

一株鸭源 H5N1 亚型禽流感病毒 人工感染鸡的病理学研究

李玉谷 张媛 崔聪颖

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 鸡经肌肉或眼-鼻-口腔-泄殖腔接种禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1) 后, 发病率和死亡率均为 100%。死亡发生在接种后 6 d 内。全身多数器官出现充血、淤血、出血、血栓形成、组织水肿和炎症, 主要有血管炎、病毒性心肌炎、病毒性肝炎、气管炎、出血性卡他性肺炎、肾小管性肾炎、肾小球性肾炎、坏死性胰腺炎、坏死性胸腺炎、坏死性法氏囊炎、脾炎、非化脓性脑炎、溃疡性肠炎等。电镜下可见心、肝、肾、胰、脾、胸腺等器官的实质细胞发生坏死和凋亡两种变化。鸡接种该病毒后, 通常血清中的天门冬氨酸氨基转移酶(谷草转氨酶)、 γ -谷氨酰基转移酶、碱性磷酸酶先升高, 后下降; 而肌酸激酶则升高, α -淀粉酶则下降。结果表明, 许多器官的严重损伤是造成鸡死亡的原因, 而该病毒的致病机制可能与细胞坏死和细胞凋亡有关。

关键词: H5N1 亚型禽流感; 病理学; 血清酶; 鸡

中图分类号: S858.312.65 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0860-08

Pathology of Chickens Experimentally Infected with a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)

LI Yu-gu, ZHANG Yuan, CUI Cong-ying

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Chickens inoculated intramuscularly or via the ocular-nasal-oral-cloacal routes with a highly pathogenic avian influenza virus, A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1), developed systematic hyperemia, congestion, hemorrhage, thrombosis, edema and inflammation in various organs, had 100% morbidity and 100% mortality within 6 days post-inoculation. The main manifestations were angiitis, viral myocarditis, viral hepatitis, tracheitis, hemorrhagic catarrhal pneumonia, renal tubule nephritis, glomerular nephritis, necrotic pancreatitis, necrotic thymitis, necrotic bursitis Fabricii, splenitis, nonsuppurative encephalitis, ulcerative enteritis. The electron microscopic studies indicated that necrosis and apoptosis occurred in the heart, liver, kidney, pancreas, spleen, thymus, etc. Usually, the serum aspartate aminotransferase (glutamic-oxaloacetic transaminase), γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase increased at first, decreased later, but creatine kinase increased, α -amylase decreased. The results demonstrated that the mechanism of pathogenesis involved cellular necrosis and apoptosis and that death of the chickens was caused by severe pathological lesion occurring in multiple organs.

收稿日期: 2010-09-16

基金项目: 广东省科技攻关项目(2004A2090102); 广东省教育厅科学基金项目(Z02003)

作者简介: 李玉谷(1963—), 男, 江西萍乡人, 博士, 教授, 博士生导师。1984年本科毕业于江西农业大学兽医专业, 同年考取广西农学院研究生, 1987年8月至1993年8月在江西农业大学任教。现在华南农业大学从事动物组织胚胎学的教学和科研工作。主持国家自然科学基金项目等各级课题8项, 参加国家科技攻关项目等各级课题10余项, 发表研究论文50余篇, 获1997年度“江西省科技进步一等奖”1项。主编和参编普通高等教育“十一五”国家级规划教材《动物组织学与胚胎学》等教材9部, 参编专著3部。E-mail: liyugu@scau.edu.cn。

Key words: H5N1 subtype avian influenza; pathology; serum enzymes; chickens

禽流感是一种由 A 型流感病毒引起的禽类感染或疾病综合征,是目前最为严重的禽类病毒性疫病。该病呈世界性存在和流行,对养禽业危害严重,近年来更是愈演愈烈,并且严重危及人类健康^[1-3]。关于禽流感的病理学,以往在鸡、火鸡、鸭、鹅等禽类进行了较为广泛的研究,但其结果不尽一致^[4-9]。有的试验发现其病变以心、肝、胰、脑为主,有的以呼吸道、肺为主,有的以肾为主,有的以胸腺、法氏囊、脾等免疫器官为主;组织损伤程度,有的严重,有的轻微,有的缺乏明显病变。这可能与病毒亚型、毒株来源、毒力强弱、感染途径以及家禽种类等相关。由此可见,禽流感的发生机理与病理学十分复杂。为此,作者在研究禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)人工感染鸭的病理学^[10]的基础上,本试验进一步探讨其人工感染鸡的病理学和部分血清酶的变化,以便为深入研究该病毒的致病机制和禽流感的发生机理等提供更丰富的资料。

1 材料与方 法

1.1 试验动物分组和接种病毒

1 日龄未接种任何疫苗的粤黄鸡 110 只,饲养在隔离的安全环境中,禽舍严格消毒,限制人员流动,进出实验室消毒。鸡投喂标准饲料,自由采食和饮水,生长发育正常,眼观健康。至 4 周龄,随机扑杀 2 只鸡并采集有关组织按常规方法接种鸡胚做 HA 试验,同时随机抽取 6 只鸡的血清按常规方法做 HI 试验,结果均为阴性,表明鸡未感染禽流感病毒,也无母源性抗禽流感病毒抗体。然后将剩余 108 只鸡分为下列 3 组进行试验。其中,接种病毒试验在华南农业大学兽医学院“农业部养禽与禽病防治重点开放实验室”生物安全三级动物实验室(BSL3)进行,所用禽流感病毒由该实验室提供,并由该实验室分离、鉴定和保存。动物排泄物进行无害化处理,试验后的动物尸体消毒后深埋,未对环境造成污染。

肌肉接种组:51 只鸡,每只经胸肌注射 1:10 稀释的含禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)的鸡胚尿囊液 0.2 mL(HA 效价 1:64)。

