
第 32 章 多种病毒感染

X. J. Meng、C. A. Baldwin、François Elvinger、Patrick G. Halbur 和 Carolyn A. Wilson

本章着重从动物传染病和人畜共患病角度介绍当前对兽医和人类公共卫生较重要的病毒。这些病毒的临床意义和经济影响程度仍未确定。猪的戊型肝炎病毒(swine HEV),猪的内源性反转录病毒(PERV),和猪的嗜淋巴疱疹病毒(PLHV)等疾病与人类移植猪的器官组织和细胞密切相关。马脑脊髓炎和猪的 HEV 都具有人畜共患的风险。

猪的戊型肝炎病毒

X.J. Meng 和 P.G. Halbur

在亚洲和非洲一些发展中国家,引起人的戊型肝炎的 HEV 是很严重的公共卫生问题(Emerson 和 Purcell, 2003; Purcell 和 Emerson, 2001)。HEV 的死亡率一般很低(<1%),但是妊娠期的死亡率可达到 25%(Kumare 等, 2004; Purcell 和 Emerson, 2001)。尽管在包括美国在内的一些发达工业国家只有少数散发的急性戊型肝炎病例,但却报告普遍存在相当高的抗 HEV 的抗体水平 (Drobeniuc 等, 2001; Meng 等, 1999, 2002)。发达工业国家抗 HEV 阳性人群的存在可以形成一个假设, HEV 的动物宿主是存在的,且 HEV 是人畜共患病(Meng 2003, 2004)。

Balayan 等人(1990)用人的中亚 HEV 毒株人工感染实验猪,报告了第一例实验条件下猪感染 HEV 的实验结果。Clayson 等人随后报道了在尼泊尔 55 头猪中 18 头检出抗 HEV IgG,在 47 头猪的血清和粪便中有 3 头分离到 REV RNA。但不幸的是,这些研究中没有能够确定 HEV 能感染猪。Meng 等人(1997)在美国猪身上分离并鉴定了第一例动物 HEV 毒株,猪的戊型肝炎病毒(swine HEV)。为了分离猪的 HEV,他们在伊利诺斯州的一家商业养猪场开展了一项预期的研究。研究人员对 18 只小猪进行了近五个月的观察以获得感染 REV 的证据,这些小猪包括抗 REV 阴性和阳性母猪产的。在急性自然感染的小猪血清中发现了与人类 REV 抗原性和遗传性相关的新病毒,命名为猪的 HEV。SPF 猪实验条件下再现了猪 HEV 的感染,并分离到 HEV,从而验证了 Koch 的假说(Halbur 等, 2001; Meng 等, 1998a, 1998b)。猪 HEV 的发现和它的跨物种传播能力引起了关

于食品卫生公共健康和采用猪器官、细胞的异体移植潜在的关注。但是，这种病毒在猪健康上的临床意义尚不确定。

病原学

基于 HEV 与嵌杯样病毒属基因结构的表面相似性，HEV 最初被分在了杯状病毒科。但随着更深入的比较序列分析发现 HEV 的密码子选择和基因组组成更接近于风疹病毒，而不是原来认为的嵌杯样病毒属(Koonin 等，1992)。



32.1. 猪HEV的基因结构。ORF1编码非结构蛋白，ORF2编码衣壳蛋白，ORF3编码一些小蛋白。NCR，非编码区；MT,甲基转移酶；Y，”Y”区；PLP，木瓜样半胱氨酸蛋白酶；Pro，提供柔韧度的富嘌呤氨基酸结构域；HVR，高变区；Hel，螺旋酶；RdRp，RNA依赖性RNA聚合酶。

另外，HEV 在其基因组的 5'端有个帽子结构，该结构存在于嵌杯样病毒属且不与嵌杯样病毒属具有显著的同源性。因此，HEV 最近被重新分为一个新的种属—肝炎病毒科 (Emerson 和 Purcell，2003)。包括猪 HEV 在内的所有 HEV 都属于该属下的肝炎病毒原型属。

