

第 28 章 猪流感

Christopher W、Olsen,Ian H.Brown、Bernard C.Easterday 和 Kristien Van Reeth

流感病毒感染是世界上多数国家猪支气管间质肺炎与呼吸道疾病常见而又重要的病因，任何动物流感的典型临床特征为：突发疾病，短期发热，食欲不振，嗜睡，咳嗽，呼吸困难及鼻腔流出分泌物。随着流感病毒在猪群中的传播，临床疾病可能持续几周时间。流感病毒还可与其它病毒或细菌病原协同作用引起猪的呼吸道疾病综合症(PRDC)。猪流感病毒感染的病程及严重性受继发感染的病原、猪的年龄、健康状况及免疫状态的影响，也可能受流感病毒毒株的影响。

猪流感病毒感染除了对猪的健康有重大意义外，还对人类公共卫生有着重要的意义。历史表明猪与人类流感密切相关。在 1918 年的夏天，美国中北部的猪群中出现一种临床和病理学与人流感有很多相似之处的流行病，与 1918 年流感大流行同时发生。那次流感大流行中全世界估计有 2000—5000 万人死亡。由于与人类流行的流感临床症状极为相似，Koen（1919）则将猪的这种疾病称为“流感（flu）”。Dorset 等（1922）在 1922 年美国兽医学年会上也报告了“猪流感（hog flu）”，提供的疾病描述与 Koen 的相似，他认为早在 1918 年前 5—6 年间在衣阿华州见到“猪流感”的病例。此外，McBryde（1927）指出农场主和兽医人员经常遇到这种疾病，他们认为由于感染猪的传染曾得过此病。McBryde 本人曾感染急性发热性疾病，与他一直在东南部衣阿华州调查研究的猪流感相似。最后 Murray（1921）还报道了美国猪流感的特征。Beveridge（1977）指出“...在 1918 年秋季[Aladar Altmann],一位匈牙利兽医描述了一种猪病，他认为是流感。”

当 Shope 1931 年首次用可靠的实验证明猪的这种疾病是由病毒引起（Shope 1931）的时候，猪流感（SI）的病原才得到确证。两年后，Smith 等（1933）证明人类流感也是由病毒引起的。“当 1957 年人类流感大流行...在当年春季首次开始在亚洲国家传播，世界卫生组织（WHO）恰好考虑进行动物血清学调查，目的是要了解在动物流感流行病学中病毒毒株的组成”（Kaplan 1969）。研究的结论是亚洲的 H2N2 毒株能感染猪，到 1970 年，大量的血清学证据表明与感染猪有接触的职业人员都感染过猪流感病毒（SIVs）。此外，在 1974 年和 1975 年（Easterday, 1986），儿童感染流感与感染猪接触有关。在 1976 年，在新泽西州

Fort Dix 部队新兵中，发生了 SIV 感染的病例（Top 和 Russel, 1977）。在 1976 年秋季，当从威斯康星州猪场猪体内及其饲养员体内分离到病毒时，有关 SIV 从猪向人间传播的推测宣告结束（Easterday 等，未发表资料；Hinshaw 等，1978）。

近年来，病毒的遗传学分析表明：1918 年早期猪的流感病毒和人的流感病毒密切相关，尽管仍不清楚原始毒株是从猪向人传播还是从人向猪传播的（Taubenberger 等 2001 年的综述）。自猪流感出现至今已超过 85 年以上，目前，SI 继续对养猪业乃至公共卫生安全有着重要的经济学意义。

病原学

流感病毒属正黏病毒科，为多形态、有囊膜的病毒，直径约 80—120nm。脂质囊膜使病毒对去污剂及常用的抗病毒消毒剂高度敏感。流感病毒由 7—8 个分节段的反义 RNA 组成，编码 11 种病毒蛋白。病毒基因组分节段的特性是流感病毒的关键结构，有利于流感病毒发生基因重排。

流感病毒可按照血清型、亚型进行分类，最近又根据基因型进行分类。A、B 和 C 型流感病毒（依据病毒的基质蛋白『M』和核蛋白『NP』的不同进行定义）中，只有 A 型流感病毒作为猪流感的病原具有临床意义。A 型流感病毒的命名按以下惯例进行：A/来源宿主/分离地点/分离株编号/分离年代，如 A/猪/威斯康星/125/98。如果未指定来源宿主，则表明为人分离株。

根据 A 型流感病毒囊膜表面突起的纤突样血凝素（HA 或 H）和神经氨酸酶（NA 或 N）糖蛋白的性质，将流感病毒分为不同的亚型。现有 16 种不同型的 HA 和 9 种不同型的 NA，它们的抗原性和遗传特性均能鉴别。病毒中不同的 HA 和 NA 组合形成病毒亚型，如 H1N1, H3N2。从功能上，HA 蛋白（结构上为三聚体）结合到含唾液酸的受体上，介导病毒感染宿主细胞。唾液酸结合物还参与红细胞凝集过程，通过血凝和血凝抑制（HI）血清学试验检测病毒的感染。HA 蛋白还含有中和抗体（Abs）结合的主要抗原位点。NA 蛋白（结构上为四聚体）催化唾液酸从邻近的糖基上裂解，因此可能阻止病毒粒子的聚集，有利于出芽病毒颗粒的释放（见 Lamb 和 Krug 2001 及 Wright 和 Webster 2001 关于《流感病毒的结构与遗传学》详细综述报道）。

为了解 A 型流感病毒的流行病学及其病毒的演变情况，对病毒既进行亚型又进行基因型的鉴定显得越来越重要。通过对每个病毒 RNA 片断的基因序列测

定，然后将这些序列经过系统发育演变分析进行基因型定型。这些分析可以确定进化系谱（根据世界上宿主的品系和地理区域），从这些谱系中可以知道每个基因的起源。近年来基因定型对于了解欧洲、亚洲和北美洲分离到的 SIVs 重排株的起源极其重要。