眼-鼻-口腔-泄殖腔接种组:51 只鸡,每只眼-鼻-口腔-泄殖腔接种上述病毒液 1 mL(两眼各 0.1 mL,两鼻各 0.1 mL,口腔 0.3 mL,泄殖腔 0.3 mL)。

上述两组各分 3 笼饲养,让其自由采食和饮水,平时观察其临床症状、发病和死亡情况。

对照组:6 只鸡,不接种病毒,另室饲养,自由采食和饮水,平时观察其有无异常。

1.2 光镜和电镜样品的制备

肌肉接种和眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒的鸡,每天对死亡鸡进行剖检,观察大体病变后,取全身主要器官置于 10% 中性福尔马林中固定,常规石蜡切片,HE 染色,光镜观察其显微病变。

未接种病毒的对照鸡,于接种病毒的鸡全部死亡后扑杀,剖检观察其是否有大体病变后,取全身主要器官置于 10% 中性福尔马林中固定,常规石蜡切片,HE 染色,光镜观察其是否有显微病变。

另取肌肉接种和眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 3 d 的病鸡心、肝、肾、胰、脾、胸腺常规透射电镜制样,Fei-Tecna G2 分析型透射电镜观察其超微病变。同时取气管常规扫描电镜制样,Fei-XL30 型环境扫描电镜观察气管黏膜和纤毛的变化。

1.3 血样采集、测定与数据处理

分组接种病毒前随机抽取 6 只鸡的血液作为对照。之后,肌肉接种组于接种病毒后连续 4 d,眼-鼻-口腔-泄殖腔接种组于接种病毒后连续 5 d,每天定时从每组随机取 6 只鸡心脏采血 3~4 mL,于 37℃ 水浴 1 h,待其血清析出后离心,吸取血清,用 Glamour 1800 型全自动血液生化分析仪,测定下列 5 项血清酶指标:天门冬氨酸氨基转移酶(谷草转氨酶,AST/GOT)、 γ -谷氨酰基转移酶(γ -GT)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶(CK)、 α -淀粉酶(α -AMY)。各项试验操作严格按仪器操作规程和试剂盒使用说明进行,每份血样重复测定一次取其均值。上述各项测定数据经 SPSS 11.5 for windows 统计软件处理,计算出平均数和标准误,并比较接种病毒前、后的差异性。

2 结 果

2.1 临床症状和大体病变

对照鸡未见异常表现,亦无明显大体病变。经肌肉接种病毒的鸡,迅速发病,接种后 24 h 内发病率

就达 100% ,并出现死亡病例 ,接种后 3 d 死亡过半 ,接种后 6 d 全部死亡 ,死亡率为 100%(表 1) 。病鸡表现为采食量和饮水量迅速下降或废绝 ,脱水消瘦 ,体温升高 ,精神沉郁 ,呆立缩颈 ,羽毛蓬乱 ,双翅下垂 ,伏卧不起 ,拉黄绿色稀粪 ,呼吸困难 ,流泪 ,鸡冠、眼睑、肉垂水肿 ,鸡冠、肉垂、腿胫部、爪部皮下出血发紫(图 1) ,以及歪头、扭颈、劈叉、转圈、仰翻等神经症状。经眼 - 鼻 - 口腔 - 泄殖腔接种病毒的鸡 ,其症状与肌肉接种的相似 ,但饮水时不断从口角甩出黏液 ,鼻腔分泌物增多 ,鼻窦肿胀 ,眼结膜充血 ,流泪等症表现更为明显。接种后 24 h 内亦 100% 发病 ,但接种后 2 d 才出现死亡病例 ,接种后 4 d 死亡过半 ,接种后 6 d 亦全部死亡 ,死亡率亦为 100%(表 1) 。

剖检时可见皮下尤其是腿胫部、爪部皮下出血明显; 气管、喉头有大量黏液; 心包内积液 ,心脏冠状沟脂肪点状出血 ,心肌可见灰白色条纹状坏死灶; 脾脏稍为肿大 ,有的可见散在的针尖大小的灰白色坏死点; 胸腺和法氏囊严重萎缩 ,有的可见出血点; 胰腺斑点状出血和多位点白色坏死点(图 2) ; 腺胃黏膜和肌胃角质下斑点状出血; 气管、十二指肠、空肠充血和出血; 肺脏和肝脏淤血 ,有的肝脏可见坏死点或坏死灶; 肾脏出血 ,有的可见坏死点; 睾丸或卵巢肿大出血; 大脑、小脑充血、出血或有坏死灶; 骨骼肌散在性出血; 胸膜、腹膜和气囊上有干酪样物质沉着。

表 1 鸡的发病率和死亡率
Tab. 1 The morbidity and mortality of chickens

组别 Group	接种数 Number of inoculated chickens	发病数 Number of diseased chickens	发病率/% Morbidity	死亡数 Number of dead chickens						死亡率/% Mortality
				1DPI	2DPI	3DPI	4DPI	5DPI	6DPI	
对照组 Control	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肌肉接种组 Inoculation intramuscularly	51	51	100	1	17	15	7	8	3	100
眼 - 鼻 - 口腔 - 泄殖腔接种组 Inoculation via the ocular - nasal - oral - cloacal routes	51	51	100	0	6	12	12	10	11	100

2.2 显微和超微病变

对照鸡无明显的显微和超微病变。接种病毒的鸡可见明显病变。

2.2.1 心脏 表现为病毒性心肌炎(图 3) 。心内膜受损 ,内皮细胞肿胀。心肌纤维从局灶性到弥漫性的变性和坏死 ,其间浸润有大量的淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞; 肌纤维尚未坏死处 ,其间质水肿 ,血管充血 ,肌纤维间隙增宽 ,含有少量的淋巴细胞、巨噬细胞等。心外膜间质水肿 ,血管充血 ,亦浸润有淋巴细胞、巨噬细胞等。两种接种方式 ,其病理变化相似。透射电镜观察 ,心肌细胞可见肌原纤维断裂溶解; 内质网肿胀 ,空泡化; 线粒体肿胀 ,嵴变短或消失 ,或呈空泡化; 细胞核固缩。

