

# 1 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

李玉谷,叶远兰,周泉鹤,崔聪颖,张媛,马勇江,李楚宣

(华南农业大学兽医学院,广州,510642)

**摘要:**通过对鸭静脉接种或眼-鼻-口腔-泄殖腔接种禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)后,采用免疫组织化学方法检查病毒核蛋白抗原,探讨了该病毒在组织器官中的定位与分布。结果表明,病毒核蛋白抗原主要存在于鸭的心肌细胞、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;在气管和支气管黏膜上皮,脑组织,肠黏膜上皮,胸腺、法氏囊、脾脏和肺脏的巨噬细胞或组织细胞以及坏死的细胞碎片中也可检查到少量病毒核蛋白抗原;而在食管、胃、睾丸、卵巢、甲状腺、肾上腺、哈德氏腺、骨骼肌等未检查到该抗原。

**关键词:** H5N1 亚型禽流感病毒;核蛋白抗原;免疫组织化学;鸭

**中图分类号:** S852.659.5;S858.325.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2009)08-1202-07

## Localization of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1) in Experimentally Infected Ducks

LI Yu-gu, YE Yuan-lan, ZHOU Quan-he, CUI Cong-ying, ZHANG Yuan, MA Yong-jiang, LI Chu-xuan  
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Using streptavidin-biotin complex immunoperoxidase staining, the tissue localization and distribution of a highly pathogenic avian influenza virus, A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1) were investigated in ducks inoculated by intravenous and ocular-nasal-oral-cloacal routes. The results showed that the viral nucleoprotein antigen was most often detected in the cardiac muscle cells, hepatocytes, Kupffer cells, pancreatic acinar epithelial cells, renal tubular epithelial cells, vascular endothelial cells and phagocytic leucocytes, and occasionally in the mucosa epithelium of trachea, bronchia and intestinal tract, encephalon, and macrophages, histiocytes and necrotic cellular debris of thymus, bursa of Fabricius, spleen and lung. But no viral nucleoprotein antigen was detected in the oesophagus, stomach, testis, ovary, thyroid glands, adrenal glands, Harderian glands and skeletal muscles.

**Key words:** H5N1 subtype avian influenza virus; nucleoprotein antigen; immunohistochemistry; duck

禽流感以往主要发生于鸡和火鸡,水禽(尤其是鸭)仅为禽流感病毒(AIV)的携带者而不发病。然而近年来水禽不仅可以因感染高致病力禽流感病毒而发病和死亡,而且水禽流感呈现越来越严重的态势,因此有必要对水禽流感进行深入的研究。关于

禽流感及其病毒抗原在病禽体内的定位分布,以往在鸡等陆禽进行了较多的研究<sup>[1-10]</sup>,但对鸭等水禽的研究甚少<sup>[11-14]</sup>。为此,作者通过人工接种 1 株高致病力禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1),对其核蛋白抗原在鸭体内的定位分布进

收稿日期:2008-11-24

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,教授,博士,博士生导师,Tel:020-85283226,E-mail:liyugu@scau.edu.cn

行了观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1), 由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 实验室)分离、鉴定和保存。

### 1.2 实验动物分组与处理

1 日龄未接种任何疫苗的本地麻鸭 120 只, 隔离饲养, 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 只鸭并采取有关组织按常规方法接种鸡胚做 HA 试验, 同时随机抽取 10 只鸭的血清按常规方法做 HI 试验, 结果均为阴性, 表明鸭未感染禽流感病毒, 也无母源抗禽流感病毒抗体。将剩余 118 只鸭分为 3 组(静脉接种组、仿自然感染眼-鼻-口腔-泄殖腔混合接种组和对照组)进行攻毒试验, 期间观察临床症状与大体病变, 具体方法参见文献[14], 试验在前述实验室进行。