HEV 是一直径为 32-34 纳米的球形、对称、无包膜的病毒颗粒，具有和嵌杯样病毒属一样的杯样凹槽结构(Purcell 和 Emerson，2001)。猪 HEV 具体形态仍不清楚，但其结构应于人的 HEV 相似，猪的 HEV 也不能有效地利用细胞培养。测定猪的 HEV 全部基因组，发现是接近 7.2kb、多聚腺苷酸、单链、有意义 RNA 分子(Meng 等，1998a)。序列分析显示猪 HEV 基因组包含三个开放阅读框架 (ORFs)，一个短的 5'非编码区 (NCR) 和短的 3' NCR (图 32.1)。

表 32.1.不同国家猪只抗 HEV IgG 流行情况

国家	猪群数	猪龄	阳性数/检测数	备注
美国	1	6—12 周	0/16(0)	Meng 等, 1997
		5 月—成年	27/41(66)	
	1	3-8 周	0/24 (0)	
	1	3 月—成年	34/37(92)	
		2 月	1/8(13)	
日本	11	3 月-成年	28/32(88)	Takahashi 等, 2003
		成年	110/115(96)	
	25	2 月	37/500(7)	
		3 月	301/750(40)	
		4 月	433/500 (87)	
西班牙	6	5-6 月	677/750(90)	Pina 等, 2001
		3 周—2 月	2/10(20)	
		5 月—成年	13/50(26)	
澳大利亚	2	混合	12/40(30)	Chandler 等, 1999
	2	16 周	45(92-95)	
	野猪	未知	15/59(17)	
台湾	10	混合	102/275(37)	Hsieh 等, 1999
加拿大(魁北克)	37		82/310(26)	Meng 等, 1999
	16	成年	34/90(38)	
加拿大(安大略)	10	保育猪	1/230(<1)	Yoo 等, 2001
	4	成年	12/82(15)	
加拿大	80	6 月	594/998(60)	Meng 等, 1999
韩国	混合	1—2 月	6/40(15)	Choi 等, 2003
		3—6 月	39/80(49)	
		成年	12/20(60)	
	13	1—2 月	3/90(3)	
		3 月	5/50(10)	
新西兰	混合	4—7 月	28/90(31)	Garkavenko 等, 2001
		母猪	3/34(9)	
		混合	54/72(75)	
尼泊尔	混合	混合	18/55(33)	Clayson 等, 1995
中国	3	混合	22/72(31)	Meng 等, 1999
	混合	<3 月	1/10(10)	Wang 等, 2002
		成年	329/409(80)	
泰国	1	1—2 月	0/20(0)	Meng 等, 1999
		3—4 月	13/20(65)	
	3	成年	10/35(29)	
印度	7	2—24 周	122/284(43)	Arankalle 等, 2002
	混合	3.2—6.4 月	54/57(95)	Arankalle 等, 2003

位于基因组 5'端的 ORF1 被认为编码非结构蛋白。许多假设性功能区域和元件在 ORF1 得到验证, 包括甲基转移酶区域, 木瓜样半胱氨酸蛋白酶 (PLP), 可提供伸缩性的富脯氨酸区, 超变区 (HVR), 一个螺旋酶和 RNA 依赖性 RNA