流行病学

在历史上，SI 在美国北部地区和西欧的暴发多发生于晚秋到早冬季节，常与寒冷的温度和寒冷的秋雨袭击有关（Easterday 1980；Easterday 和 Van Reeth 1999）。然而研究表明：SIVs 终年存在（Hinshaw 等 1978；Olsen 等 2000），且随着不断对养猪业进行限制，季节性的临床疾病已不太突出。

随着动物的移动，流感病毒极易传入到猪群中，病毒传播主要是猪对猪接触通过鼻咽途径进行，在排毒高峰（多在感染后的 2—5 天）时，每 ml 鼻腔分泌物中排泄的病毒含量 $\geq 10^7$ 个感染颗粒（Landolt 等 2003；Van Reeth 等 2003a）。流感病毒一旦传入猪群，只要有易感猪存在，病毒就可能继续传播。在全进全出的饲养模式中，由于猪群的淘汰和设施的消毒不断进行，病毒可能消失。但是流感病毒可能会传入到新的猪群，因此解释了病毒似乎持续存在于猪场中的原因。

推测 SI 带毒者的存在与 SIVs 持续相互传播有关。历史上，曾假设通过猪肺线虫和蚯蚓的传播使猪舍中保持有流感病毒的（Shope 1941）。然而，这种机制的证据不足，且病毒的持续存在更可能是通过不断引进易感猪而导致的。

流行病学与遗传演化

为了解猪流感病毒的流行病学（全球流行病学）及其遗传演变情况，首先需要了解其它动物流感病毒的生态学与流行病学。

同在猪中一样，流感病毒在马、海洋哺乳动物、禽及人类中，可以导致临床疾病和/或具有重要经济学意义的疾病。相反，流感病毒在水禽和海鸟中一般具有高度宿主适应性，很少引起发病，表现低进化率（“进化静止”）（Gorman 等 1990，Webster 和 Kawaoka 1994，Webster 等 1992 及 Wright 和 Webster 2001 的文献综述）。在水生鸟类中已分离到 A 型流感病毒的所有 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型。在这些鸟类中，A 型流感病毒主要在肠道细胞中复制，因此，在粪便中排毒而污染湖水（Hinshaw 等 1980；Webster 等 1978），因此水禽成为全球广泛存在的流感病毒宿主。系谱研究资料表明：哺乳动物 A 型流感病毒也是水禽 A 型

流感病毒进化演变而来(Webster 等 1992 及 Wright 和 Webster 2001 的文献综述)。然而,只有 H1、H3、N1 和 N2 亚型病毒建立了稳定的谱系,并在猪群中广泛传播。

古典的 H1N1 亚型猪流感病毒 自从 1930 年 Shope 等首次分离到 H1N1 流感病毒,到上个世纪 90 年代(Arora 等 1997; Chambers 等 1991; Hinshaw 等 1998; Morin 等 1981; Olsen 等 2000),古典的 H1N1 流感病毒是引起北美猪群发生流感的主要原因。在南美、欧洲和亚洲的猪群中也分离到了古典的 H1N1 流感病毒(Brown 2000 和 Olsen 等 2004 的文献综述)。除家养猪外,有证据表明野猪也感染古典的 H1N1 猪流感病毒(Hinshaw 等 1983; Wright 等 1992)。

在美国,从 1965 年至上个世纪 80 年代期间(Luoh 等 1992; Noble 等 1993; Sheerar 等 1989),古典的 H1N1 猪流感病毒在抗原性和遗传性方面仍然高度保守,但在上个世纪 90 年代期间,已分离到古典的 H1N1 猪流感病毒抗原和遗传变异株(Dea 等 1992; Olsen 等 1993, 2000; Rekik 等 1994)。

人流感病毒向猪间传播 只有少量的证据表明人的 H1N1 流感病毒自然感染猪群后能保存下来(Brown 2000 的文献综述),但在亚洲和欧洲猪群中经常分离到 H3N2 亚型人流感病毒(Brown 2000 和 Olsen 等 2004 的文献综述)。也有证据表明:在欧洲猪群中持续流行的 H3N2 病毒发生了遗传/抗原性漂移(de Jong 等 1999),当与人群中 H3N2 流感病毒的遗传/抗原性漂移相比,这种遗传/抗原性漂移相当小。在北美,从猪体内分离出 H3N2 人流感病毒的几率低得多(Bikour 等 1995; Hinshaw 等 1978; Karasin 等 2000c),不过人的 H3N2 流感病毒传入猪群中可能是美国猪群中出现重排病毒的重要因素。

禽流感病毒向猪间传播 实验研究表明猪可广泛感染禽流感病毒(AIVs)(Kida 等 1994),且世界上许多国家已经证明猪自然获得 AIVs 的感染。H1N1 禽流感病毒传入猪至少有三次(Brown 2000; Guan 等 1996; Karasin 等 2004; Pensaert 等 1981),特别是在 20 世纪 90 年代,传入猪群的 H1N1 禽流感病毒在大多数欧洲大陆和英国流行,最终成为这些地区 SI 的主要原因(Brown 等 1997b; Donatelli 等 1991; Scholtissek 等 1983)。这些类禽源 H1N1 流感病毒也经历了遗传/抗原性漂移(Brown 等 1997b; de Jong 等 2001),而且已经从猪传播到家养火鸡(Ludwig 等 1994; Wood 等 1997)。

此外，在中国猪群血清中，检测出禽 H4、H5 和 H9 病毒的抗体（Ninomiya 等 2002）；在亚洲猪群中分离出 H1N1、H3N2 和 H9N2 亚型禽流感病毒（Guan 等 1996；Kida 等 1988；Peiris 等 2001a,b）；以及在加拿大猪群中分离出禽 H4N6、H3N3 和 H1N1 流感病毒（Karasin 等 2000b, 2004）。

