

第 17 章 脑心肌炎病毒

Frank Koenen 著

脑心肌炎病毒（EMCV）传播分布广泛，大多数种属均易感。1940年首次在啮齿动物上分离到脑心肌炎病毒（Jungeblut和Sanders，1940）。后来在佛罗里达州，从患有心肌炎的黑猩猩上分离到EMCV（Helwig和Schmidt，1945）。此后，在不同的动物种属中都检测到病毒或抗体（Tesh和Wallace，1977年）。

1960年，Murnane等在巴拿马从急性死亡的猪的脾脏和肺脏分离到EMCV，并首次鉴定为猪的病原。猪感染EMCV有两种临床表现：引起仔猪突发性死亡的急性心肌炎，或母猪繁殖障碍。

尽管没有有效监督机制追踪EMCV的感染，但在猪体上发现EMCV，已经在全世界有了报导。1970年以来，本病在澳大利亚发生过多起(Acl和Littlejohns，1975；Seaman等，1986)高死亡率的暴发。南非（Williams，1981）、新西兰（Sutherland等，1977）、古巴（Ramos等，1983年）、加拿大（Dea等，1991年）都有EMCV流行暴发的报导。在欧洲，由EMCV引发的临床病例于1986年首次发现于家养猪，此后发病率增加。在意大利、希腊（Paschaleri-Papadopoulou，1990年）、瑞士（Hani等，1992年）、比利时（Koenen等，1999年）、塞浦路斯（Loikaidis等，1996年）都有急性心肌炎暴发的报道。在比利时，EMCV常可从繁殖失败的病猪中分离到。

EMCV的感染很常见，但临床上却很少发病。Maurice等在2004年提出，EMCV的暴发通常很集中，即所谓的“地方流行性”。在意大利，疫区50%没有任何临床症状的农场与有临床症状的农场具有相似的流行水平，可以提供大量亚临床感染的证据。同样地，Sangar等于1977年在英国检测到EMCV的抗体，但却没有分离到病毒。

病原学

EMCV是一种RNA病毒，属于心肌炎病毒科小RNA病毒属。一些抗原相似性病毒如Columbia-SK和Mengo病毒，在十九世纪四十年代被分离到，并被认为是与EMCV同类。Tinsley等在1984年报导EMCV与蟋蟀麻痹病毒具有抗原相关性。

EMCV病毒粒子属单链RNA病毒，分子量 2.6×10^6 道尔顿。病毒基因组编码一个前导蛋白，缺乏蛋白裂解活性。前导蛋白从P1被病毒编码的蛋白酶3Cpro

切割。在1D/2A连接处也被3C_{pro}切割而不被2A切割。2A蛋白引起在P1-2A和下游基本序列NPGP之间链的裂解，或者多肽链的断裂，EMCV中有一个多聚C域，由不同长度的核苷酸组成，通常为80—250bp(van Regenmortel 等，2000)。

尽管抗原性稳定，但EMCV的D域（编码衣壳蛋白VP1）表现出很大的遗传变异性。单一的核酸突变就可使EMCV株毒力减弱，或使其变为一种可以引起糖尿病的毒株（Nelsensalz等，1996）。特别是希腊分离株不同于其它的EMCV株（Knowles等，2000）。在猪和啮齿动物分离的EMCV株可以观察到较小的变异。

EMCV具有与其它小RNA病毒相似的特性。它具有乙醚抗性，在较宽的PH范围内可稳定存在。EMCV在60℃经30分钟即可灭活，但是一些毒株呈现出显著的热稳定性（Joo，1999）。

EMCV在包括啮齿动物、猪和灵长类动物的细胞培养物中能很好的复制。小仓鼠肾细胞（BHK-21）和Vero细胞常用于病毒增殖。病毒也可以在鼠和鸡胚细胞中增殖，对许多实验动物具有致病性。

病毒可凝集豚鼠、马和绵羊的红细胞。大多数EMCV株在KCl—H₃BO₃（0.12M KCl；0.05）缓冲溶液中可达到最佳凝结效果。据报导，EMCV毒株间凝集活性存在差异（Kim等，1991）。细胞培养物中EMCV的通路改变了其体外生长特性，减少了毒力，并影响了红细胞凝集活性（Zimmerman，1994）。

流行病学

EMCV 常被认为是一种感染啮齿动物的病毒，尽管人们从 30 多种动物，包括哺乳动物、鸟类和昆虫中都分离到该病毒。哺乳动物中，宿主范围包括啮齿动物，猴子甚至非洲黑猩猩、大象、狮子、松鼠、猫鼬、浣熊和猪。在某些动物，EMCV 感染可引起严重后果，比如动物园里的狮子由于被饲喂了因 EMCV 感染而死亡的非洲象的尸体，最后死亡（Simpson 等，1977）。