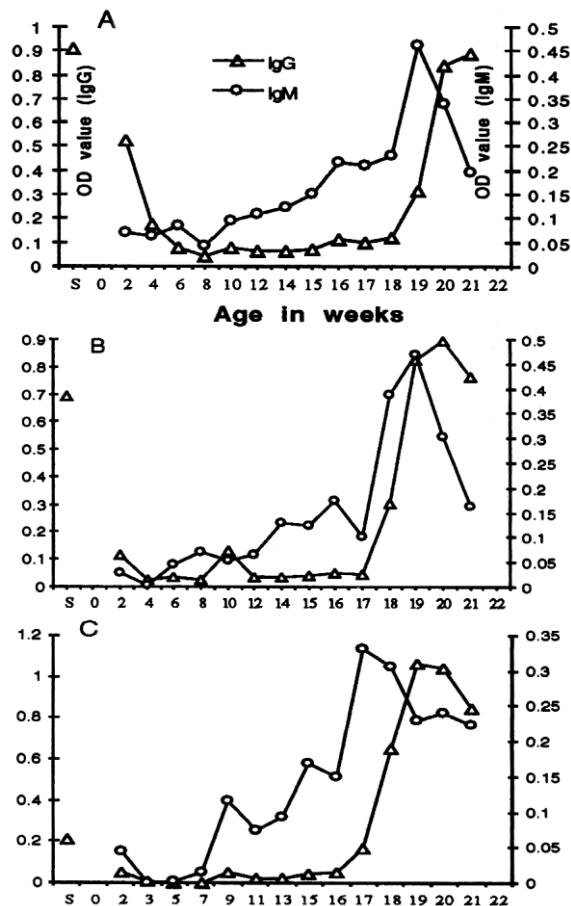
聚合酶（RdRp）(参考图 32.1)。

ORF2 编码表面抗原蛋白。ORF3 编码一种未知功能的小蛋白，并且与 ORF1 和 ORF2 部分重叠。人类 HEV 的 ORF3 是一种细胞骨架相关的磷蛋白，它可能与病毒的复制有关(Zafrullah 等，1997)。

流行病学

血清流行病学研究显示，无论人类是否流行戊型病毒性肝炎，猪的 HEV 感染在世界范围内是普遍存在的，包括发展中国家和发达国家（参考表 32.1）。血清阳性率在种属和地区之间也各有差异。

