

第13章 非洲猪瘟

José Manuel Sánchez-Vizcaíno

非洲猪瘟（African Swine Fever, ASF）是由非洲猪瘟病毒科、非洲猪瘟病毒属的一种 DNA 病毒引起的疾病。由于该病能迅速传播并且对社会经济有重要影响，世界动物卫生组织（Office International des Epizooties, OIE）将 ASF 列为 A 类传染病。目前，ASF 主要在非洲的许多亚撒哈拉国家及意大利的撒丁岛呈地方性流行。在自然条件下，非洲猪瘟病毒（ASF virus, ASFV）只感染猪，包括野猪和家猪。疣猪（*Phacochoerus aethiopicus*）和非洲野猪（*Potamochoerus porcus*）感染 ASFV 后通常呈隐性感染。在非洲，这两种猪是 ASF 的保毒宿主(De Tray 1957; Heuschele 和 Coggins 1965)。软蜱可作为本病的保毒宿主和传播媒介，特别是非洲钝缘蜱和游走性钝缘蜱。非洲猪瘟病毒通常是由饲喂来自于国际机场和海关的被污染的猪肉制品引起的。一旦该病毒在家养猪群中存在，感染猪和带毒猪将成为最重要的传染源。该病的临床症状和病变可表现为从急性到隐性不等，并且与猪的几种出血性疾病相似，特别是猪瘟和猪丹毒。该病需要通过实验室诊断进行确诊。目前还没有针对 ASFV 的有效疫苗和治疗方法。因此，ASF 的控制主要依靠实验室快速诊断和执行严格的卫生防疫措施。

病原

ASFV 是非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属的唯一成员（Murphy 等, 1995）。ASFV 是一个复杂的二十面体病毒，其特征与虹彩病毒科和痘病毒科的成员相似。单一病毒粒子含有一些带有六角形外膜的有共同轴心的结构（见图 13.1），六角形外膜结构是病毒穿过细胞膜出芽时获得的（Carrascosa 等, 1984）。电镜观察结果表明，ASFV 的平均直径为 200nm（Breese 和 DeBoer 1966）。

ASFV 为双股线形 DNA 基因组，根据病毒株的不同其大小在 170-190kb 之间（Blasco 等, 1989; Tabares 等, 1980），该病毒含有一个末端颠倒重复（Sogo 等, 1984），一个约 125kb 大小的中央保守区及可变末端。ASFV 的 BA71v 毒株的整个 DNA 序列由 170,101 个核苷酸和 151 个开放阅读框组成，编码 5 个多基因家族（Yañez 等, 1995）。

ASFV 是一种非常复杂的病毒。在细胞内的病毒粒子至少有 28 种结构蛋白 (Tabares 等, 1980) 被证实, 在被感染的猪巨噬细胞中有 100 种以上的病毒诱导蛋白被证实。在这 100 多种的病毒诱导蛋白中至少有 50 种可与感染猪或康复猪的血清反应 (Alcaraz 等, 1992), 40 种能与病毒粒子相结合 (Carrascosa 等, 1985)。某些蛋白, 例如 p73、p54、p30 和 p12, 具有良好的抗原性。虽然这些蛋白在诱导保护性免疫反应中的作用还不清楚 (Neilan 等, 2004), 但仍被应用于 ASF 血清学诊断中 (Arias 和 Sanchez-Vizcaino, 1992)。

ASFV 能在大量的稳定细胞系中生长, 包括 VERO、MS 和 CV 细胞系 (Hess 等, 1965)。该病毒主要在感染猪的单核细胞和巨噬细胞中复制 (Malmquist 和 Hay, 1960; Minguez 等, 1988), 但同时也在内皮细胞 (Qilkinson 和 Wardley, 1978)、肝细胞 (Sierra 等, 1987)、肾小管上皮细胞 (Gomez-Villamandos 等, 1995) 和嗜中性粒细胞 (Carrasco 等, 1996) 中复制。未见 ASFV 感染 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞 (Gomez-Villamandos 等, 1995; Minguez 等, 1988)。自然条件下, ASFV 能在某些软蜱中复制, 主要是非洲钝缘蜱 (Plowright 等, 1970) 和游走性钝缘蜱 (Sanchez Botija, 1963)。