猪感染重排的流感病毒 由于流感病毒基因组分节段，使得两个病毒共感染同一宿主时，在病毒复制期间发生 RNA 片断的交换。由于猪的呼吸道细胞既表达人流感病毒选择的 SA α 2, 6Gal 受体，又表达禽流感病毒选择的 SA α 2, 6Gal 受体，所以，对人的 A 型流感病毒和禽的 A 型流感病毒感染均易感（Ito 2000；Ito 等 1998a, 2000；Suzuki 等 1997）。在美国和世界各地猪群中，已分离出几个不同类型的重排病毒（Olsen2002a,b）。

重排 H3N2 病毒 已在亚洲和美国的猪体内分离出人流感病毒和古典猪流感病毒混合的重排 H3N2 病毒（Nerome 等 1995；Shu 等 1994；Zhou 等 1999），此外，在亚洲猪体内已分离到含人 HA 和 NA 基因及禽内部蛋白基因的 H3N2 流感病毒（Peiris 等 2001a）且成为目前欧洲猪群中流行的 H3N2 病毒（Campitelli 等 1997；Castrucci 等 1993；Lin 等 2004）。自 1998 年以来，全美国猪群中经常分离出独特的“三种病毒重排”的 H3N2 病毒，这些病毒含有人流感病毒源的 HA、NA 和 PB1 聚合酶基因，古典 H1N1 亚型猪流感病毒源的 NP、M 和 NS 基因，及北美禽流感病毒源的 PB2 和 PA 聚合酶基因（Karasin 等 2000c；Webby 等 2000；Zhou 等 1999）。感染这种三种病毒重排的病毒不仅引起猪的呼吸道疾病，而且引起母猪自发流产，成年猪死亡（Karasin 等 2000c；Zhou 等 1999）。这些致死性结果在古典 H1N1 亚型猪流感病毒感染中是不常见的。至于与重排病毒相关的流产是由于病毒直接作用的结果，还是由于感染猪发生的高热所致，仍有待确定。

重排 H1N2 病毒 就在最初分离出三种病毒重排的 H3N2 病毒后不久，在美国猪感染 H1N2 病毒后出现了类流感疾病和流产。遗传演化分析结果表明：这种病毒保留了三种病毒重排的 H3N2 病毒全部基因型，但通过与古典 H1N1 亚型猪流感病毒重排，已获得 H1 型 HA 基因（Karasin 等 2000a）。类似的 H1N2 病毒经常在美国猪群中传播（Choi 等 2002a,b；Karasin 等 2002），而且已传染给密苏里州的火鸡（Suarez 等 2002）和北卡罗来那州的野水禽（Olsen 等 2003）。

直到 1999 年，报道在北美猪群中有 H1N2 流感病毒，然而，在日本（Ito 等

1998b; Nerome 等 1985; Ouchi 等 1996; Shimada 等 2003; Sumimura 等 1980)、法国 (Gourreau 等 1994) 和台湾 (Tsai 和 Pan2003), 已从猪体内分离出 H1N2 流感病毒。这些 H1N2 流感病毒为人 (或类人源猪系 H3N2 病毒) 和古典 H1N2 亚型猪流感病毒的重排结果。人-禽流感病毒重排的 H1N2 病毒于 1994 年首次在英国猪体内分离出 (Brown 等 1995, 1998), 随后传播到欧洲的其它国家 (Marozin 等 2002; Schrader 和 Suss2003; Van Reeth 等 2000, 2003a,b)。尽管意大利猪群分离的一些 H1N2 病毒含有类禽源的猪 H1 HA 基因 (Marozin 等 2002), 但这些病毒含有典型的人源 HA 和 NA 基因及源于欧洲类禽源的 H1N1 猪流感病毒的内部蛋白基因。

重排 H1N1 病毒 自 1998 年以来, 已在美国分离出含古典猪 H1N1 HA 和 NA 基因及重排 H3N2 病毒或 H1N2 猪流感病毒其余基因的重排 H1N1 病毒。这种病毒首次从威斯康星州直接与猪有接触史的类流感病人体内分离出 (Cooper 等 1999)。然而, 从 2001 年以来, 这种基因型的病毒经常从美国的猪体内分离到 (Olsen 等未发表资料; Webby 等 2002)。目前的监测结果表明: 这种基因型已成为北美猪群中 H1N1 病毒的优势基因型 (Olsen 和 Webby, 未发表资料)。

重排 H1N7 病毒和 H3N1 猪流感病毒 这些亚型病毒在猪群中分离的不多。H1N7 亚型病毒于 1992 年在英国的一个猪场分离到。这种病毒含类 A/马/布拉格/1/56 的 NA 和 M 基因、人流感病毒源的其余基因, 且实验感染猪的致病性低 (Brown 等 1994, 1997a)。重排 H3N1 病毒 (人 H3N2 病毒×古典猪 H1N1 病毒) 在英国和台湾猪体内分离出 (Brown 未发表资料; Tsai 和 Pan 2003)。

公共卫生意义

猪感染流感病毒有两个方面重要的公共卫生学意义: 人感染猪流感病毒 (动物病) 和猪可能作为人流感大流行的新病毒宿主。

在美国、亚洲和欧洲已报道 SIVs 的感染 (包括致死性的感染)。大多数感染的是古典的 H1N1 SIV。然而, 从欧洲猪体内分离的全禽源 H1N1 病毒、在欧洲和香港猪体内分离到的含禽源内部蛋白基因的重排 H3N2 病毒、以及在美国猪体内分离到的重排 H1N1 病毒均从人体内分离到 (Alexander 和 Brown2000, Olsen2002a 和 Olsen 等 2002, 2004)。

