

第30章 猪传染性胃肠炎和呼吸道冠状病毒

Linda J. Saif 和 Karol Sestak

传染性胃肠炎(TGE)

传染性胃肠炎是一种高度接触传染性肠道疾病，以引起两周龄以下仔猪呕吐、严重腹泻和高死亡率(通常100%)为特征。虽然不同年龄的猪对这种病毒均易感，5周龄以上猪的死亡率较低。

1980年开始出现了呼吸衰竭变异的TGE病毒，即猪的呼吸性冠状病毒（PRCV），在临床上改变了TGEV，虽然各年龄的猪对TGEV和PRCV都易感，但是血清阴性的猪群或者超过5周龄的猪的死亡率很低。

Doyle和Hutchings(1946)于1945年首次报道了该病在美国发生。此后，世界上大多数国家都有该病发生的报道。TGEV的临床症状被PRCV改变，很容易早期诊断。这种病对经产猪群中TGEV和PRCV血清阴性的猪造成很大的损失，对于育肥猪和成年猪由于临床症状不明显，只出现食欲不振和轻微腹泻，因此无法确诊。血清学诊断曾经是一个比较可靠的诊断方法，但是由于1980年以来PRCV抗体交叉反应的出现，传统血清学诊断试验不足以确诊（Laude 等，1993；Pensaert 和Cox，1989）。90年代早期的调查显示在北美有19%-25%的猪群是TGEV血清阳性(Egan 1982； USDA APHIS VS 1992)。1995年在爱荷华州检查的22个猪群中有16个是TGEV阳性 (Wesley 等，1997)。最近的数据表明TGEV在美国的爆发与以前的数据相比有下降的趋势，可能是由于PRCV的爆发(Yaeger等2002)。现在许多欧洲国家接近100%的猪群是TGEV阳性，其原因是1984年PRCV在欧洲的出现并且快速传播的结果(Brown和Cartwright, 1986; Laude 等, 1993; Pensaert, 1989; Pensaert和Cox, 1989; Pensaert 等, 1986, 1993)。TGEV造成很大的经济损失(Mousing 等, 1988; Pritchard, 1987); 然而，随着PRCV在各地方的流行，TGEV造成的经济影响开始下降(Laude等, 1993; Pensaert 和 Cox, 1989)。

在北美，TGEV/PRCV阴性的猪群，TGEV仍然是仔猪发病死亡的原因，对于PRCV血清阴性的地方猪群，TGEV的诊断越来越困难。由于在各年龄猪温和性发病掩盖了TGEV的感染(Kim 等, 2000b)。在饲喂和出口过程引起了人们对TGEV阴性猪群的关

注。

病原学

TGEV是冠状病毒家族中一员(Lai 和Cavanagh, 1997)。TGEV是有囊膜的多晶体,直径是60-100nm。见图30, 1负染的电镜照片(Granzow 等, 1981; Okaniwa 等, 1968; Phillip 等, 1971), 表面有呈现棒状的长度为12-25nm的纤突。

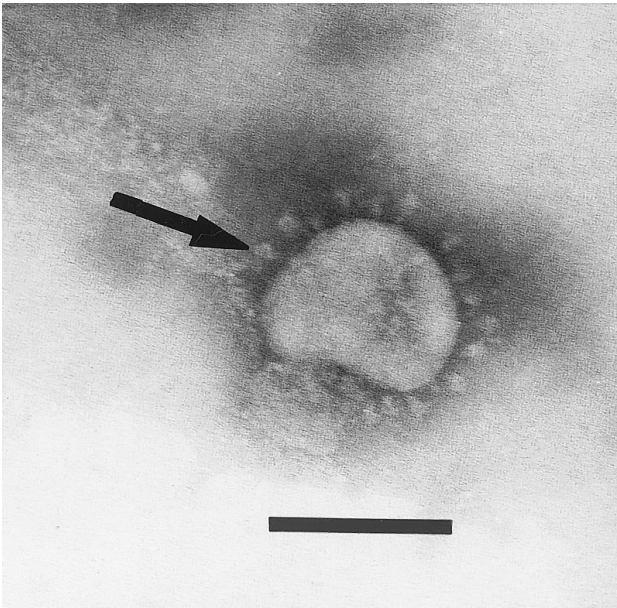


图30, 1 1TGEV电镜照片, 显示典型的冠状病毒形态, 箭头所指为病毒外包膜突起。横线=100nm。

TGEV抗原在感染后早至4~5 h用免疫荧光(IF)于细胞浆中可以检测到(Pensaert, 1970a)。病毒的成熟发生于细胞浆中, 通过内质网出芽, 常在细胞浆的空泡中观察到病毒粒子(直径65~90 nm)(图30, 2A)(Thake, 1968; Pensaert, 1970b; Wagner, 1973), 病毒从感染细胞排出后常见其排列于宿主细胞膜上(图30, 2B), TGEV糖蛋白已在被感染的猪睾丸细胞表面所证实(Laviada, 1990)。

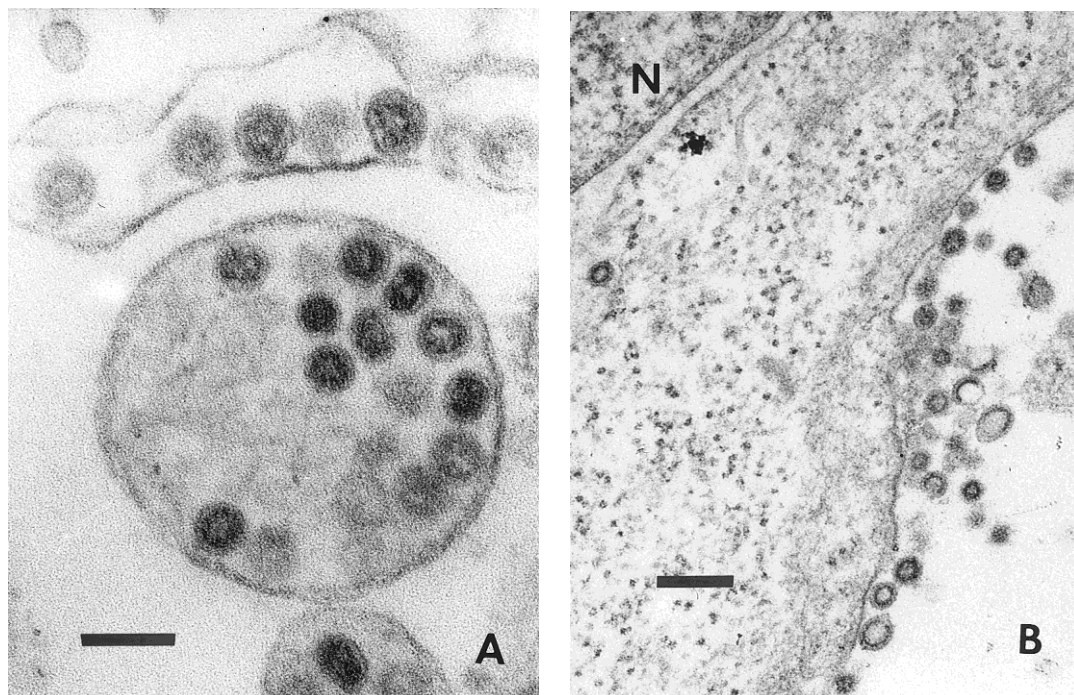


图30, 2(A)TGEV在猪肾细胞(感染后36 h)内质网空泡中。横线100=nm; (B)TGEV排列于猪肾细胞膜上(感染36 h)。N=核, 横线=200nm

生物学特性

病毒冷冻贮存非常稳定,而在室温或室温以上不稳定。据报道,来自患猪肠组织中的病毒于-20℃存放6~18个月未见滴度下降(Young, 1955, Haelterman和Hutchings, 1956)。相反,来自患猪肠组织中病毒,在21℃干燥、腐败状况下,则很不稳定,3天后接种猪4头,只有两头发病;10天后接种,未检测到病毒(Bay, 1952),置于37℃,每隔24 h病毒滴度下降一个log₁₀(Young, 1955)。细胞培养病毒分别存放于-20℃、-40℃、-80℃,365天后滴度无明显下降,而存放于37℃4天,感染性全部消失(Harada, 1968)。病毒若以液浆状态保存,其感染性可保持:5℃保持8周以上;20℃保持2周;35℃则仅保持24 h(Haas, 1995)。

分子学特性

TGEV和缺失变异株PRCV都是囊膜病毒,它们含有一个大的、多腺苷酸、单链、正股基因组RNA(genomic RNA of positive sense polarity)基因结构,复制过程以及病毒蛋白的表达都与其它冠状病毒类似(Laude, 1990, 1993; Enjuanes和Van der Zeijst, 1995),

TGEV的基因组RNA具有传染性，Purdue115病毒株是由28,579个核苷酸组成(Kapke和Brian, 1986; Rasschaert和Laude, 1987; Rasschaert, 1987; Eleouet, 1995)。

TGEV的蔗糖浮密度为1.18~1.20 g/ml(Brian, 1980; Jimenez, 1986), 病毒囊膜中的磷脂和糖脂是由宿主细胞诱导产生的, 所以, 囊膜的构成依赖于宿主细胞(Pike和Garwes, 1977)。完整的TGE病毒包含四种结构蛋白: 一个大的表面糖蛋白(Spike或S); 一个小的膜蛋白(SM), 一个完整的膜糖蛋白(M), 以及一个核衣壳蛋白(N)(Garwes和Pocock, 1975; Spaan, 1988; Godet, 1992)。蛋白N(47kD)与TGEV的RNA结合形成一个螺旋状核糖蛋白复合物, 这种结构与蛋白M形成一个二十面体(Risco, 1996)。这个29~36 kD糖蛋白M, 通过3~4跨越膜的部分牢固地镶嵌于病毒的包膜内, 并以两种不同的形式出现(Risco, 1995); 一, 蛋白M的N末端是病毒包膜外部, 而C末端在膜的内部; 二是分子的两个末端都在病毒粒子的外部。上述两种形式中, 带有一个糖基的位点亲水性的N末端与干扰素的产生有关(Charley和Laude, 1988)。M蛋白突出的N末端和C末端上的抗原位点能结合补体依赖的中和单克隆抗体(MABs)(Woods, 1988; Laude, 1992; Risco, 1995)。S糖蛋白作为一个完整的复合体在电镜下观察像“皇冠”状(图30, 1)。S糖蛋白(170~220 kD)的机能作用, 包括病毒中和(依赖补体), 病毒吸附于细胞, 膜的融合以及血细胞凝集。Garwes(1978/1979)已经证明, 钝化后的S糖蛋白, 能诱导产生TGEV的中和抗体, ST细胞及猪小肠绒毛上皮细胞已经被证实是病毒受体。(Delmas, 1992; Weingartl和Derbyshire, 1994)。病毒受体氨肽酶受体结合部和S蛋白上主要中和位置(SiteA)都在同一范围内(Godet, 1994)。TGEV和靶细胞糖蛋白的硅酸残基结合, 这种结合可能与小肠绒毛上皮细胞感染有关(Schwegmann-Wessels 等, 2002)。用唾液酶处理TGEV可增强其细胞凝集活力(Noda, 1987; Schultze, 1996), 这种凝集活性位于TGEVS蛋白N末端部位, 而PRCVS蛋白正缺少这一部位, 因此, 根据有无细胞凝集现象出现, 可区别PRCV和TGEV毒株(Schultze, 1996)。

已用TGEV弱毒株(Jimenez, 1986; Laude, 1986; Correa, 1990; Delmas, 1990)和强毒株(Welch和Saif, 1988; Zhu, 1990; Simkins, 1992, 1993)生产单克隆抗体, 并用其鉴定TGEV蛋白种类并找出诱导抗体的抗原位点。在S蛋白上的中和因子, 在PRCV和TGEV毒株是高度保守(Garwes 等, 1987; Jimenez 等, 1986; Sanchez 等, 1990;

Simkins 等, 1993; Welch 等, 1988)。用中和单克隆抗体在S蛋白标定抗原位点显示有四种不同抗原位点(A、B、C、D), 其中, 通过强力中和单克隆抗体确认A、B为主要的免疫抗原决定簇(Garwes, 1987; Simkins, 1992, 1993; Correa, 1990; Delmas, 1990; Gebauer, 1991), 而其它位点(D、C)也能诱导中和抗体(Laude, 1986, Posthumus, 1990), 四个主要抗原位点的每一个位置被标在S糖蛋白的主要结构上。从氨基末端开始, Madrid Group将这些位点定为C、B、D和A(Correa, 1990), 而Paris Group则定为D、C和A、B(Delmas, 1990)。Paris的D、C和A、B位点(除特殊说明外, 本章使用该名称)与Madrid 位点 B、D和A分别相互重叠。用抗TGEV单克隆抗体的变异株, 确认了A位点上的三个亚位点Aa、Ab、Ac(Correa, 1990)。