### 1.3 接种病毒后病毒的重新分离鉴定

取对照鸭 2 只(5、10 d 各 1 只), 静脉接种病毒后 1、2、3 d 各 2 只, 5 d 的 1 只病死鸭(4 d 无病死鸭, 5 d 只有 1 只病死鸭, 6 d 后剩余 1 只鸭且不再死亡, 故未取材), 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~10 d 各 2 只鸭(1~6 d 为病死鸭, 7~10 d 鸭不再死亡, 故为扑杀的存活鸭)的心、肝、脾、肺、肾、胰、脑、胸腺、法氏囊等组织器官, 捣碎后加适量生理盐水制成悬液, 离心取上清, 经双抗处理后, 各天的样品分别接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 收集 48~96 h 死亡鸡胚的尿囊液, 按常规方法做 HA 试验, 若 HA 试验为阳性, 则进一步用抗新城疫病毒的特异性血清做 HI 试验以排除新城疫病毒感染的可能性, 然后用抗 H5 禽流感病毒的特异性血清做 HI 试验鉴定禽流感病毒。试验操作均在前述实验室进行, 特异性血清等生物试剂亦由该实验室提供。

### 1.4 接种病毒后 HI 抗体的检测

采取 10 只对照鸭的血清; 静脉接种病毒后 1、2 d 各 10 只, 3 d 的 6 只, 4、5 d 各 2 只鸭的血清(3 d 仅存活鸭 6 只, 4、5 d 仅存活鸭 2 只, 6 d 后仅存活鸭 1 只, 故未再采血); 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~10 d 各 10 只鸭的血清, 按常规方法应用 H5 禽流感病毒标准抗原检测 HI 抗体的效价。试验操

作均在前述实验室进行, 标准抗原等生物试剂亦由该实验室提供。

### 1.5 组织制片与免疫组织化学染色

1.5.1 石蜡切片的制备 取对照鸭 10 只, 静脉接种病毒后 1、2、3 d 各 10 只, 5、10 d 各 1 只, 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~10 d 各 10 只鸭的心、肝、脾、肺、肾、气管、支气管、胰、胸腺、法氏囊、大脑、小脑、食管、腺胃、肌胃、小肠、大肠、睾丸、卵巢、甲状腺、肾上腺、哈德氏腺、骨骼肌等组织器官, 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 5  $\mu\text{m}$  厚切片。切片分为 3 套: 一套用于本试验, 进行免疫组织化学染色, 观察禽流感病毒核蛋白抗原的定位分布; 一套进行 HE 染色, 观察一般病理组织学变化<sup>[14]</sup>; 一套进行 TdT 缺口末端标记(TUNEL)染色, 观察细胞凋亡情况<sup>[15]</sup>。

1.5.2 免疫组织化学染色 石蜡切片复水; 甲醇配制的 0.3% 过氧化氢中孵育 10 min; PBS(0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH7.2)洗 5 min×2 次; 0.1% 胰蛋白酶(Genview 产品)消化 30 min; PBS 洗 5 min×4 次; 滴加正常血清封闭液(Ultra V Block), 室温下孵育 5 min; 适当漂洗; 滴加 1:50 稀释的鼠抗 A 型流感病毒核蛋白的单克隆抗体(ViroStat 产品), 湿盒内孵育 60 min(阴性对照以 PBS 代替一抗); PBS 洗 5 min×4 次; 滴加生物素化羊抗鼠抗体(LAB VISSION 产品), 室温下湿盒内孵育 10 min; PBS 洗 5 min×4 次; 滴加链霉素抗生物素结合的过氧化物酶(Streptavidin Peroxidase), 室温下湿盒内孵育 10 min; PBS 洗 5 min×4 次; 滴加 0.1 mL 媒染剂(Chromogen)与 0.9 mL DAB(二氨基联苯胺)的混合液于组织片, 孵育 15 min; 苏木精复染细胞核、脱水、透明、封固, 光镜观察并照相。