流行病学

1921年, Montgomery 首次在肯尼亚报道了 ASF。该病毒可从疣猪 (*Phacochoerus aethiopicus*) 传播给家猪 (*Sus scrofa*), 死亡率为 100%。自那以后, ASF 仍在许多非洲国家呈地方性流行: 安哥拉、莫桑比克、南非、塞内加尔、苏丹、乌干达、巴布韦、São Tomé 和 Príncipe。

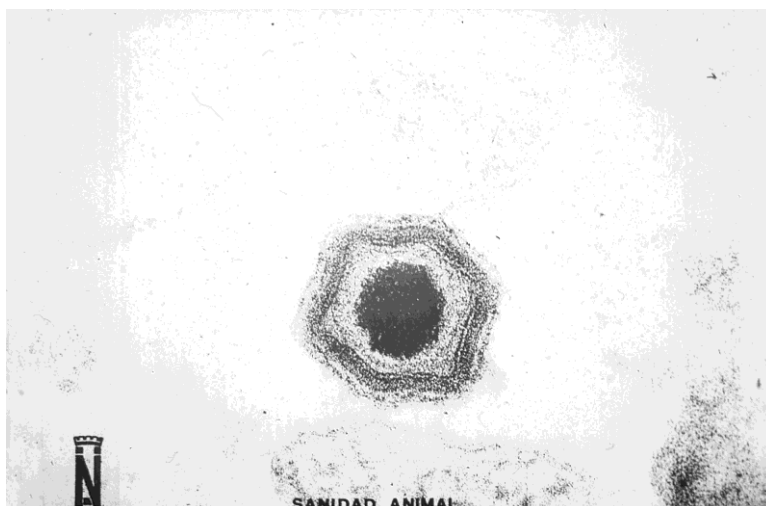


图13.1 一个ASF病毒粒子的电镜照片

1957 年，ASFV 首次在非洲以外的国家出现。葡萄牙的里斯本发生了伴有 100%死亡率的超急性非洲猪瘟（Manso Ribeiro 等，1963）。1960 年，ASF 又在里斯本附近发生，很明显这是 ASF 的再次爆发，同年该病从葡萄牙传到西班牙（Polo Jover 和 Sanchez Botija，1961）。直到 1995 年 ASF 仍在葡萄牙和西班牙呈地方性流行，在实施了强制性消灭 ASF 的计划后，这两个国家才宣布为无 ASF 的国家。

1978年，ASFV再次在非洲以外的国家出现：马耳他、意大利的撒丁岛、巴西和多米尼亚共和国。1979年海地发生了ASF，1980年ASF在古巴出现。目前，ASF仅出现在非洲，主要是亚撒哈拉国家和撒丁岛。在其他地方，ASF 成功地被根除了。

家畜中只有猪能自然感染 ASFV。非洲野公猪也对 ASFV 易感，其临床症状和死亡率与西班牙和葡萄牙以及撒丁岛上自然感染 ASFV 的家猪相似（Contini 等，1983；Sanchez Botija，1982）。相反，ASFV 在三种非洲猪中通常只引起隐性感染：非洲疣猪（*Phacochoerus aethiopicus*）、大林猪（*Hylochoerus meinertzhageni*）和非洲野猪（*Potamochoerus porcus*）。有几种软蜱被证明是 ASFV 的保毒宿主和传播媒介，包括非洲钝缘蜱（Plowright 等，1969）和伊比利亚半岛的游走性钝缘蜱（Sanchez Botija，1963）。

ASFV 以循环感染非洲野猪和软蜱的方式在非洲传播。某些野猪感染 ASFV 后其组织中的病毒含量较低，并且表现为低水平或不能检测到的病毒血症（Plowright，1981）。病毒的水平足以达到从蜱向家猪传播，但通常不能造成动物间的直接接触感染。ASFV 的传播途径使得该病很难在非洲根除。

与非洲野猪相比，欧洲野猪对 ASFV 较易感，并且其临床症状和死亡率与家猪相似。在欧洲，患病动物与健康动物的直接接触是传播本病的主要途径。该病在伊比利亚半岛存在是通过游走性钝缘蜱等媒介的非直接传播，特别是在猪的室外养殖中。