抗原及基因关系

已知猪传染性胃肠炎病毒只有一种血清型(Kemeny, 1976)。病毒中和(VN)试验不能区分猪呼吸道冠状病毒(PRCV)与从肠道分离出的TGEV毒株(Pensaert, 1989; Pensaert和Cox, 1989), 但可用阻断ELISA试验(参照以下诊断部分)或通过PRCV的S基因大量缺失, 导致其S蛋白(170~190 kD)小于TGEV的S蛋白(220 kD)这一特性来区分。

有七种冠状病毒的抗原性或基因序列相关 (Enjuanes和Van der Zeijst, 1995; Siddell, 1995), 它们是猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪呼吸道冠状病毒(PRCV)、狗冠状病毒 (CCV)、猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)、猫肠道冠状病毒(FECV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和人类冠状病毒 (HCV 229 E)。根据病毒中和(VN)免疫荧光(IF)交叉反应以及用单克隆抗体与蛋白S、N或M进行鉴定, 在这7种病毒中, 只有TGEV, PRCV, CCV, FIPV和FECV具有抗原相关性(Pedersen, 1978; Reynolds, 1980; Woods, 1982; Enjuanes和Van der Zeijst, 1995)。所有这些相关性抗原位点共同存在于S蛋白亚抗原位点AC上 (Enjuanes和Van der Zeijst, 1995)。另外, 用放射免疫沉淀、免疫印迹和ELISA方法证明了TGEV、CCV和FIPV病毒蛋白S、M和N之间有交叉反应, 说明这几种病毒其实是同一始祖病毒的变异株(Horiznek, 1982)。用多因子血清做免疫印迹试验, 也能观察到在TGEV和PRCV的结构蛋白S、M及N之间有类似交叉反应(Callebaut, 1988)。

猪流行性腹泻病毒(PEDV)是另一种与TGEV相似的猪冠状病毒, 此病仅在欧洲和亚洲有记载, 对美国成年猪的一次血清抽样调查中, 尚未测出PEDV抗体(DeBouck, 1982;

L J Sai f和 M, B, Pensaert 未出版资料, 1990)。有报道称, 有人用PEDV, FIPV, CCV, TGEV和被称为水貂冠状病毒的N蛋白做免疫印迹交叉反应(Yaling, 1988; Have, 1992), 用多因子血清和单克隆抗体其它血清学试验都未测出在FEDV和TGEV相关冠状病毒之间有抗原交叉反应(Pensaert和DeBouck, 1978; Callebaut, 1988; Enjuanes和Van der Zeijst, 1995), 另一种猪冠状病毒-血凝性脑脊髓炎病毒与冠状病毒组I无抗原相关性(Enjuanes和Van der Zeijst, 1995; Siddell, 1995)。

虽然, TGEV, CCV和FIPV有抗原相关性, Reynolds(1980)认为, 通过双向中和试验, TGEV和CCV在血清学上是有区别的(用自然感染动物血清)。另外, 体外生物学特性差别也已查出, TGEV和CCV均可生长于狗肾细胞(Welter 1965; Reynolds, 1980), 也可生长于猫传代细胞(Woods, 1982), CCV和FIPV均不能生长于猪睾丸细胞(ST)或猪甲状腺细胞上, 而TGEV的分离物则可在这两种细胞上生长(Reynolds, 1980)。

TGEV, CCV和FIPV也存在体内生物学特性差别, 它们对新仔猪致病性不同(Binn, 1974; Woods和Pedersen, 1979)。FIPV毒力与TGEV相似, 引起腹泻和肠道病变, CCV感染后无临床症状, 只有轻微的绒毛萎缩, 用猪抗TGEV荧光抗体做IF试验表明, 在TGEV和FIPV感染猪肠绒毛细胞中可见荧光, 但在CCV感染猪荧光主要位于肠腺细胞。急性感染狗所携带的CCV已被证明可感染仔猪, 并产生CCV和TGEV血清中和抗体(Woods和Wesley, 1992)。不过, 实验感染FIPV的仔猪和怀孕母猪不产生TGEV中和抗体, 但能对TGEV的感染有免疫作用(Woods和Pedersen, 1979)。

分子探针和单克隆抗体也被用来检测和鉴别这些有抗原相关性的冠状病毒。S糖蛋白基因决定了宿主的种类, 其N末端的300个氨基酸差别最大, 与TGEV相比较, CCV和FIPV则更为相似(Jacobs, 1987; Wesseling, 1994)。基于上述差别, 从TGEV的S基因衍生而来的DNA探针, 在严格条件下, 可与TGEV的RNA反应, 而不能与CCV或FIPV的RNA反应。cDNA探针或RT-PCR(反转录PCR)技术都被用于区分美国PRCV毒株和TGEV毒株(Bae, 1990; Vaughn, 1994; Jack wood, 1995)。用特异性抗TGEV糖蛋白S单克隆抗体也可能区分TGEV相关的冠状病毒。但其不能与PRCV, FIPV或CCV反应(Laude, 1998; Callebaut, 1989; Sanchei, 1990; Simkins, 1992)。

PRCV毒株分离于80年代中期和90年代, 且已被鉴定, 部分已做了核酸序列分析

(Rasschaert, 1990; Wesley, 1991b; Britton, 1991; Vaughn, 1995)。在TGEV和PRCV之间, 两者的全部核苷酸和氨基酸的序列有96%的同源性, 这证明PRCV是由TGEV进化而来的, 但它是通过一系列独立的因素发生所造成的。在PRCV基因中, 有两种特性值得注意: ①在近S基因N末端有大量缺失(621~681核苷酸), 从而形成一个较小的蛋白体; ②不同缺失部位常随之消除S基因开放阅读框架的下游。这种遗传变化, 可导致PRCV组织嗜性的改变。从序列分析显示, 明显同源性发生于3个基因上, 它们编译了TGEV相关病毒(TGEV, PRCV, CCV, FECV, FIPV)的三种主要结构蛋白, 而这些病毒与HCV229E和FEDV之间也存在同源性(Enjuanes和Van der Zeijst, 1995), 因此, 资料所显示的上述后两种毒株与TGEV相关病毒之间有着基因关系, 但它们用血清学分析尚未证明(Enjuanes和Van der Zeijst, 1995; Siddell, 1995)。

已报道了一种改变了表现型小蚀斑(SP)TGEV变异株(Woods, 1978; Woods, 1981)。尽管 SP变异株的S基因与野毒TGEV相似, 大缺失(462核苷酸)出现在SP病毒基因组S基因的下游(Wesley, 1990a), 这种缺失消除了可能被编译病毒蛋白的开放阅读框架(ORF), 同时也消除了第二个可能的病毒蛋白N末端部分的开放框架(ORF)。多次细胞传代病毒株Nouzilly, 是一种具有SP表现型的减弱TGEV毒株, 正缺少这两种开放阅读框(ORF)(Britton, 1994)。由此推测, 致病性发生改变的SP病毒Nouzilly病毒和PRCV病毒是由于基因缺失所造成的。

最近出现的严重急性呼吸综合症(SARS)是由于暂时定为冠状病毒IV的新的冠状病毒引起的人的肺炎综合症。SARS被认为是一种人畜共患病, 它的基因和TGEV相差很远, 其确切的动物宿主仍没有搞清楚(Drosten 等, 2003; Ksiazek 等, 2003; Marra 等, 2003; Peiris 等, 2003; Rota 等, 2003)。然而, 有报道称SARS冠状病毒与冠状病毒I的抗体有交叉反应, 包括TGEV和PRCV, 主要是通过N蛋白(Nagesha 等, 2004; Ksiazek 等, 2003; Sun 和 Meng 2004)。虽然血清检测为SARS并且用RT-PCR能够检测到病毒, 但是给PRCV血清阳性的6周龄的猪接种SARS没有成功。是否是由于存在的PRCV抗体影响了猪对SARS的易感性。

流行病学

有关TGE的流行病学已有过论述(Haelterman, 1962; Ferris, 1973; Toma, 1978;

Wood, 1979; Pritchard, 1982, 1987)。对一个猪场来说, 可将TGE归纳为两种流行形式: 流行性和地方流行性。另外, 若感染了TGEV的变异株PRCV, 则会出现不同的模式, 从而使TGE流行病学的研究复杂化(Pensaert, 1989; Pensaert和Cox, 1989)。

流行性TGE

流行性TGE指该病于一个全部或大多数TGEV/PRCV阴性的和易感的猪场发生。当TGEV侵入这类猪场时, TGEV常常很快感染所有年龄的猪, 尤其是在冬天。大多数猪会发生不同程度的厌食、呕吐和腹泻。

哺乳仔猪发病严重, 迅速脱水, 2~3周龄以下猪死亡率很高, 但随年龄增长死亡率逐渐下降。哺乳母猪常发病, 表现厌食和无乳, 从而进一步导致仔猪死亡率上升。因为在美国没有类似疾病报道, 所以, 病史和严重的临床症状有助于对TGE的诊断。然而, 在欧洲FED有相似的临床症状(Pensaert和DeBouck, 1978), PRCV在欧洲的出现, 大大降低了TGE发病率和严重程度 (Pensaert和Cox, 1989; Brown和Paton, 1991; Laude, 1993; Pensaert, 1993)。

地方流行性TGE

地方流行性TGE指本病和本病毒在一个猪场持续存在, 这是由于不断地或经常地受到易感染猪的影响, 易感猪感染后造成本病长期存在。地方流行TGE局限于仔猪出生率高的血清学阳性猪场(Stepanek, 1979), 以及不断增加易感猪到曾经暴发TGE猪群中。这种情况下, TGEV在成年猪, 尤其新引入猪场的猪传染较慢(Morin, 1978, 1983; Pritchard, 1987)。育种母猪免疫后在哺乳期间通过初乳和常乳将抗体转移给仔猪, 使仔猪获得不同程序的被动免疫。母猪通常不发病。在这些猪群中, 断奶后6~14天仔猪出现温和TGEV所引起的腹泻症状。当病毒感染力超过猪的被动免疫力时, 猪将受到临床感染。这种不同年龄的感染程度与猪场的管理体制和母猪免疫水平有关, 死亡率常低于10%~20%, 这取决于年龄特征和从免疫母猪被动获得的免疫力。哺乳仔猪或刚断奶猪的地方流行性TGE难以诊断, 而且必须与发生于仔猪的其它常见类型地方流行性腹泻, 如轮状病毒腹泻和大肠杆菌病区别。只要易感猪或未完全免疫猪接触TGEV, 地方性流行性TGE就将在猪场中持续存在。

包括免疫母猪在内的猪群, 均可复发或再次感染TGEV, 且不断地排出病原

(Pritchard, 1987)。这种情况常发生在美国或其他国家养猪业较集中的地区。猪群可重新感染,特别在架子猪或育肥猪中尤其常见。在夏天和秋天期间终止,冬天感染的猪又变成了易感猪。如果TGEV被带入产仔房,哺乳猪和断奶猪发生的TGE与上述流行相似,因为通常母猪已获得免疫。TGEV是来源于猪本身携带的病毒重新被激活,还是从猪群以外其它途径传入,尚不清楚。

猪呼吸冠状病毒

PRCV是从屠宰猪血清调查中以及世界贸易检查中发现的。1984年,比利时首次分离出PRCV,一种非肠道致病性冠状病毒(Pensaert, 1986)。1989年,在美国意外地发现有两个猪群的血清呈TGEV阳性,而它们既没有进行TGEV免疫注射,亦未发现任何TGE的临床症状(Hill, 1990; Wesley, 1990b)。PRCV是TGEV的一个变异株,它感染呼吸道上皮细胞和肺泡巨噬细胞(Pensaert, 1989; Pensaert和Cox, 1989; Paul, 1994)。攻毒试验后,PRCV只感染小肠中少数未确定的几种细胞,因此,猪粪便中携带的病毒是有限的或不可能检测出(O'Toole, 1989; Cox, 1990a, b; Van Cott, 1993, 1994; Brim, 1994, 1995)。对从消化道和呼吸道排泄物中分离的PRCV进行遗传比较,发现在S蛋白有细微的,固定的基因差别(点突变)(Costantini等, 2004)。然而被PRCV感染的猪产生的抗体,能中和TGEV病毒。