大多数 SIV 感染的患者都直接与猪有过接触, 欧洲和美国进行的血清学研究

表明：与猪接触的人中感染 SIV 的机率增加（Kluska 等 1961；Nowotny 等 1997；Schnurrenberger 等 1970；Woods 等 1968，1981）。此外，最近对美国猪场工作人员及其家庭成员（与市区对照受试者比较）研究发现：生活在猪场里或每周进入猪舍 4 天及以上的农场主及其家庭成员统计学上出现 SIV 血清阳转（Olsen 等 2002）。然而，也有感染 SIV 无明显的动物接触史。尽管这样的病例表明：除 Fort Dix 事件外（Top 和 Russell 1977），在最初猪对人传播病毒后可能存在病毒人对人的传播，但很少有证据表明猪源流感病毒人对人传播。

已经证明：人 H3N2 病毒的老祖宗在猪群中传播的时间超过在人群中传播的时间（Brown 2000 和 Olsen 等 2004）。此后这些病毒再次传入人群尤其是小孩特别关注，因为儿童出生前对流行的这些病毒缺乏免疫力。

由于猪对禽源和人源流感病毒感染均易感（Ito 2000 文献综述；Ito 等 1998a），因此猪被认为是“混合器”宿主，通过基因重排，出现人流感病毒大流行（Scholtissek 和 Naylor 1988；Scholtissek 等 1985；和 Brown 2000 文献综述，Webster 等 1992，Scholtissek 等 1998，及 Wright 和 Webster 2001）。

发病机理

SIV 感染通常仅限于呼吸道，病毒在鼻粘膜、扁桃体、气管、肺及气管支气管淋巴结上皮细胞中复制（Brown 等 1993；Heinen 等 2000；Lanza 等 1992）。检测到的病毒血症滴度较低，病毒血症持续时间短（Brown 等 1993）。试图使病毒在呼吸道以外的部位复制很不成功（Choi 等 2004）。

SI 呈急性感染，病毒清除极快。大多数实验研究中，接种（PI）后 1 天鼻腔开始排毒，7 天内停止排毒。同样，7 天后肺脏或其它呼吸道组织中分离不出 SIV（Brown 等 1993；Choi 等 2004）。

病毒感染后肺脏是主要的靶器官，每克肺脏中病毒感染滴度 $>10^8 \text{EID}_{50}$ ，（Haesebrouck 和 Pensaert 1986；Van Reeth 等 1998）。免疫荧光（IF）和免疫组化（IHC）研究表明：病毒高度特异性的亲嗜细支气管上皮（Born 等 1998；Brown 等 1993；Haesebrouck 和 Pensaert 1986；Van Reeth 等 1998）。经 IF 染色后，直到 100% 的气管/细支气管上皮层及大量的肺泡上皮细胞呈阳性。气管和细支气管内有典型的分泌物，带有变性脱落的粘膜细胞和嗜中性粒细胞。但到接种后的 2

—3 天，肺脏中病毒滴度及病毒阳性细胞数量开始减少。

SIV 的感染很容易在实验室用滴鼻（IN）、气雾或气管内（IT）注射途径进行复制，但复制出典型的 SI 临床症状和病理变化需经 IT 途径注射大剂量的病毒（ $\geq 10^{7.5} \text{EID}_{50}$ ）才能完成（Maes 等 1984）。用侵袭性不强的方法，如 IN 途径，可能引起温和的或完全是亚临床的感染（Larsen 等 2000；Van Reeth 和 Pensaert 1994）。

流感病毒的直接细胞损伤可能与 NA 和/或 PB1F2 蛋白引起的细胞凋亡有关（Gibbs 等 2003；Morris 等 1999；Schultz-Cheey 和 Hinshaw 1996）。但是，急性感染期宿主产生的前致炎细胞因子（Cytokine）在 SI 疾病发展中可能起主要作用。对感染 SIV 猪肺脏产生的 α 干扰素（ $\text{IFN}\alpha$ ），肿瘤坏死因子- α （ $\text{TNF}\alpha$ ）、白细胞介素-1（ $\text{IL}1$ ）及白细胞介素-6（ $\text{IL}6$ ）进行研究均支持这一观点（Van Reeth 等 1998，2002）。这些细胞因子已知能诱导肺脏机能障碍和炎症、发热、不适及食欲减退，这些反应相互作用，共同加强。在 IT 感染实验中，接种后 18-24 小时，当肺脏病毒滴度、嗜中性粒细胞浸润及临床症状达高峰时，肺脏滤液液中发现了所有 4 种细胞因子大量存在。与此相比，IN 途径接种 SIV 后，肺脏病毒滴度低，诱导产生的细胞因子水平不高，及感染后临床症状表现温和或亚临床症状。

因此，到达下呼吸道的病毒量和产生感染病毒的数量可能决定着肺脏中细胞因子产生的程度，反之，又决定着疾病的严重程度。然而，许多细胞因子又是抗病毒的，具有免疫刺激作用，因而可以清除流感病毒。所以，SIV 感染期间每种细胞因子的特定作用值得进一步研究。

临床症状

A 型流感病毒感染后，由于病毒的快速传播，典型症状为一群猪发病。H1N1、H1N2 和 H3N2 亚型病毒感染后的临床症状相似，在大多数欧洲国家（Brown 2000 文献综述）和美国（Karasin 等 2000a,c,2002；Zhou 等 1999），所有亚型病毒均产生急性呼吸道症状。疾病突然暴发，潜伏期 1-3 天，一个猪群或一个流行病学单元内所有年龄大部分猪出现典型的临床症状。

SI 症状基本与上个世纪 20 年代描述的症状相似（Dorset 等 1922；McBryde 1927；Shope 1931）。开始症状表现为发热、食欲不振、不爱活动、衰竭、扎堆及卧地不起，还可能出现结膜炎、鼻炎、鼻腔分泌物、喷嚏、咳嗽及体重减轻。疾

