

文章编号: 1001-411X(2001)03-0070-03

# H9N2 亚型禽流感病毒的致病特性研究

郭霄峰, 廖 明, 辛朝安

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

**摘要:** 将 SS、KMI、KMIII 3 个禽流感病毒的感染性胚液分别接种 2 周龄及 5 周龄的 SPF 鸡, 观察其临床症状及病理变化。结果显示: 1. 3 个毒株均可引起攻毒鸡体温升高, 部分出现水样淡黄色稀粪, 但不能致死攻毒鸡。表明 3 个毒株均为非高致病力毒株。2. 攻毒鸡除胰腺充血出血外, 其他器官不见明显的肉眼病理变化, 但组织病理学的变化较为明显和一致, 主要为: 脑及脊髓充血出血, 神经元变性坏死, 胶质细胞增生; 心肌充血出血, 组织变性坏死; 胰腺充血出血, 组织坏死。3 个毒株对 5 周龄 SPF 鸡的病理变化无明显差异, 但 KMI 毒株对 2 周龄 SPF 鸡的病理损害稍大于 SS 株。

**关键词:** 禽流感病毒; H9N2 亚型; 致病力

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种禽传染病, 于 1878 年首次在意大利暴发流行, 当时称之为“鸡瘟”。禽流感引起的损失主要表现为: 高致病力毒株致鸡只的大量死亡, 非高致病力毒株引起产蛋量下降, 免疫功能障碍而继发细菌或病毒的感染。自 1994 年首次报道禽流感在中国流行以来<sup>[1]</sup>, 中国的禽流感受到了世人的关注。从生产实际和已有的报道分析, 禽流感病毒 H9N2 亚型已成为中国当前的主型<sup>[2]</sup>。H9N2 亚型引起的禽流感的报道最早见于 1966 年, 感染火鸡主要表现为轻度的上呼吸道症状。但自 90 年代开始, H9N2 禽流感病毒对鸡的危害越来越严重, 除引起上呼吸道障碍、产蛋量严重下降外, 个别毒株还引起了较大的死亡。因此, 开展对禽流感病毒 H9N2 亚型毒力的研究, 无论在病毒学, 还是在兽医学等学科上均具有重要的学术意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)病毒: A/Chicken/Guangdong/SS/1994(H9N2), 缩写为 SS, 1994 年分离自广东某鸡场。A/Chicken/Guangxi/KMI/1999(H9N2), 缩写为 KMI, 1999 年分离自广西某鸡场。A/Chicken/Guangxi/KMIII/1999(H9N2), 缩写为 KMIII, 1999 年分离自广西某鸡场。3 株病毒均由华南农业大学动物医学系禽病研究室保存, 经中国预防医学科学院病毒学研究所国家流感中心以单因子抗血清鉴定, 均为 H9N2。

(2)SPF 鸡胚: 购自山东省某 SPF 鸡场, 于广东省生物药厂孵化至 10 日龄。

(3)SPF 鸡: 购自北京实验动物中心, 鸡龄为 2 周

和 5 周龄的来航鸡。于中山医科大学实验动物部 SPF 实验室无菌隔离器中饲养、攻毒。

### 1.2 方法

(1)病毒的繁殖: 参照郭元吉等<sup>[3]</sup>方法进行。

(2)病毒致病力测定: 参照 Calnek<sup>[4]</sup>的方法进行。

第一次试验: 将 2 周龄的 SPF 鸡分成 3 组, 每组 6 只。第一组为空白对照, 肌肉注射 1:10 稀释的正常 SPF 鸡胚尿囊液 0.2 mL, 第二组肌肉注射 1:10 SS 种毒 0.2 mL, 第三组肌肉注射 1:10 KMI 种毒 0.2 mL。接种后第 2 d 开始测量鸡的体温, 观察鸡的精神、食欲、饮欲、排出的粪便, 观察 7 d, 统计接种鸡的发病率和死亡率。之后剖检鸡只, 分别收取心、肝、脾、肺、肾、脑、脊髓、十二指肠、法氏囊、盲肠肾上腺、胰腺作组织切片, 以观察其组织病理学变化。