猪群密度,猪场之间的距离及季节皆会影响PRCV的流行病学。PRCV通过空气或相互接触而感染所有年龄的猪。在高密度饲养地区,PRCV能传播到几公里以外的邻近猪场(Pensaert 和Cox, 1989),另外随邻近猪群规模的扩大,这些猪场被感染的危险增加(Henningsen, 1989)。PRCV呈亚临床感染,在西欧许多国家迅速广泛传播(Brown和Cartwright, 1986; Jestin, 1987; Lange, 1988; Henningsen, 1989; Pensaert, 1989; Van Nieuwstadt和Pol, 1989; Laude, 1993; Martin, 1994),甚至传播到以前未曾发现TGEV的欧洲国家(Pensaert, 1989),类似这种快速、广泛传播的PRCV尚未在美国检测到(USDA APHIS VS, 1992),不过,1995年,血清抽样调查表明,在衣阿华(Iowa)州的许多无临床症状的猪群中,PRCV抗体呈阳性(Wesley, 1997)。

在欧洲许多猪群中,PRCV已经呈地方性流行(Pensaert, 1989; Lanza, 1993; Laude, 1993; Pensaert, 1993)。在母源抗体下降之后,病毒在20~26周龄前的猪群中循环感染

(Pensaert, 1993)。将不同来源引进猪, PRCV血清学阳性和血清学阴性猪混合饲养, 在短时间内, 绝大多数混合猪群中的猪, 血清学阳、阴性发生了转换(Van Reeth和Pensaert, 1994a)。用PRCV试验感染猪只表明, 病毒在鼻分泌液中存留时间不到两周(Onn, 1989; Wesley, 1990b; Bourgueil, 1992; Van Cott, 1993; Brim, 1994), 尚无证据说明PRCV是通过粪便口腔传染。1993年, 据Pensaert报告, 封闭种猪场的猪在断奶以后, 即使还存在母源抗体的情况下, 亦很快被感染, 这说明, PRCV通常感染新断奶仔猪而持续存在于猪群中。PRCV可一年四季存在于猪群中或者春夏两季临时消失, 在寒冷的月份里又会出现于猪群中(Pensaert, 1993)。这种无临床症状的感染却与欧洲的雨雾季节一致(Laude, 1993)。

在欧洲, 用阻断ELISA做TGEV血清流行性调查, 发现了PRCV的广泛传播(Brown和Paton, 1991; Lanza, 1993; Pensaert, 1993)。据报道, 在分别来自西班牙(Lanza, 1993)和英国(Brown和Paton, 1991)的育种母猪血清样品中, TGEV阳性检出率为零或非常低(0, 6%), 而从比利时屠宰场160头母猪血清也只有7, 6%的阳性率。因此, 在欧洲, TGEV感染的流行已经减少, 但在此期间PRCV却开始传播开来。

传播和贮主

TGE的主要流行特点之一是呈季节性, 即在冬天, 通常从11月中旬到翌年4月中旬。对这种季节性发病有数种解释。Haelterman(1962)认为这可能是由于病毒的特征, 因为此病毒冷冻时相当稳定, 但置于较高温度或阳光下就比较敏感。这使病毒冬季在猪场间传播有较大的可能性, 尤其是附着于无生命的物体上, 如在运输饲料和运输动物期间。观察显示如使环境温度显著降低或上下波动, 则肥育猪易于出现TGE临床症状(Shimizu, 1978; Shimizu 和 Shimizu, 1979a), 因此利于病毒病在冬季传播。

在两个流行季节期间, 什么是TGEV的宿主呢?Haelterman(1962年)认为至少有三种宿主: ① 病毒扩散呈亚临床症状的猪场; ②除猪以外的宿主; ③带毒猪。对本病持续存在最令人信服的解释是, 它以地方性流行方式存在于肥育猪(Morin, 1978)或不断有仔猪出生的猪场中。这些在温暖的数月中可以构成本病持续存在的疫源, 会造成冬季病毒传播。已发现在某些情况下如夏季, TGEV感染在育肥猪群中传播很慢, 所以, 这种观点较为可信(Maes和Haelterman, 1979)。

TGEV存在于猪以外的宿主也有证据，猫、狗和狐狸已被认为是TGEV从一个猪群传播到另一个猪群的可能带毒者，因为在不同的时间，它们通过粪便排出病毒(Haelterman 1962; McClurk in , 1970)，虽然，猫、狗对TGEV感染无临床症状(除重复感染狗外Klemm和Ristic,1976)且不产生抗TGEV抗体，但其所排出的病毒则能感染猪(Haelterman,1962; Reynolds和Garwes, 1979)。

冬天在猪饲养区，大量集中的燕八哥可能为TGEV机械地从一个农场传播到另一个农场提供了一条途径。Pilchard(1965)报道给燕八哥口服TGEV 32 h后，仍能从粪便中检测到TGEV。室内苍蝇(*Musca domestica*)也被认为是TGEV传播的可能媒介，有人从地方流行性猪场的苍蝇体内检测到TGEV抗原，而且试验感染苍蝇排毒能持续3天(Gough和 Jorgenson,1983)。

与TGEV传播有关的第三种可能是感染猪排出活毒时间的长短和带毒猪的作用。只有一篇报道称(Lee, 1954)在自然条件下，粪便排毒比通常报道的2周长得多(Pensaert, 1970a)，至于呼吸道排毒，感染后11天仍可从鼻棉拭中检测到病毒(Kemeny, 1975)，然而从肺匀浆中检出病毒可持续至感染后104天(Underdahl, 1975)。在TGE急性期(Kemeny, 1975; Kemeny 和 Woods,1977)给泌乳母猪乳房内接种TGEV后(Saif 和 Bohl,1983)都可从感染母猪奶中发现TGEV。最近的研究证明，TGEV抗原存在于乳腺组织中，这说明病毒可在泌乳母猪乳腺中增殖。如这篇研究报告所表明的那样，病毒通过乳汁传给仔猪可以部分地说明在一窝仔猪间迅速传播的原因。

尽管在肠道和呼吸道感染后104天仍可检出病毒，但不清楚这些病毒是否能以活毒形式从体内排出并导致新的感染。在已暴发TGE后的3~5个月，分别向该场增加易感猪，经血清学测定没有感染发生(Derbyshire, 1969)。

用PRCV通过鼻腔试验感染猪10天后仍带毒(Onno, 1989; Wesley, 1990b)，不过还不清楚需要多长时间，PRCV康复后的猪仍会传播。携带TGEV或PRCV病毒猪，其长期传播作用仍待进一步探讨。

临床症状

流行性TGE

仔猪的典型症状是短暂的呕吐，伴有或继而水样，通常黄色腹泻，体重迅速下降，

脱水以及2周龄以下猪的高发病率和高死亡率。仔猪严重腹泻并在粪便中经常含有小的未消化的凝乳块，粪便气味恶臭。临床症状的轻重、发病持续期长短和死亡率与猪的年龄呈负相关，大部分不足7日龄仔猪出现症状后2~7天死亡。大部分3周龄以上哺乳猪将存活，但可能在一段时间内体质虚弱。

生长期猪和育肥猪及母猪，其临床症状常只限于厌食和腹泻1至数天，偶尔伴有呕吐。极少数死亡可能是由于多种因素如应激或混合感染引起的，后者常发生于断奶仔猪。某些泌乳母猪发病严重，体温升高，无乳、呕吐、厌食和腹泻，这些严重症状可能是由于它们与受感染仔猪密切接触而受到病毒的严重感染或由于荷尔蒙变化而引起，后者影响易感性。相反，与感染仔猪无接触的母猪通常仅有轻微的临床症状或无症状。

潜伏期短，(通常为18 h~72 h，感染一般很快地传遍整个猪群，所以，大部分猪2~3天受到感染，而这种情况，在冬季比夏季更容易发生(Maes 和 Haelterman, 1979)。

地方流行性TGE

地方流行性TGE如在流行病学一节中所述，最可能发生在仔猪出生率高和TGEV或者PRCV血清阳性的大猪场。感染猪的临床症状与同龄易感猪相似但较轻微，死亡率低，尤其是将猪放置在温暖环境。哺乳仔猪的临床症状可能与“白痢”相似，后者最常由轮状病毒引起(Bohl, 1978)。在某些猪场，受管理情况制约，地方流行性TGE主要发生于断奶猪，而且可能与大肠杆菌、球虫或轮状病毒感染相混淆(Morin, 1983; Pritchard, 1987)。

猪呼吸道冠状病毒

PRCV所引起的临床症状及严重程度取决于不同的PRCV毒株，据推测，产生这种现象与由于轻度的基因缺失的不同有关。另外，猪群感染其它呼吸道病毒尤其感染PRRSV，也可改变其疾病的严重程度和临床症状。基本上呼吸疾病的症状决定于多种因素，包括环境、季节、管理、病毒量的多少以及其它细菌和病毒在猪群中的感染状况(Van Reeth和Pensaert, 1994a, b)。

试验感染育肥猪时，只有短时间的体重下降。与对照猪比较，4~6日龄的试验感染PRCV猪只有体增重率下降情况(Vannier, 1990; Lanza, 1992; Van Reeth, 1996; Wesley和Woods, 1996)。

许多欧洲和美洲的PRCV毒株常呈亚临床感染。通过组织学检查，有轻微的间质性肺炎发生(Van Reeth 和 Pensaert,1992; Laude, 1993; Enjuanes 和 Van der Zeijst,1995)。一项研究表明，在相同条件下，不同的北美PRCV毒株，其发病机理亦有差别(Halbur, 1994)。AR310和LEPP，都是S基因缺失的PRCV分离毒，它们在感染猪4~10天都能产生中度的呼吸道疾病，而同时感染第三美国毒株(1894)的猪却只产生轻微的呼吸道疾病。不过，如果病毒感染量较低，即使是在无特定病原猪群中感染AR310，也无临床症状产生(Halbour, 1993)。用分离自加拿大魁北克的PRCV(IQ90) 108, 5 TCID₅₀感染1周龄猪，可引起严重肺炎，其死亡率达60%。值得注意的是，同窝仔猪通过接触感染PRCV，估计其感染的病毒量较小，它们的临床症状仅有呼吸加快和发热(Jabrane, 1994)。用高剂量的PRCV接种猪只能导致长期带毒(VanCott 等, 1993)。通过试验感染PRCV后所见到的临床症状可能与病毒感染量、感染猪的年龄以及接种技术有关，同时，猪群的健康状况及治疗对所得的研究结果也有影响(Vannier,1990)。

PRCV除了单独感染外，也能与其它呼吸道病毒或致病微生物共同感染猪。这种情况常发生在将不同来源猪重新组合的保育舍或育成、育肥舍(Van Reeth和 Pensaert,1994a)，调查发现，所谓“双重”感染比单独感染严重。当试验感染PRCV 2天后，再感染流感病毒或猪伪狂犬病毒，明显增加其呼吸症状的严重程度(Van Reeth 和 Pensaert, 1994b; 1996)。用PRCV再感染被PRRSV感染的猪，可延长由于呼吸病所引起的发热时间，并降低增重率或者长期带PRCV Hayes 等, 2000; Van Reeth 等, 1996)。由于多种呼吸道病毒和细菌广泛存在于猪群中，它们与PRCV混合感染可导致严重的呼吸道疾病，而这种发病机制，尚需进一步研究。

发病机理

对TGE的发病机理已做过论述(Hooper和Haelterman,1966; Moon,1978; Shepherd, 1979)。发病早期可描述如下：TGEV被吞咽后，首先感染小肠粘膜，并由于功能上皮细胞迅速大量脱落，而引起肠绒毛萎缩。

病毒在肠道的增殖

无论是口腔还是鼻腔途径感染，病毒都被吞咽进入消化道，它能抵抗低pH和蛋白水解酶而保持活性直至与高度易感的小肠上皮细胞接触。大量此类细胞感染，其功能迅速

遭破坏或改变,导致小肠内的酶活性明显降低,扰乱消化和细胞运输营养物质和电解质,引起急性吸收不良综合征(Moon, 1978), Hooper 和 Haelterman(1966)认为感染猪不能水解乳糖,也可能不能消化其它营养物质,导致对小猪至关重要的营养物质的明显缺乏,而且他们认为,未消化乳糖存在于肠道内,使渗透压升高,导致体液滞留甚至从身体组织内吸收体液,进而导致腹泻和脱水。

TGEV感染猪引起腹泻的其它机制包括空肠钠运输的改变和血管外蛋白质丢失(Prochazka, 1975),前者引起肠道内电解质和水积聚(Butler, 1974)。死亡的最终原因可能是脱水和代谢性酸中毒以及由于高血钾而引起的心功能异常。