结果判定: 阴性对照切片不着色, 切片出现棕褐色或棕红色沉淀判为阳性, 无此反应判为阴性。

## 2 结果

### 2.1 接种病毒后鸭的临床症状、发病率和死亡率

对照鸭未见异常表现, 更无发病和死亡。

静脉接种病毒的鸭, 在 10 h 内全部表现明显的临床症状, 如精神不振、活动减少、呆立缩颈、食欲减退、饮水减少、体温升高等。其中, 在用于观察不同时间病理变化的 36 只鸭中, 除接毒后 1、2、3 d 各随机扑杀 2 只活鸭进行剖检外, 其余 30 只全部在 3 d 内死亡, 最早在接毒后约 23 h 死亡。在用于计算发

病率、死亡率的另外 18 只鸭中,接毒后 27 h 死亡 1 只,之后每隔 2~3 h 即有 1 只鸭死亡,至 2 d 死亡率为 50%,3 d 为 88.9%,5 d 达到最终的 94.4%。病鸭表现为精神萎靡,双翅下垂,伏卧不起,羽毛蓬乱,食欲、饮水废绝,排白色粪便,并出现歪头、扭颈、劈叉、转圈、仰翻等神经症状;部分鸭还有流泪、头部和脸部水肿、呼吸困难等。至 6 d 存活 1 只鸭,病情好

转,不再死亡,至 10 d 已无临床症状(表 1)。

眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒的鸭,临床症状与静脉接种的相似,但潜伏期稍为延长,接毒后 1 d 内仅有轻微的临床症状,2 d 才表现出明显的临床症状,并开始死亡,其中最早死亡的一例发生在接毒后约 40 h,5 d 为死亡高峰期,7 d 后不再有鸭死亡。死亡率为 50%,发病率 77.8%(表 1)。

表 1 鸭的发病率和死亡率

Table 1 The morbidity and mortality of ducks

	接种数 Number of inoculated ducks	发病数 Number of diseased ducks	发病率 Morbidity	死亡数 Number of dead ducks						死亡率 Mortality
				1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	
对照组 Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
静脉接种组 Inoculation intravenously	18	18	18/18 (100%)	0	9	7	0	1	0	17/18 (94.4%)
混合接种组 Inoculation via the ocular-nasal-oral- cloacal routes	18	14	14/18 (77.8%)	0	1	1	1	5	1	9/18 (50%)

dpi. Days post inoculation

## 2.2 接种病毒后病毒的重新分离鉴定结果

对照鸭的 HA 试验为阴性。静脉接种病毒后 1、2、3、5 d,其 HA 试验呈阳性,NDV HI 试验阴性,H5AIV HI 试验阳性。眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病

毒后 1~5 d,其 HA 试验呈阳性,NDV HI 试验阴性,H5AIV HI 试验阳性;接种病毒后 6~10 d,其 HA 试验呈阴性(表 2)。

表 2 HA 抗原效价

Table 2 HA antigen titer

	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6~10 dpi
对照组 Control	-	-	-	-	0	0
静脉接种组 Inoculation intravenously	1:64	1:64	1:128	-	1:64	-
混合接种组 Inoculation via the ocular-nasal-oral-cloacal routes	1:16	1:64	1:64	1:32	1:16	0
	1:32	1:64	1:64	1:64	1:16	0

