 Molenbeersel、Kinrooi 和 Bree 地区发生新的 AI 疫情。其中 2 起发生于蛋鸡群, 1 起发生于肉鸡群。这 3 起新爆发疫情涉及 64 700 只鸡,其中 4200 只发病, 2000 只死亡, 销毁 62 700 只。经兽医与农业化学研究中心用鸡胚分离病毒检验,证实病原为 H7N7 亚型 AIV。在我国,黄庚明和王传彬等^[19-20]分别在 2002 年和 2005 年分离到 H7N3 亚型和 H7N2 亚型的 AIV。因此,除 H5 亚型禽流感外, H7 亚型已对禽类造成重大威胁。

经典的流感病毒病原学诊断方法中病毒分离及其生物学特性的研究是最为可行和最能说明问题的,但病毒的分离鉴定需要将病料接种鸡胚或组织培养,需要较长的时间,不能够满足急性烈性传染病紧急疫情防制工作的需要,同时由于高致病性禽流感病毒存在感染哺乳动物的潜在危险,病毒的操作需要在生物安全三级实验室进行,一般检疫部门不具备这种试验条件。因此,生产实践中迫切需要一种准确、能快速检测病原的诊断技术。RT-PCR 方法就是一个很有开发、推广前景的快速诊断技术。本研究通过对多个 H7 亚型禽流感病毒的 HA 基因分析后从保守区设计引物,建立了一步法 RT-PCR 诊断方法。该方法对病毒尿囊液最低检出量为 10^{-2} 稀释; 对棉拭子液最低检出量为 8 倍稀释,敏感性较高;通过

对 H1~H15 亚型禽流感病毒以及鸡新城疫病毒等其他 14 种禽病病原进行检测,证明该方法能特异性扩增 H7 亚型禽流感病毒,但不能扩增其他病毒,特异性好。该方法检测病毒时间远远低于病毒分离,仅需 3~5 h 即能确诊。

本研究建立的一步法 RT-PCR 方法具有敏感性高、特异性好、简便易操作等特点,便于实际操作和现地应用,适用于禽流感病毒快速检测和亚型鉴定,为在最短时间内确诊禽流感病例,及时采取防治措施奠定基础。

REFERENCES

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbial Rev*, 1992, **56**: 152-179.
- [2] Earn DJ, Dushoff J, Levin SA. Ecology and evaluation of the flu. *Trends Ecol Evol*, 2002, **17** (7): 334-340.
- [3] Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, **79**(5): 2814-2822.
- [4] Webster RG, Shortridge KF, Kawaoka Y. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1997, **18**(4): 275-279.
- [5] Alexander DJ. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J Comp Pathol*, 1995, **112**(2): 105-126.
- [6] Truszczyński M, Pearson J, Edwards S, ed. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Paris: Office International des Epizooties, 2000.
- [7] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn MG, *et al.* Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*, 2004, **363**(9409): 587-593.
- [8] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al.* Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 1356-1361.
- [9] Röhm C, Süß J, Pohle V, *et al.* Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chickens in Leipzig, Germany. *Virology*, 1996, **218**: 253-257.
- [10] Cross GM. The Status of Avian Influenza in Poultry in Australia//Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza, 1987: 96-103.

- [11] Nestorowicz A, Kawaoka Y, Bean WJ, *et al.* Molecular analysis of the hemagglutinin genes of H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission. *Virology*, 1987, **160**: 411–418.
- [12] Wood GW, Mccauley JW, Bashiruddin JB, *et al.* Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol*, 1993, **130**: 209–217.
- [13] Perdue ML, Garcia M, Senne D. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res*, 1997, **49**: 173–186.
- [14] Perdue ML, Suarez DL, Swayne DE. Avian influenza in 1990s. *Avian Poultry Biol Rev*, 2000, **11**(1): 1–20.
- [15] Perdue ML, Latimer JW, Crawford JM. A novel carbohydrate addition site of the haemagglutinin protein of a highly pathogenic H7 subtype avian influenza virus. *Virology*, 1995, **213**: 276–281.
- [16] Capua I, Marangon S, dalla Pozza M, *et al.* Avian influenza in Italy 1997–2001. *Avian Dis*, 2003, **47**: 839–843.
- [17] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al.* Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 1356–1361.
- [18] Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol*, 2004, **33**(4): 393–404.
- [19] Huang GM, Xin CA. Analysis of homology of its sequence and cloning of nucleoprotein gene fragment of avian influenza virus strain H7N3. *Chin J Anim Vet Sci*, 2002, **33**(2): 165–168.
黄庚明, 辛朝安. 禽流感病毒 A/goose/China/24/96 (H7N3) 分离株 NP 基因片段的克隆及其序列同源性分析. 畜牧兽医学报, 2002, **33**(2): 165–168.
- [20] Wang CB, Tian KG, Wang HW, *et al.* Isolation and identification of H7N2 avian influenza virus strain CK/HB/1/02 in China. *Virol Sin*, 2005, **20**(6): 632–636.
王传彬, 田克恭, 王宏伟, 等. 我国 H7N2 亚型禽流感病毒 CK/HB/1/02 株分离鉴定. 中国病毒学, 2005, **20**(6): 632–636.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

人兽线虫学

唐仲璋 唐崇惕 著

978-7-03-025653-9 ¥198.00 2009年10月 出版

内容简介

本书系统介绍了寄生于人体、畜、禽及有关动物体内的线虫病原群类; 主要对线虫类病原的分类系统, 包括隶属于杆形线虫目、蛔虫目(蛔虫亚目、尖尾线虫亚目)、圆线虫目(圆线虫总科、后圆线虫总科、毛圆线虫总科)、旋尾线虫目(旋尾亚目、驼形亚目、丝虫亚目)、鞭虫目以及膨结线虫目的常见线虫二百六十余种做了详细介绍; 并介绍了各病原虫种的分类位置、形态特征、已知的生活史、宿主(中间宿主、辅加宿主和终末宿主)种类、流行病学特点、病害情况及防治方法等; 同时重点介绍了病原生物学和流行病学; 此外还介绍了与常见病原有关的其他种类的研究资料。全书附有插图三百六十余幅。

本书供综合性大学生物科学学院动物学专业教师、学生, 医学院校病原学与流行病学专业教师、学生, 农业院校动物医学专业教师、学生, 寄生虫病研究所、防疫站、兽医站的寄生虫学和寄生虫病学的科学工作者在教学、学习或工作中参考和使用。

