

番鸭体内 H5 亚型禽流感 H 抗体与抗感染关系研究

张济培, 陈建红, 廖明, 卢玉葵, 黄得纯, 司兴奎

(1. 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东佛山 528231; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要 对经过 H5N1 油苗免疫的 50 日龄番鸭, 按 H 抗体水平分组后, 进行人工接种 HPAIV, 通过试验鸭的临床症状、病理变化和排毒情况综合判断 H 抗体水平与保护力之间的关系。结果表明, H 抗体水平在 $5.0\log_2$ 以下时, 番鸭群可感染 HPAIV, 出现临床症状, 表现不同程度的病理变化, 并有排毒现象。抗体水平达到 $3.0\log_2 \sim 5.0\log_2$ 的免疫番鸭群已具有一定的抵抗力, 可以延缓发病时间, 降低发病程度。随抗体水平的升高, 发病与排毒的程度有所下降。当抗体水平达 $6.0\log_2$ 及以上时, 番鸭对人工接种 HPAIV 具有完全抵抗能力, 不排毒。因此, 番鸭对 H5N1 亚型 HPAIV 具完全抵抗力的 H 抗体水平的临界保护滴度为 $6.0\log_2$ 。

关键词 番鸭; 禽流感; H 抗体水平; 保护力

中图分类号 S834 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05435-04

Study on the Relation between H Antibody Level and the Resistance to Challenge with Virulent H5 Subtype Avian Influenza Virus for Muscovy Duck

ZHANG Ji-pai et al (College of Life Science, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231)

Abstract 50-day-old Muscovy ducks were grouped according to the different antibody levels to AIV H5N1 inoculated with corresponding inactivated vaccine, and each group was intramuscularly challenged with virulent AIV isolated from duck. The clinical signs and gross pathogenic changes were recorded at different time after Muscovy duck challenged with AIV. The laryngotracheal and cloacal swabs as well as partial internal organs were inoculated in 11-day-old chicken embryos intra-allantoic cavity for AIV isolation. The results showed that antibody levels detected by HI test less than $5.0\log_2$ could not resist the challenge of virulent AIV H5N1 subtype, and clinical signs and different degrees of gross pathogenic changes were observed furthermore, the shedding viruses were verified. If antibody levels detected by HI test was between $3.0\log_2$ and $5.0\log_2$, the degrees of latent period for showing symptoms, the pathogenic signs were lessened, and the partial resistant capability was found. While the antibody levels detected by HI test were more than $6.0\log_2$, no clinical signs, gross pathogenic changes and shedding virus were detected. So far $6.0\log_2$ could be regarded as the critical titer for H5 subtype AIV. Muscovy duck could resist virulent AIV challenge well when their attained to more than $6.0\log_2$ by HI test.

Key words Muscovy duck; Avian influenza; H antibody level; Protection efficacy

禽流感(AI)是由A型流感病毒(AIV)引起的一种禽类的传染性疾病综合症^[1]。目前,禽流感疫情发生的频率正逐渐加快,范围也不断扩大,严重危害全球家禽与人类健康。为有效防控禽流感,我国大陆采取以扑杀、强制性免疫和生物安全相结合为主的扑灭措施,并取得较好的防控效果。多年来以鸡作为研究对象,对禽流感进行了较为全面的研究。水禽养殖主要品种之一的番鸭,在禽流感暴发过程中,表现较高的易感性,引发较高的发病率和死亡率^[2],而对番鸭禽流感的免疫防制、抗体水平与保护力的关系等方面的研究数据尚缺乏。该试验对不同H5亚型禽流感H抗体水平番鸭与保护力的关系进行研究,为制定科学的免疫程序和免疫效果监测方案提供科学依据。

1 材料

1.1 种毒与疫苗 A/Duck/Guangdon/177/2004(H5N1)(简称H5 177株),华南农业大学禽病研究室分离、保存并提供;H5亚型禽流感油乳剂灭活疫苗(H5N1, Re1株,下称H5N1油苗),由哈尔滨维科生物技术开发公司生产,批号:2005040。