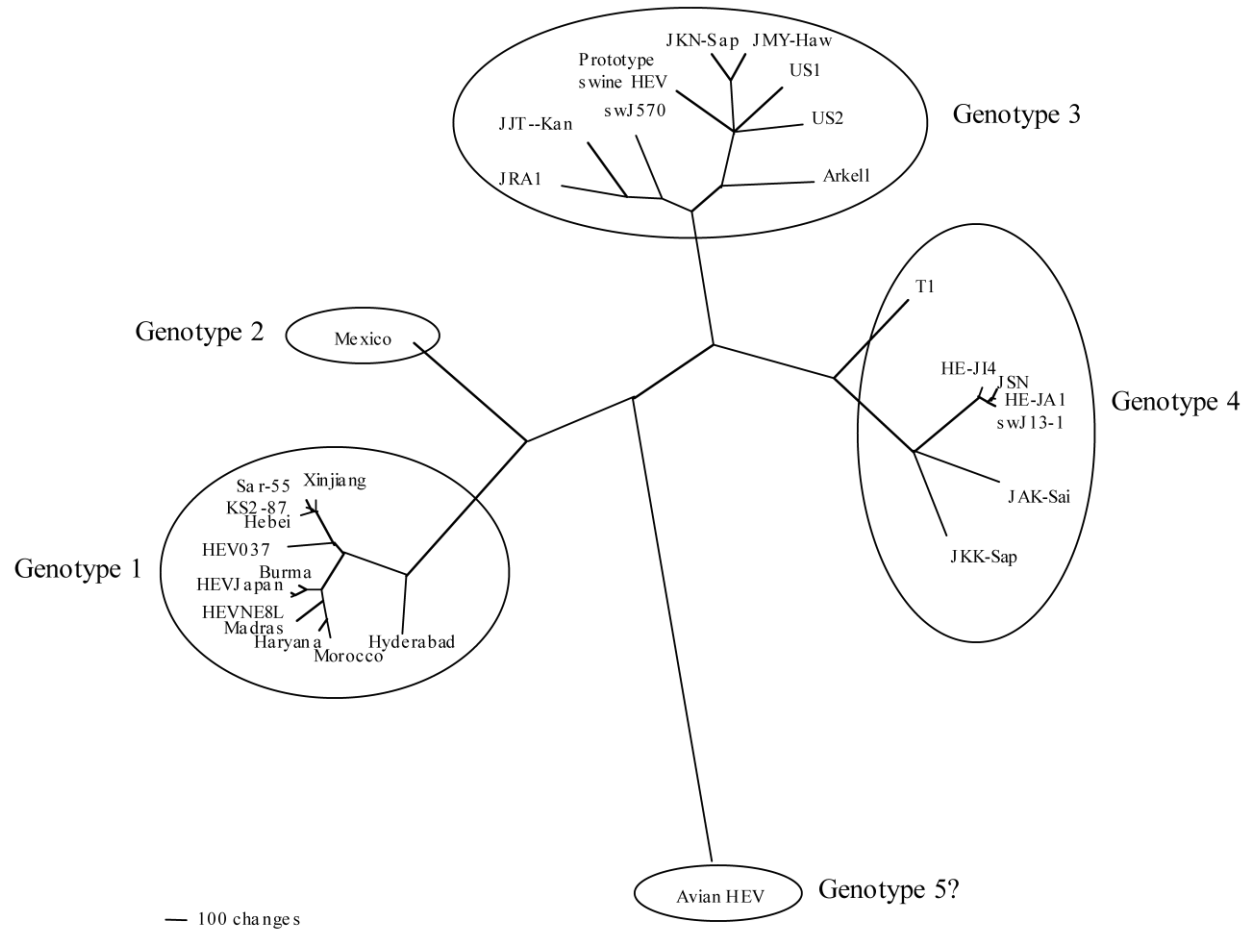
病猪一般表现为持续1-2个星期的毒血症，并且3-7星期后随粪便排毒 (Huang等,2002; Meng等,1998b; Takahashi 等,2003)。HEV感染一般发生在母源抗体降低后的第2-3月龄（图32.2），与小猪向猪圈中转移的时间是一致的，增加了粪便交叉污染的机会(Huang等,2002; Meng 等,1997)。尽管一般成年猪，母猪，公猪呈现抗HEV IgG阳性，但一般不会散播病毒。



32.2. 商业猪场中预期试验中三头代表性猪的 HEV 抗体的对应变化情况。(A) 高滴度抗-HEV IgG 阳性母猪产的小猪。(B) 低滴度抗-HEV IgG 阳性母猪产的小猪。(C) 阴性母猪

产的小猪。并显示出了育种母猪抗-HEV IgG 的 ELISA OD 值 (S) . (Reproduced with permission by the National Academy of Science from Meng 等. 1997.)

通过对分离出的猪HEV序列分析发现，世界上至少存在着两种基因型的HEV，基因型3和4（图32.3）。对于人类而言基因型3和4的HEV毒株能引起戊型肝炎的散发，而亚洲和墨西哥的戊型肝炎的大流行则与基因型1和2有关 (Meng 等,2004)。



32.3 基于30个人、猪和鸟HEV毒株的完整基因组序列的系统树。证实猪HEV毒株既不属于基因型3也不属于基因型4。表示性状变化的刻度条与遗传距离相对应。(Reproduced with permission by the Society for General Microbiology from Huang 等. 2004.)

除了家猪，猪 HEV 也能感染野猪(Chandler 等，1999)。在实验条件下，猕猴和大猩猩也对猪 HEV 易感(Meng 等,1998a)。人工接种猪 HEV 的猕猴在接种后的第四周产生抗 HEV IgG，并且出现毒血症并在粪便中检出 HEV。这些注射了 HEV 的灵长类动物的血肝酶，丙氨酸氨基转移酶 (ALT)，异柠檬酸脱氢酶