EMCV 在猪间传播的资料很少，但啮齿动物被广泛认为充当了一个病毒储存库，并作为 EMCV 在猪之间传播的传染源。病毒通常持续存在于啮齿动物但不引起发病（Acland，1989；Zimmerman，1994），并且在感染 EMCV 的啮齿动物组织中，EMCV 的水平很高，而且它们可以通过粪便和尿液向外排毒。因此猪接触到 EMCV 污染的饲料、饮水或感染的啮齿动物尸体等被认为是 EMCV

传播的主要原因（Acland, 1989; Seaman 等, 1986; Spyrou 等, 2004; Tseh 和 Wallace, 1977）。

这些推断已在比利时临床感染 EMCV 的病例分析中得到证实（Maurice 等, 2005b）。在单变量水平分析表明, 啮齿动物、农场设施和总体卫生条件与临床 EMCV 有关。多变量分析了临床 EMCV 和潜在风险因子之间的相关性。鼠是临床 EMCV 感染的主要风险因子。

感染 EMCV 的猪体上可排出病毒, 至少短期内可以。猪只之间的传播或接触过感染死亡猪的猪是病毒的潜在传播途径（Billinis 等, 1999; Foni 等, 1993; Maurice 等, 2002）。病毒传播的另一种潜在途径是经胎盘传播（Christianson 等, 1992; Koenen 和 Vanderhallen, 1997; Links 等, 1986）。在条件下, 其它因子, 诸如感染剂量、感染途径和感染猪年龄, 也是病毒传播的重要因素（Billinis 等, 2004; Littlejohns 和 Acland, 1975）。在一些国家, 可发现季节对病毒传播的影响, 本病尤其在秋季多发（Maurice 等, 2005）。

临床症状

感染时, 猪的年龄是判断临床疾病的重要指标, 特别是刚出生几周即感染的严重病例。接近 100% 的死亡率的高度致死性, 仅限于断奶前仔猪（Joo, 1999）。断奶后猪到成年猪的感染通常表现亚临床症状, 尽管一些成年猪可以发现死亡病例。Billinis 等 2004 年在中发现, 20 日龄和 40 日龄猪的死亡率没有差别, 但 105 日龄猪无死亡。

感染 EMCV 的仔猪主要表现为因心功能不全而突然死亡。其它的临床症状包括: 食欲减退、精神沉郁、畏寒战栗、步履蹒跚、四肢瘫痪或呼吸困难。感染的猪（Craighead 等, 1963; Littlejohns 和 Acland, 1975）体温高达 41°C, 在接种后 2~11 天死亡（通常 3~5 天）, 偶然也有患慢性心肌炎后康复的病例。

在育种猪, 临床表现各异, 有的具有明显的病变, 有的出现不同形式的繁殖障碍, 包括流产、木乃伊胎或死胎等增加（Dea 等, 1991; Koenen 和 Vanderhallen, 1997）。

非猪源种属

在实验动物, EMCV 的临床表现和发病机理各不相同。大鼠和仓鼠经过不同途径接种后可造成急性死亡。由脑炎引发的神经疾病已经被报导, 但在剖检

时更常见心肌炎。在鼠类，一些毒株引起致命性脑炎和广泛的心肌损伤，或特异性的胰腺 β -细胞坏死（Cerutis等，1989）。

鼠，豚鼠，兔子和猴EMCV的感染过程与动物的年龄和病毒毒株有关。感染心肌炎EMCV株的大鼠，没有临床症状或大体病变。尽管在感染后3天到21天可从不同的组织中分离到病毒。EMCV最常分离于Peyer's 氏结和胸腺，甚至从接种后60天死亡的大鼠上也可分离到。结果显示：经口感染后，EMCV在这些组织持续存在（Spyrou等，2004）。据报道，猫头鹰、猴和长尾猴高度易感。病毒很少引起兔子和恒河猴发病，尽管有很高的病毒血症但不引起明显的感染。