1.2 抗原与血清 禽流感H5、H7、H9亚型H标准抗原及阳性血清,NDV、EDSV H标准抗原及阳性血清,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.3 试验动物 10日龄SPF鸡胚:由北京梅里亚试验动物技术有限公司提供;10日龄非免疫鸡胚:由佛山墟岗蛋鸡场供应;番鸭:从佛山市三水横山窝种番鸭场购进1日龄健康本地番鸭苗,隔离饲养,试验前不作任何免疫;禽红细胞供体

动物:成年公鸡、成年公番鸭,各3只,未经免疫,隔离饲养,由佛山科学技术学院禽病学实验室提供。

1.4 主要试剂与其他试验材料 1%鸡红细胞悬液、1%番鸭红细胞悬液:分别采取3只公鸡血液与3只公番鸭血液,按GB/T18936-2003中红细胞悬液配制方法配制^[3];HE染色试剂,按常规配制^[4]。

2 方法

2.1 攻毒株的增殖 将H5 177株种毒液用生理盐水作 10^{-2} 稀释,经尿囊腔接种10日龄SPF鸡胚0.2 ml/胚,37℃孵育,收集接种24 h后死亡及至72 h存活鸡的胚尿囊液,测定HA效价 10^9 的鸡胚液分装,为攻毒病毒液,-70℃保存备用。

2.2 攻毒病毒液对50日龄番鸭半数致死量(LD₅₀)的测定 取1日龄雏番鸭42只隔离饲养至50日龄,按常规方法进行H5 177株增殖病毒液的LD₅₀测定。按Reed-Muench法^[5]计算LD₅₀。

2.3 试验番鸭的免疫与分组 取隔离饲养至14日龄雏番鸭120只,其中100只接种H5N1油苗0.5 ml/只,21日龄再取60只接种疫苗1 ml/只;另20只不作任何免疫。至50日龄检测H抗体,按抗体水平分组,每组随机抽取10只,第1、2、3、4、5组的H抗体水平依次为 $3\log_2$ 、 $4\log_2$ 、 $5\log_2$ 、 $6\log_2$ 、 $7\log_2$ 。将20只未免疫无抗体鸭随机分成第6、7组,10只/组。

2.4 攻毒与病毒分离 用H5 177株增殖病毒液对“2.3”中划分的第1~6组试验鸭进行人工发病,每只经胸部肌肉注射1.0 ml。第7组注射生理盐水1.0 ml/只。

2.4.1 攻毒鸭临床症状与病变观察。 攻毒后每天观察,记录发病、死亡情况,对死亡鸭进行剖检,观察病变,观察至攻毒后第10天,对未死亡的鸭只全部扑杀。对所有死亡及扑杀的鸭只采取脑、心、肝、胰腺、脾、肺、肾、十二指肠、法氏囊、

基金项目 广东省重大农业攻关项目(2004A2090103,2005A20901003)。

作者简介 张济培(1970-),男,广东陆河人,硕士,高级实验师,从事水禽疾病防治研究。

收稿日期 2007-03-15

胸腺等组织样品,经10%甲醛溶液固定后,按常规切片,HE染色^[4],显微镜观察,检查各器官组织的变化情况。

2.4.2 喉头气管、泄殖腔拭子采取、处理与鸡胚接种。在攻毒前及从攻毒后24 h开始,间隔24 h用灭菌棉签采取攻毒鸭和试验对照鸭的喉气管和泄殖腔拭子,常规处理后接种10日龄鸡胚,每个样品接种5枚鸡胚,0.2 ml/枚。收取24 h以后死亡鸡胚液作HA试验,剖检胚体。接种后第4天,将所有存活鸡胚4℃冷冻致死,分别收取接种同一样品的鸡胚尿囊液混合后作HA检测。将HA效价在2log₂及以上的鸡胚液配制4单位抗原,用禽流感H5、H9、H7亚型和ND、EDS标准阳性血清进行H检测。