2.2.2 肝脏 表现为病毒性肝炎。肝细胞颗粒变性 ,胞体肿大; 部分肝细胞呈水泡变性 ,核固缩 ,染色加深。含有零星散在的小坏死灶(图 4) 。血管充血、淤血 ,小叶间血管、胆管、中央静脉周围浸润有淋巴细胞形成“管套”现象。两种接种方式 ,其病理变化相似。透射电镜观察 ,肝细胞可见坏死和凋亡两种变化。坏死的细胞 ,细胞膜破裂 ,核碎裂 ,线粒体、内质网等细胞器肿胀或空泡化 ,胞质内可见许多细胞碎片。凋亡的细胞 ,结构基本完整 ,核不破碎 ,核内染色质边集于核膜下 ,呈新月形或圆环状。

2.2.3 气管 炎症明显。管腔内可见脱落的上皮细胞和分泌物。血管充血、淤血、出血。黏膜上皮局部或大面积坏死脱落 ,上皮尚未脱落处其纤毛多有脱落现象。外膜水肿 ,浸润有淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞。两种接种方式 ,其病理变化相似。扫描电镜观察 ,可见气管出血 ,黏膜表面附有大量的红细胞、黏液等 ,有的黏膜表面出现裂缝 ,上皮细胞的纤毛大面积脱落(图 5) 。

2.2.4 肺脏 表现为出血性卡他性肺炎(图 6) 。血管充血、淤血、出血 ,有的形成血栓。血管上皮细胞肿胀 ,部分血管受损 ,血管周隙明显增宽 ,充满水肿液。初级支气管、次级支气管、三级支气管、肺房、呼吸毛细管腔内充满血液并有脱落的上皮细胞、炎性细胞和分泌物。两种接种方式 ,其病理变化相似。

2.2.5 肾脏 主要表现为肾小管性肾炎 ,部分病例可见肾小球萎缩和系膜增生性肾小球肾炎(图 7) 。血管充血、淤血、出血。肾小管上皮细胞变性、坏死。间质内有较多的淋巴细胞和巨噬细胞浸润。个别病例可见肾小球萎缩 ,染色加深 ,一侧留下较大的囊腔。部分肾小球系膜细胞增生 ,致使肾小球增大 ,肾

小囊甚窄或缺乏。两种接种方式,其病理变化相似。透射电镜观察,肾小管上皮细胞可见坏死和凋亡两种变化。坏死的细胞,腔面的微绒毛变短或脱落,细胞膜破裂;胞质内线粒体、内质网肿胀,出现许多空泡;肾小管腔内和上皮细胞内有尿酸盐晶体沉积。

2.2.6 胰腺 表现为坏死性胰腺炎(图8),是最典型的病变之一。血管充血、淤血、出血。胰腺泡上皮细胞肿胀变性、坏死。坏死灶内细胞崩解,结构破坏,并可见淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润。一些细胞呈核固缩,染色加深,表现为凋亡状。两种接种方式,其病理变化相似。透射电镜观察,胰腺泡上皮细胞也可见坏死和凋亡两种变化(图9)。

2.2.7 胸腺 表现为坏死性胸腺炎(图10)。血管充血、淤血、出血。皮质淋巴细胞大量减少,一些淋巴细胞坏死崩解。组织细胞(histiocyte)大量增生。髓质淋巴细胞也减少,胸腺小体增多,有的胸腺小体周围聚集大量的嗜嗜性细胞,有的胸腺小体出现坏死。两种接种方式,其病理变化相似。透射电镜观察,胸腺细胞也可见坏死和凋亡两种变化(图11)。

2.2.8 脾脏 表现为脾炎。血管充血、淤血、出血,血管上皮细胞肿胀变性。红髓白髓分界不清,淋巴细胞减少,尤其白髓中的淋巴细胞减少明显,导致中央动脉周围淋巴细胞稀少。鞘动脉周围的淋巴细胞也减少。一些淋巴细胞坏死崩解。组织细胞、巨噬细胞增生,吞噬红细胞、细胞碎片或含铁血黄素,形成噬血征(图12)。两种接种方式,其病理变化相似。透射电镜观察,脾淋巴细胞也可见坏死和凋亡两种变化。

2.2.9 法氏囊 表现为坏死性法氏囊炎(图13)。黏膜上皮中出现少量坏死灶。囊小结减少,皮质淋巴细胞大量减少,髓质淋巴细胞也明显减少,一些淋巴细胞变性坏死或呈凋亡状变化。网状上皮细胞和巨噬细胞轻度增生。两种接种方式,其病理变化相似。

2.2.10 脑 大脑、小脑均表现为非化脓性脑炎。血管充血、淤血,周围有淋巴细胞浸润形成“管套”现象。部分神经元变性、坏死,核固缩。小脑蒲肯野氏细胞变性明显,核固缩,胞质内尼氏体溶解。小胶质细胞增生,吞噬坏死的神经元形成噬神经元现象,或聚集形成胶质细胞结节(图14)。部分鸡可见液化性坏死灶,脑水肿,血管周隙和神经元周隙增宽,血管上皮细胞肿胀变性。两种接种方式,其病理变化相似。

2.2.11 肠 小肠和大肠均表现为溃疡性肠炎(图15)。十二指肠、空肠较为严重,可见黏膜上皮和肠绒毛上皮坏死脱落充满于肠腔内,并有较多的炎性细胞。黏膜下层水肿,有炎性细胞浸润。肌层水肿,间隙明显增宽。各层血管充血、淤血、出血。