病进一步发展为张口呼吸，呼吸困难，尤其是迫使病猪走动时，表现更为明显。本病的发病率高（近 100%），但死亡率低（通常不超过 1%），除非出现并发感染和/或幼龄仔猪。一般说来，发病后 5-7 天开始恢复，恢复较快，如同暴发时一样突然、出乎意外。

SI 急性暴发出现的典型临床症状如上所述，一般仅限于完全易感的血清学阴性猪中发生，包括无保护的哺乳仔猪或老龄猪。例如，在欧洲，当流感病毒突然再传入暂时血清学阴性的 50kg 及 50Kg 以上的育肥猪时，通常发生急性疾病（Loeffen，个人通讯）。与此相比，由于以前的感染而获得主动免疫力的育龄猪及其具有母源免疫力的后代仔猪多数不受感染。在育肥期无明显的呼吸道疾病，且从无临床症状的猪体内分离病毒的育成猪中，在经历了不同亚型病毒流行后，表现的是亚临床感染（Hinshaw 等 1978）。

除免疫状态以外，许多因素如年龄、感染压力、并发感染、气候条件及畜舍环境等可能相互作用，影响着 SIV 感染的临床结果。比如，已认识到继发感染许多细菌病原，如胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌及猪链球菌 2 型影响着 SIV 感染的严重性和病程。最近自然条件下观察到的结果表明：呼吸道病毒也作为复杂的致病因子。在欧洲集约化饲养的育肥猪群中，流感病毒和猪呼吸道冠状病毒（PRCV）或猪呼吸道与繁殖障碍综合征病毒（PRRSV）双重或三重感染率相当高（Houben 等 1995；Madec 等 1987；Van Reeth 和 Pensaert 1994）。通过实验进行双重病毒感染的研究，已经支持流感病毒与其它呼吸道病毒合并感染可能加剧病程的假设（Van Reeth 和 Pensaert 1994；Van Reeth 等 1996，2001c）。在这些研究中，与单一病毒感染猪比，双重病毒感染猪的发热、呼吸道疾病、生长停滞等症状显然更严重，持续时间更长。但双重病毒感染后，一些未知的因素可能影响着疾病的发展，因为在其它的研究中，同时接种 PRCV 和 H1N1 或 H3N2 病毒后，临床症状并未见加重（Lanza 等 1992；Van Reeth 等 2001c）。

猪群中暴发流感后，生产者和兽医师们偶尔报道出现繁殖性能下降、不育率增加、流产、弱小胎及死胎。然而，SI 病毒是否与猪繁殖障碍的发生有特异的、直接的关系，尚没有足够的资料得出结论。除极少数例外（Madec 等 1989；Woods 和 Mansfield 1974；Young 和 Underdahl 1949），认为流感病毒不能感染猪的生殖

道。

病例变化

单纯 SI 的肉眼病变主要表现病毒性肺炎。病变最常出现在肺的尖叶和心叶，实验感染研究表明：肺组织肉眼可见的实质性病变率差异很大，但在感染后的 4—5 天，50% 以上的肺脏可能出现病变（Born 等 1998；Richt 等 2003）。一般在病变肺组织和正常肺组织之间有明显的分界线，病变区呈紫色的硬结，一些肺叶间质明显水肿，呼吸道内充满血色、纤维蛋白性渗出物。相连的支气管和纵隔淋巴结通常肿大。在自然发生的 SI 中，这些病理变化常很复杂或由并发的感染，特别是细菌感染所掩盖。

SI 感染的组织学病变特点是肺脏上皮坏死和支气管上皮细胞层脱落（Haesebrouck 等 1985；Haesebrouck 和 Pensaert 1986），气管内实验接种后 24 小时，呼吸道内出现炎症细胞和坏死的上皮细胞，主要是嗜中性粒细胞堵塞，在此阶段收集的肺脏渗出液中，嗜中性粒细胞占总数的 50% 以上，而未感染的健康猪中，巨噬细胞占优势（Van Reeth 等 1998）。嗜中性粒细胞不仅引起呼吸道的堵塞，而且还可能通过释放细胞内的各种酶，损伤肺脏。感染几天后，支气管周围和血管周围淋巴细胞浸润（Richt 等 2003）。在田间临床暴发的典型 SIV 中，观察到同样的病理变化（Done 等 1996）。然而，同临床症状一样，肺脏病变也很轻微、不明显。

最后发现，H1N1 和 H3N2 病毒株引起增生性和坏死性肺炎（PNP），其特征为 II 型肺细胞明显增生和肺泡中坏死细胞聚集（Dea 等 1992；Girard 等 1992；Morin 等 1990）。但最近研究表明：PRRSV 是本病关键的病原（Drolet 等 2003）。

免疫

SIV 感染后的免疫反应包括抗体产生和细胞介导的免疫（CMI）。抗体产生可能针对病毒 HA、NA、M 和 NP 蛋白，但只有针对 HA 顶部球形区的抗体能阻止病毒吸附到宿主细胞受体上，因而中和病毒的感染力。这些抗体可以通过病毒中和试验或 HI 试验测定。NA、M 和 NP 蛋白的抗体不能阻止病毒的感染，但能通过其它抗体依赖机制介导杀伤感染细胞。在鼠的流感试验模型中，细胞毒 T 淋巴细胞（CTLs）主要针对病毒内部 NP 和 M 蛋白，而很少针对 HA 和 NA。尽管 CTLs 不能阻止病毒的感染，但在清除肺部病毒中起着关键的作用。