发病机理

通过不同的临床资料结合亚临床感染表明，不同EMCV株致病机理不同。据认为是一些株仅能引起繁殖障碍或心肌炎中的一种，而其它的毒株既能引起繁殖障碍又能引起心肌炎（Koenen 和 Vanderhallen,1997）。澳大利亚株的毒力比新西兰株强（Littlejohns 和 Acland,1975；Homer 和Hunter,1979），在佛罗里达州发现某些分离株仅引起心肌炎，而不引起死亡（Gainer 1967; Gainer 等，1968）。因此，EMCV感染猪可能受毒株，病毒剂量和动物个体因素，比如年龄和怀孕状况等的影响。

猪的自然感染最有可能是经口感染的。经口服途径实验感染的仔猪，最早在接种后6小时即可以在肠道内检测到病毒。在心脏和扁桃体，急性病例在接种后最初30小时，其单核巨噬细胞和心肌细胞的胞质即可见阳性病变。此后，一些死亡动物的心脏和扁桃体具有典型的病理变化，并可见清晰的免疫组化阳性反应斑。接种后3天，可在肝脏、肾脏、脾脏和肺脏分离到病毒。病毒血症期不存在病毒感染提示病毒可在肠道内复制。在自然感染或实验感染中，心肌病毒滴度最高。在剖检时，心肌病变明显，在感染后存活的动物能产生EMCV抗体。病毒随着抗体的出现而减少（Gelmetti 等，2006）。

怀孕母猪胎盘感染EMCV的发病机理尚不清楚。经肌肉途径感染妊娠后期的母猪，最早于感染后2周即出现胎儿死亡。在妊娠中后期，可见早产小猪，流产和产木乃伊胎儿等。在母猪怀孕早期，胎儿是否感染目前尚不清楚（Koenen 和 Vanderhallen,1997;Love和Grewal,1986）。抗体和病毒能在胎儿上检测到，但是病变大小则根据实验的不同而有差异（Kim等1989b;Koenen和 Vanderhallen,1997）。

经实验室传代株感染猪胎儿后，几乎看不到致病性。

病理变化

因急性心肌炎死亡的病猪可见心外膜出血，而无全身病变。尸体剖检时通常可见心包积水，胸腔积水和肺水肿。心脏常肿大，变软和苍白无光泽。最明显的病变出现在心肌（如图17.1，17.2），可见大小不等的病灶，特别是在右心室，并延伸到不同的肌层。这些病变多呈现微黄或白色的坏死灶或大的、不规则的白色病灶，一般肥育期猪比哺乳仔猪常见（Catryck 等，1996; Littlejohns 和 Acland，1975）。

感染胎儿表面正常，但实际上可能会出血和水肿。胎儿在感染的不同时期，均可出现木乃伊胎，偶见心肌病变。仔猪最主要的组织病理学变化出现于心脏。免疫组化（IHC）反应阳性的心肌细胞，主要位于心肌细胞的胞浆内，呈微细的颗粒状。坏死的心肌钙化，但并不常见（图17.3）。在扁桃体，阳性反应主要见于坏死的纤维灶和单核巨噬细胞系统的胞浆内。最近有在淋巴结也发现病变的报道（Craighead 等，1963; Gelmetti 等，2006; Papaioannou 等，2003; Psychas 等，2001）。脑部的病变为脑膜充血，血管周围单核细胞浸润，中枢神经变性（Acland和 Littlejohns，1975）。自然感染EMCV死亡的胎儿还可见非化脓性脑炎和心肌炎病变（Kim 等，1989a）。

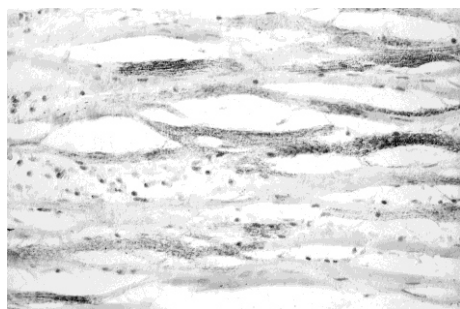


图17.1 感染EMCV的猪心脏矢状面出现多量的大小不等的病灶（尤其是右心室），病变可达不同的肌层。（Regional Animal Health Centre Flanders, Torhout, Belgium).