2.2.12 其他器官 卵巢和睾丸以充血、淤血、出血、水肿为主,部分卵泡变性、坏死;部分曲精小管上皮与基膜分离,生精细胞零乱。骨骼肌可见充血、水肿,肌纤维轻度变性,染色变淡,肌纤维间隙增宽,内含水肿液以及少量的淋巴细胞等。食管、肌胃和腺胃充血、淤血、出血、水肿,有的可见炎症。

2.3 血清酶的测定结果

鸡接种上述禽流感病毒后不同时间5项血清酶的变化情况见表2、表3。

表2 鸡肌肉接种禽流感病毒后5项血清酶的测定

Tab.2 5 serum enzymes of chickens inoculated intramuscularly with the avian influenza virus(U/L)

	AST	γ -GT	ALP	CK	α -AMY
BI	153.64 ± 23.63	16.07 ± 3.51	1 351.60 ± 225.52	1 120.85 ± 163.24	447.43 ± 104.78
1DPI	188.26 ± 27.06	19.15 ± 3.29	1 556.73 ± 296.62	1 487.22 ± 125.76	86.12 ± 12.82*
2DPI	144.38 ± 37.61	17.20 ± 2.55	1 032.00 ± 380.23	1 420.60 ± 422.42	777.50 ± 178.83*
3DPI	217.35 ± 36.59	16.47 ± 4.46	301.41 ± 70.69*	2 079.88 ± 949.15	514.26 ± 185.94
4DPI	131.61 ± 31.12	13.55 ± 3.47	345.15 ± 77.33*	1 815.42 ± 381.45	329.91 ± 129.79

* 表示与接种病毒前比较,差异显著(0.01 < P < 0.05);未标者表示与接种病毒前比较,差异不显著(P > 0.05)。

BI: 接种病毒前; DPI: 接种病毒后天数。

* indicates significant difference(0.01 < P < 0.05) compared with before inoculation; No marking indicates no significant difference(P > 0.05) compared with before inoculation. BI: before inoculation; DPI: days post - inoculation.

表 3 鸡眼-鼻-口腔-泄殖腔接种禽流感病毒后 5 项血清酶的测定

Tab. 3 5 serum enzymes of chickens inoculated via the ocular - nasal - oral - cloacal routes with the avian influenza virus(U/L)

	AST	γ -GT	ALP	CK	α -AMY
BI	153.64 ± 23.63	16.07 ± 3.51	1 351.60 ± 225.52	1 120.85 ± 163.24	447.43 ± 104.78
1DPI	247.55 ± 17.59	19.78 ± 1.45	1 812.20 ± 638.97	2 439.60 ± 305.75	299.20 ± 28.89
2DPI	145.85 ± 20.42	16.51 ± 4.30	1 025.22 ± 246.95	1 314.80 ± 256.35	120.57 ± 30.81
3DPI	173.37 ± 47.34	19.32 ± 1.88	1 084.80 ± 278.85	1 790.50 ± 545.75	70.53 ± 10.49*
4DPI	99.69 ± 28.86	19.76 ± 3.44	1 637.23 ± 870.84	956.70 ± 220.53	328.67 ± 63.33
5DPI	119.70 ± 29.37	18.59 ± 4.77	751.05 ± 152.50	848.28 ± 195.08	280.15 ± 124.59

**表示与接种病毒前比较,差异极显著($P < 0.01$);*表示与接种病毒前比较,差异显著($0.01 < P < 0.05$);未标者表示与接种病毒前比较,差异不显著($P > 0.05$)。BI:接种病毒前;DPI:接种病毒后天数。

** indicates extremity significant difference ($P < 0.01$) compared with before inoculation; * indicates significant difference ($0.01 < P < 0.05$) compared with before inoculation; No marking indicates no significant difference ($P > 0.05$) compared with before inoculation. BI: before inoculation; DPI: days post - inoculation. The same is as follows.

从表 2、表 3 可以看出,鸡肌肉接种上述禽流感病毒后,血清中的 AST、 γ -GT 先升高,之后下降,但变化幅度不是很大,与接种前相比差异不显著($P > 0.05$)。ALP 也是先升高,之后下降,其中肌肉接种后 3、4 d 下降明显,与接种前相比差异显著($0.01 < P < 0.05$)。但眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 4 d 仍高于接种前。CK 除眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 4、5 d 低于接种前外,其余时间均高于接种前,但差异不显著($P > 0.05$)。 α -AMY 除肌肉接种后 2 d 显著高于接种前($0.01 < P < 0.05$)外,其他时间均低于接种前,其中肌肉接种后 1 d 和眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d 显著低于接种前($0.01 < P < 0.05$)。

3 讨 论

3.1 关于禽流感病毒的致病性

本研究结果表明,禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)对鸡具有高度致病性,发病急,死亡快,发病率和死亡率高,均为 100%。肌肉接种时,死亡发生在接种后 1~6 d,高峰期为接种后 2~3 d;眼-鼻-口腔-泄殖腔接种时,死亡发生在接种后 2~6 d,高峰期为接种后 3~5 d。作者此前研究表明,鸭静脉接种该病毒时,其发病率为 100%,死亡率为 94.4%,死亡发生在接种后 1~5 d,高峰期为接种后 2~3 d;眼-鼻-口腔-泄殖腔接种时,发病率为 77.8%,死亡率为 50.0%,死亡发生在接种后 2~6 d,高峰期为接种后 5 d^[10]。由此可见,与鸭相比,该病毒对鸡的致病性更为强大。这可能是由于鸭的免疫系统相对较完善(如鸭有淋巴结等)所致,或是与流感病毒的宿主特异性相关。关于相同禽流感病毒株对不同动物的致病性不同,以往有许多报道。例如,禽流感病毒 A/chicken/Hong Kong/220/1997(H5N1)经鼻内接种时,可以导致鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡、环颈雉、斑雀 100% 死亡率,山鹑 75% 死亡率,相思鹦鹉 60% 死亡率,舍雀 36.4% 死亡率,但不能引起鹧鸪、家鹅、家鸭、鸽子、麻雀和八哥死亡^[11-14]。