非洲猪瘟在非洲和欧洲流行病学上的主要不同与 ASFV 在软蜱中的复制

有关。非洲钝缘蜱可垂直传播和经三合体传播 ASFV (Plowright 等, 1970)。而在欧洲, 游走性钝缘蜱只可经三合体传播 ASFV。实验证明非洲的钝缘蜱属可将 ASFV 传播给家猪 (Mellor 和 Wilkinson, 1985)。广泛分布于南美和北美的其他种属的蜱被认为可保存和传播 ASFV (Groocock 等, 1980)。

一旦ASFV在家猪群中存在, 带毒猪就成为重要的传染源, 并且带毒猪在该病流行中的作用决定了ASF根除措施的制定。在西班牙, 带毒猪的血清学检测在成功根除ASF上起了重要作用 (Arias和Sanchez-Vizcaino, 2002)。

ASFV在普通环境中难于灭活, 对酸性环境和温度有一定的抵抗力。能从室温放置18个月的血清和血液制品中分离出该病毒。然而, 该病毒经60°C处理30分钟可被灭活 (Plowright和Parker, 1967), 并能被许多脂溶剂和商品化的消毒剂灭活。ASFV在冰冻或未煮熟的肉中能存活几周或几个月。在腌制或处理过的猪肉制品中, 例如Parma火腿, 经腌制300天后病毒不再有感染力 (McKercher等, 1987)。在西班牙腌制的猪肉制品中, 例如Serrano火腿和Iberian火腿及肩肉, ASFV能存活140天, 在Iberian腰肉中能存活112天 (Mebus等, 1993)。70°C加热或罐装火腿中没有有感染力的ASFV。

发病机理

一般情况下, ASFV在家猪中经口或经鼻腔传播 (Colgrove等, 1969; Plowright等, 1968)。然而猪也可通过其它途径感染ASFV, 例如, 蜱叮咬 (Plowright等, 1969)、皮肤划伤、肌肉注射、静脉注射、皮下注射和腹腔注射 (Mcvicar, 1984)。潜伏期取决于ASFV的毒力强弱和接种途径, 从4-19天不等。

ASFV主要在病毒入侵部位附近淋巴结的单核细胞和巨噬细胞中进行复制。经口感染时, 病毒最先在扁桃体和颌下淋巴结的单核细胞和巨噬细胞中进行复制, 然后经血液和/或淋巴液转移至病毒二次复制的场所——例如: 淋巴结, 骨髓, 脾, 肺, 肝和肾。通常在感染后4-8天出现病毒血症, 由于缺乏中和抗体病毒血症将持续数周或数月。

ASFV易与红细胞膜 (Quintero等, 1986) 和血小板作用 (Gomez Villamandos等, 1996), 并在感染猪体内引起血细胞吸附现象 (Sierra等, 1991)。近来, 与血细胞吸附现象相关的蛋白已被确定 (Galindo等, 2000)。

急性病例中的出血机理是由于在疾病后期, 内皮细胞中复制的病毒使内皮细

胞的吞噬活性增强引起的。亚急性病例中的出血机理主要是因为血管壁的通透性升高而引起(Gomez Villamandos等, 1995)。急性病例中淋巴细胞减少的机理与淋巴器官的T区淋巴细胞凋亡有关(Carrasco等, 1996), 但是还不能证明ASFV能在T细胞和B细胞中复制(Gomez-Villamandos等, 1995; Minguez等, 1998)。

亚急性非洲猪瘟表现为暂时性血小板减少(Gomez-Villamandos等, 1996)。肺血管内巨噬细胞的活化可在急性非洲猪瘟和亚急性非洲猪瘟的后期引起肺水肿(死亡的主要原因)(Sierra等, 1990; Carrasco等, 1996)。

临床症状

非洲猪瘟的临床症状与猪霍乱和猪丹毒等其它猪病的临床症状相似。因此, 需要建立实验室诊断方法进行确诊(Sanchez-Vizcaino, 1986)。非洲猪瘟的临床症状随ASFV的毒力、感染剂量和感染途径的不同而不同。非洲猪瘟的临床症状可从超急性型(例如: 猪突然死亡, 很少有临床症状)到亚急性型或隐性感染。ASFV在非洲主要引起急性非洲猪瘟, 其表现为食欲减退、高热(40~41 °C)、白细胞减少、内脏器官出血、皮肤出血(尤其是耳部和腹部皮肤)和高死亡率(Moulton和Coggins, 1968; Mebus等, 1983)。