## 2.3 接种病毒后 HI 抗体的检测结果

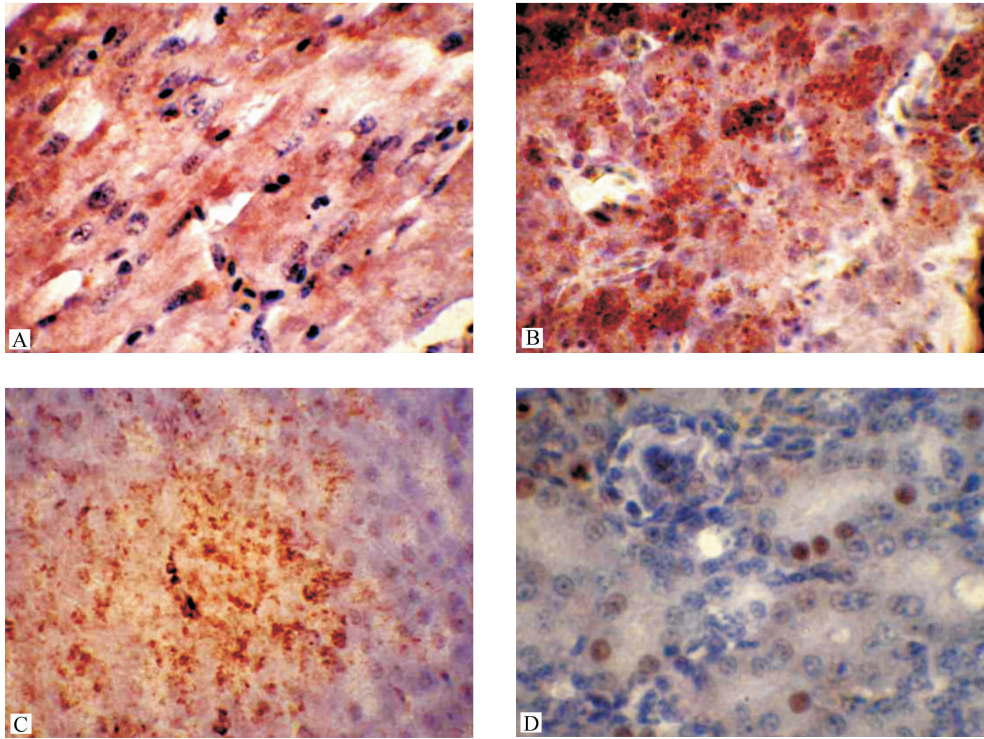
对照鸭,静脉接种病毒后 1~5 d、眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~6 d 的鸭,其血清中均未检测到 HI 抗体。眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 7~10 d 的部分鸭血清中检测到 HI 抗体(表 3)。

## 2.4 接种病毒后病毒核蛋白抗原免疫组化检查结果

对照鸭的各组织器官均呈禽流感病毒核蛋白抗原免疫反应阴性。接种病毒的鸭部分组织器官呈免

疫反应阳性,其中反应最强、阳性率最高的是心肌细胞、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(图 1);在气管和支气管黏膜上皮,脑组织,肠黏膜上皮,胸腺、法氏囊、脾和肺的巨噬细胞以及坏死的细胞碎片中也见少量阳性反应,在少数病例的脾组织细胞中可见较多的阳性反应;但在食管、腺胃、肌胃、睾丸、卵巢、甲状腺、肾上腺、哈德氏腺、骨骼肌等未见阳性





A. 静脉接种后 2 d, 心肌细胞质和细胞核内可见病毒核蛋白抗原阳性反应; B. 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d, 肝细胞质和细胞核内可见病毒核蛋白抗原阳性反应; C. 眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 3 d, 胰腺坏死灶的胰腺泡上皮细胞质和细胞核内可见病毒核蛋白抗原阳性反应; D. 静脉接种后 1 d, 肾小管上皮细胞核内可见病毒核蛋白抗原阳性反应

A. Intracytoplasmic and intranuclear AIV nucleoprotein antigen detected in myocardial cells at 2 days post-inoculation (DPI) by intravenously inoculation. B. Intracytoplasmic and intranuclear AIV nucleoprotein antigen detected in hepatocytes at 3 DPI by inoculation via the ocular-nasal-oral-cloacal routes. C. Intracytoplasmic and intranuclear AIV nucleoprotein antigen detected in necrotic acinar epithelial cells in areas of pancreatitis at 3 DPI by inoculation via the ocular-nasal-oral-cloacal routes. D. The kidney at 1DPI by intravenous route. Intranuclear AIV nucleoprotein antigen detected in renal tubular epithelial cells.