该病毒对鸡的感染是全身性的,嗜细胞性的。接种该病毒后,可以引起鸡全身绝大多数器官,尤其是一些重要器官(如心、肝、脾、肺、肾、胰、脑、胸腺、法氏囊等)严重的充血、淤血、出血、血栓形成、组织水肿,以及实质细胞变性、坏死或凋亡。作者认为,该病毒的致病机制与细胞坏死和细胞凋亡有关,而许多器官严重的病理损伤是鸡死亡的原因。此前作者研究表明,鸭经静脉或眼-鼻-口腔-泄殖腔接种该病毒后,心、肝、脾、肺、肾、胰、肠、脑、胸腺和法氏囊均可发生细胞坏死和细胞凋亡^[15];而病毒核蛋白抗原存在于的心肌细胞、肝细胞、枯否氏细胞、胰腺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞、血管内皮细胞和血液吞噬性白细胞等^[16]。这说明禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)不仅引起细胞变性和坏死,而且还可诱导细胞凋亡,从而对鸡的多种器官造成严重损害,导致鸡发病和死亡。据报道,禽流感病毒 A/chicken/Victoria/1/1985(H7N7)可以诱导肝、肾、脑的血管上皮细胞凋亡和坏死^[17]。

3.2 关于病理学变化

本研究结果表明,鸡接种禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)后,眼观病变主要是,鸡

冠、肉垂、腿胫部、爪部皮下出血,出现紫黑色出血斑;心脏冠状沟脂肪点状出血,心肌灰白色条纹状坏死灶;胸腺和法氏囊严重萎缩;胰腺斑点状出血和多位点白色坏死点;腺胃黏膜和肌胃角质下斑点状出血等。组织学病变主要表现为,全身多数器官充血、淤血、出血、水肿、血栓形成,以及血管炎、病毒性心肌炎、病毒性肝炎、气管炎、出血性卡他性肺炎、肾小管性肾炎、系膜细胞增生性肾小球肾炎、坏死性胰腺炎、坏死性胸腺炎、坏死性法氏囊炎、脾炎、非化脓性脑炎、溃疡性肠炎等。这与作者对鸭接种该病毒的研究结果相似^[10],也与以往报道的高致病性禽流感相似^[11-14,18-23],但心脏冠状沟脂肪点状出血、心肌灰白色条纹状坏死灶、系膜细胞增生性肾小球肾炎等病变以往鲜有报道,而且该病毒引起的组织损伤更为广泛和严重。据报道,高致病力禽流感病毒 A/chicken/Hong Kong/220/1997(H5N1)可以引起鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡、环颈雉、山鹑、鹧鸪和家鹅的肺充血、出血和水肿,骨骼肌出血,消化道黏膜和浆膜出血,胰腺多位点坏死斑点、胸腺和法氏囊萎缩等^[11-14]。H7N3 亚型高致病力禽流感病毒接种鸡,主要侵害血管内皮,表现为肺和淋巴组织严重出血、坏死和炎症^[18]。高致病力禽流感病毒 A/chicken/Victoria/1/1985(H7N7)、A/turkey/England/50-92/1991(H5N1)、A/tern/South Africa/1961(H5N3)接种鸡时,可以导致全身性充血、出血、血栓形成,血管内皮炎、血管壁内或血管周围单核细胞浸润,心脏局灶性单核细胞浸润、心肌纤维变性和坏死,局灶性支气管肺炎,肝脏局部坏死、枯否氏细胞吞噬含铁血黄素,肾脏局部肾小管上皮细胞变性和坏死,胰腺泡上皮细胞变性和坏死,局部小胶质细胞炎和坏死,非化脓性脑炎,脑脊膜炎等^[19]。此外,一些 H5N2、H5N9 亚型高致病力禽流感病毒,如 A/chicken/Puebla/8623-607/1994(H5N2)、A/chicken/Pennsylvania/1370/1983(H5N2)、A/chicken/Queretaro/14588-19/1995(H5N2)、A/turkey/Ontario/7732/1966(H5N9),也可引起鸡相似的病变^[20-21]。