非洲以外的地区也可能暴发急性ASF, 但亚急性ASF和慢性ASF最常见。亚急性ASF表现为暂时性的血小板和白细胞的减少, 并可见大量出血灶(Gomez-Villamandos等, 1997)。慢性ASF表现呼吸改变、流产和低死亡率(Arias等, 1986)。

病理变化

ASF的病变随病毒的毒力不同而不同。急性和亚急性ASF表现为广泛的出血和淋巴组织的损伤。相反, 亚临床和慢性ASF的病变很少或没有病变(Mebus等, 1983; Gomez-Villamandos等, 1995)。

非洲猪瘟的主要大体病变出现于脾、淋巴结、肾和心脏(Sanchez Botija, 1982)。脾脏呈红黑色, 肿大、梗死和变脆(见图13.2), 有时病变为大的梗死灶并伴有被膜下出血。淋巴结出血、水肿和变脆(见图13.3), 有时看起来像黑红色的血肿。因为充血和被膜下出血, 淋巴结的切面有时呈现大理石样的外观。有时肾皮质及其切面上有点状出血(见图13.4), 肾盂切面也呈点状出血。有些病例可见带有出血性浆液的心包积水。心内膜或心外膜上有出血点或出血斑。急性ASF

还能观察到其它的病变，例如，腹腔内的出血性浆液，并伴有整个消化道水肿和出血。同时还能观察到肝脏和胆囊的充血，以及膀胱粘膜的出血点。在胸腔中有时可见胸腔积水和胸膜上的出血点，肺脏通常呈现水肿。也能观察到脑膜、脉络丛和脑组织充血(Arias等，1986)。

非洲以外地区发生的ASF大多数呈亚急性型，除了病变较轻外，其余表现与急性ASF相似。亚急性型ASF表现为淋巴结和肾脏的大量出血，脾脏肿大和出血，肺脏瘀血、水肿，有些病例可观察到间质性肺炎(Arias等，1986)。

急性ASF的组织病理学变化出现在血管和淋巴器官。病变呈现出血、微血栓形成，以及内皮细胞的损伤并伴有皮下死细胞的大量聚集(Gomez-Villamandos等，1995)。病毒的复制使得脾脏的结构受到破坏并引起脾脏巨噬细胞的坏死，导致了以出血性脾肿大为特征的急性和亚急性ASF(Carrasco等，1997)。急性ASF的淋巴样组织损坏主要见于淋巴器官的T区，但仍未观察到ASFV能在淋巴细胞中进行复制(Minguez等，1988和Carrasco等，1996)。

慢性ASF主要引起呼吸道的变化，病变很小或几乎没有(Gomez-Villamandos等，1995；Mebus等，1983)。病变包括纤维素性胸膜炎、胸膜粘连、干酪样肺炎和淋巴网状组织增生。纤维素性心包炎和坏死性皮肤病变也很常见(Moulton和Coggins，1968；Arias等，1986)。



图13.2 急性ASF脾脏肿大，呈黑色

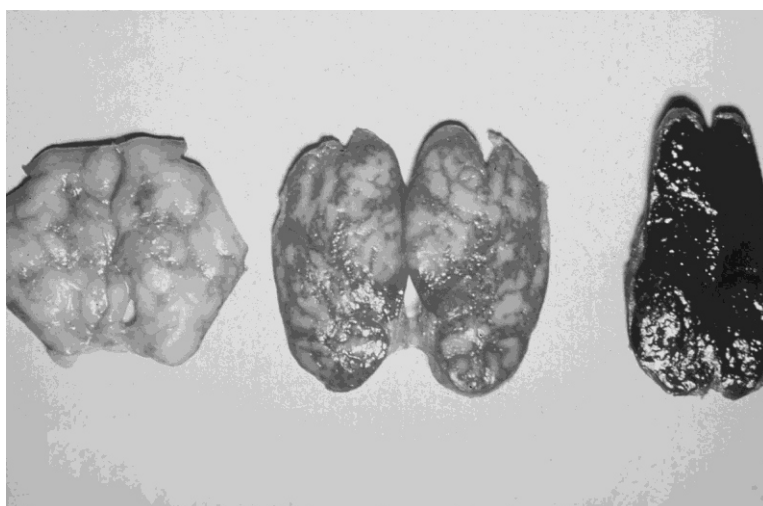


图13.3正常猪的淋巴结(左)；亚急性ASF猪的淋巴结(中)；急性ASF 猪的淋巴结(右)