图 1 各组鸭部分组织 AIV 核蛋白抗原的免疫组化染色(苏木精复染) 600×

Fig. 1 Localization of AIV nucleoprotein antigen in some tissues by Streptavidin-biotin complex immunoperoxidase staining and hematoxylin counterstain 600×

### 3 讨论

#### 3.1 关于病毒的重新分离

关于接种 AIV 后鸭体内病毒的重新分离, 本试验仅仅进行了初步的研究, 即只是对接种病毒后每天数只鸭各种器官的混合物接种鸡胚进行了病毒分离, 而未分别对每只鸭每种器官进行病毒分离。其目的是证明本次人工发病确实由 AIV 所致。本试验结果表明, 对照鸭的材料中未检测到 AIV, 说明鸭没有自然感染 AIV; 而静脉接种和眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~5 d 的鸭病料中检测到 AIV, 说明鸭的发病死亡是由 AIV 所致。眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 6~10 d 的鸭病料中不能检测到 AIV, 接种后 7~10 d 的部分鸭血清中可以检测到 HI 抗体, 说明此时存活的鸭已将病毒消灭, 这与其

病情相对较轻、发病率和死亡率较低、接种 7 d 后不再有鸭死亡相符。据报道, 家鸭鼻内接种高致病力禽流感病毒 A/chicken/Hong Kong/220/1997 (H5N1) 后, 仅能从接种后 2 d 的口咽拭子中重新分离到病毒<sup>[11]</sup>。而高致病力禽流感病毒 A/goose/Hong Kong/793. 2/2002 (H5N1) 经眼-鼻-气管-口腔-泄殖腔人工感染绿头野鸭 (mallard), 在接种后 3 d 的多种脏器尤其是脑组织含有高滴度的病毒; 存活的鸭低水平地从气管中排毒, 可以持续 10 d, 但接种 4 d 后不能从泄殖腔拭子中检查到病毒<sup>[12]</sup>。

#### 3.2 关于 HI 抗体的产生

关于接种 AIV 后鸭体内 HI 抗体的产生, 以往鲜有报道。本试验结果表明, 对照鸭血清中不能检测到 HI 抗体, 一方面是因为这些鸭为非免疫鸭, 而且未受到 AIV 感染(病毒分离试验呈阴性), 因而不

可能产生 HI 抗体;另一方面说明这些 4 周龄的鸭体内已经没有母源抗体了。静脉接种病毒后 1~5 d,眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 1~6 d,其血清中均未检测到 HI 抗体;而眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后 7~10 d 的部分鸭血清中检测到 HI 抗体,并且随着时间的延长,能检测到抗体的鸭数增多,抗体滴度也表现出逐渐增高的趋势。这与鸭的病情发展是一致的。鸭眼-鼻-口腔-泄殖腔接种病毒后,死亡发生在接种后 1~6 d,接种 7 d 后不再有鸭死亡,临床表现逐渐好转,病理变化逐渐减轻。