SIV 感染后的免疫反应极快，效果极好，感染后 1 周内完全清除呼吸道内的病毒。从感染后的 7 天起可以测出 T 细胞的反应（Heinen 等 2001 a,b; Larsen 等 2000）。感染后的 7—10 天血清中能测到 HI 抗体，感染后 2—3 周达高峰，抗体滴度可达 1: 160—1: 320（Heinen 等 2000; Larsen 等 2000），之后的几周内抗体滴度维持在较高的水平，直到感染后 8—10 周开始下降（Van Reeth 等 2004; 及其未发表资料）。用高度敏感的 ELISA 技术，在感染后第 3 天的血清中及感染后第 4 天的鼻腔分泌物中均检测到 HI 特异抗体（Lee 等 1995）。感染后猪血清中还存在 NA、NP 抗体（Heinen 等 2000,2001a; Van Reeth 等 2003a），且在鼻腔和肺脏渗出液中也发现了抗 NP 抗体（Heinen 等 2000）。正如所料，血清中 IgM 及稍晚些时候 IgG 占优势，而鼻腔洗液中以 IgA 为主（Heinen 等 2000; Larsen 等 2000）。Larsen 等（2000）证实了鼻粘膜组织中的抗体分泌细胞在猪的呼吸道局部产生的这些抗体。肺脏中的抗体至少部分是从血清中渗滤的，如在猪（Heinen 等 2000）及其它动物（White 和 Fenner 1994）的支气管肺泡洗液样本中以病毒特异的 IgG 为主。但在 SIV 感染猪肺脏洗液中也发现大量的 IgG 抗体（Larsen 等 2000），且不能排除肺实质产生的局部抗体。

初次感染 SIV 后，对同样或类似的毒株再感染产生坚强的保护作用。猪实验感染 H1N1 和 H3N2 SIV 后，当在初次感染后的 6 周和 9 周分别用同源病毒再攻击时，完全能保护猪阻止病毒在肺脏和鼻腔中复制（Heinen 等 2001b; Larsen 等 2000），然而尚不清楚确切的保护期。在“同源”免疫中，HA 特异的中和抗体可能起主要调节作用。证明猪体内其它免疫保护作用机制的研究资料仍然不足。

在欧洲和美国，由于同时流行不同亚型的流感病毒，因此，在猪的饲养周期中，可能感染多种抗原性不同的 SIVs。实验研究证明：目前欧洲的 H1N1、H3N2 和 H1N2 SIVs 之间交叉保护作用（减少排毒和降低疾病的严重性）很低（Heinen 等 2001a; Van Reeth 等 2003a），可能是由于这些病毒尽管具有不同的 HA 和 NA 蛋白，但其 NP 和 M 蛋白几乎一致（Van Reeth 等 2004）。如同介导“广谱”保护的免疫机制一样，这些田间研究资料的真正意义仍不清楚。此外，免疫接种后的保护作用更多的是亚型特异的（Van Reeth 等 2003b）。

高滴度的血清中和抗体渗滤到肺脏后，足以抑制免疫猪肺脏中 SIV 的复制，而获得保护（Haesebrouck 和 Pensaert 1986）。另一方面，保护免疫猪阻止鼻腔排

毒的作用似乎不大（Macklin 等 1998；Rapp-Gabrielson 等 2000），这可能是由于鼻粘膜中缺乏病毒特异的 IgA 抗体。

母源抗体可以保护仔猪抗 SIV 感染，但也干扰免疫接种产生的主动抗体应答。新生仔猪 SIV 母源抗体水平的高低取决于母猪的抗体水平，且随时间而下降，持续时间约为 4—14 周。实验研究中，有母源抗体的仔猪攻毒后均不能完全阻止鼻腔排毒，但一些母源抗体的仔猪肺脏能获得完全的保护（Labarque 等 2004；Loeffen 等 2003；Renshaw 1975）。具有高水平被动抗体的仔猪对病毒感染不能产生免疫应答，他们对同样病毒的再感染完全易感；具有低水平母源抗体的仔猪可以产生微弱的、延迟的主动免疫反应（Loeffen 等 2003；Renshaw 1975）。最近研究还证明：不同亚型之间的母源免疫力不能产生交叉保护（Choi 等 2004；Labarque 等 2004）。

诊断

由于 SI 感染后没有特殊的临床症状，因此，SI 的临床诊断靠推测，必须将 SI 与猪的许多呼吸道疾病进行区别。确诊要靠实验室的诊断，或通过病毒分离、病毒蛋白或核酸的检测、或检测病毒特异的抗体。

从活猪体内分离病毒一般采取鼻腔拭子获得粘液样本，对很难获得鼻腔拭子的小仔猪，则取咽拭子。在疾病的发热期，鼻腔和咽部分泌物最可能分离到病毒。样品应收集在聚酯拭子（如聚酯纤维）而不是棉拭子上。然后悬浮在适当的运输液（如甘油盐水）中，在运输到实验室期间保持冷藏（冰箱温度，4℃）。如果病毒分离的样品在收集后的 48 小时内能进行检测，就将样品保持在 4℃；如果这些样品必须较长时间保存，则建议保存在-70℃。SIVs 在-20℃保存不稳定。为了保存运输液中可能存在的少量病毒，应尽量避免过滤样品。可以通过在运输液中添加适当的抗微生物制剂来控制外来的细菌和真菌污染。

也可从急性期病死猪或剖杀猪气管或肺组织中分离病毒，组织材料在分离培养前，应同拭子一样保存。试验前，先用灭菌盐水将气管或肺组织进行匀浆处理。

分离病毒的方法已有详细的描述（Swenson 和 Foley 2004）。简述如下：一般用 10—11 日龄鸡胚，尿囊腔途径接种繁殖培养病毒，随后在 35℃孵化 72 小时。SIVs 不能典型的致死鸡胚，但用血球凝集试验（一般用鸡或火鸡的红细胞）能检测到尿囊液中的病毒，以此推测流感病毒的存在。分离期间至少需要盲传 2