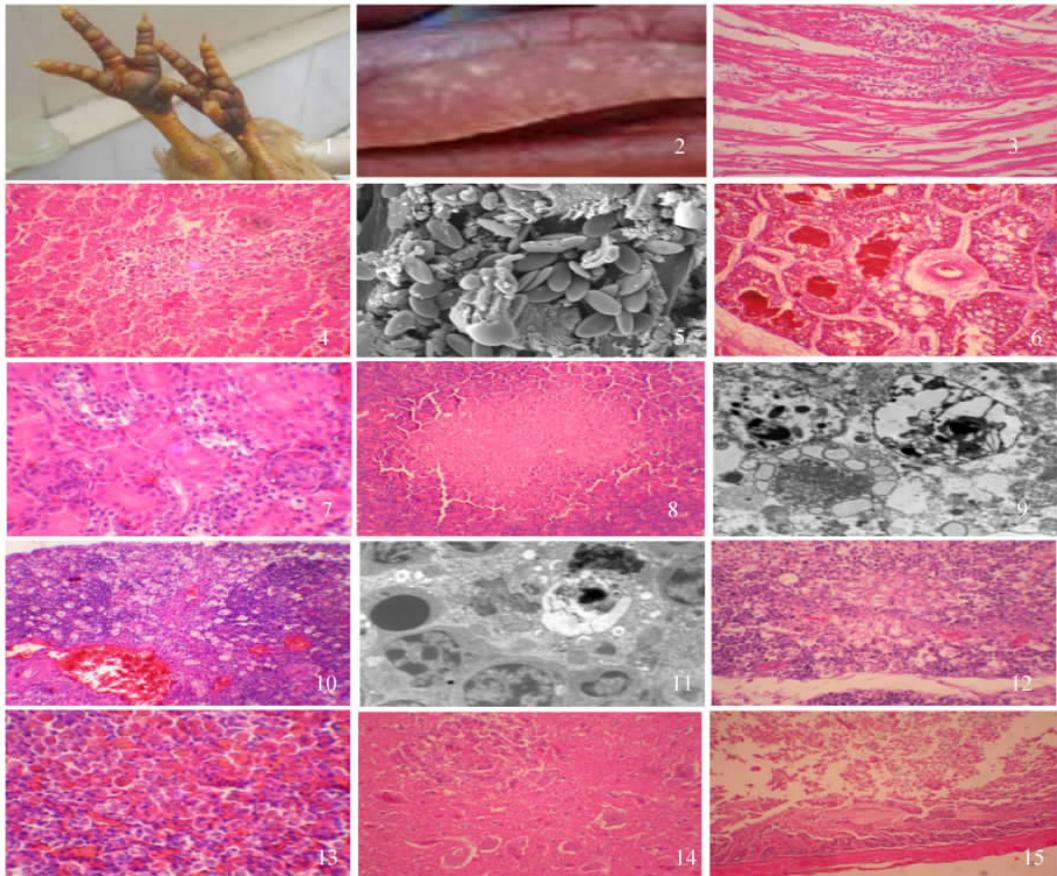
本试验结果表明,禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)引起的免疫器官胸腺、法氏囊和脾的病变十分明显并具有自身的特点。在胸腺,除了快速严重萎缩、淋巴细胞明显减少、剩余淋巴细胞发生坏死和凋亡外,还发现有组织细胞(histocyte)和胸腺小体大量增生,有的胸腺小体周围聚集大量的嗜嗜性细胞,这些病理变化以往未见报道,其发生机理有待深入研究。在法氏囊,也可见明显萎缩、淋巴细胞大量减少以及剩余淋巴细胞发生坏死和凋亡。在脾,也可见淋巴细胞尤其是骨髓中的淋巴细胞大量减少,组织细胞大量增生并吞噬红细胞或含铁血黄素。脾的噬血征是该病毒感染最显著的病理学特征之一,也可能是该病毒的致病机制之一。噬血征可以引起外周血细胞减少症、血细胞异常凝结、肝功能受损和许多器官的功能衰竭,从而导致死亡^[22-23]。这与作者对鸭接种该病毒的研究结果相似^[10],表明该病毒可以对鸡的免疫系统造成严重损伤,这可能是导致鸡高发病率和高死亡率的主要原因之一。据报道,高致病力禽流感病毒 A/chicken/Hongkong/220/1997(H5N1)接种鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡、环颈雉和山鹑,也可见脾淋巴细胞减少、组织细胞增生和吞噬红细胞,胸腺、法氏囊和黏膜相关淋巴组织的淋巴细胞减少以及细胞凋亡或坏死等^[11]。高致病力禽流感病毒 A/chicken/Victoria/1/1985(H7N7)、A/turkey/England/50-92/1991(H5N1)、A/tern/South Africa/1961(H5N3)等,也可引起鸡相似的病变^[19-20]。

3.3 关于血清酶的变化

通过检测血液、尿液等体液中某些生化指标,尤其是检测血清酶,用于人类疾病的临床诊断、治疗监测、药物疗效和预后判断等,已得到广泛应用。然而,在畜禽疾病方面研究不多,应用不广,尤其在禽流感方面几乎是空白。本试验通过对鸡接种禽流感病毒后 5 项血清酶的测定,获得了一些有价值的资料,这与作者对鸭接种该病毒的研究结果基本一致^[24]。作者认为,通过检测血清酶,对于探讨禽流感的发生机理、临床诊断和预后判断等,具有一定参考意义。

AST 主要存在于心脏,其次为肝、骨骼肌和肾等,血清 AST 活性升高,多来自心肌或肝的损伤;肾或胰损伤时,AST 活性也升高。 γ -GT 主要存在于肾,其次为胰、肺和肝等,血清 γ -GT 主要来自肝和胆囊,肝胆疾病时 γ -GT 活性升高。ALP 以肝含量最多,其次为肾、小肠和骨骼等,血清 ALP 主要来自肝和骨骼,肝炎时血清 ALP 升高,若 ALP 不断下降,则表示病情恶化^[25]。本试验结果表明,鸡接种上述禽流感病毒后,血清 AST、 γ -GT 先升高,之后下降。ALP 也是先升高,之后下降,而且下降明显。说明该病毒对鸡的心、肝、肺、肾、胰、骨骼肌等造成了损伤。这与组织病理学相符。接种上述禽流感病毒后,心、肝、肺、肾、胰等均存在明显的病变,骨骼肌也有轻微的病变。CK 在骨骼肌含量最高,其次是心肌和

脑组织,肌肉感染性疾病血清 CK 活性升高^[25]。本试验结果表明,鸡接种上述禽流感病毒后,血清 CK 升高,这可能主要是心和肝损伤所致,因为二者均存在明显的病变,而骨骼肌病变轻微,可能对血清 CK 影响不大。 α -AMY 以胰腺和唾液腺含量最多,临床上通常作为评价胰腺外分泌功能的一种辅助诊断指标。胰腺和腮腺损伤时,血清和尿中的 α -AMY 可显著增高;如果原来 α -AMY 已升高却发生与症状不相应的降低时,常为凶险的坏死性胰腺炎的预兆^[25]。本试验结果表明,鸡接种上述禽流感病毒后,