第二次试验: 将 5 周龄的 SPF 鸡分成 4 组, 每组 8 只。第一组为空白对照, 静脉接种 1:10 稀释的正常 SPF 鸡胚尿囊液 0.2 mL, 第二组静脉接种 1:10 SS 种毒 0.2 mL, 第三组静脉接种 1:10 KMI 种毒 0.2 mL, 第四组接种 1:10 KMIII 种毒 0.2 mL。观察方法同第一次试验。

(3)病毒分离鉴定: 参照 Calnek<sup>[4]</sup>的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 病毒的繁殖

禽流感病毒 SS、KMI、KMIII 接种于 10 日龄的 SPF 鸡胚 48 h 后, 胚胎仍然存活, 但部分胚胎的头、颈、翅膀等部位有点状出血。吸取感染了 AIV 的新鲜 SPF 鸡胚尿囊液于微量反应板中作血球凝集试验, 结果表明, 3 个病毒株均能凝集 1% 的鸡红血球, 凝集

收稿日期: 2001-01-19

作者简介: 郭霄峰(1963-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 国家重大基础研究项目(G1999011905); 广东省科委攻关项目(99B05601G)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

价分别为  $1:2^9$ 、 $1:2^9$ 、 $1:2^{10}$ 。以 H9 单因子血清和抗 NDV 血清为抗体作血球凝集抑制试验, 结果显示, 3 个毒株均能被 H9 抗血清抑制, 而不能被抗新城疫病毒血清所抑制。

2.2 致病性试验

第一次试验: 攻毒后 7 d, 全部鸡只存活。接种正常胚液的鸡只保持正常。而接种了病毒液的其他 2 个组发生了变化。攻毒后第 3 d 鸡只体温开始升高, 接种 SS 的鸡群, 其平均体温比正常鸡群高约  $0.5^{\circ}\text{C}$ 。接种了 KMI 的鸡群, 平均体温比正常鸡高约  $1.0^{\circ}\text{C}$ , 部分鸡只还排出白色水样稀粪。攻毒鸡剖检后, 除部分鸡只的胰腺充血、出血外, 其他实质器官无明显的肉眼可见病理变化。实质器官经超薄切片并染色后,

于显微镜下观察, 发现有明显的组织病理学变化。图 1~6 显示, SS 毒株和 KMI 毒株接种 2 周龄的 SPF 鸡后, 病毒对鸡只的损害主要见于脑、脊髓、心肌、胰腺、肺、法氏囊、肾、气管等器官。以脑、心肌及胰腺的损害为重。其具体表现为: 脑及脊髓充血出血、神经元变性坏死、胶质细胞增生、部分普金野(Purkinje)细胞胞核溶解坏死, 分子层内毛细血管显现。心肌充血出血、心肌纤维间淋巴细胞浸润、心肌纤维组织变性坏死。胰腺充血出血、部分胰腺坏死并丧失原有组织结构。肺组织毛细血管扩大充血、局部出血、水肿, 气肿。气管充血出血。法氏囊充血出血、组织坏死。统计 2 组鸡出现病变的器官数及病理损害的严重程度, 发现 KMI 株的值比 SS 株大。