(ICD)均有所升高(图 32.4)。在血清肝酶上升时肝脏活组织检查发现亚急性病毒性肝炎,肝脏呈现局灶性炎性坏死病变。接种猪 HEV 的大猩猩同样发生了感染,血清中产生了 HEV 抗体,粪便中检测出猪 HEV 的 RNA。

HEV 具有感染非人类灵长类的能力,表明它是可以跨越物种界限传播的。更重要的是,一种基因型 3 的人类 HEV 株(US-2)可以感染 SPF 猪。(Halbur 等, 2001; Meng 等, 1998a)。接种的猪迅速产生毒血症和 HEV 抗体,表明 US-2 株完全可以在猪体内复制和传播。

HEV 在其他动物跨种传播也有报道。据报道人 HEV 也可感染羔羊(Usmanov 等, 1994)。同样的,据报道含有感染性 HEV 的人类粪便悬液可使 Wistar 大鼠感染(Maneerat 等, 1996)。但试图实验条件下用猪的 HEV 感染实验大鼠和小鼠却失败了(Sun 和 Meng, 未发表的数据)。

越来越多的证据表明猪 HEV 也可以感染人。Hsieh 等人(1999)发现:与普通人的 8%阳性率相比,27%的台湾猪场主呈 HEV 抗体阳性。最近, Meng 等人(2000)用猪 HEV 和人 HEV(巴基斯坦 Sar-55 株)混合抗原检测 465 名猪场兽医的抗-HEV IgG。在检测过的八个州中,400 名普通献血者的阳性率是 17%(猪 HEV 抗原)或 18%(Sar-55 抗原),而 295 名猪场兽医的阳性率则大约为 23%(猪 HEV 抗原)或 27%(Sar-55 抗原)。美国猪场兽医的阳性率是普通献血者的 1.51(猪 HEV 抗原 $p=0.03$)和 1.46 (Sar-55 抗原 $p=0.06$)倍。在工作中使用缝合针的兽医阳性率是不使用者的 1.9 倍。同样的,来自传统养猪大省的被测者比不养猪州的被测者更容易呈现阳性。譬如,来自养猪大州米尼苏达州的可被检测者血清阳性率大约是养猪很少的阿拉巴马州的可被检测者的 5-6 倍。

Drobeniuc 等(2001)也评价了在摩尔多瓦的 264 个猪场主和 255 个普通人 HEV 抗体的流行和 HEV 感染的风险。大约 51%猪场主的 HEV 抗体阳性,然而没有接触过猪的普通人群血清阳性率却达到了 25%。Withers 等(2002)报道在北卡罗来那州的猪场工作者($n=165$)的 HEV 抗体流行率(10.9%)是普通人(2.4%, $n=127$)的 4.5 倍。

这些数据充分证明戊型肝炎是人畜共患病且猪是传播宿主(Meng 2003, 2004)。

猪 HEV 的传播途径可能是粪便-口腔传播。病猪的粪便是病毒传播的主要来源。实验表明与接种 HEV 的猪同处一舍的 SPF 猪在接种猪发病后的 2 周发病

(Meng 等, 1998a)。

研究者认为猪通过直接与病猪接触或吞食了病猪粪便污染的料和水而感染此病。尽管通过静脉接种方法很容易感染此病(Halbur 等, 2001; Meng 等, 1998a, b), 但经口腔途径实验性的再现猪的发病是很难的(Kasorndorkbua 等, 2002)。此病也可能存在其它传播途径。

作为一个粪便-口腔的传染病, 水介的传染病是人类爆发戊型肝炎的特征(Purcell 和 Emerson 2001)。发病猪的粪便含有大量病毒, 因此猪的粪便可能污染灌溉水和海岸水, 从而可能导致贝类海产品的污染(Meng 2004)。研究者在污水中检测出了猪源性的 HEV(Clemente-Casares 等, 2003; Pina 等, 2000)。