代，才可以证明不存在病毒。重复传代时应在严格控制条件下进行，以避免实验室的交叉污染。

目前 SIV 的分离越来越多的采用细胞进行。几种不同来源的细胞系支持流感病毒的生长，包括：牛、犬和猪肾细胞系，猪肺和气管上皮细胞，人二倍体细胞（Easterday 1975；Ferrari 等 2003）及 Vero 细胞（Govorkova 等 1995），猪睾丸细胞（Potgeiter 等 1977）及水貂肺细胞（Schultz-Cherry 等 1998）。接种鸡胚加细胞培养（Clavijo 等 2002）或多种细胞系培养的方法可以增加病毒的分离率，这样病毒可以有选择性的在不同宿主细胞中生长。而且，最近研究表明：Madin-Darby 犬肾细胞和水貂肺细胞可以共同培养分离 SIV（Landolt 等 2005）。

流感病毒 HA 和 NA 亚型可以用 HI 和神经氨酸酶抑制（NI）试验测定（Swenson 和 Foley 2004），但现在越来越多的采用分子生物学方法检测病毒及对流感病毒的亚型定型。反转录聚合酶链反应（RT-PCR）试验（传统的 RT-PCR 和实时 RT-PCR 技术）的敏感性均相当于病毒分离方法，但快速、高通量。这些诊断方法作为普遍的、商品诊断 SIV 的方法仍不成熟，且在检测异源病毒方面使用受限，但这些诊断方法已成功的用在猪群流行亚型的检测，与常规的病毒分离和鉴别方法相关（Choi 等 2002c,2004；Landolt 等 2005；Olsen 等未发表资料；Schorr 等 1994）。

其它检测病毒或病毒抗原的方法包括用于检测肺组织（Barigazzi 等 1993）、鼻粘膜上皮细胞（Onno 等 1990）、或支气管肺泡渗出物（Runge 等 1996）的直接免疫荧光技术；检测固定组织的免疫组化（IHC）方法（Haines 等 1993）；ELISA（Lee 等 1993）；用免疫过氧化物酶染色进行定型和亚型的快速细胞培养技术（Ziegler 等 1995）；以及能快速检测临床样品中 A 型流感病毒抗原的商品化酶联免疫吸附膜试验（Directigen FLU-A）（Ryan-Poirier 等 1992）。

血清学试验可以用来检测流感病毒特异的抗体存在。血清学方法诊断急性 SIV 感染需要用急性期和康复期（感染后 3—4 周）双份血清样本和适当的抗原。

尽管有商品 ELISA 试剂用于 SIV 的诊断，但 HI 仍然是检测抗 SIV 抗体的最常见的试验方法。诊断学家必须认识到猪血清中可能存在非特异抑制剂和非特异凝集素，干扰 HI 试验。血清应加以处理，以减少或破坏它们的活性，尽管有些处理降低了特异性抗体水平。使用最广的是用受体破坏酶处理和用鸡红细胞吸附

处理（Swenson 和 Foley 2004）血清。由于世界各地不同地理区域流感病毒的抗原漂移和变异，猪群中感染同一亚型病毒的抗原性存在相当大的差异，因此，在血清学试验中用作抗原的病毒选择应保证这些病毒毒株与一个地区、国家或大陆目前流行的病毒相匹配（Brown 等 1997b；de Jong 等 1999；Karasin 等 2002；Olsen 等 2000；Richt 等 2003）。

其它的试验，如 NV 试验（Brown，Olsen，未发表资料）或单向辐射溶血试验（Ogawa 等 1978）已用于检测猪流感病毒的抗体。尽管这些试验不需对血清进行预处理，但它们更适合在专业实验室使用。

有病毒抗体的母猪，其哺乳仔猪或断奶仔猪用血清学和病毒学方法进行 SIV 的确诊更复杂。已经表明：有母源抗体的断奶仔猪可能感染排毒，感染病毒后恢复率和临床症状的严重性相反与母源抗体水平相关（Easterday 1971；Renshaw 1975）。此外，由于主动抗体产生被母源抗体抑制，康复期血清中抗体水平低于急性期血清中抗体水平（Easterday 1971；Mensik 1960, 1963, 1966；Renshaw 1975）。母源抗体衰退后，仔猪可能再感染、排毒、出现临床症状、产生典型的初次抗体反应。

预防与控制

免疫接种和生物安全仍然是预防猪 SI 的主要措施。在欧洲和美国已有使用含佐剂的 SIV 商品灭活疫苗作肌肉注射。初次免疫接种应进行两次，间隔 2—4 周。建议母猪每半年进行一次加强免疫接种。

由于欧洲和美国流行的 SIVs 之间的抗原性和遗传特性不同，不同大陆之间 SIV 疫苗株的成分不同。欧洲使用的疫苗首次在 20 世纪 80 年代中期获得执照，该疫苗中含有当时流行的 H1N1 和 H3N2 两个亚型。大多数通用疫苗仍含古老的人 New Jersey/76(H1N1)株和 Port Chalmers/73 (H3N2) 株。现有的疫苗中即有全病毒疫苗，又有“裂解”疫苗（高度纯化的流感病毒裂解产生）。在美国，首次在 1993 年批准使用单价 H1N1 SIV 疫苗，1998 年 H3N2 流感病毒在美国猪群中出现后，使用单价和双价的 H1N1/H3N2 SIV 疫苗。在美国，尽管含重组 H1N1 病毒的三价疫苗最近研制成功，但目前 SIV 疫苗主要含古典的 H1N1 病毒和三重组的 H3N2 病毒。含猪群特异毒株的自家疫苗在美国也在使用。