图17.2 间质性心肌炎和心肌纤维钙化(Prof. Dr. R. Ducatelle, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Belgium)。

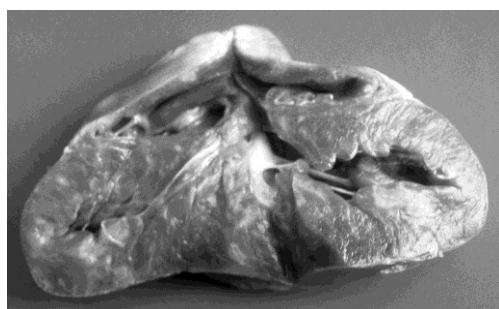


图17.3 EMCV感染猪的心脏显示心肌可见典型的白色病灶。

诊断

在新生仔猪和哺乳期猪，疾病的典型特征为3天到5周龄的猪突然死亡。大多数病例死前无任何临床症状。有些病例出现呕吐、呼吸困难（由心力衰竭引发的腹式呼吸）。仔猪通常在一到几个小时内死亡，但仅限于感染猪群。本病可通过杂交培育小猪传播。典型的病变是心肌上可见白色坏死灶。

产后猪最典型的症状是突然死亡，所有年龄的猪都易感，但60~70kg的猪最易感。疾病通常仅限于某一猪场，死亡出现在傍晚猪活动时。这些猪在死前可听到嘶叫声，并可见呼吸困难。

繁殖障碍和断奶前仔猪死亡可作为诊断的指征（Joo, 1999）。但由EMCV引发的繁殖障碍需与其它病原引起的母猪繁殖障碍相区别。EMCV引起的繁殖障碍症状基本相同，而猪细小病毒感染引起木乃伊胎儿增加，尤其是青年母猪产仔时，没有新生胎儿死亡。其它的感染如：猪繁殖呼吸综合症（PRRS）、Aujeszky疾病（伪狂犬）和细螺旋体病，均应进行鉴别诊断。

组织病理学诊断可能是关键的诊断方法。如前所述，不同程度的非化脓性间质性心肌炎或脑炎（淋巴细胞、组织细胞、炎性细胞浸润）等可作为EMCV感染的指征。诊断应该与鼠或细胞培养物上的病毒分离鉴定相结合。BHK-21细胞最敏感，但是Hela或Vero细胞系最常用。感染的细胞形成单层后，短时间内出现完全的细胞病变。病毒的鉴定可以用交叉病毒中和，以抗血清作对照、结合EMCV血清荧光抗体染色变化加以鉴定。已有核酸探针和反转录PCR（RT-PCR）检测EMCV的报道（Bakkali等, 2002; Meng 等, 1993; Vanderhallen 和 Koenen, 1997）。如果条件具备，分子生物学技术可作为更为敏感和特异性的诊断方法，特别是测序。

血清学检测抗EMCV血清抗体的方法包括：包括血凝抑制（HI）、酶联免疫吸附测定（ELISA）（Brocchi等, 2000）、胶体金、免疫荧光抗体检测（IFA）、琼脂糖免疫扩散（AGID）和病毒中和（VN）。VN和ELISA最常用作诊断EMCV的特异性方法。通过交叉中和，并未发现EMCV与来自62个人的肠道病毒血清型和11头猪的病毒血清型不同（Zimmerman, 1994）。VN 实验中，抗体滴度达到1: 16时有效。VN抗体反应开始于接种7天，可以持续更长时间（6个月12个月）。

防制

目前尚无治疗EMCV的有效方法，但在急性病例，可以通过避免猪压力或兴奋状态来减少致死率。据认为，啮齿动物在EMCV传播中起重要作用。因此，为防止临床病例发生，须保持好环境卫生，尽可能保持设施和饲料无啮齿动物污染，特别是在EMCV疫区。病毒可用浓度为0.5ppm含氯离子水溶液灭活。消毒常用碘酒和氯化汞。

猪是否接触粪便对猪获得免疫保护很重要（Maurice等，2004b）。在装有开放性便池的猪舍中，动物获得了免疫，没有呈现临床变化，可能是由于猪感染了低滴度的病毒。

EMCV灭活疫苗在美国已商业化。疫苗很有效，因为在免疫过的猪体检测到了高滴度EMCV抗体。当用有毒力的EMCV攻毒时，可保护猪不发生临床死亡。而未用疫苗免疫过的猪群60%死亡。同样经实验证明，疫苗对经胎盘感染也具有保护作用。

公共卫生

目前认为，EMCV对公共卫生的影响很小。尽管常感染猪，但在人类，并未有感染并导致疾病的报道（Zimmerman, 1994），即使最可能接触感染的人群（兽医，动物管理员和实验室人员）也没有发病的报道。由于EMCV在世界范围内存在，免疫低下的人常发生二次感染。EMCV混合感染未见报导。这个事件之所以引起人们的关注，主要是由于人们常利用猪的细胞，组织以及器官（异体移植时）。通过移植感染EMCV的猪器官（Brewer等，2003）的小鼠实验，证实了这种推理。

（刘美丽 译 赵德明 校）