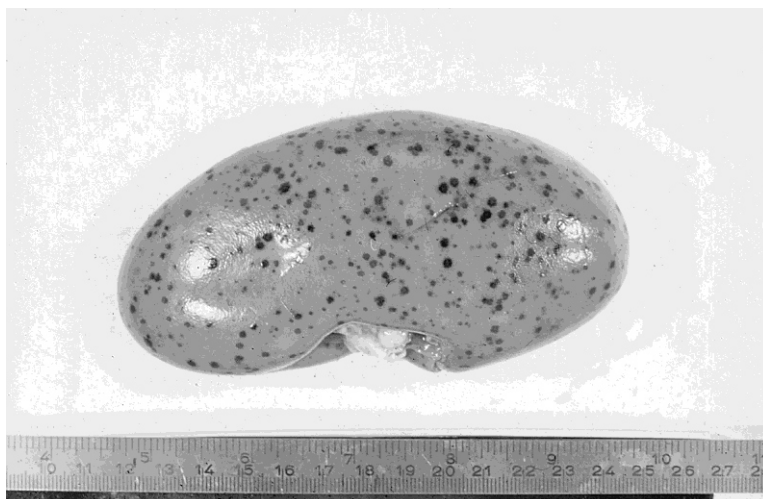


图13.4 急性ASF猪肾脏，可见肾皮质表面有大量出血点

免疫学

抗ASFV的免疫保护机制仍不清楚，并且开发有效疫苗的所有设想都未成功。当今疫苗很难产生有效的免疫力，可能与不同ASFV分离株间的变异太大有关，也可能与ASFV能在参与免疫反应的细胞中复制有关。尽管尚未证明ASFV能在T细胞和B细胞中复制(Minguez等，1988；Gomez-Villamandos等，1995)，但ASFV确实能在单核细胞和巨噬细胞中复制。即使有免疫抑制作用的话，其作用也不明显（Sánchez-Vizcaíno等，1981）。

ASFV有很好的抗原性，在感染期间能诱导产生高水平的特异性抗体。在感染后4天能检测到IgM，感染后6～8天能检测到IgG(Sánchez-Vizcaíno等，1979)。并且初次感染后血清中的抗体能维持很长一段时间。抗ASFV的抗体能延迟临床

症状的出现，减轻病毒血症，并能保护感染猪不会死亡(Schalafer等1984；Onisk等，1994)。

早期的实验表明实验感染和自然感染ASFV的猪血清中没有中和抗体。然而，康复猪用口蹄疫疫苗免疫时能产生正常水平的中和抗体，该实验证明了ASFV不影响体液免疫反应(De Boer，1967)。其他学者(Ruiz Gonzalvo等，1986)也证明不同的ASFV分离株大部分能被恢复期血清中和，但总有10%的ASFV不能被中和。另外，Gomez-Puertas等(1996)报道，恢复期猪血清中的ASFV抗体能有效地中和感染易感细胞之前或之后的ASFV。然而，现在还不能证明ASFV的特异性抗体完全符合经典的病毒中和试验；另一方面，来自康复猪的细胞毒性T淋巴细胞能杀死感染ASFV的巨噬细胞(Martins和Leitao，1994)——这表明细胞介导的免疫反应可能是保护性免疫反应的重要组成部分。然而，抗体和细胞介导的免疫反应在保护猪抵抗ASF中所起的作用还不太清楚。

