

# 禽流感的快速诊断方法

李维义 孙建宏 刘景利 辛晓光

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 哈尔滨 150001)

最近一些亚洲国家相继报道有禽流感发生,首先报道的是韩国、日本、越南,其次为柬埔寨、印度尼西亚、巴基斯坦和中国。越南是在联合国协助之下做出诊断,柬埔寨是将病料送往法国作出的诊断,泰国最初被误诊为禽霍乱,印度尼西亚则被误诊为新城疫,目前仍可听到某些地区有疑似禽流感的报道。大面积的暴发流行和被误诊的事实,说明人们对禽流感疫病是生疏的,鸡在死亡数万至数十万只之后才作出诊断,诊断所需要的时间太长,不利于及时控制和消灭疫病,禽流感的诊断方法需要改进,如能在鸡死后数小时作出诊断,则可以及时控制和消灭疫病,不会出现像现在这样的大面积流行,本文对此问题进行了一些有益的探讨和试验。

禽流感的传统诊断方法是分离病毒和检测抗体。分离病毒是自死鸡取病料接种鸡胚,鸡胚死亡后,收取尿液做鸡红细胞凝集试验,如能凝集鸡的红细胞,说明尿液中有病毒存在,但是否为禽流感病毒,尚需进一步做出鉴定,因新城疫死鸡的病料也可感染鸡胚,其尿液也可凝集鸡的红细胞。有时因病料中的含毒量少或最初不适应于鸡胚,需要在鸡胚中传 2~3 代之后,才可以分离出病毒。由开始分离病毒至作出病毒鉴定约需 1~3 周时间。检测禽流感抗体也需要两周的时间,对禽流感检测抗体的先决条件,是鸡感染禽流感后不死亡,两周后其体内才可以产生抗体,若鸡死亡则无法检测抗体,若能在死鸡的当日即作出确诊,则可以及时采取一些措施而控制疫情,有利于对疫病的扑灭。

对禽流感疫病做一深入了解,即会发现于死鸡的当日作出禽流感的确诊是可以做到的,只需要将传统的禽流感诊断方法(分离病毒与检测抗体)改为检测抗原即可。可以在很短的时间内确诊禽流感。因检测抗原所采用的方法不同,确诊禽流感所需的时间有些差异,最慢者需要 24h,中间者为数小时,最快者可在 30 分钟内确诊禽流感。

传染病的血清学诊断方法有两种:一是检测抗体,另一是检测抗原。任何一种传染病检测抗体所采取的都是血清,而检测抗原则不同,检测抗原所需的器官则因病而不同,每种传染病所监测的器官不同,过去在这方面所进行的工作较少,这就是为什么习惯上将传染病的血清学诊断方法视作为检测抗体,很少有人想到检测抗原的原因,实际上,检测抗原对控制和消灭传染病的重要性远较检测抗体为大,遗憾的是此项工作被人们所忽视。

感染传染病而死亡的鸡,其体内定有大量病毒,才能将鸡致死,因病毒的嗜器官性不同,所以病毒在不同器官中的含量是不同的,将病毒含量最多的器官作为被检器官,器官内的病毒即为抗原,用已知的阳性血清做抗原检测,若能检测出器官中的抗原,即可以确诊该传染病。禽流感检测抗原所需的被检器官是肺和粪便,用生理盐水做 50% 乳剂,3000 转离心 20min,取上清液作为被检病料,用下列 4 种方法之一,即可以确诊禽流感。

## 1. 血凝抑制试验(HI)

取上清液做红细胞凝集试验,如上清液可以凝集鸡的红细胞,则用不同亚型的禽流感阳性血清与上清液做血凝抑制试验,如果上清液凝集红细胞的能力,被某一亚型禽流感阳性血清所抑制时,则可以诊断为鸡感染某一亚型禽流感。因新城疫鸡的肺上清液也可以凝集鸡的红细胞,所以需用新城疫阳性血清同时作凝集抑制试验,以排除新城疫的可能。

如果上清液不能凝集鸡红细胞时,则尚需做病毒浓缩,浓缩后的病毒如果能凝集鸡的红细胞时,则用其作血凝抑制试验,如果上清液经过浓缩处理后,仍然不能凝集鸡红细胞时,则可以否定病鸡死于禽流感。上清液的病毒浓缩方法见下述的琼扩试验。