大多数 SIV 疫苗效力试验资料是通过免疫—攻毒试验获得的，选取 SIV 抗

体阴性猪免疫两次商品疫苗，第二次免疫后的 2—6 周，用强毒 SIV 攻击。对欧洲疫苗进行的几次研究中，采用严重的气管内攻毒方法，未免疫的对照猪在攻毒后的 24 小时内引起了典型的 SIV 症状和肺脏中高滴度的病毒产生，而免疫 New Jersey/76(H1N1)-和/或 Port Chalmers/73 (N3N2) 商品疫苗组中，完全阻止了发病和病毒在肺脏中的复制 (Haesebrouck 和 Pensaert 1986; Vandeputte 等 1986)。根据 20 世纪 90 年代后期欧洲 H1N1 和 H3N2 SIVs 中的抗原漂移较小的报告 (de Jong 等 1999, 2001)，已经考虑用最近的毒株取代疫苗毒株。然而在对猪进行的研究试验中，商品疫苗仍然能诱导产生对最近 H1N1 或 H3N2 毒株的高滴度抗体以及极好的临床和病毒学的保护作用 (Heinen 等 2001b; Van Reeth 等 2001a,b)。因此，对最近的 H1N1 或 H3N2 毒株没有科学的争议。由于欧洲 H1N2 病毒与疫苗中 H1N1 病毒和 H3N2 病毒之间没有抗原交叉性，以及在实验感染研究中现有的疫苗不能保护抗 H1N2 病毒的攻击 (Van Reeth 等 2003b)，在现有的疫苗中增加 H1N2 成分值得认真的考虑。

在用美国的疫苗进行研究中，常用 IN 途径攻毒，并常用鼻腔排毒情况作为评价保护作用的主要参数。免疫接种不能完全提供抗感染的保护作用，但能使鼻腔拭子中 H1N1 攻毒株的滴度降低 $1-2\log_{10}$ 感染单位，也能降低免疫猪肺脏中的病毒滴度和肺脏肉眼病变计分 (Brown 和 McMillen 1994; Macklin 等 1998; Rapp-Gabrielson 等 2000)。美国双价 SIV 疫苗对 2002 H3N2 分离株攻毒具有交叉保护作用，该攻毒株为 H3N2 疫苗株的遗传漂移株 (Rapp-Gabrielson 等 2003)。

尽管疫苗株和攻毒株之间存在抗原性的交叉，但抗原性和遗传分析不能作为评判疫苗株好坏的最准确的方法。免疫猪攻毒试验仍然是检测疫苗效力的最好的方法。除疫苗株的性质外，其它一些因素，如抗原量、佐剂、免疫猪的健康状况、使用适当的疫苗及适当的接种时机等均影响疫苗的效力。一般来说，含高抗原量的疫苗效力更好。尽管不同疫苗中确切的佐剂配方可能不同，但大多数商品疫苗采用具有高度免疫刺激作用的油佐剂。新一代的佐剂像 QuilA 及 QuilA 与***联合用在 SIV 试验疫苗中，也能诱导高滴度的抗体反应 (Bikour 等 1994)。

血清抗体阴性猪使用两头份疫苗后，HI 抗体滴度一般可达 1: 20—1: 640，但不同疫苗及不同试验之间结果可能有相当大的差异。疫苗诱导的 HI 抗体维持时间可能很短，已报道疫苗免疫接种后 10 周内血清抗体滴度明显下降 (Erickson

等 2002)。一些研究人员报道攻毒前血清 HI 抗体滴度与攻毒后肺脏中病毒滴度呈负相关 (Bikour 等 1996; Haesebrouck 和 Pensaert 1986; Haesebrouck 等 1987; Van Reeth 等 2001a,b)。在 Van Reeth 等(2001 a,b)的研究中,所有 HI 抗体滴度>160 的免疫猪完全保护,阻止病毒在肺脏复制及发病。当然,抗体滴度能否完全保护抗感染也取决于攻毒剂量,所以,抗体滴度 ≤ 160 时,用低剂量攻毒或在野外条件下攻毒,可能有很好的保护效果 (Bikour 等 1996)。

有关 SIV 疫苗在田间的效力及成本利益方面的资料非常少。多数 SIV 疫苗用于母猪的免疫接种。母猪在产仔前通常加强一次免疫接种后,血清 HI 抗体滴度一般可达 1: 160—1: 640 或更高,这样使其子代的母源抗体水平高、持续时间更长。Thacker (2000) 研究表明,低水平 HI 抗体的未免疫母猪所生仔猪中,几乎所有的 SIV 被动抗体水平在 6 周龄时下降到 1: 40 以下,与之相比,免疫母猪所生仔猪哺乳后,SIV 被动抗体水平在 16 周龄时才下降到 1: 40 以下。因此,母猪免疫接种对控制哺乳仔猪的流感发生非常重要,且通常能保护整个哺乳期

通常很少对育肥猪实施免疫接种,但在育肥期可能发生流感的猪场,对猪群采取免疫接种措施是有益的。然而育肥猪的免疫接种可能很难与母猪的免疫接种结合起来,因为被动免疫时间的延长可能干扰仔猪有效的免疫接种。

所谓新一代的 SIV 疫苗也进行了实验室试验,但结果相当不尽人意。流感 HA 或 NP 基因的 DNA 疫苗能降低流感病毒的排毒量和缩短排毒期 (Macklin 等 1998)。Olsen 及其同事 (2000) 发现,用 HA DNA 疫苗免疫后,对攻毒没有任何意义的保护作用,但 DNA 免疫接种使免疫猪对强毒感染或对常规 SIV 灭活疫苗的免疫接种产生更强的抗体反应 (Larsen 等 2001; Olsen 等 2000)。Heinen 等 (2002) 研制了一种表达 M2 蛋白的重组疫苗和一种含有 NP 和 M 基因的 DNA 疫苗。尽管这两种疫苗均诱导了期望的免疫应答,但没有抗感染或抗病的保护作用。

(李慧姣 译 吴福林 校)