诊断

因为ASF与其它出血性猪病(例如，猪霍乱、猪丹毒和败血性沙门氏菌病)的临床症状和病变相似，因此，建立确诊ASF的实验室方法很有必要。和诊断其它病毒性疾病一样，ASF的诊断主要是针对感染性病毒、病毒抗原、病毒DNA或特异性抗体的检测。有各种实验室方法用来检测ASFV或其抗体(Sánchez-Vizcaíno，1986；Arias和Sánchez-Vizcaíno，2002)。

已经有一些方法被用于ASFV的检测，但目前最方便、安全及常用的方法为直接免疫荧光法(direct immunofluorescence, DIF)(Bool等，1969)，血细胞吸附实验(hemadsorption test, HA)(Malmquist和Hay，1960)和聚合酶链式反应(PCR)(Wilkinson，2000；Aguero等，2003)。

直接免疫荧光法(DIF)是利用脾、肺、淋巴结或肾的触片或冰冻切片中的ASFV抗原与标记的抗ASFV免疫球蛋白进行反应来确诊。该方法对诊断急性ASF具有快速、经济、高敏感性的特点。然而，DIF诊断亚急性和慢性ASF时只有40%的敏感性。这种敏感性的降低似乎与感染猪组织内抗原-抗体复合物的形成有关，这种组织中的抗原-抗体复合物能阻断ASFV抗原与标记的抗ASFV免疫球蛋白的结合(Sánchez-Vizcaíno，1986)。

由于血细胞吸附实验(HA)的特异性和敏感性，HA在许多情况下都很有用。

HA方法可用于诊断新暴发的ASF，尤其是其它方法诊断为阴性时，应该用HA方法进行确诊。血细胞吸附实验是利用红细胞能吸附在体外培养的感染ASFV的巨噬细胞膜表面。在ASFV诱导的细胞病变出现前，红细胞能在巨噬细胞周围形成典型的玫瑰花环(见图13.5)(Malmquist和Hay，1960)。然而，尽管HA实验是检测ASFV的最敏感的方法，但应该指出的是，一些ASFV分离株能诱导巨噬细胞的细胞病变，而不能出现血细胞吸附现象(Sanchez Botija，1982)。这些毒株可利用DIF方法检测细胞培养物的沉淀物确诊。

用来自病毒基因组的高度保守区基因片段作为引物，利用PCR技术对分离到的ASFV毒株进行检测是可行的。目前已利用PCR技术从所有已知的病毒基因型中鉴定ASFV分离株，其中包括那些低毒力病毒株以及不能产生血细胞吸附现象的病毒株(Wilkinson，2000；Aguero等，2003)。当组织中病毒不适合做其它诊断实验时，可利用PCR技术检测组织中的病毒DNA进行确诊。在ASF的监测、控制和根除计划中，PCR技术是一种优秀、快速的常规诊断方法(Aguero等，2003)。目前，已开发成功一种基于限制性内切酶分析的确诊方法(Aguero等，2003)。

研究抗ASFV的抗体在两个方面是极其重要的：第一，因为ASF没有疫苗，所以ASFV抗体的出现表明动物已受感染；第二，在感染ASFV后6~8天能从血液中检测到特异性IgG，这种特异性IgG能存在很长时间，甚至数年。ASFV诱导的抗体出现时间早并且持续时间长，该现象对于研究亚急性和慢性ASF很重要。同样，在消灭ASF的计划中抗体检测起着重要作用(Arias和Sánchez-Vizcaíno，1992)。

一些技术适用于ASF抗体的检测。但目前最常用的是间接免疫荧光实验(indirect immunofluorescence, IIF)、间接ELISA(Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Sánchez-Vizcaíno等，1979，1983)和免疫印迹技术(Immunoblotting assay, IB)(Pastor等，1987)。

IIF无论是检测血清还是检测组织渗透物中的ASF抗体都具有高敏感和高特异(Sanchez Botija等，1970)。该方法利用被ASFV感染的单层细胞检测ASFV的抗体。通过荧光标记的A蛋白检测抗原-抗体反应。利用IIF和DIF法能在3h之内检测出85%~95%的ASF病例(急性型、亚急性型和慢性型)(Sánchez-Vizcaíno，

1986)。

目前，对ASF进行大规模的血清学调查时，ELISA是最有效的方法。该方法是利用A蛋白检测与ASF抗体相结合的病毒蛋白，酶结合在A蛋白上，当酶与合适的底物反应时出现可见的颜色反应。