## 2. 琼脂扩散试验(AGP)

禽流感病毒有一特性,在 4℃ 时可以吸附于鸡

红细胞的表面,在 37℃时可以将吸附的病毒释放出来,利用此一特性,可以对禽流感病毒做浓缩处理。取上清液 9.0ml,加入经生理盐水洗过三次的离心沉淀的鸡红细胞 1.0ml,充分震荡混合均匀,放 4℃冰箱,病毒吸附于鸡红细胞表面后,再取出离心,弃去上清液,向沉淀的鸡红细胞内加入 2.0ml 生理盐水,充分摇动混合,放 37℃水浴箱内,吸附于红细胞表面的病毒释放至生理盐水中,然后再作离心处理,吸取上清液即为浓缩的病毒液。用浓缩的病毒液做红细胞凝集试验,如果血凝价达  $2^{12}$  以上时,则此浓缩的病毒液可作为禽流感的琼扩抗原,用它同已知的禽流感阳性血清做琼脂扩散试验,如二者之间出现沉淀线时,即可以确诊为禽流感。如果病料的上清液经过浓缩处理后,血凝价下降或仍没有血凝价时,则可以否定病鸡为禽流感。病料上清液最初所表现出的红细胞凝集能力,可能为新城疫病毒所引起。用新城疫阳性血清作血凝抑制试验,即可获得证实。

### 3. 玻片血凝抑制试验

用病料的上清液或经浓缩处理的病料上清液 1 滴放在玻片上,然后加 1 滴 10% 鸡红细胞,用牙签将两者充分混匀,若上清液中的病毒含量高时,则于 30s 左右,玻片上可出现红细胞凝集现象,上清液中的含毒量低时,则需要 2min 左右的时间才可以出现凝集现象。如果上清液无凝集能力时,即可以否定为禽流感。玻片上的红细胞凝集也可被禽流感阳性血清所抑制。据此可以做玻片血凝抑制试验。玻片上加 1 滴上清液,再加 1 滴禽流感阳性血清,用牙签将二者充分混匀,稍后加 1 滴 10% 鸡红细胞悬液,将三者充分混匀,如果血凝现象被抑制时,即可以诊断为禽流感。禽流感的阳性血清最少应包括 H5、H7 和 H93 个亚型。

### 4. 禽流感病毒的特性诊断

实验室内若没有禽流感阳性血清时,可以根据禽流感病毒的特性而做出是否为禽流感的诊断。在鸡的传染病中,可引起鸡红细胞凝集的传染病有 3 个:禽流感、新城疫和减蛋综合症。减蛋综合症不能引起鸡大批死亡,它能引起鸡红细胞凝集上清液的器官为卵巢、输卵管和其粘液。如上述器官的上清液可以引起鸡红细胞凝集,则可以诊断为减蛋综合症。在三个传染病中,可以除外减蛋综合症。余下的禽流感和新城疫,单靠病料的上清液,不易将二者区别开来,因其肺乳剂上清液都可以凝集鸡的红细胞,二者不易区别,此时若对上清液做病毒吸附和释放试验,则很容易将二者区别开来,具体操作方

法见前述(2、琼脂扩散试验),如果肺上清液经病毒浓缩处理后,血凝价有明显的提高时,则可以诊断为禽流感,若血凝价有明显的下降时,则可以诊断为新城疫。

### 5. 讨论

禽传染病分两大类,一是由细菌引起的细菌性传染病,如禽霍乱和沙门氏菌病等,该类传染病有药物可用于治疗和预防,一般不会引起大面积流行,并且易于控制;另一是由病毒引起的病毒性传染病,如禽流感、新城疫等,该类传染病没有药物可用于治疗和预防,只能靠消灭传染源和注射相关的疫苗来预防,疫苗预防注射需要两周时间才可以产生免疫力,短时间内不会有预防作用,该类传染病易于造成大面积流行,控制其流行有很大的难度,消灭传染源的关键是尽可能早的发现传染原,及时做出正确的诊断。

传染病发生的规律,一般先由个别鸡或极少数鸡染病死亡,然后扩散至一定数量的鸡发病,最后在大面积的鸡群中发病流行。个别鸡或极少数鸡发病是传染病发生流行的萌芽阶段,大面积流行是萌芽之后的扩散结果。在萌芽至流行有一阶段的时间距离,若能在萌芽阶段对疫病诊断清楚,采取一些预防措施,则可以将传染病消灭在萌芽阶段,不会发生传染病的大面积流行。

传染病的抗原检测是诊断传染病的重要方法,对发病或死亡鸡可在 24h、数小时甚至 1h 内确诊疫情,可以尽早的及时为控制和消灭疫情而采取一些有效的措施,如封锁、隔离和宰杀病鸡等,将传染病控制在一个很小的范围内,不使其有扩散和流行的机会,这是控制和消灭传染病的有力措施。

抗原检测不需要贵重的仪器和设备,操作技术也是较为简单和易于掌握的,各养鸡场都应建立化验室,对疑似传染病的死鸡都要进行抗原检测,将传染病消灭在萌芽初发阶段,这将是传染病预防的一个方向性措施。

据统计我国鸡的死亡率为鸡总数的 15%~20%,其中 75% 死于传染病,传染病中 80% 以上的鸡死于病毒性传染病,若能全民对死鸡进行抗原检测,则可以将传染病消灭在萌芽阶段,不会发生大面积的流行,每年所创造的经济效益将会超过千万元而达到亿元之巨,希望有关人员对此给与足够的关注和重视,将过去的重视抗体检测转变为重视抗原检测,这是时代发展的需要,是预防、控制和消灭传染病的需要。