2.4.3 内脏组织的处理与鸡胚接种。无菌采取观察期间死亡的鸭,以及攻毒后第10天扑杀的鸭(包括对照组鸭)的肝脏、脾脏、胰脏、脑组织,常规处理无菌上清液接种10日龄鸡胚,检测方法同“2.4.2”。

3 结果与分析

3.1 攻毒病毒液对50日龄番鸭的半数致死量(LD₅₀) 按Reed Merch法计算得出攻毒病毒液对50日龄番鸭肌肉注射的LD₅₀为10^{-0.75}/0.5 ml。

3.2 免疫鸭攻毒后的临床症状表现 攻毒后各试验组鸭在

48 h内无明显变化;至72 h第6组(无抗体攻毒组)试验鸭出现精神沉郁、减食、不愿走动、流泪等症状;至96 h开始,第1、2、3组也陆续出现相应病症。随后第6组病鸭出现废食、软脚、扭头、眼结膜浑浊等症状,并于120 h首先出现死亡。而第4、5和7组(不攻毒对照组)无肉眼可见症状。各试验组鸭死亡结果见表1。

表1 攻毒后各试验组鸭死亡结果

组别	H 抗体	死亡数 只	死亡 各 组鸭数	组别	H 抗体	死亡数 只	死亡 各 组鸭数
1	3log ₂	3	3/10	5	7log ₂	0	0/10
2	4log ₂	1	1/10	6	0log ₂	5	5/10
3	5log ₂	0	0/10	7	0log ₂	0	0/10
4	6log ₂	0	0/10				

3.3 病死鸭与人为扑杀鸭的大体病理变化 未免疫攻毒组和具3log₂、4log₂、5log₂ H抗体水平的攻毒组鸭均出现不同程度的大体病变,尤以口腔黏膜点状出血与坏死、心肌条纹状坏死、肝脏的点状出血与坏死、脾脏坏死与胰脏的点状透明样坏死最为明显。抗体水平达6log₂及以上试验组与无抗体不攻毒对照组无可见病变。各组鸭病理变化情况见表2。

表2 试验鸭剖检肉眼可见病理变化

组别	H 抗体	序号	眼结膜充血	皮下水肿	口腔喉头出血	心肌	胰脏	脾脏	肝脏	肺脏	肠黏膜	气囊渗出	是否死亡	
1	3log ₂	1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	是	
		2	±	+	+	-	+	+	+	-	+	-	是	
		3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	是	
		4	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	否
		5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	否
		6	-	-	+	+	-	+	+	+	±	+	+	否
		7	±	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	否
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	否
		9	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
2	4log ₂	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	是	
		2	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	否	
		3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	否	
		4	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	否	
		5	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	否	
		6	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	否	
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		8	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	否
		9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
3	5log ₂	1	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	否	
		2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	否	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	否	
		4	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	否	
		5	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	否	
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	否
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	否
		9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
4	6log ₂	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	否	
		2	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	

(接下表)

续表2

组别	H 抗体	序号	眼结膜充血	皮下水肿出血	口腔喉头出血	心肌	胰脏	脾脏	肝脏	肺脏	肠黏膜	气囊渗出	是否死亡	
5	7log2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	否	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	否	
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
6	0log2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	是
		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	是
		3	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	是
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	是		
5	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	是		
6	±	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	否		
7	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	否		
8	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	否		
9	±	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	否		
10	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	否		
7	0log2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否	
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	否

注:表中“+”号表示相关病变较明显,“±”表示病变轻微,“-”表示无可见病变。

3.4 试验鸭部分器官组织病理学变化 攻毒后发病死亡的鸭,以及攻毒后 10 d 扑杀存活鸭中的无抗体攻毒组与 3log2 抗体水平攻毒组鸭的组织,均出现不同程度的病理变化,以非化脓性脑炎、变质性肝炎、坏死性脾炎、坏死性胰腺炎等变化为主。4log2 抗体水平攻毒组扑杀鸭的心、肝、肾、肺、脾组织的病理变化与无抗体攻毒组、3log2 抗体水平攻毒组鸭一致,其余组织以及 5log2 抗体水平攻毒组扑杀鸭各组织的病理变化较为轻微。6log2、7log2 抗体水平攻毒组与无抗体不攻毒对照组扑杀鸭各组织均无明显病理变化。