Yazaki 等 (2003) 最近报道了在日本北海道出现的食用烤的或未做熟的猪肝之后 2-8 周后发作急性戊型肝炎的散发病例。在当地商店出售的猪肝分离到的猪 HEV 病毒序列与从戊型肝炎病人身上分离的病毒序列十分相似, 从而为 HEV 是人和猪之间的人畜共患病提供了更多直接证据。

发病机理

猪 HEV 的主要发病机理尚不清楚。有人认为猪的 HEV 通过粪便-口腔途径进入宿主(Purcell 和 Emerson, 2001; Williams 等, 2001)。猪 HEV 主要复制位点还不清楚。实验条件下用猪 HEV 感染灵长类动物和猪时, 可在肝脏发现病毒的复制(Meng 等, 1998a, b)。实验人员认为猪 HEV 在肝脏复制后从肝细胞释放到胆囊, 然后随粪便排出。Williams 等 (2001) 通过用猪的 HEV 和人类 HEV 的 US-2 株实验性的感染猪, 发现存在 HEV 的肝外复制位点。通过负螺旋特异性 RT-PCR, 在病猪肝脏中以及肝外的小肠、空肠、肠系膜淋巴结检测到标志病毒复制的负链 HEV RNA。运用原位杂交技术, Choi 和 Chae (2003) 也在肝细胞、胆小管上皮组织及肝外的小肠、大肠、淋巴结、扁桃体、脾脏、肾脏检测到猪 HEV RNA。尽管这些肝外病毒复制位点的临床和病理意义尚不清楚, 但研究人员认为猪 HEV 起初可能先在胃肠道复制, 然后主要通过毒血症散播到其目标组织—肝脏。

据报道, 对于人类而言, 怀孕会增加本病的严重性和死亡率。感染戊型肝炎的孕妇死亡率可以达到25%(Kumar 等 2004; Purcell 和 Emerson 2001)。然而, 人工感染的怀孕猕猴不能再现爆发性戊型肝炎, 和不怀孕的母猴相比怀孕母猴的肝炎严重程度并没有增加(Tsarev 等, 1995)。同样的, 人工感染怀孕母

猪并不表现出比非孕对照组严重的症状(Kasorndorkbua 等, 2003)。HEV感染母猪不表现出繁殖障碍和临床的肝炎症状。然而, 被感染孕妇出现的爆发性戊型肝炎的发病机理尚不清楚。

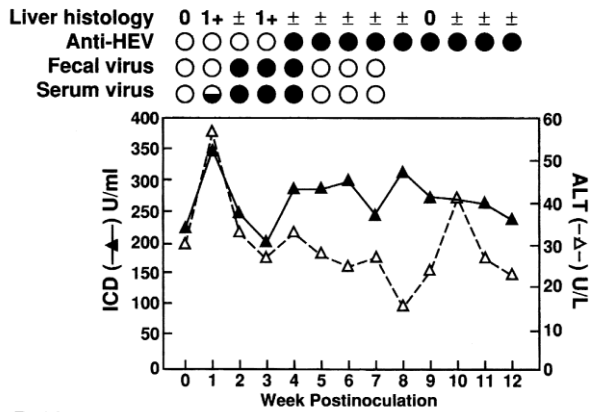
临床症状

自然和人工感染猪HEV的猪临床无明显症状。潜伏期(从感染病毒到随粪便散毒)时间为1-4周(Halbur 等, 2001; Meng 等, 1998a, b)。然而, 猪群感染HEV的比率相当高(参考表32.1)。猪HEV的发病率和死亡率还不清楚。