图版说明 图 1 肌肉接种后 3 d,示鸡胫部、爪部皮下出血。图 2 肌肉接种后 3 d,示胰腺坏死灶。图 3 肌肉接种后 2 d,心肌炎,HE 染色,×400。图 4 肌肉接种后 3 d,肝炎,示坏死灶,HE 染色,×200。图 5 肌肉接种后 3d,气管炎,上皮和纤毛脱落,黏膜表面附有血细胞和黏液等,扫描电镜,×1600。图 6 肌肉接种后 4 d,肺充血、淤血、出血和水肿,HE 染色,×200。图 7 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 4 d,肾炎,示肾小体系膜细胞增生,部分肾小管上皮细胞变性坏死,HE 染色,×400。图 8 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 2 d,坏死性胰腺炎,HE 染色,×200。图 9 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d,坏死的胰腺泡细胞,透射电镜,×9300。图 10 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d,坏死性胸腺炎,HE 染色,×200。图 11 肌肉接种后 3 d,坏死和凋亡的胸腺细胞,透射电镜,×9300。图 12 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d,坏死性法氏囊炎,HE 染色,×400。图 13 肌肉接种后 3 d,脾炎,示噬血征,×400。图 14 肌肉接种后 2 d,非化脓性脑炎,示胶质细胞结节,HE 染色,×400。图 15 肌肉接种后 3 天,小肠炎,HE 染色,×200

Fig1 showing subcutaneous hemorrhages in shins and claws of chicken at 3 days post-inoculation intramuscularly(DPI-IM) . Fig2 showing necrotic pancreatic areas at 3 DPIIM. Fig3 myocarditis at 2 DPIIM hematoxylin - eosin staining(HE) ,×400. Fig4 hepatitis ,showing a necrotic area at 3 DPIIM. HE ,×200. Fig5 tracheitis ,showing the epithelium and cilia detachment ,numerous mucus and red cells attaching to mucous membrane at 3DPIIM SEM ,×1600. Fig6 pulmonary hyperemia ,congestion hemorrhages and edema at 4 DPIIM. HE ,×200; Fig7 nephritis ,showing intraglomerular mesangial cell proliferation ,renal tubular epithelium degeneration and necrosis at 4 days post-inoculation via ocular - nasal - oral - cloacal routes (DPIONOC) ,HE ,×400; Fig8 necrotic pancreatitis ,at 2 DPIONOC ,HE ,×200. Fig9 necrotic pancreatic acinar cells at 3 DPIONOC ,TEM ,×9300. Fig10 necrotic thymusitis at 3 DPIONOC ,HE ,×200; Fig11 necrotic and apoptic thymocytes at 3 DPIIM ,TEM ,×9300. Fig12 necrotic bursitis at 3 DPIONOC ,HE ,×400. Fig13 splenitis ,showing a haemophagocytic syndrome at 3 DPIIM ,HE ,×400. Fig14 nonsuppurative encephalitis ,showing a gliocyte nodule at 2 DPIIM ,HE ,×400. Fig. 15 enteritis ,at 2 DPIIM ,HE ,×200.

血清 α -AMY 主要表现为下降,表明胰腺病变严重,这与组织病理学相符。据报道,人感染 H5N1 亚型禽流感病毒、H3N2 亚型流感病毒、A 型或 B 型流感病毒后,大多数发生肌炎、心肌炎或脑炎,血清 AST、CK 明显升高^[26-29]。小鼠感染 B 型流感病毒后,通常诱发心肌炎,导致血清 AST、CK 明显升高^[30]。小鼠经静脉接种流感病毒 A/PR8 株,血清 AST 升高可达 24 倍^[31]。流感病毒感染 MDCK 细胞后,可使细胞中的 AST 释放,导致培养液中 AST 升高^[32]。

致谢:本研究得到辛朝安教授、毕英佐教授和罗开健副教授的大力支持和热情帮助,特致谢忱。

参考文献:

- [1] Swayne D E, Pantn - Jackwood M. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry [J]. *Dev Biol(Basel)* 2006, 124: 61 - 67.
- [2] Guan Y, Poonm L L, Cheung C Y, et al. H5N1 influenza: a problem pandemic threat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101 (21): 8156 - 8161.
- [3] WHO. Avian influenza [J]. *Wkly Epidemiol Rec* 2005, 88(27): 233 - 240.
- [4] Laudert E, Halvorson D, Sivanandan V, et al. Comparative evaluation of tissue tropism characteristics in turkeys and mallard ducks after intravenous inoculation of type A influenza viruses [J]. *Avian Dis*, 1993, 37(3): 773 - 780.
- [5] Slemons R D, Swayne D E. Tissue tropism and replicative properties of waterfowl - origin influenza viruses in chickens [J]. *Avian Dis*, 1995, 39(3): 521 - 527.
- [6] Swayne D E, Slemons R D. Renal pathology in specific - pathogen - free chickens inoculated with a waterfowl - origin type A influenza virus [J]. *Avian Dis*, 1990, 34(2): 285 - 294.
- [7] Swayne D E, Slemons R D. Comparative pathology of a chicken - origin and two duck - origin influenza virus isolates in chickens: the effect of route of inoculation [J]. *Vet Pathol*, 1994, 31(2): 237 - 245.
- [8] Swayne D E, Slemons R D. Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck - and turkey - origin type A influenza viruses in chickens [J]. *Avian Dis*, 1995, 39(1): 74 - 84.
- [9] Sturm - Ramirez K M, Ellis T, Bousfield B, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks [J]. *J Virol* 2004, 78(9): 4892 - 4901.
- [10] 李玉谷, 周泉鹤, 崔聪颖, 等. 一株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的组织病理学观察 [J]. *畜牧兽医学报* 2008, 39(10): 1373 - 1381.
- [11] Perkins L E, Swayne D E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/1997(H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species [J]. *Vet Pathol* 2001, 38(2): 149 - 164.
- [12] Perkins L E, Swayne D E. Pathogenicity of a Hong Kong - origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks and pigeons [J]. *Avian Dis* 2002, 46(1): 53 - 63.
- [13] Perkins L E, Swayne D E. Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *Avian Dis* 2002, 46(4): 877 - 885.
- [14] Perkins L E, Swayne D E. Varied pathogenicity of a Hong Kong - origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars [J]. *Vet Pathol* 2003, 40(1): 14 - 24.
- [15] 李玉谷, 叶远兰, 崔聪颖, 等. 一株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的细胞凋亡观察 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(7): 1069 - 1073.
- [16] 李玉谷, 叶远兰, 周泉鹤, 等. 一株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的抗原定位观察 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(8): 1202 - 1208.
- [17] Ito T, Kobayashi Y, Morita T, et al. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens [J]. *Virus Res* 2002, 84(1 - 2): 27 - 35.
- [18] Jones Y L, Swayne D E. Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens [J]. *Avian Dis* 2004, 48(1): 119 - 128.
- [19] Kobayashi Y, Horimoto T, Kawaoka Y, et al. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *Avian pathol*, 1996, 25(2): 285 - 304.
- [20] Swayne DE. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens [J]. *Vet Pathol*, 1997, 34(6): 557 - 567.
- [21] Mo I P, Brugh M, Fletcher O J, et al. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity [J]. *Avian Dis*, 1997, 41(1): 125 - 136.