空肠绒毛明显变短或萎缩(图30, 3),回肠稍轻微,但十二指肠近端通常不发生变化(Hooper和 Hael lerman,1966)。新生仔猪比3周龄猪的病毒增殖多,且绒毛萎缩严重(Moon, 1973; Norman, 1973),说明新生猪对TGEV更易感。对这种临床发病抵抗力与年龄因素相关的机制解释如下:第一,大龄猪受感染的绒毛上皮细胞可很快被游走的利贝昆(Lieberkühn)滤泡上皮细胞所取代,可部分地说明其死亡率比新生猪低的原因。Moon(1978)报道,3周龄猪小肠内更换绒毛细胞的速度比新生仔猪快3倍。据报道,这些新绒毛细胞可抵抗TGEV感染(Pensaert, 1970b; Shepherd, 1979),这可能是由于免疫应答、干扰素(LaBonnardiere和Lau de,1981)或这些新生细胞不能支持病毒生长;第二,TGEV在新生猪绒毛吸收细胞的尖端小血管系统积聚增殖,而3周龄以上猪缺少这个系统(Wagner, 1973);第三,病毒剂量在感染中可能起主要作用。Witte和Walther(1976)证明感染市售猪(约6月龄)所需TGEV剂量比感染2日龄仔猪所需要剂量大10,000倍。

然而,对于以下情况,TGE临床症状也会更严重:①饲喂缺锌饲料(Whitenack,1978);②贫血(Ackerman, 1972);③低温环境或室温波动大(Shimizu, 1978);④注射合成皮质类固醇、地塞米松(Shimizu 和 Shimizu,1979a),关于最后两项,认为其机制是干扰了局部细胞介导免疫应答的早期活动(Shimizu 和 Shimizu,1979a)。

TGEV细胞培养弱毒株不能感染前段小肠上皮细胞,这可能解释了这类弱毒株引起腹泻不像强毒株那样严重的原因(Frederick, 1976; Hess, 1977; Furuuchi, 1979; Pensaert, 1979),而且TGEV细胞培养致弱程度与小肠感染程度呈负相关(Hess, 1977)。

TGEV细胞培养弱毒株与致弱大肠杆菌混合感染无菌猪比分别单独感染引起更为严

重的疾病(Underdahl, 1972), 已有报道, TGEV和大肠杆菌或猪轮状病毒混合感染(Hornich, 1977 ; Theil, 1979)。

病毒在肠外的增殖部位

TGEV 虽然口腔食入是最常见的病毒入侵途径, 但鼻腔和空气感染亦为重要, 但比之PRCV传播, 其重要性要小得多。从鼻腔或口腔接种悉生猪的肺部可见肉眼病变, 但无肺炎临床症状(Underdahl, 1975)。一篇最初的报道指出, 在新生猪肺泡巨噬细胞中有TGEV存在, 说明这些细胞在肺感染中的可能作用。然而, 只有已适应细胞培养的TGEV, 在体外培养肺泡巨噬细胞上能增殖, 强毒株却不能增殖(Laude, 1984)。已有报道TGEV高度致弱株在上呼吸道和肺能增殖, 但不能在新生猪肠内增殖, 与PGEV感染相似(Furuuchi, 1979)。有趣的是, 在TGEV强毒株和弱毒株的S基因有2个氨基酸的改变(核酸位点219和655)说明这种变化改变了呼吸的定向(Ballesteros 等, 1997; Sanchez 等, 1999)。而且, 在感染仔猪 (Van Cote, 1993)和哺乳感染仔猪的母猪鼻腔里都检出了携带的TGEV(Kemeny, 1975)。

此外, 研究表明, TGEV能在泌乳母猪乳腺中增殖(Saif和Bohl, 1983), 而且感染猪通过乳汁排毒(Kemeny 和 Woods, 1977)。对野外条件下TGEV可能感染乳腺的意义尚不清楚。无论是它对泌乳缺乏(常在TGEV感染母猪中见到), 还是对仔猪感染的迅速传播是否起作用值得研究。

虽然TGEV自然感染猪胎儿尚无报道, 但给胎儿注射, 能引起绒毛萎缩和TGEV抗体的产生(Redman, 1978)。

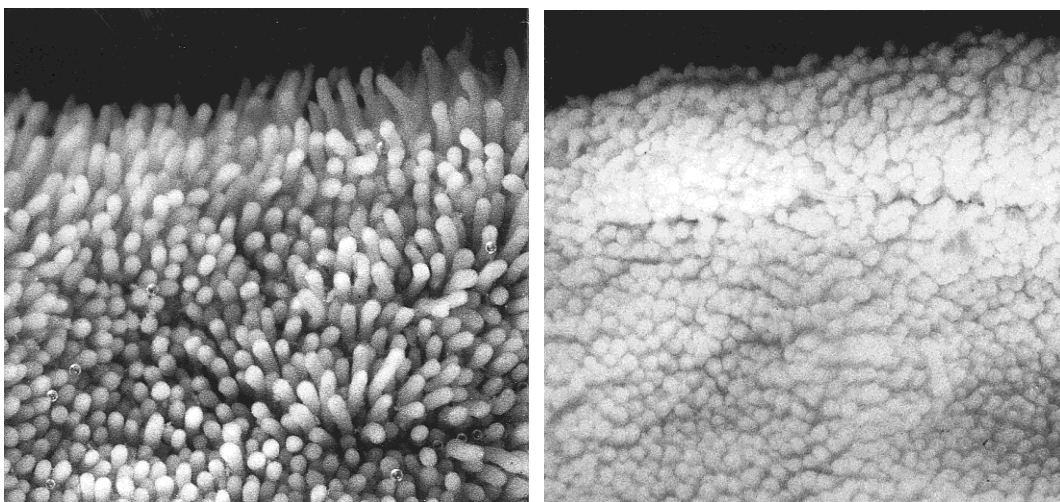


图30, 3正常猪空肠绒毛(A)和TGEV感染猪空肠绒毛(B), 此为通过解剖镜观察, 约×10

PRCV PRCV亲嗜呼吸道细胞, 它在猪的肺中繁殖, 且病毒滴度高 (107–108 TCID₅₀), 它也感染鼻腔、气管、大小支气管、肺泡的上皮细胞和肺泡巨噬细胞(Pensarte, 1986; O'Toole, 1989), 感染PRCV 后发生毒血症, 且被传送到实质器官和淋巴结。

在小肠中, 只有少数分散细胞含有PRCV抗原, 即使将病毒直接注入小肠腔也是这样。被感染PRCV的细胞位于小肠绒毛囊层里或底部, 而病毒则不扩散到周围其它细胞中(Cox, 1990a, b) 。PRCV在小肠里有限繁殖的现象解释了为什么在PRCV感染猪的粪便中难以检测到病毒的原因 (Van Cott, 1993, 1994)。

研究人员试图用不中和单克隆抗体的变异株和基因重组TGEV病毒株, 以分子为基础, 研究TGEV和PRCV之间在致病性和组织嗜向性方面的差别(Bernard 和 Laude,1995; Ballesteros, 1997)。据Bernard 和 Laude(1995)报道, 用抗S蛋白位点D选择的大多数TGEV(Purdue115株)抗单克隆抗体变异株对猪的小肠致病性减弱, 它们与S蛋白基因上的位点变异或小的缺失有关, 而这种基因编译了S蛋白N末端的亚位(PRCV株缺失区与之相似)。依据TGEV肠/呼吸道(PUR46) 和呼吸道(PTV)两种病毒的重组物并通过PUR46重组物感染猪的观察结果Ballesteros(1997)断定, PUR46重组S蛋白中的第219氨基酸替代物是起着丢失嗜小肠性的作用。由此, 作者推测TGEV感染小肠上皮细胞需要S蛋白(氨基酸219周围)上两个不同的区域: 一是粘连细胞受体胺肽酶N; 另一个则可能是粘连尚未鉴定的某种小肠共受体。

病理变化

TGE肉眼病变

除脱水外, 肉眼变化常局限于胃肠道, 胃内充满凝乳, 粘膜充血或有或无。Hooper和Haelterman(1969)报道, 感染后3天扑杀猪, 约50%在胃膈侧憩室边上有出血小区。

小肠充满黄色的常常是泡沫性的液体, 并且一般含有未消化的凝乳块。肠壁菲薄, 几乎透明, 可能是绒毛萎缩引起的, 虽然肺部病变已在试验感染的悉生猪肺部看到(Underdahl, 1975), 但对自然感染尚无报道。

亚肉眼病变(Subgross)

TGE的一个很重要的病变是空肠和回肠绒毛明显变短, Hooper和Haelterman(1969)

把这种变化叫做绒毛萎缩(图30, 3), 然而, 这也见于轮状病毒腹泻, 但一般不如TGE严重或广泛(Bohl, 1978)。据报道, 某些大肠杆菌株和球虫也产生这种病变(Hornich, 1977)。不过在地方流行的许多猪群中, 其病理变化及小肠绒毛萎缩的程度差异很大(Pritchard, 1987)。

显微病变

绒毛萎缩的程度, 可通过组织切片比较空肠绒毛的长度与利贝昆滤泡的深度来判断。正常仔猪绒毛与滤泡比约为7:1, 在被感染仔猪相应比值约为1:1(Hooper 和 Haelterman, 1969)。据报道在实验攻毒的8周龄猪中的其它病变, 包括派尔氏淋巴集结上的圆顶上皮微小溃疡, 尤其是小肠的前部(Chu, 1982a)。

扫描电镜(EM)已用来揭示TGE小肠病变的形成(Waxler, 1972; Moxley 和 Olson, 1989b)。而且与光学显微镜下观察的病变相关性好。Moxley和Olson在1987年通过扫描电镜发现, 在被TGEV感染猪, 其被动免疫水平不但影响绒毛萎缩的程度, 还会影响它们的分布, 未感染TGEV母猪或用活弱毒苗免疫母猪将它们所产仔猪与曾用强毒感染的母猪所产仔猪相比, 后者绒毛萎缩程度有限。在部分免疫保护的猪中最初见到绒毛萎缩是在回肠而非空肠。从地方流行TGE的猪群, 也观察到类似现象。小肠上皮细胞被TGEV感染后经透射电镜观察, 揭示了微绒毛、线粒体、内质网和其它细胞器的变化。病毒颗粒主要位于细胞浆空泡中, 在肠绒毛细胞和派尔氏淋巴集结圆顶区的M细胞、淋巴细胞和巨噬细胞中也观察到有病毒颗粒(Thakc, 1968; Wagner, 1973; Chu, 1982 a)。

PRCV病变

如前所述, 绒毛萎缩尚未在感染PRCV猪中观察到。但是, 镜检无症状猪的肺脏表明, 在绝大多数被PRCV感染猪中, PRCV可引起扩散性间质炎症(O'Toole, 1989; Van Nieuwstadt 和 Pol, 1989; Cox, 1990a), 其它一些较严重的呼吸道病变的报道, 与PRCV的病毒株和对实验猪的感染剂量有关(Halbur, 1993, 1994; Jabrane, 1994; Paul, 1994)。

免疫预防

主动免疫 猪口服强毒TGEV感染后, 主动免疫的机制和持续期尚未彻底搞清。育成期猪肠内感染, 可测到的血清抗体至少维持6个月, 也可能维持数年(Stepanek, 1979)。血清抗体滴度尽管可作为TGE血清学诊断方法, 但不能显示主动免疫活动的程度。TGE

康复猪可抵抗以后的攻毒，主要是由于肠粘膜局部免疫(Van Cott, 1994; Saif, 1994; Brim, 1995)。首次感染的年龄及免疫状况和攻毒的强弱会大大影响这种主动免疫的完善程度和持续期。

肠主动免疫的机制，可能与刺激分泌IgA(SIgA)免疫系统有关，固有层内淋巴细胞分泌肠内sIgA抗体(Van Cott, 1993, 1994; Saif, 1994)。IgA和分泌抗体细胞(ASCs)已经从口腔途径接种TGEV后猪的肠液和血清中检出，而肠道外接种途径接种的猪则检不出(Kodama, 1980; Sprino 和 Ristic, 1982; Van Cott, 1993, 1994; Saif, 1994)。Kodama(1980)认为，血清中IgA抗体的检测，如果源自肠道，可作为TGE主动免疫的指标。在另一项研究中，给悉生猪口服TGEV后5天到至少35天(DPE感染后天数)，其血清和肠内产生可测到的TGEV中和抗体(Saif, 1976)。IgM免疫细胞(5~15 DPE)和IgA免疫细胞(7~35 DPE占主导)，亦在被感染悉生猪肠固有层中检测到。最近，免疫酶联点(ELISPOT)技术，已被用来检查全身和局部肠有关淋巴组织(GALT)中IgA和IgG抗体活动。只有TGEV强毒株才能刺激GALT产生大量IgA抗体分泌细胞，而活的TGEV弱毒株(疫苗)或PRCV只诱导产生极少量的IgA(抗体分泌细胞)(Van Cott, 1993, 1994; Saif, 1994; Berthon, 1990)。这些研究和其它研究(Stone, 1982)表明，猪在出生时，即具备产生体液抗体和粘膜抗体的免疫能力。不过，在小肠中，需要更长的成熟时间，才能达到成年猪抗体免疫应答水平。