免疫印迹技术(IB)的特异性和敏感性均较高，且容易判断。该方法可替代IIF用于确诊ELISA方法难以确诊的病例(Arias和Sánchez-Vizcaíno, 1992)。

能用做ASF实验室诊断的样品有淋巴结、肾、脾、肺、血液和血清。组织样品可用于病毒分离(HA试验)、病毒抗原及DNA检测(DIF和PCR法)，血液可用于病毒分离(HA和PCR法)，血清和组织渗出物可用于抗体检测(IIF、ELISA和IB法)。

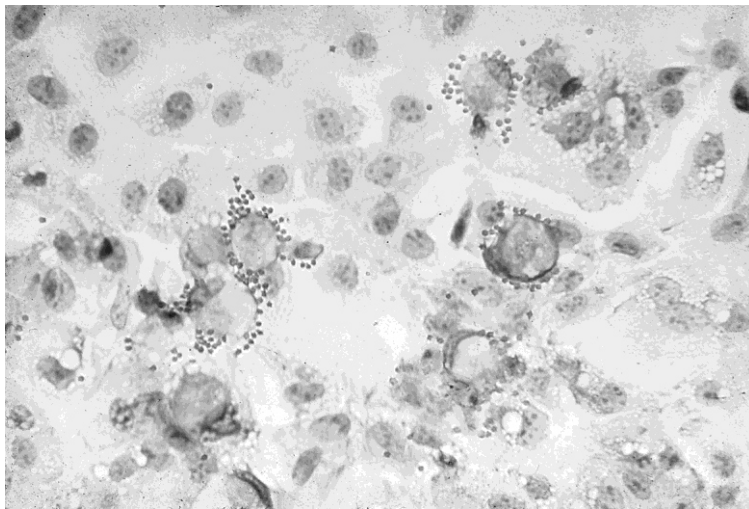


图13.5血球吸附现象：红细胞吸附在感染ASFV的巨噬细胞周围

预防和控制

目前还无法治疗ASF，也没有有效的疫苗来预防ASF。自从1963年第一个ASF弱毒疫苗在葡萄牙应用以来(Manso Ribeiro等，1963)，人们做了许多努力以期制备满意的疫苗。灭活疫苗不能产生任何保护作用。弱毒活疫苗能使一些猪免受同源ASFV毒株的感染，但是这些猪部分会成为病毒携带者或出现慢性病变，当大规模使用弱毒活疫苗时，这种可能性会增加(Manso Ribeiro等，1963；Sanchez Botija, 1963)。其它研究表明，抗同源或一些异源ASFV毒株的猪血清能抑制(体外)与异源毒株相关但与异源毒株不同的毒株对细胞的感染(Ruiz Gonzalvo等，

1986)。近来的发现表明，针对ASFV蛋白p30、p54和p72的中和抗体不足以产生抗体介导的免疫保护（Neilan等，2004）。ASFV的全部核苷酸序列分析(Yannez等，1995)对揭示ASFV不同基因在保护性免疫反应中所起的作用提供了新的机会。ASF在葡萄牙和西班牙流行二十多年后被根除的事实表明，疫苗在根除ASF的计划中不是必需的。

由于ASF会引起很高经济损失，而且没有有效的疫苗控制该病，所以无ASF国家预防ASFV的传入显得尤为重要。流行病学回顾研究表明，ASFV主要来自于国际空港和海港的被ASFV污染的垃圾。因此，飞机和轮船的残余食品应全部焚烧。在存在ASFV的欧洲，如撒丁岛，ASF呈地方性流行，在这里存在有温和型或隐性ASF，预防ASF最重要的方面是控制猪只流通，并进行广泛的血清学检测以确定带毒猪。在非洲一些ASF呈地方性流行的地区，预防ASF的最重要的是控制天然宿主，例如，软蜱(非洲钝缘蜱)和疣猪，并且要防止这些传染源与家猪接触。不论什么原因，当怀疑猪感染了ASF时，应严格限制猪只的流通并立即进行ASF的确诊。另外，重要的是牢记低毒力ASFV不会引起临床症状和病变。

（李晶晶 译 王金秀 校）