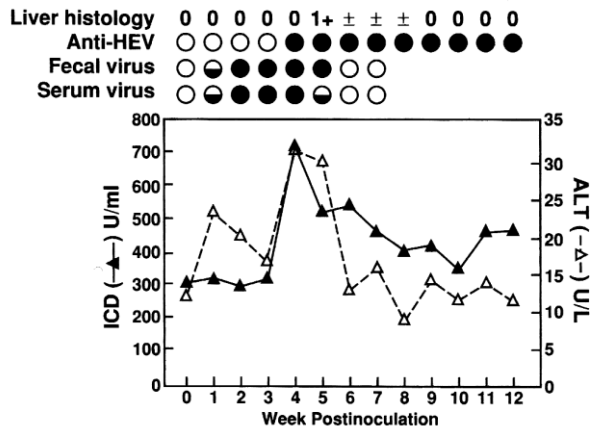
病理变化

研究人员在一项预期性的研究中, 在急性感染阶段解剖了四头自然发病的仔猪(Meng 等, 1997)。剖检中, 肝脏和其它18个组织器官并未发现肉眼可见病变。然而, 在显微镜下均出现肝炎病变, 表现为伴有局灶肝细胞坏死、轻度和中度多灶性门静脉淋巴浆细胞肝炎。四只猪都有轻度淋巴浆液性肠炎, 其中三只猪出现多灶性淋巴浆细胞性间质性肾炎。实验条件下, 接种猪HEV和人US-2型HEV的SPF猪无明显临床症状。然而, 在接种后(DPI)的7-55天内实验猪出现轻度、中度的肝和肠系膜淋巴结肿胀。人工感染猪光镜下出现以轻中度多灶浆液性淋巴样肝炎和局灶性肝细胞坏死为特征的病变(图32.5)。在20 DPI 时肝脏炎症和肝细胞坏死最为严重。在3-27 DPI 可在感染猪的粪便、肝组织和胆汁中检测到HEV RNA(Halbur等, 2001)。静脉接种猪HEV的12头怀孕不同时期的小母猪均感染并随粪便排毒(Kasorndorkbua等, 2003)。在55天的实验中这些母猪并无出现肝炎或肝酶升高的临床症状。猪HEV并未明显影响胎儿大小、存活、以及出生体重和体重增加情况。母猪以及所产胎儿和小猪也无明显肉眼病变。其中4头母猪镜下出现轻度多灶性淋巴组织细胞肝炎和个别肝细胞坏死的症状。感染猪HEV的母畜所产胎儿无明显病变。HEV在猪群中是繁殖障碍病原体的证据逐渐减少。

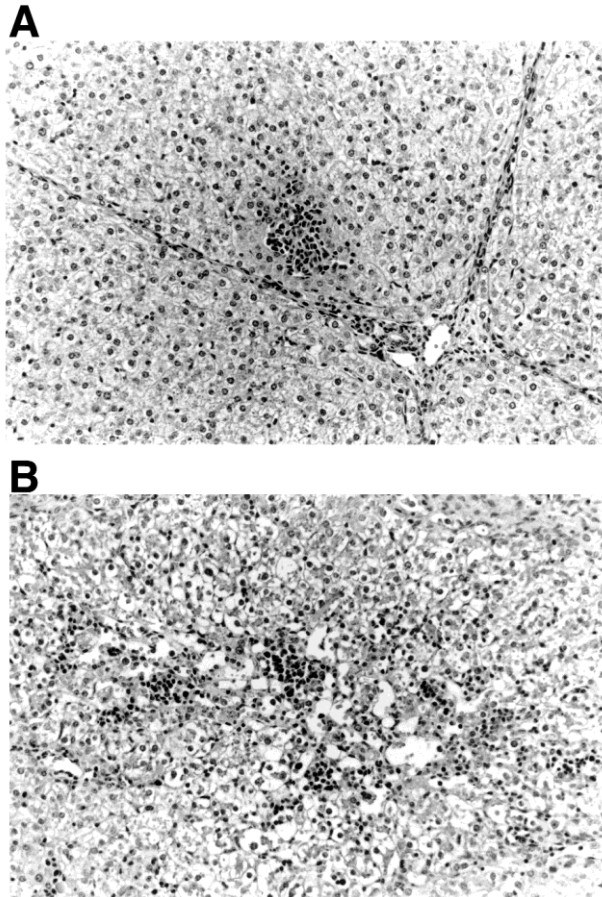
A. M305



B. H400



32.4 猪HEV人工感染猕猴试验。绘制出了肝脏内酶的水平情况（ALT和ICD）。并表示出了血清和粪便中的HEV抗体和猪HEV RNA 的存在（实圈）和不存在（空圈）。半实圈表示只有用巢床PCR才能检测到猪REV RNA .图中还标出了活体检查时肝脏损伤情况（分0到+4几个级别）。(Modified with permission from Meng 等.)