3.5 喉头与泄殖腔拭子及组织样品上清液病毒分离结果 喉头、泄殖腔拭子及组织无菌上清液病毒分离结果见表 3。鸡胚在接种样品后 24 ~96 h 出现部分死亡,对死亡鸡胚尿囊液作 HA 检测,结果大多数具有血凝性,接种后 96 h 存活鸡胚的尿囊液只有极个别具有血凝性。攻毒死亡鸭的组织中均可分离到病毒,攻毒后 240 h 扑杀试验存活鸭组织进行病毒分离的结果见表 4。将以上分离物 HA 效价在 2log2 以上的尿囊液配制 4 单位抗原,经 H 检测,发现其血凝活性能被 H5 亚型 AI 阳性血清抑制,而不能被 H9 亚型 AI 阳性、H7 亚型 AI 阳性血清和 ND、EDS 阳性血清所抑制。

表3 试验鸭喉头与泄殖腔拭子病毒分离结果

组别	H 抗体水平	攻毒后时间 h							
		24	48	72	96	120	144	192	240
1	3log2	2/10	5/10	6/10	7/10	6/10	5/9*	2/7*	2/7*
2	4log2	0/10	2/10	5/10	6/10	5/10	4/9*	3/9*	1/9*
3	5log2	0/10	2/10	3/10	5/10	5/10	4/10	1/10	1/10
4	6log2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
5	7log2	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
6	0log2	5/10	7/10	9/10	9/10	8/9*	4/6*	2/5*	2/5*
7	0log2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

注:1~6 组为攻毒组,7 组为不攻毒对照组;分母表示试验鸭数,分子表示分离到病毒的鸭数,下表同。带“*”号分母为该时段存活的试验鸭数。

表4 攻毒后 240 h 存活鸭组织上清液病毒分离结果

组别	H 抗体水平	病毒分离阳性比例	组别	H 抗体水平	病毒分离阳性比例
1	3log2	5/7	5	7log2	0/10
2	4log2	4/9	6	0log2	5/5
3	5log2	3/10	7	0log2	0/10
4	6log2	0/10			

4 讨论

4.1 不同 H 抗体水平番鸭感染 AIV 后的临床症状与病理变化差异 试验鸭攻毒后,从 72 ~96 h,抗体攻毒组和抗体水

平为 $3\log_2$ 、 $4\log_2$ 、 $5\log_2$ 攻毒组陆续出现AI 的临床症状和不同的病理变化,尤以无抗体组出现症状的时间早,症状与病变最为典型,并且首先出现死亡。说明具有 $3\log_2$ 、 $4\log_2$ 和 $5\log_2$ 抗体水平鸭仍可感染并出现临床症状,但已具有一定的抵抗力,可以延缓发病时间,降低发病程度与死亡率。具有 $6\log_2$ 以上抗体水平鸭,不表现症状,未出现肉眼可见的病变,说明其对H5N1 亚型HPAIV 的攻击具有较好的抵抗力。

4.2 不同HI 抗体水平番鸭感染AIV 后的组织病理学变化
攻毒后发病死亡鸭的各组织器官的病理变化与马春全等^[6]报道的鸭H5 亚型HPAIV 病例的组织病理学变化基本一致。结果表明,抗体水平在 $5\log_2$ 的番鸭感染HPAIV 后,病毒可在体内增殖,并对组织造成损伤,但其损伤程度与抗体水平有关,抗体越高,病毒对组织的损伤越轻。当抗体水平达 $6\log_2$ 时,机体完全可以抵抗病毒对组织的损伤。