### 3.3 关于病毒侵害的组织器官

本试验结果表明,鸭接种 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1)后,其核蛋白抗原免疫反应主要见于心肌细胞、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。在病理组织学观察中发现,不管是静脉接种还是眼-鼻-口腔-泄殖腔接种,这些细胞都存在严重的变性和坏死,许多器官的血管也有炎症反应;在细胞凋亡的检查中也观察到,胰腺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞和肝细胞的凋亡率最高,心肌细胞也有少量发生凋亡<sup>[14-15]</sup>。说明这些器官的病理损伤是上述 AIV 造成的。接种这种病毒后造成病毒血症,在血液中部分病毒被吞噬性白细胞吞噬,因而血液吞噬性白细胞中可以检查到病毒抗原;由于病毒复制迅速,病毒过多,吞噬性白细胞无法杀灭全部病毒,因而病毒进而侵害血管内皮,继而侵害器官的实质细胞;在肝脏中亦有部分病毒被枯否氏细胞吞噬,因而除了肝细胞外,在枯否氏细胞中也可检查到病毒抗原。上述结果与以往报道的鸡等其他禽类的结果不尽一致,这可能与病毒亚型、毒力强弱、毒株来源、动物种类等有关。据报道,智利源高致病力 H7N3 亚型 AIV 经鼻内接种鸡时,病毒抗原主要定位于全身许多组织器官的血管内皮,而心肌细胞、肝细胞、枯否氏细胞、胰腺泡上皮细胞等仅偶尔受到感染<sup>[1]</sup>。高致病力禽流感病毒 A/chicken/Hongkong/220/1997(H5N1)经鼻内接种斑雀、舍雀、麻雀、欧洲八哥和相思鸚鵡时,病毒抗原见于斑雀的鼻腔、脑、胰腺、脾、肾上腺和卵巢等,舍雀和相思鸚鵡的脑和胰腺等,麻雀的心脏和睾丸,而欧洲八哥不能检出病毒抗原<sup>[2]</sup>;接种鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡、环颈雉和山鹑时,肾上腺、肺、心、脾和脑是这些禽类含有病毒抗原最为集中的器官<sup>[3]</sup>;接种鹧鸪、家鹅、家鸭和鸽时,鹧鸪的病毒抗原主要见于胰腺泡上皮细胞、脑神经元

和胶质细胞、鼻腔和气囊上皮、心肌纤维和巨噬细胞中,鹅只有少数心肌纤维、胰腺泡上皮细胞、脑神经元、胶质细胞、室管膜细胞、肝细胞、枯否氏细胞、胆管上皮细胞和脾的巨噬细胞可见病毒抗原存在,而鸭和鸽的任何组织器官中都不能检查到病毒抗原<sup>[11]</sup>。鸡气管内接种高致病力禽流感病毒 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2)、A/chicken/Victoria/185/1985 (H7N7) 和 A/turkey/Ontario/7732/1966(H5N9),病毒抗原检出率最高的是脑神经元、室管膜细胞、心肌细胞、胰腺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞以及肺的三级支气管和肺房中的坏死细胞<sup>[5]</sup>。鸡鼻内接种高致病力 H7N7、H7N3 亚型 AIV 时,胰、脑、肾、心脏和骨骼肌呈免疫染色阳性反应<sup>[7]</sup>。

本试验只在气管和支气管上皮,肺巨噬细胞,脑组织,肠黏膜,以及胸腺、法氏囊和脾脏的巨噬细胞和坏死的细胞碎片中见到少量病毒核蛋白抗原免疫阳性反应,仅在少数病例的脾组织细胞中见到较多的阳性反应,偶尔在胸腺淋巴细胞中见到阳性反应,而在法氏囊和脾脏结构正常的淋巴细胞中未检出阳性反应,虽然这些器官都存在明显的病变。它们之所以很少或不能检查到病毒抗原,其原因可能是,这些器官的病变不是病毒的直接作用,而是由于全身各组织器官广泛的充血、淤血、出血和血栓形成,导致这些器官的缺血缺氧而间接造成的;或是病毒曾经短暂地侵害过这些器官,但在检查之前已经被机体排出或被杀灭;或是这些组织器官中的病毒含量不高,加上在制作石蜡切片的过程中可能导致部分抗原的破坏;还有,免疫组化方法使用的抗体是抗流感病毒核蛋白的单克隆抗体,用某一毒株免疫所制备的这种抗体,在检查其他毒株时可能存在一定的差异。因此,虽然上述器官存在明显的组织病理学变化,但无法检查到或极少地检查到病毒抗原。

本试验在食管、胃、睾丸、卵巢、甲状腺、肾上腺、哈德氏腺、骨骼肌等组织器官中未见病毒核蛋白抗原免疫阳性反应,组织病理学观察,其病变也不严重<sup>[14]</sup>,这可能是侵入这些器官的病毒较少,或是病毒未直接侵害它们,其病变是其他间接因素造成的。