除局部抗体介导免疫外，细胞介导免疫(CMI)应答在抗TGEV感染的主动免疫中也起重要作用。数种试验已用于证明CMI对TGEV的作用，包括巨噬细胞移动抑制试验(Frederick 和 Bohl, 1976)，白细胞移动抑制试验(Woods, 1977; Liou, 1982)，直接淋巴细胞性细胞毒的试验(Shimizu 和 Shimizu, 1979b)，淋巴细胞增殖反应(Shimizu 和 Shimizu, 1979c; Welch, 1988; Brim, 1994, 1995; Anton, 1995, 1996)，同步细胞介导细胞毒性试验(SCMC)和抗体依赖性细胞介导细胞毒性试验(ADCC)(Cepica和Derbyshire, 1983)。对CMI抵抗TGEV感染的作用只有间接证据。口服强毒TGEV感染猪肠相关淋巴组织的淋巴细胞(GALT)证实CMI的作用(Frederick 和 Bohl 1976; Shimizu 和 Shimizu 1979c; Welch, 1988; Brim, 1994, 1995); 非肠道或口鼻接种弱毒TGEV或PRCV使猪只在全身许多部位(脾或外周血液淋巴细胞)发生CMI。口腔感染6月龄猪后，CMI

在肠相关淋巴组织而不是全身淋巴细胞至少持续110天(Shimizu 和 Shimizu,1979c), 而感染 7~11日龄仔猪, 则仅需14~21天就产生CMI(Welch, 1988; Brim, 1994)。最新证实, CD4 T辅助细胞(T Helper cell)参与对TGEV淋巴细胞增殖反应(Anton, 1996)。用TGEV弱毒疫苗或者重组TGEV疫苗免疫母猪证实了对TGEV的淋巴细胞增殖反应和乳腺免疫之间有相关性(Park 等, 1998)。虽然, 淋巴细胞增殖研究表明, 每一种TGEV中的三种主要蛋白质每一种都存在着T细胞抗原位点, 而T细胞抗原位点起主要作用的是蛋白N(N321) (Anton, 1995)。N321肽诱导T细胞而在体内协助合成中和抗体即抗蛋白S的特异性抗体。研究人员还进一步报道, 体内高滴度抗TGEV特异性抗体(从在体外被TGEV激活的肠系膜淋巴细胞), 需至少两种TGEV结构蛋白的刺激即蛋白S和N, 它们能最大限度的刺激免疫应答。这个发现, 对TGEV亚单位(Subunit)的最佳设计及抗TGEV重组疫苗都有重大影响。

新生仔猪缺乏淋巴细胞的细胞毒性, 而在临产母猪中, 此细胞毒性下降, 曾认为缺少杀伤TGEV感染细胞的杀伤(K)和自然杀伤(NK)活性可能与新生仔猪和临产母猪对TGEV感染的敏感性增加有关(Cepica和Derbyshire, 1984), 所以, CMI通过一种或全部SCMC, ADCMC或致敏T淋巴细胞介导细胞毒性的联合作用来快速消除TGEV感染的上皮细胞, 在TGEV感染猪的康复或抵抗再感染中可能起到一定作用。

PRCV 在欧洲, 随着PRCV的广泛流行, TGE流行暴发急剧减少, 这使欧洲猪病研究人员提出是否猪呼吸道冠状病毒能诱导肠主动免疫从而预防TGEV。多项研究一致认为, 光感染PRCV的哺乳或断奶猪再攻毒TGEV可部分地对TGEV攻毒起免疫保护作用, 且不同程度的缩短了病程, 减少了TGEV的排毒量和减轻了腹泻症状(Cox, 1993, Van Cott, 1994; Brim, 1995, Wesley 和 Woods,1996), 这种部分免疫机制大概与TGEV中和抗体滴度迅速增加有关(Cox, 1993; Wesley 和 Woods,1996), 同时也与已观察到的在先前已感染PRCV猪的肠道内IgG、IgA抗体分泌细胞的数量迅速增加有关(Van Cott, 1994; Saif, 1994)。研究人员推测, 这种PRCV特异性抗体IgG和IgA(ASCs)从与支气管有关的淋巴组织(BALT)迁移到PRCV感染的肠中去的现象可解释为: 这是迅速免疫记忆应答, 在经攻击TGEV强毒后, 而诱发了部分抗体保护。不过, 在感染PRCV的新生猪, 至少需要6~8天时间来完成此种抗TGEV的部分免疫(Wesley 和 Woods,

1996)。因此，在TGEV流行期间，用这种主动免疫方法来保护血清学阴性新生猪可能太迟。

被动免疫 被动免疫为新生仔猪抗TGEV感染提供及时保护非常重要。猪出生时，无免疫球蛋白(Igs)，出生后通过初乳获得。初乳中的Igs主要是由IgG组成，体现为血清渗出液从母体转移到仔猪，通过肠上皮进入循环，这样为新生仔猪提供了像母猪那样足量的血清抗体(Porter 和 Allen, 1972; Bourne, 1973)。这些体液抗体的功能主要是抵抗全身感染而非肠内感染(Hooper 和 Haelterman, 1966)。哺乳期第一周IgG浓度开始减低，成为乳中占主要成分的Ig(Porter 和 Allen, 1972)。sIgA是乳腺组织内来源于肠道的细胞分泌的(Roux, 1977)。sIgA乳汁抗体不被仔猪吸收，但在肠道被动免疫中起重要作用。

被动免疫抵抗TGEV感染的机理已有(Pensaert, 1979; Saif Bohl, 1979a, 1981a; Saif, 1985; Saif 和 Theil, 1990)介绍，TGE康复猪可将被动免疫传给它们的哺乳仔猪(Bay, 1953)。哺乳仔猪由于经常吞食含有TGEV中和抗体的初乳或常乳而获得保护。这些抗体在肠腔内能中和被食入的TGEV，从而保护易感的小肠细胞。Haelterman(1963, 1965)把这种免疫机制称乳汁免疫，这是当免疫母猪让其仔猪约每两小时哺乳一次而自然完成的。被动免疫也可通过连续让仔猪口服抗血清而人工完成(Haelterman, 1963; Noble, 1964)。

母猪初乳和常乳中的TGEV抗体主要与IgA和IgG有关(Abou, Youssef 和 Ristic, 1972; Bohl, 1972; Saif, 1972)。乳内IgA类TGEV抗体提供最有效的保护，但IgG类乳内抗体如保持高滴度，或人工饲喂初乳IgG也有保护作用(Bohl 和 Saif, 1975; Stone, 1977)。IgA类TGEV抗体具有更大效力的可能原因包括：①它们在乳中滴度较高(Porter 和 Allen, 1972)；②对蛋白水解酶抵抗力较强(Underdown 和 Dorrington, 1974)和③它们选择性地与肠细胞结合(Nagura, 1978)。乳中IgG类抗体是胃肠外途径或全身受抗原刺激后产生的，而IgA的存在则是由于肠道感染。为解释经肠道感染后乳中IgA类TGEV抗体的产生，曾认为IgA免疫细胞在肠内经抗原致敏后转移到乳腺定位，并将IgA抗体分泌到初乳和常乳内(Saif 和 Bohl, 1979b, 1981a; Saif, 1985; Saif 和 Theil, 1990; Saif, 1994)。首先提出在TGEV感染中，这种“肠-乳腺”免疫轴对设计适宜的免疫程序(Bohl, 1972; Saif, 1972)，以提供有效的乳汁免疫是很重要的概念。

诊断

实验室诊断Bohl(1981)对此已有过综述。收集和保存适当的样品对确诊是必要的。虽然绒毛萎缩是严重感染猪的共同病变，但同样也发生于其它肠道传染病(轮状病毒、猪流行性腹泻、球虫病、有时是大肠杆菌)。TGE的实验室诊断通常要进行下列一种或几种检查病毒抗原的检测，病毒核酸的检测，病毒显微镜检测，病毒的分离、鉴定，或有效抗体应答的检测。

遗憾的是，由于没有一种多克隆抗体能区分TGEV和PRCV，所以，血清学试验结果变得复杂化。然而，综合临床症状、病理学检验和病毒在组织中的分布可提供初诊的依据。由于PRCV不能造成腹泻或绒毛萎缩以及只能在呼吸道组织中繁殖，以此可区别于TGEV(Pensaert, 1989; Pensaert 和 Cox, 1989)。因此，如果在肺组织中测出抗原，用血清样品同时做PRCV和TGEV病毒中和试验，且结果皆阳性，临床又无肠道疾病症状，则可确认为PRCV。

病毒抗原检测

在小肠上皮细胞中检测TGE病毒抗原或许是诊断仔猪TGE的简单和最常用的方法。IF (Pensaert, 1970a)和免疫过氧化物酶(Becker, 1974; Chu, 1982b; Shoup, 1996)技术都可应用，但前者较常用。为获得最佳结果，可于腹泻早期将猪扑杀，将空肠和回肠粘膜刮取物(Black, 1971)或将空肠或回肠制备冷冻切片进行直接(图30, 4)或间接IF染色。粘膜刮取物通常提供较多的肠粘膜样品。IF试验中可能遇到的问题包括：①试剂缺乏敏感性或特异性(直接或间接荧光抗体必须无其它肠道病原体抗体，尤其是轮状病毒)；②腹泻早期感染细胞脱落前未取得样品(仔猪必须“安乐死”后取样)；③与FIPV、CCV和PRCV有交叉反应。不过，PRCV在肠绒毛囊繁殖并非多见。若IF或免疫过氧化物酶试验呈阳性，并伴有腹泻症状，则几乎肯定为TGEV。

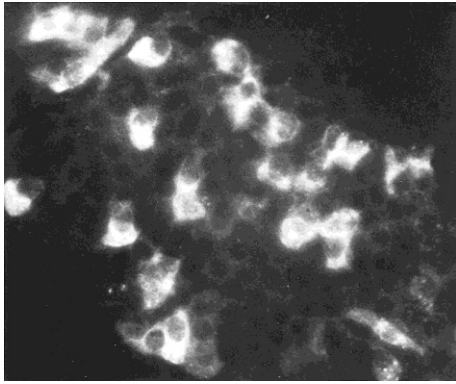


图30, 4TGEV感染猪的免疫荧光细胞压片来自空肠刮取物, 用荧光抗体直接法染色。(×350)

最近, 一种用抗TGEV高糖蛋白N的单克隆抗体免疫过氧化物酶技术来检测TGEV(小肠组织)或PRCV(肺), 样品用福尔马林固定, 石蜡包埋组织(Shoup, 1996), 如同病理组织学一样, 可在同一个组织样品, 既可诊断TGEV, 又可诊断PRCV, 同时, 也能依据PRCV和TGEV在组织上的存在进行对比。虽然, 多克隆抗体不能区分TGEV和PRCV, 但一些单克隆抗体只与TGEV反应而不能与PRCV结合。这些能区别此两种病毒的单克隆抗体已被用于IF和免疫过氧化物酶试验中(Garwes, 1988; Van Nieuwstadt 和 Pol, 1989), 用上述两种试验方法已在呼吸道组织和鼻腔上皮细胞中检测出PRCV, 但仍需用不同的单克隆抗体来进一步证实, 因为TGEV的肠道病毒株也能在这些组织中繁殖。

用抗TGEV单克隆或多克隆抗体双层夹心ELISA已被广泛应用于检测在细胞培养、粪便和肠内容物中的TGEV(Bernard, 1986; Van Nieuwstadt, 1998; Lu, 1991; Cornaglia, 1994; Lanza, 1995)和在鼻分泌物及肺组织匀浆中的PRCV(Cornaglia, 1994)。ELISA是一种快速且适用于从活猪中取得大量样品的诊断方法。

病毒核酸检测

近年来, 已发展了用核酸杂交探针技术来检测粪便样品, 感染组织或感染细胞中的TGEV基因序列(Shockley, 1987; Benfield, 1991)。核酸探针是从TGEV外包膜蛋白突起基因的5'末端而来, 它能将TGEV和PRCV明显区别开。在杂交试验中, 用这些探针可区别不同的肠TGEV 毒株, 它们分离自美国、日本、英国包括美国的活弱毒TGEV疫苗株和PRCV, FIPV和CCV的分离物(Bae, 1990; Wesley, 1991a)。RT-PCR和非放射性标