4.3 试验鸭喉头与泄殖腔拭子及组织病毒分离结果 无抗体攻毒组在攻毒后24 h 即可从部分鸭只的喉头与泄殖腔拭子中分离到病毒,并持续到240 h,病毒分离的高峰期在攻毒后48 ~ 144 h,说明番鸭感染H5N1 亚型HPAIV 后在症状出现之前可经呼吸道与消化道排出病毒,该结果与廖明等^[7]对试验鸡感染H5N1 亚型禽流感病毒后排毒规律的研究结果相似。显示感染HPAIV 的番鸭群在发病前就具有传染能力,在生产中必须引起注意。在高发病季节或严重受威胁区,可以通过采取喉头和/ 或泄殖腔拭子样品分离病毒或检测,从而起到监测疫情的作用。 $3\log_2$ 抗体组攻毒后鸭的排毒规律与无抗体组相似,但排毒鸭的数量相对少一些。 $4\log_2$ 与 $5\log_2$ 抗体组首次分离到病毒的时间均为攻毒后48 h,比无抗体组和 $3\log_2$ 抗体组推迟了24 h,分离出病毒的鸭数量也较低。抗体水平 $6\log_2$ 试验组,攻毒后未分离到病毒。以上说明,抗体水平 $5\log_2$ 番鸭感染H5N1 亚型HPAIV 后,病毒可在体内

增殖,且经呼吸道与消化道排出病毒,但以无抗体鸭最易感染与发病。攻毒后10 d,无抗体攻毒组仍有个别存活鸭可经喉头与泄殖腔拭子分离到病毒,说明感染HPAIV 后番鸭具有较长的排毒时间。其他试验组虽已不能从喉头与泄殖腔拭子分离到病毒时,仍可从部分存活鸭的组织中分离到病毒,同时从死亡后的鸭组织中也可分离到病毒,说明在发病后期经呼吸道、消化道排毒减少,但组织中仍有病毒存在而成为带毒鸭,所以在对发生禽流感的禽群作诊断时,通过内脏组织结合喉气管、泄殖腔拭子分离病毒更为合适。

从以上试验结果可见,与无抗体组鸭比较抗体水平在 $3\log_2$ ~ $5\log_2$ 的免疫番鸭具有一定的抵抗力,但处于 $4\log_2$ 及以下抗体水平番鸭仍会感染发病并排毒,具 $5\log_2$ 抗体水平番鸭攻毒后虽未出现死亡,但仍可排毒。当抗体水平达 $6\log_2$ 及以上时,鸭对HPAIV 具有良好的抵抗力,未能检测到排毒现象。根据(NY/T 769-2004):“高致病性禽流感免疫技术规范”规定禽类进行禽流感疫苗的免疫接种后,鸡HI 抗体平均水平大于或者等于 $4\log_2$ 时,判定为免疫效力良好,而火鸡、鸭、鹅等禽类接种禽流感疫苗免疫效力评价尚缺乏足够的血清学依据。从该试验结果来看,评价标准显然不适合于番鸭群,所以番鸭对H5N1 亚型HPAIV 具完全抵抗力的HI 抗体水平的临界滴度定为 $6\log_2$ 更为合适。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感M. 2 版. 北京:北京农业大学出版社,1995 :1 - 12.
- [2] 王永坤. 鸭流感防治研究进展J. 辽宁畜牧兽医,2003(6) :33 - 36.
- [3] 中华人民共和国国家标准.GB/T 18936-2003. 高致病性禽流感诊断技术[S].
- [4] 杜卓民. 实用组织学技术M. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1998 :8 - 57.
- [5] 殷震,刘景华. 动物病毒学M. 2 版. 北京:科学出版社,1997 :329 - 331.
- [6] 马春全,卢玉葵,邓桦,等. 鸭H5N1 型高致病性禽流感的病理组织学观察J. 中国兽医科技,2004,34(11) :11 - 13.
- [7] 廖明,罗开健,程珏益,等. 试验鸡感染H5N1 亚型禽流感病毒后排毒规律的研究J. 中国人兽共患病杂志,2004,20(9) :751 - 753.