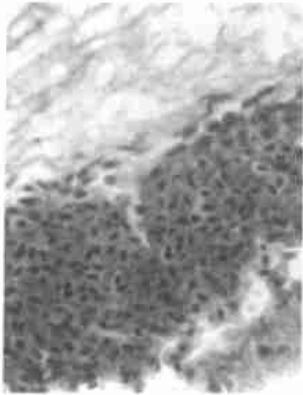


图 1 脑膜下一个较大的出血灶  
Fig. 1 Foci of hemorrhage under dura mater

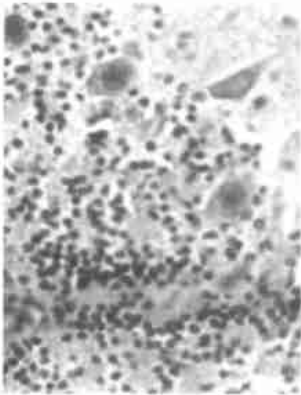


图 2 小脑组织中部分普金野细胞胞核溶解坏死, 分子层内毛细血管显现  
Fig. 2 Necrosis of purkinje cell

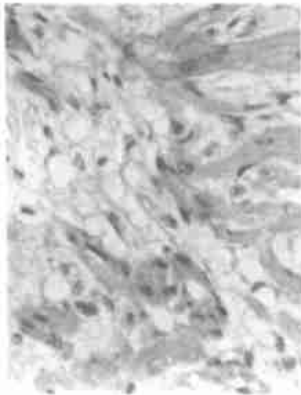


图 3 心肌纤维组织坏死  
Fig. 3 Necrosis of cardiac muscle cell

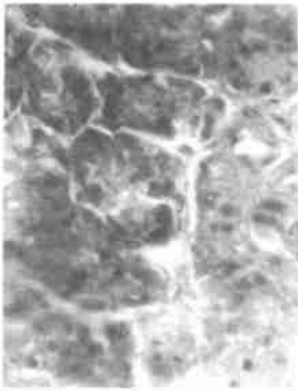


图 4 部分胰腺坏死  
Fig. 4 Necrosis in pancreas

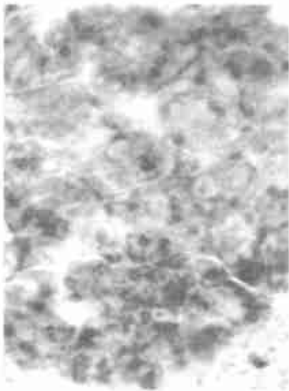


图 5 胰腺出血  
Fig. 5 Hemorrhage in pancreas

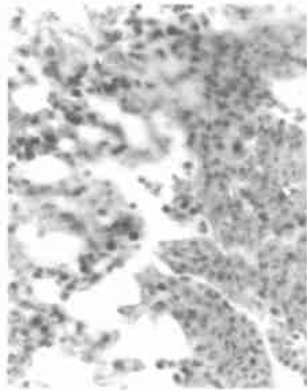


图 6 肺局部出血  
Fig. 6 Hemorrhage in pulmonary alveoli

3 个毒株接种 5 周龄 SPF 鸡后, 攻毒鸡的体温比正常鸡高约  $1.0^{\circ}\text{C}$ , 但仅仅维持了 1 d 时间。鸡只的病理损害与 2 周龄鸡相似, 但致病性差异不明显。

2.3 病毒的分离

来自攻毒鸡的病料接种鸡胚后, 在观察期内均不引起胚胎的死亡, 但部分鸡胚的头、颈等部位有点状出血。经 HA 和 HI 测试, 鸡胚尿囊液均能凝集鸡的红血球, 并且能被 H9 单因子血清抑制。表明 3 个

攻毒组的体温反应和组织学病理变化均由禽流感病毒引起。

3 结论

分离于 1994 和 1999 年的 3 个禽流感病毒均属于 H9N2, 为非高致病力毒株。以 2 周龄的 SPF 鸡为感染动物, SS 与 KMI 两毒株的毒力有差异。但在 5 周龄的 SPF 鸡中, SS、KMI、KMIⅢ 对鸡的损害差异不明显。

虽然这 3 个毒株对 2 周龄和 5 周龄的 SPF 鸡没有引起严重的临床症状, 但却有明显的组织病理损害。

对国内近 7 a 来禽流感的流行作进一步的分析, 发现禽流感病毒对鸡的危害愈来愈严重, 流行的范围也越来越广, 据此推测病毒的毒力在渐渐增强。病毒致病力试验表明, 分离于 1994 和 1999 年的 2 个禽流感病毒对 2 周龄 SPF 鸡均有大小不等的致病力。从鸡只的体温反应和组织病理损害的严重程度分析, 分离于 1999 年的 KMI 毒株对 2 周龄 SPF 鸡的致病作用稍强。但这 2 个毒株接种于 5 周龄的 SPF 鸡后, 对鸡的损害却无明显的差异, 这可能与较大龄的鸡对病毒的耐受能力较强有关, 试验结果与临床表现一致<sup>[5]</sup>。