### 3.4 关于病毒侵害机体的进程

本试验结果表明,静脉接种后 1 d 或眼-鼻-口腔-泄殖腔接种后 1~2 d,AIV 核蛋白抗原免疫阳性反应主要见于血管内皮细胞、血液吞噬性白细胞以及血管附近的实质细胞;静脉接种后 2 d 或眼-鼻-口

腔-泄殖腔接种后 2~3 d, 阳性反应可见于心肌细胞、肝细胞、枯否氏细胞、胰腺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞, 胸腺、法氏囊、脾脏和肺的巨噬细胞或组织细胞等实质细胞。接种后 5 d 阳性反应明显下降, 接种后 6 d 已很难检查到阳性反应, 接种后 7 d 已不能检查到阳性反应。这说明上述 AIV 在鸭体内存在的时间不长, 若鸭能够耐过感染而不死亡, 则病毒能被机体杀灭和清除。这与病情的发展和 HI 抗体的检测结果是一致的(如上所述)。该病毒侵害机体的进程与其他 AIV 不尽一致。据报道, 高致病力禽流感病毒 A/chicken/Hongkong/220/1997(H5N1) 经鼻内接种鸡、火鸡、鹌鹑、珍珠鸡和环颈雉时, 一般在接种后 2 d 可在组织器官中检查到病毒抗原, 但在山鹑直到接种后 3 d 才能从心、脑、肾和胰腺实质中检查到病毒抗原<sup>[3]</sup>; 接种家鹅后 4~7 d 少数心肌纤维和炎性细胞中存在病毒抗原, 接种后 4~10 d 胰腺泡上皮细胞、脑神经元、神经胶质细胞、室管膜细胞以及少数肝细胞、枯否氏细胞、胆管上皮细胞和脾的巨噬细胞可见病毒抗原存在, 但接种家鸭和鸽后任何时间、任何组织器官都不能检查到病毒抗原<sup>[11]</sup>。鸡接种高致病力禽流感病毒 A/chicken/Victoria/1/1985 (H7N7)、A/turkey/England/50-92/1991 (H5N1) 和 A/tern/South Africa/1961 (H5N3) 25 h 后, 心肌细胞、肾小管上皮细胞、胰腺泡上皮细胞、神经细胞、小胶质细胞, 肝、脾、胸腺的巨噬细胞, 肺呼吸毛细管上皮细胞、毛细血管内皮细胞和单核细胞呈免疫阳性反应, 但其染色性在接种后 4、5 d 则显著下降<sup>[10]</sup>。

**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 ] 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.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] PERKINS L E, SWAYNE D E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species [J]. *Vet Pathol*, 2001, 38(2):149-164.
- [ 4 ] SILVANO F D, YOSHIKAWA M, SHIMADA A, et al. Enhanced neuropathogenicity of avian influenza A virus by passages through air sac and brain of chicks [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(3):143-148.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] SWAYNE D E. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens [J]. *Vet Pathol*, 1997, 34(6):557-567.
- [ 7 ] HOOPER P T, RUSSELL G W, SELLECK P W, et al. Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs [J]. *Avian Dis*, 1995, 39(3):458-464.
- [ 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 ] SHALABY A A, SLEMONS R D, SWAYNE D E. Pathological studies of A/chicken/Alabama/7395/75 (H4N8) influenza virus in specific-pathogen-free laying hens [J]. *Avian Dis*, 1994, 38(1):22-32.
- [ 10 ] KOBAYASHI Y, THORIMOTO T, KAWAOKA Y, et al. Pathologic studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *Avian pathol*, 1996, 25:285-304.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 刘超男, 刘明, 张云, 等. H5N1 亚型禽流感病毒的鸭致病性研究 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2):412-417.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] 李玉谷, 叶远兰, 崔聪颖, 等. 1 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.