记物cDNA探针也已被用来区分TGEV和PRCV分离物(Vaughn, 1994, 1996)。通过设计针对PRCV毒株的S基因的缺失区域的引物区分TGEV和PRCV。

病毒的电镜检测

通过负反差透射电镜证明, 在感染猪肠内容物和粪便中有TGEV(图30, 5)(Saif, 1977)。而且, 免疫电镜(IEM)比常规EM技术更好, 前者对检测临床样品或细胞培养物中的TGEV更敏感, 并可提供病毒血清学鉴定。此外, 用IEM更易区分TGEV和常见的膜类碎片, 而且同时可检测其它肠道病毒的存在(Saif, 1977)。在我们实验室IEM检测TGEV至少与IF敏感性相同, IEM也能检测鼻分泌物中的PRCV(L, J Saif, 1977), 不过, 虽然粪便样品中不会有大量的PRCV存在, 如不用单克隆抗体, 这种方法也不能区分TGEV 和 PRCV(Van Cott, 1993, 1994)。

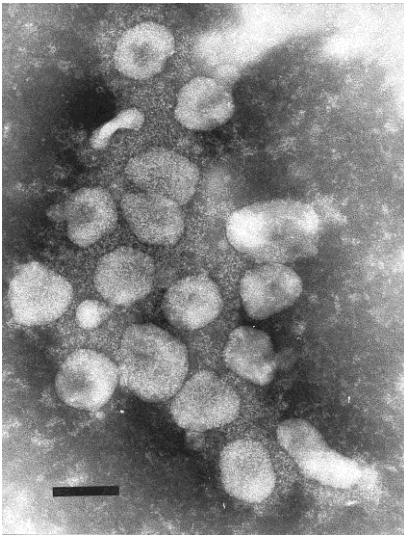


图30, 5形成的典型病毒-抗体结合物通过IEM观察到的TGEV和无特定病原猪抗TGEV血清反应

病毒的分离与鉴定

经口服感染仔猪也许是分离或检测TGEV最敏感的方法(Dulac, 1977)。然而, 这种方法成本很高, 因此, 常用细胞培养, 原代和次代猪肾细胞(Bohl 和 Kumagai, 1965)、猪肾传代细胞系(Laude, 1981)、猪唾液腺原代细胞(Stepanek, 1971)、猪甲状腺原代细胞(Witte, 1971)以及McClurkin ST传代细胞(Mc Clu rkin 和 Norman, 1966)已成功地用来从被感染猪的粪便及肠道内容物分离TGEV。然而, 某些批次的猪甲状腺细胞受细小

病毒污染或许是使用这种细胞的一个缺点(Dulac, 1977)。初次分离野毒株可能没有明显的细胞病变(CPE), 需连续传代才出现明显的CPE。在ST或猪甲状腺细胞上的典型CPE由具有膨胀的、圆形或长形外观如气球的细胞组成(Kemeny, 1978)。ST传代细胞已用于CPE、蚀斑或IF试验以检测TGEV野毒株(Kemeny, 1978; Bohl, 1979)。为检测病毒CPE或蚀斑, 在细胞培养液中加入胰酶制剂或胰蛋白酶(Bohl, 1979; Woods, 1982)和使用较老的细胞(Stark, 1975)可进一步提高ST细胞的敏感性。Pocock和Garwes(1975)报道, 在次代猪甲状腺细胞用弱酸性营养液时TGEV增殖滴度最高。猪肾细胞, 特别是ST细胞已被用于PRCV的分离, 而PRCV也能在猫胎儿传代细胞系中生长(Laude, 1993)。鼻液棉拭子和肺组织匀浆是分离PRCV材料, CPE的形成过程与TGEV相似, 并逐渐可见到合胞体(Pensaert, 1989; Pensaert 和 Cox, 1989)。与SARS冠状病毒在体外培养细胞造成相同的病变(Ksiazek 等, 2003; Peiris 等, 2003)。

用特异性TGEV抗血清通过VN, IF或IEM能够鉴定细胞病毒培养物。不过, 需要用抗TGEV的单克隆抗体来进一步证实以排除PRCV的可能(Garwes, 1988; Laude, 1988)。也可用RT-PCR或cDNA探针将他们区分(Laude, 1993; Enjuanes 和 Van der Zeijst, 1995)。不会发生令人糊涂的与CCV和FIPV交叉反应, 因为, 这些病毒不会生长在ST或次代猪甲状腺细胞上(Reynolds, 1980)。

血清学诊断

检测TGEV抗体在几个方面有助于诊断和控制TGE。然而, 由于包括TGEV和PRCV中和反应极其相似(Pensaert, 1989; Pensaert 和 Cox, 1989), 使TGEV的血清学诊断变得复杂。必须用阻断ELISA试验(后述)来将其抗体区分。只引进血清学阴性猪也将有助于猪场保持无TGEV和PRCV。急性期和康复期血清样品之间抗体滴度上升是流行性TGE和感染PRCV可靠的诊断方法。猪群的有关病史和血清抗体水平有助于解释血清学检测结果。为判定一个猪场中地方流行性TGE或PRCV是否存在, 可以检测2~6月龄猪的血清。这个年龄的猪群缺乏被动获得免疫抗体(Derbyshire, 1969), 因此, 阳性结果表明有地方流行性TGE或PRC。血清学试验可用于监测一个猪场中TGEV或PRCV感染情况。(Cartwright, 1968; Vannier, 1982)。

TGEV抗体可以通过数种不同血清学方法检测, 最常用的是VN试验, 通过各种不同

方法在不同细胞培养系统中使用细胞培养适应病毒：微量滴定板(Toma和Benet, 1976) CPE抑制试验和蚀斑减数试验(Bohl和Kumagai,1965; Thomas和Dulac,1976)最普遍。感染TGEV后7~8天即可检测出血清中和抗体，而且至少可持续存在18个月。很少资料报道有关PRCV中和抗体的持续时间。已经建立了非常敏感ELISA试验(Nelson和Kelling, 1984 ; Paul, 1986; Hohdatsu, 1987; Garwes, 1988; Bernard, 1989; Callebaut, 1989; Van Nieuwstadt, 1989; Berthon, 1990)已有论述，但此法均需要浓缩纯化病毒或者S基因包被ELISA板。在恢复期猪中未能证明有补体结合抗体(Dulac, 1977)。

用阻断ELISA试验进行PRCV和TGEV在血清学上的鉴别

用TGEV单克隆抗体研究表明，一些在TGEV的抗原位点，而在PRCV蛋白上却没有(Laude, 1988 ; Callebaut, 1989; Sanchez, 1990; Simkins, 1992, 1993)。因此，TGEV上的一些抗原决定簇，由于在PRCV蛋白缺失而没有。TGEV单克隆抗体粘附PRCV的能力不同为血清学试验基础，以此检测猪群是否被TGEV或被PRCV感染(Garwes, 1988; Bernard, 1989; Callebaut, 1989; Van Nieuwstadt和Boonstra,1992; Simkins, 1993)。在阻断ELISA试验中，TGEV抗原皆与抗TGEV和PRCV血清发生反应，而与抗TGEV单克隆抗体反应却不相同。由于抗TGEV血清中含有竞争性抗体而与抗原结合，从而阻断了单克隆抗体与之吸附的机会。相反，抗PRCV血清中无竞争性抗体存在，而不能阻断单克隆抗体与抗原吸附的机会。因此，若ELISA试验结果为阴性(No Blocking)，同时中和试验(VN)为阳性者，则为PRCV感染。由于某些感染猪TGEV和PRCV的抗体滴度较低，评价这个试验结果时，需以整个猪群来考虑，原因可能是这是早期感染(7~14天)或者感染某些TGEV毒株可能诊断不出的缘故(Callebaut, 1989; Van Nieuwstadt Boonstra,1992; Simkins, 1993)。近来，从发生PRCV感染的国家出口没有TGEV的猪，只有这个实验可提供TGEV血清学阳性动物与PRCV不同的资料。现在，用以区分美国的TGEV和PRCV可靠的商用ELISA试剂，仍在研究中。

预防和治疗

治疗

特异性治疗TGE的抗病毒制剂尚未研制成功。已报道抗病毒金刚烷胺(Dimitrov,1982)和Isathiazone化合物对TGEV细胞培养中的增殖有抑制作用(Potopalsky, 1983)。虽然在

TGE感染早期，于猪肠中可检测到高水平1型干扰素，但干扰素在TGE的恢复或致病机理中的作用尚无定论(LaBonnardiere 和 Laude,1981)。最新研究表明，干扰素可能激活新生仔猪体内的自然杀伤性细胞(natural killer cell)，它对TGEV的感染起着某种程度的抑制作用(Lesnicks和Derbyshire,1988；Loewen 和 Derbyshire,1988)。另外，在TGE暴发期间，用1~20 IU人 α 干扰素给 1~12日龄的仔猪口服，连续4天，其存活率明显高于未给药猪(Cummins, 1995)，不断给刚出生的新生猪口服 α 干扰素其存活率却未见增加。这种对TGEV感染仔猪昂贵但有效的治疗仍需要评估。

目前可行的治疗方法仅仅是减少饥饿、脱水和酸中毒。非肠道补液、补充电解质和营养对治疗小猪有效，但对于猪场不实用，而宜用口服电解质溶液和葡萄糖溶液治疗仔猪(Moon,1978)。建议采取以下措施：提供温暖(最好32℃以上)无穿堂风和干燥的环境，并让口渴的TGEV感染猪可自由接近水或营养液。这些措施将会减少受感染的3~4日龄以上猪的死亡率。抗细菌治疗对2~5周龄猪有益，特别是对发生与大肠杆菌致病株的混合感染。当发生疾病时，交叉哺乳或将已感染,或易感的同窝仔猪哺乳于TGE免疫母猪是有用的(Stepanek, 1979；Pritchard,1982)。

管理

防止TGEV侵入猪场 潜伏期或那些排毒或带毒的猪是TGEV侵入猪场的来源，为避免发生侵入，预防措施是从无TGEV猪场引进猪，并且是血清学阴性和将这些猪在并群前在猪场隔离2~4周。一个常见的问题是在TGE暴发后多久，猪只可被移入猪场而不传播TGEV？对这个问题合乎实际的回答是，在本病症状消失后4周，才能将这种猪引入“清洁”猪场。

燕八哥是冬季本病在猪场间的传播者，主要由于它们倾向于大群聚集并在猪周围的地方觅食。猫、犬或狐狸在某些情况下，对猪场间TGEV的传播可能起一定的作用(见流行病学)。

TGEV感染猪的粪便可被靴、鞋、衣服、车斗、饲料携带，并可能成为其它猪场感染的来源。尤其在冬季，这些可能是TGEV传播的重要途径，因为它们与猪及饲料同时被运输。因此，应注意减少类似事情的发生。在冬季如果来访者(尤其是运输猪和饲料人员)与猪有直接接触，最好为他们提供干净的鞋袜。

TGE发生后 当一个猪场发生TGE，怀孕猪尚未感染，为最大限度地减少即将出生仔猪的损失可采取以下两种适当措施：①如果这些母猪将在2周后产仔，可有意使它们接触强毒，例如已感染猪的肠道组织，这样他们在产仔期可获得免疫力；② 如果这些母猪在2周内产仔，尽可能提供设施和加强管理使它们至少在产后3周不被TGEV感染。为最大限度地减少死亡，给仔猪提供温暖、干燥、无过堂风环境并在近处给予水、营养液或牛奶(见治疗部分)。

一些成功方法既可防止疫病传入种猪群，又不减少猪的饲养量，其步骤是(Harris, 1987) ① 猪场在4~6月后，再引进新一批猪群；②遇到TGEV暴发，给全场猪(包括新引入的猪)饲喂切碎的感染猪的肠道组织来消除易感猪，以缩短病程，并保证全群猪感染在同一水平上；③严格对产房及哺乳房的猪采取全进全出的方法；④TGE症状消失2个月，且血清阴性时，方可引入新猪群，并监测TGEV血清学的变化。在控制TGEV的同时，必须注意潜在危害，包括其它病原侵入怀孕母猪或整个猪群。