本研究所用的 3 个分离毒株接种 SPF 鸡后, 其死亡率均小于 75%。参照美国健康动物协会鉴别高致病力毒株和低致病力毒株的条款<sup>[4]</sup>, 表明来自不同年代、不同地区的 3 个禽流感病毒株均为非高致病力毒株。这与近 7 a 来国内禽流感的发生与发展相符<sup>[1, 5]</sup>。

本研究较详细地描述了 H9N2 亚型禽流感病毒引起的组织病理变化。研究结果显示, SS、KMI、KMII 对不同龄的鸡致病作用虽然不尽相同, 但对鸡的组织病理学损害却相似。虽然对 SPF 鸡的损害波及多个器官, 但以脑、心肌及胰腺的损害为重。这些发现与文献报道的部分结果相似<sup>[4]</sup>。

禽流感病毒感染后所引起的损害还与感染鸡是否受到细菌的感染有关<sup>[7]</sup>。毒力试验提示我们, 在非常严格的无菌条件下 3 个分离毒株尚能引起试验鸡

的体温反应和明显的组织病理损害。可以推断, 在自然条件下, 由于不可避免的细菌混合感染, H9N2 所引起的损害将更加严重。因此, 生产中为了减少由 H9N2 引起的经济损失, 应尽量防止鸡只的细菌混合感染。

致谢: 本试验得到了华南农业大学动物医学系陈玉汉教授, 中山医科大学实验动物部陈系古教授、黄冰副教授的热情支持, 在此深表感谢!

参考文献:

[ 1 ] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[ J ]. 中国兽医杂志, 1994, 22( 10): 3—5.

[ 2 ] GUO Y J. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineage in ASIA [ J ]. Virology, 2000, 267: 279—288.

[ 3 ] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[ M ]. 北京: 中国三峡出版社, 1997. 87—91.

[ 4 ] CALNEK B W, JOHN B H, BEARD C W, et al. Diseases of poultry[ M ]. 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997. 583—605.

[ 5 ] 辛朝安, 罗开健, 廖 明, 等. 禽流感的诊断与防治 [ J ]. 养禽与禽病防治, 2000, ( 7 ): 9—10.

[ 6 ] FINDLAY G M, MACKENZIE R D, STIER R O. The histopathology of fowl pes[ J ]. J Pathol Bacteriol, 1937. 45: 589—596.

[ 7 ] TASHIRO R, CIBOROWSKI H D, PULVERER K G, et al. Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia[ J ]. Nature, 1987, 325: 536—537.

Studies on the Pathogenicity of H9N2 Subtype Influenza Virus

GUO Xiao-feng, LIAO Ming, XIN Chao-an

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** After virus inoculation, chicken embryos did not die, but developed hemorrhagic foci in the head, neck, etc. Infectious allantoic fluid was tested with HA assays, and it was found that HA titers attained  $1:2^9$  to  $1:2^{10}$ , and the HA activity could be inhibited with antiserum against H9 subtype AIV. After a three-day incubation period, two-week-old SPF chickens, inoculated with infectious allantoic fluid, showed mild clinical signs, mainly with fever and yellowish diarrhea, which showed that the three strains were not highly pathogenic. Compared with CK/GD/SS/94, CK/GX/KMI/99 induced higher fever. Gross lesions were observed only in the pancreas, which was characterized by hyperemia and hemorrhages. Histopathologic damages were consistent and limited primarily to the brain, myocardium, pancreas, etc. Brain lesions were hyperemia, hemorrhages, necrosis of neuron and proliferation of glial cells. Hyperemia, hemorrhages and foci of necrosis were seen in myocardium and pancreas. Extent of lesions were compared, and the findings indicated that the lesions was a little more severe in CK/GD/SS/94 than in CK/GX/KMI/99. But difference in histopathologic damage was not obvious in the five-week-old SPF chickens infected with allantoic fluid containing the three viruses.

**Key words:** avian influenza virus; H9N2 subtype; pathogenicity

【责任编辑 柴 焰】