- [54] Abendstein D , Pernfuss B , Strasser H. Evaluation of and its metabolite oosporein regarding phytotoxicity on seed potatoes [J]. *Biocon Sci Technol* ,2000 ,10: 789 – 796.
- [55] Soman A G , Glor J B , Angawi R F , et al. Verticillanins: New phenopicolinic acid analogs from *Verticillium lecanii* [J]. *J Nat Prod* ,2001 , 64 ,189 – 192.
- [56] Wang L , Huang J , You M , et al. Toxicity and deterrent activity of toxin from *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) against sweetpotato whitefly , *Bemisia tabaci*(Gennadius) [J]. *Pest Management Science* 2007 63(4) : 381 – 387.
- [57] Liu W Z , Boucias D G , McCoy C W. Extration and characterization of the insecticidal toxin *Hirsutellin A* produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* [J]. *Experimental Mycology* ,1995 ,19: 254 – 262.
- [58] Krasnoff S B , Gupta S. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos* [J]. *J Chem Ecol* ,1994 20(2) : 293 – 302.
- [59] Boucia D G , Farmieria W G , Pendlan D J C. Cloning and sequencing of the insecticidal toxin *Hirsutellin A* [J]. *J Invertebr Pathol* ,1998 72: 258 – 261.
- [60] Vey A , Quot J M , Mazet I , et al. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture [J]. *J Invertebr Pathol* ,1993 61: 131 – 137.
- [61] Maimala S , Tartar A , Boucias D , et al. Detection of the toxin *Hirsutellin A* from *Hirsutella thompsonii* [J]. *J Invertebr Pathol* , 2002 80(2) : 112 – 126.
- [62] Bandani A R , Butt T M. Insecticidal ,antifeedant ,growth inhibitory activities of efrapeptins ,metabolites of the entomogenous fungus *Tolypocladium* [J]. *Biocon Sci Technol* ,1999 9: 499 – 506.

(上接第 867 页)

- [22] Henter J H , Elinder G , Ost A. Diagnostic guidelines for haemophagocytic lymphohistiocytosis. The FHL study Group of the Histiocyte Society [J]. *Semin Oncol* ,1991 ,18(1) : 29 – 33.
- [23] Favara B E. Haemophagocytic lymphohistiocytosis: a haemophagocytic syndrome [J]. *Semin Diagn Pathol* ,1992 9(1) : 63 – 74.
- [24] 李玉谷 , 崔聪颖 , 周泉鹤 , 等. 一株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的 18 项血液生化指标测定 [J]. *中国畜牧兽医* 2009 36(4) : 36 – 42.
- [25] 周新 , 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社 2004: 48 – 348.
- [26] Togashi T , Matsuzono Y , Narta M. Epidemiology of influenza – associated encephalitis – encephalopathy in Hokkaido , the northernmost island of Japan [J]. *Pediatr Int* 2000 42(2) : 192 – 196.
- [27] Agyeman P , Duppenhaler A , Heininger U , et al. Influenza – associated myositis in children [J]. *Infection* 2004 32(4) : 199 – 203.
- [28] Hu J J , Kao C L , Lee P I , et al. Clinical features of influenza A and B in children and association with myositis [J]. *J Microbiol Immunol Infect* 2004 37(2) : 95 – 98.
- [29] Yoshino M , Suzuki S , Adachi K , et al. High incidence of acute myositis with type A influenza virus infection in the elderly [J]. *Intern Med* 2000 39(5) : 431 – 432.
- [30] Davis L E , Kornfeld M. Experimental influenza B viral myositis [J]. *J Neurol Sci* 2001 ,187(1 – 2) : 61 – 67.
- [31] Sanchez – Lanier M , Davis LE , Blisard KS , et al. Influenza A virus in the mouse: hepatic and cerebral lesions in a Reye ' s syndrome – like illness [J]. *Int J Exp Pathol* ,1991 72(5) : 489 – 500.
- [32] Hornickova Z. Different progress of MDCK cell death after infection by two different influenza virus isolates [J]. *Cell Biochem Funct* ,1997 ,15(2) : 87 – 93.