地方流行性TGE 为了控制或消除地方流行性TGE猪场的问题，可考虑以下两种途径：第一，对怀孕期血清学阳性母猪，在怀孕晚期或刚产仔后肌肉注射或乳腺内注射TGEV弱毒活苗以加强免疫。虽然可见到的资料有限，但这种程序可提高乳中的抗体水平(Saif和Bohl,1983)并为哺乳仔猪提供更长期的被动免疫(Stepanek, 1979; Leopoldt 和 Meyer, 1978; Lutter, 1982)。尽管这种程序可能只推迟已感染猪TGE的发病，但有助于减少死亡率。第二，改变管理制度消除易感猪，以中断感染周期，可采取如下方法：防止敏感猪不断进入猪场，即暂时改变产仔计划，暂时使用其它设施；使用较小的产房和哺乳房，以更好地成功应用“全进全出”管理制度。

免疫接种

新生猪或断奶猪的免疫接种

TGEV疫苗曾经给新生仔猪服弱毒TGEV，试图通过干扰作用或局部免疫来诱导产生快速保护。已证明早期无干扰作用，而且通常5天以后才能诱导主动免疫而得到保护(Pensaert, 1979)。一篇研究报告报道比此稍早开始的保护，将疫苗接种猪放在较低温度(18~20℃)下以加强弱毒增殖，结果接种后3~4天开始产生保护力(Furuuchi, 1976)。不能诱导早期干扰现象和产生主动免疫时间的延长，使新生仔猪疫苗接种头几天内，产生

快速保护以抵抗TGEV的希望不大。

哺乳仔猪或育肥猪的主动免疫对控制地方流行性感染可能是重要,尤其是对刚断奶猪,这些猪感染TGEV可能导致死亡率增加。TGEV弱毒活苗和灭活苗已经得到联邦政府的许可,在猪出生后,尽快给哺乳仔猪口服或腹腔内注射。一个有限的初步研究报道,疫苗接种哺乳猪产生的保护力比对照血清学阳性哺乳猪保护比例大,尽管接种疫苗猪血清性抗体水平未提高,但两组之间的差异明显(Graham,1980)。然而,由于感染的抵抗性与年龄有关,较大龄猪的攻毒更难标准化。

进一步的研究报道,口服TGEV弱毒活苗后,免疫接种猪的母源抗体降低(Hess, 1982; Lanza, 1995; Sestak, 1996)或全部抑制(Furuuchi, 1978)其主动免疫的产生。最近,用已自然感染母猪的哺乳仔猪进行观察(Furuuchi, 1978)发现,哺乳仔猪被动循环抗体和肠内抗体滴度较高,这或许是对TGEV弱毒株主动免疫完全干扰的原因。

已经通过其它途径以试图免疫小猪抵抗TGEV。Woods和Pedersen(1979)报道,给猪鼻内和腹膜内接种2个剂量的抗原相关FIPV强毒活苗疫苗,攻毒后死亡率33%(3/9)。相反,以TGEV小蚀斑(SP)变异弱毒株一次口服接种的猪,攻毒后100%死亡(3/3)。Gough(1983a)报道,10头断奶仔猪肌肉接种2~3个剂量TGEV亚单位(23 kD)佐剂苗,可抵抗强毒的攻击。不过经非肠道给哺乳猪3个单位杆状病毒表达的重要组蛋白S佐剂苗(含有A-D 4个主要抗原位点)可诱导中和TGEV的血清抗体,但不能抵抗TGEV的攻击(Shoup,1997)。给3周龄的仔猪腹腔内注射由杆状病毒表达的TGEV的3个主要的结构蛋白和大肠杆菌不耐热佐剂后,再用TGEV攻毒,产生了免疫反应,并产生了病毒特异性IgA,使肠道中的病毒数量下降很多(Sestak等, 1999a)。随后的研究表明来源于TGEV的重组杆状病毒可以用来刺激机体产生粘膜免疫和全身免疫。

血清学阴性怀孕母猪的TGEV免疫接种 曾用各种病毒疫苗(强毒、弱毒、灭活和亚单位病毒)和不同的接种途径(口腔、鼻肉、肌肉、皮下和乳腺内)作激发乳汁免疫的试验(Bohl, 1975; Kaji 和 Shimizu,1978; Pensaert,1979; Saif 和 Bohl, 1979a; Voets,1980; Moxley 和 Olson, 1989a; Saif 和 Theil, 1990; Saif, 1994)。怀孕母猪口服强毒活苗通常能激发最高的免疫水平,使母猪获得保护免疫,并在乳汁中相应产生持续高滴度IgA TGEV抗体,仔猪吃奶后获得免疫保护。

疫苗和接种

目前有几种获得联邦政府许可生产的TGEV疫苗，均为灭活或弱毒活苗，允许给怀孕母猪和新生仔猪使用。这些疫苗与其功效将根据不同接种途径分别在下面几部分中进行讨论。许多可变化的因素使得对试验疫苗和商品疫苗的评价复杂化，数据之间常相互矛盾。这些因素包括接种剂量和TGEV株，接种猪的年龄，环境状况，尤其是温度，接种猪的泌乳能力和接种时母猪的免疫状态。

口腔和/或鼻内接种 根据观察，母猪在怀孕期间感染TGEV能将免疫力传递给它们的仔猪，用TGE强毒“计划”感染怀孕母猪已被用于模拟这种自然免疫。这一程序的完成，通常是至少于产仔前2周给孕猪喂食自然强毒。这种毒可以用急性TGEV感染小猪的肠，切碎拌于饲料或放入冷冻胶囊中用球形枪经口腔给母猪接种。

给怀孕猪口腔接种TGEV弱毒，以刺激产生乳汁内IgA TGEV抗体，看来是合乎逻辑的接种途径，可作为模仿自然感染途径和诱导免疫力产生。曾单独应用鼻内(IN)途径或与口腔途径联合应用，因为已知TGEV弱毒株在呼吸道增殖(Furuuchi, 1979)，而且附加吞咽可接种较多的病毒到肠内。然而口腔和(或)鼻内使用弱毒苗的结果通常令人失望(Saif 和 Bohl, 1979a, 1981a; Voets, 1980; Henning 和 Thomas, 1981; Moxley 和 Olson, 1980a)。在以前的研究中，经口腔或口腔和肌肉途径接种TGEV高代Purdue株，极少IgA TGEV抗体存在，而且来自免疫接种母猪的仔猪攻毒死亡率为25%~100%(Saif 和 Bohl, 1979a,b; Voets, 1980; Moxley 和 Olson, 1989a; Saif 和 Theil, 1990)。

由于TGEV弱毒株在通过胃的酸性环境时可能发生死亡，这促使了人们利用肠溶性胶囊包装冻干弱毒苗的研究(Hess, 1978; Voets, 1980)。Hess(1978)使用高滴度的TGEV B1株(细胞培养300代)，试验表明乳汁中能产生含高滴度IgA TGEV抗体，而且仔猪死亡率仅10%。Voets(1980)使用高代Purdue株，发现9头母猪中有6头口服接种后不发生血清转化；即使那3头有血清转化的母猪其仔猪死亡率也高达44%。Fichtner(1982)给怀孕母猪连续喂食弱毒Riems株10天后，其仔猪攻毒后30%死亡。为进一步研究，以确定接种的病毒能到达小肠，进行两项将弱毒直接注射到肠腔内的试验。母猪怀孕期间一次肠内注射TGEV弱毒Purdue株，其仔猪攻毒后，再次呈现保护性差(62%死亡)(Voets, 1980)，然而，母猪怀孕期间连续数天肠内注射TGEV弱毒Riems株后，其攻毒仔猪获较好保护

(10%死亡)(Fichtner, 1982)。

其他研究者选择各种高传代和低传代TGEV株, 在体外来进行抗酸和蛋白酶试验, 并用这些毒株为疫苗做被动免疫保护的研究(Aynaud, 1985; Chen, 1985; Shirai, 1988; Bernard, 1989)。他们报道的结果不一致, 用TGEV强毒攻毒后各窝仔猪死亡率在0%~73%。稍后的两项研究资料阐述这些疑惑是由于攻毒猪的年龄差异而致, 其他研究也证明这是影响仔猪存活能力的一个要素(Moxley 和 Olson, 1989a)。

一种生长在一持续感染的猪白细胞传代细胞上活的致弱的SP变异TGEV, 被用于以口腔/鼻内和(或)乳腺内途径免疫接种妊娠猪(Woods 1978,1984)。对其吮奶仔猪攻毒, 结果死亡率为14%~34%。在此后的研究中, 该作者报道, 通常产后3~4天, 乳汁中IgA和IgG 类两种TGEV抗体滴度高。然而, 在以SPTGEV免疫接种的8头母猪中, 有3头母猪所产仔猪攻毒后出现轻微症状。虽然在SPTGEV免疫母猪哺乳的仔猪中观察到腹泻(发病率48%)。但据报道症状轻微和发病迟缓(3 DPE)。据报道, SPTGEV对新生仔猪缺乏致病力, 在肠的固有层增殖而不在上皮细胞增殖(Woods1981)。各种TGEV弱毒株的分子分析试验揭示mRNA2和3的改变影响了S蛋白和非结构蛋白3(Register 和 Wesley, 1994)。

Moscari(1980b)报道, 口腔接种TGEV CKp弱毒株后诱导产生乳内IgA TGEV抗体, 但没报道保护性研究结果。使用商品疫苗(Ambico Inc)进行两次口服(喂食)和一次肌肉注射的免疫接种研究, 两者的结果不一致。Welter(1980)报道攻毒猪8%死亡, 而其他人报道死亡率较高, 与未接种疫苗母猪哺乳的仔猪死亡率相似(Saif和 Bohl, 1981b; Bohl, 1982; Moxley 和 Olson, 1989a)。

使用TGEV弱毒株口腔或鼻内接种免疫效果一般较差, 这可能是因为大部分弱毒株病毒在母猪肠内的表面或有限的增殖(Frederick, 1976b; Hess, 1977)。所以, 导致对肠表层下IgA 浆细胞的抗原刺激很少, 相应地乳内IgA抗体分泌就很少。曾尝试用低代次细胞培养TGEV诱导被动免疫, 但结果表明口腔/鼻内感染的母猪的血清学转化和仔猪的保护率不规律(Saif 和 Bohl 1979b)。存在的困难仍是如何研制出既能刺激母猪肠内IgA抗体应答, 又能完全致弱或不具备感染性不会感染新生仔猪发病的TGEV商品疫苗。

胃肠外免疫接种 各种不同的试验疫苗和两种商品疫苗均为致病活毒, 给母猪分别于产前约6周和2周肌肉接种。对这种免疫方式的实验评价通常表明仔猪死亡率下降

(接种猪38%~56%，对照组71%~92%)，但发病率下降(Bohl, 1975; Voets, 1980; Moxley 和 Olson, 1989a)。然而，与自然感染母猪所产的各窝仔猪几乎全部获得保护(死亡率0~9%)相比，疫苗接种效果差。Henning和Thomas(1981)以及Matischeck(1982)报道，使用两种商品疫苗的免疫接种效果更好，死亡率分别为10%和18%。

肌肉注射免疫接种有两个主要缺点。①接种猪产生很少或不产生肠道免疫，当感染TGEV后常发病。如果发生在泌乳期，则乳猪将吃不到足够的奶；②这些接种母猪乳中的TGEV抗体是IgA类低滴度抗体，不能给乳猪提供理想的被动免疫。

给血清学阴性的妊娠猪乳腺内注射TGEV，结果在乳内高滴度的主要是IgG TGEV抗体，而对泌乳母猪给予相同的注射，结果可产生IgA和IgM TGEV抗体。特异抗体活性不仅发现于注射侧乳腺的奶中，而且也发现于另一侧未注射乳腺的奶中(Bohl 和 Saif, 1975; Saif 和 Bohl, 1983)。经乳腺内免疫接种怀孕猪的同窝仔猪保护性好(死亡率为14%~26%)，可能因为攻毒时(产后3天)乳中持续存在滴度异常高的IgG抗体(Shibley, 1973; Bohl 和 Saif, 1975)。同样，乳内Ig G抗体滴度显著增高的情况，发生在以高滴度($10^3 \sim 10^9$, 3TCID₅₀)的TGEV TD163弱毒株肌肉/鼻内免疫接种的两头母猪。其仔猪无一死亡，证实当IgG TGEV抗体在乳内呈现高滴度时具有保护能力(Kaji 和 Shimizu, 1978)。

异源苗 TGEV和FIPV间的抗原关系是研究FIPV作为猪的异源冠状病毒疫苗可能性的基础。初步研究表明，用活的FIPV强毒口腔/鼻内和乳腺内于妊娠期免疫接种的两头母猪所产的哺乳仔猪获得一些抗TGE的免疫力(死亡率25%)。然而，这种FIPV也能使新生仔猪致病(Woods 和 Pedersen, 1979)。随后的研究用经过细胞培养致弱的FIPV以同样途径接种母猪，导致仔猪死亡率较高(52%)和乳内IgG类低滴度TGEV抗体(Woods, 1984)。

TGEV感染猪的免疫接种 分别给曾有和没有自然感染TGEV的两群妊娠猪接种疫苗，接种后两组猪的免疫应答和相应仔猪的保护力有显著差别。这些差别可能解释了在疫苗接种试验中，如果不知道用了曾感染过的猪做试验而导致不一致的结果。只有使用非常灵敏的试验(如蚀斑减少病毒中和)去测定TGEV抗体和了解试验猪场有关TGE暴发的历史，才能排除这种可能性。PRCV在猪场的存在可能使TGEV疫苗研究的前景更

加复杂。

少数实验室研究表明,用TGEV弱毒于妊娠期间经胃肠道外途径接种曾感染过的猪,结果引起TGEV乳内抗体IgA和IgG类升高(Saif 和 Bohl, 1981a,b, 1983; Saif, 1985)。其他人也报道了给曾感染过的猪乳腺内注射灭活TGEV后,乳汁内TGEV抗体滴度大大提高(Thorsen 和 Djurickovic, 1971)。这些滴度大约是乳腺内接种血清学阴性母猪或未预防接种过的感染母猪抗体滴度的4~7倍。将目前可用于胃肠道外接种的TGEV疫苗对曾感染过的怀孕母猪进行加强免疫比对未感染过的血清学阴性怀孕猪进行初次免疫大概更为有效。这些疫苗可能对于存在地方性流行TGE的猪场尤为适用(Leopoldt 和 Meyer, 1978; Stepanek, 1979)。

预防TGEV的PRCV疫苗 自PRCV在欧洲国家猪群中广泛流行以来, TGEV在这些国家的发生率与严重性因此而减低(Pensaert 和 Cox, 1989; Laude, 1993)。这也说明了以前接触PRCV的猪群免疫水平对后来TGEV传染有一定的影响(Pensaert, 1989; Pensaert 和 Cox, 1989)。

许多研究人员曾经检测了在母猪感染PRCV和仔猪对TGEV被动免疫之间的关系。曾经自然感染PRCV母猪诱发不同程度被动抗体(死亡率44%~53%),从而保护了实验感染TGEV吃奶猪(Bernard, 1989; Paton 和 Brown, 1990)。据记载,在猪场暴发TGE期间,曾接触PRCV的母猪所产的仔猪,也不同程度受到免疫保护(Pensaert 和 Cox, 1989; Callebaut, 1990)。

报道称,对在怀孕期间曾实验感染或再感染PRCV的哺乳母猪进行TGEV攻毒后,也发现有类似不同免疫水平的保护(死亡率平均为30%~67%)(Callebaut, 1990, DeDiego, 1992; Wesley 和 Woods, 1993; Lanza, 1995; Sestak, 1996)。值得一提的是有关后两项研究称:在两次怀孕期间,母猪多次接触PRCV,其新生猪的死亡率最低(0~27%,平均14%),母乳中的IgA和IgG的滴度最高。这项研究结果与其它报告相一致(Callebaut, 1990),母猪自然感染PRCV,在怀孕期间再感染PRCV,这些母猪的奶中有分泌抗TGEV抗体IgA,在对其后代用TGEV攻毒后,母乳具有高水平的保护能力(3/6窝死亡率0~12.5%)。除了保护性标志即母乳中的IgA抗体,另一项研究表明(Wesley 和 Woods, 1993),在母猪体内,PRCV诱发的被动免疫起着抗TGEV作用,母猪诱发抗TGEV的主动免疫,

从而防止母猪发病或无乳。曾接触PRCV的母猪所产仔猪的腹泻死亡率始终较低，即使吃奶仔猪感染TGEV，也不会使母猪发病或无乳。

在接触PRCV母乳中，IgA抗体不能持续被诱发产生，这种机制尚不清楚。就像被TGEV感染后所产生被动保护抗体IgA一样(Pensaert 和 Cox,1989; Callebaut, 1990)。初次感染PRCV后，只有30%的母猪乳中有IgA抗体；再感染PRCV，则增加至84%，这个结果与Sestak(1996)报道一致：在两次母猪怀孕期间多次接触PRCV，可使母猪乳中抗TGEV的IgA(和IgG)抗体滴度明显升高。已观察到在初次接触PRCV母猪乳中不同水平抗体应答，可能与接触PRCV血清学阴性猪BALT，GALT和肠系膜淋巴结中，病毒特异性IgA ASCs的数量少有关(Van Cott, 1993, 1994)，再感染PRCV后，能够促进在BALT中IgA ASCs的数量，从而增强了在BALT和乳腺之间的联系和可能的sIgA免疫效力。口、鼻腔接种PRCV于血清阴性猪后，观察到BALT中存在，主要“病毒特异”IgG ASCs(Van Cott, 1993)，接着攻击TGEV，在曾接触PRCV猪的GALT中IgG ASCs (和IgA ASCs)数量明显增加(Van Cott, 1994)。由于IgG抗体在曾接触过呼吸道中的病毒猪的乳中占主要地位，比如致弱的TGEV和伪狂犬病毒(Saif 和 Bohl,1977)。可以想象，BALT和母猪乳腺之间存在一种免疫学联系，或BALT刺激促进血清IgG抗体产生并逐渐渗透到乳中。

除了在接触TGEV或PRCV母乳中IgA抗体的数量不同外，研究人员调查了在病毒抗原表位上的潜在差别，这种抗原表位能被感染PRCV和TGEV母猪所诱发的IgA乳抗体所识别(DeDiego, 1992, 1994)。在被TGEV感染的母猪，抗原亚位点A(Aa,Ab,Ac)，伴随抗原亚位点D(Madrid)，它们是抗体IgA最佳诱发者，而感染PRCV后，抗原位点D和亚位点Ab则是免疫的主导者。作者推断，只有IgA识别至少抗原位点A和D，它们在体内提供良好的免疫保护，而任何类别球蛋白只识别一个在细胞培养中被病毒中和的抗原位点。

为了弄清接触PRCV的猪抗TGEV被动免疫和主动免疫水平及机制，还需做进一步的研究，特别要阐明如下机制是非常重要的：在感染PRCV后，IgA抗体被诱发，若BALT与乳腺免疫存在联系，却没有肠与乳腺免疫诱发母乳中IgA有效，为什么IgA抗体仅发生于曾接触PRCV的母猪，且IgA抗体有效保护哺乳猪，抵抗肠道TGEV的感染。

新型实验疫苗

现有的疫苗存在毒力太弱或者应用剂量太低的缺点，使之产生的保护不能持续(Saif

1996; Saif 和 Jackwood 1990; Shoup等, 1997; VanCott等, 1993)。需要研究更加稳定的疫苗。研究者把目光集中在研制一种活的弱毒疫苗, 给母猪免疫后在乳汁中产生IgA抗体, 对哺乳仔猪产生保护(Park等, 1998; Saif, 1996; Sestak等, 1999a)。

在过去的十年中, 人们把重点放在构建TGEV蛋白亚单位疫苗。在TGEV的三种结构蛋白中, S蛋白包含了主要的抗原位点, 能够被病毒的中和抗体识别(Delmas等, 1986; Jimenez等, 1986)。根据这些位点的连续区域(Delmas和Laude 1990; Gebauer等, 1991; Posthumus等, 1990), 提出了用S蛋白设计抗原合成多肽(Posthumus等, 1991)。结果发现N蛋白包含了T辅助细胞的表位(Anton等, 1995)。从N蛋白设计合成了15肽与S蛋白协同作用产生了抗TGEV的特异性抗体(Anton等, 1996)。现在用真核和原核表达系统如大肠杆菌, 沙门氏菌, 腺病毒, 痘病毒, 杆状病毒及植物表达TGEV的S, M, N 蛋白。(Britton等, 1987; Enjuanes等, 1992; Godet等, 1991; Gomez等, 2000; Park 等, 1998; Pulford 和Britton 1991; Shoup等, 1997; Smerdou等, 1996a; Smerdou等, 1996b; Torres等, 1996; Tuboly等, 1994, 2000)。在一些研究中, 接种动物后产生了保护性抗体并有部分的保护力(Torres等, 1995)。在其他的一些研究中, 并没有产生保护性抗体产生(Gomez等, 1998, 2000; Smerdou等, 1996a, b; Tuboly等, 2000)。或者只是产生了血清IgG病毒中和抗体(Park等, 1998; Shoup等, 1997)。用原核载体包括活载体(减毒沙门氏菌)表达TGEVS基因和S基因片断, 接种鼠(Hu等, 1985), 兔子(Smerdou等, 1996a), 或猪(Sestak和Schifferli, unpublished, 2004)后, 产生了低的或者没有产生中和抗体。这些失败的原因在于细菌表达的S蛋白缺少糖基化依赖的构象免疫决定簇A。用原核载体表达的TGEV的S糖蛋白包被上糖基化依赖的抗原决定簇A, B或者没有位点C,D后接种动物能够产生各种水平的中和抗体和保护力。由痘病毒表达的TGEV的S糖蛋白只能产生低滴度的中和抗体, 没有保护力(Hu等1985)。由杆状病毒表达的TGEV的S糖蛋白产生的中和抗体能在鼠和猪的血清中监测(Shoup等, 1997; Tuboly等, 1995)。但是, 这种体液免疫抗体的保护力是很低的(Godet等, 1991; Shoup等, 1997; Tuboly等, 1995)。只有S糖蛋白结构中包含抗原位点A的才能产生高滴度的中和抗体。S糖蛋白结构中包含抗原位点C,D的只能产生低滴度的中和抗体, 不过, 有意思的是, 第一次接种后还可以刺激猪产生第二次血清抗体反应(Shoup等, 1997)。杆状病毒表达的TGEV

的S糖蛋白加上弗氏不完全佐剂接种到没有感染TGEV的母猪乳房内，只能在乳汁中检测到少量的IgG抗体(Shoup等，1997)。而且这些母猪在接触了TGEV后并没有出现病态和死亡(Shoup等，1997)。用同样杆状病毒表达的TGEV的S糖蛋白乳房内注射，给母猪口服弱毒疫苗，结果S糖蛋白疫苗在乳汁中产生了抗体，保护力达到57%，而口服疫苗产生的保护力为43%(Park等，1998)。用杆状病毒表达的TGEV的机构蛋白(S, N, 和 M)和大肠杆菌的突变LT佐剂一起接种猪，结果产生IgA抗体，并且减少了粪便中的病毒数量(Sestak等，1999a)。

人们把目光又转向了表达TGEV S蛋白的活载体疫苗。用人类腺病毒5重组物表达的TGEV S蛋白(含位点A-D)或S蛋白(Madrid位点C和B)通过口鼻和腹膜内途径，在猪血清中可诱发中和TGEV的中和抗体。用给新生仔猪口服TGEV和免疫血清混合物，然后，人工饲喂被免疫的猪免疫血清，只有一组饲喂用腺病毒、表达TGEV S蛋白重组物(含位点A、D)免疫猪的免疫血清的新生仔猪，可被动地减少腹泻和死亡数量，但不能抗TGEV感染。

其他人(Callebaut，1996)发展了用人腺病毒5来表达PRCV S蛋白的重组物，用这种重组物通过口、鼻腔接种仔猪后，在对这些猪攻击PRCV后，虽然不能阻止鼻腔中带毒，它们在鼻腔所携带病毒水平下降和产生快速的抗PRCV的中和抗体。在另外的研究中，建立了用猪腺病毒5来表达TGEV S蛋白的重组物口服免疫仔猪(Tuboly 和 Nagy 2001)。虽然在接种猪的肠道中产生抗TGEV的IgA抗体，但是仔猪仍然从肠道排毒。

最近用TGEV感染性的cDNA 微小基因组的研究表明这种方法还可以用来探索来源于肠道或者呼吸道其他病原体的目的免疫原(Alonso等，2002； Gonzalez等，2002； Sola等，2003)。用不同的绿色荧光基因取代TGEV开放阅读框的3a或者3b后，病毒仍然保持免疫原性和致病性(Sola 等，2003)。

既然TGEV的病理损伤主要在肠道，一种有效的疫苗应该是通过足够剂量的弱毒疫苗口鼻免疫后能够在肠道产生免疫反应(Saif 和 Jackwood 1990； VanCott 等，1993)。通过应用辅助粘膜传递系统如免疫刺激复合物，生物所能分解的微球体和感染性重组TGEV克隆来加强TGEV的免疫原性和减少致病性，进一步改进TGEV疫苗。

(张太翔 译 白瑜 校)