32.5. 人工感染猪 HEV 或人 HEV 的猪肝脏组织学损伤。(A)人工感染猪 HEV 的猪的肝脏, 接种后 (DPI) 14 天表现为轻度的淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞局灶性浸润和肝窦间隙轻度的弥漫性炎症。(B) 人工感染人 HEV US-2 株的猪的肝脏, DPI 14 天表现为淋巴浆细胞和组织细胞肝炎和严重的肝细胞空泡变性和肿胀。HE 染色。(Reproduced with permission by the American Society for Microbiology from Halbur 等. 2001.)

免疫

猪对 HEV 的免疫反应出现在毒血症和随粪便排毒时期, 特征为在持续的抗-HEV IgG 后迅速出现抗-HEV IgM(Meng 等, 1998a, b)。与人类 HEV 相似, 猪 HEV 外壳蛋白也是免疫原—诱导产生免疫保护。据研究证明猪 HEV ORF2 外壳蛋白、人类 HEV 以及新发现的禽类戊型肝炎病毒具有相同的抗原决定簇(Haqshenas 等, 2002)。迄今, 包括基因型 3 和 4 在内的所有 HEV 毒株都属于一个血清型。灵长类动物交叉实验证实: 不同基因型的人类 HEV 毒株抗体可产生交叉保护(Purcell 等, 2003)。

具有高滴度 HEV 抗体的母猪可以将抗体传给后代, 因此一些小猪在出生后不久可能为血清阳性。血清阳性的初产仔猪母源抗体可持续 7-9 周(Meng 等,

1997)。研究人员认为母猪的母源抗体可提供针对猪 HEV 的保护性免疫。

猪逆转录病毒

C. A. Wilson

逆转录病毒定义是需要将其 RNA 基因组转录为双链 DNA,并作为翻译过程中重要一步的病毒。由于无已知可感染猪的外源性逆转录病毒,因此可确定猪携带内源性逆转录病毒(PERVs)。与外源性病毒不同,PERVs 包含一系列可遗传的病毒,由于这些病毒作为基本元素广泛存在于所有猪的基因组中,因而是不能被猪群消除的。

尽管并无资料表明 PERV 能引发某些猪的疾病,但从患有白血病和淋巴瘤猪的细胞系当中检测到 C 型逆转录病毒粒子,这样的事实增添了对猪内源性逆转录病毒具有致癌性这样的猜测。另外,从形态学和基因学上,PERV 与那些已表明能引起老鼠白血病的鼠逆转录病毒密切相关。然而,PERV 与白血病细胞系的联系并不足以说明 PERV 是其诱因,因为在这些研究当中没有区分出这二者的因果关系。因此,PERVs 是否致癌这一研究最终被抛弃了。

由于研究发现将猪原代细胞(Martin 等, 1998; Wilson 等, 1998)或者已培养出来猪的细胞系(Patience 等, 1997)与人类细胞系联合细胞培养的产物能感染人类细胞,科学工作者对 PERVs 重新产生兴趣。这些发现有特定的重要意义,因为它们很好的迎合了发展临床异体移植的需求,比如可以将非人体的细胞或器官移植到人类身上。携带有可防止超急排斥反应的 2 对人类基因的转基因猪,将有望成为临床异体移植应用的试金石(Byrne 等, 1997)。然而,猪细胞具有感染人类细胞的内源性逆转录病毒的研究,更加引起了关于异体移植对公共卫生影响的关注。由于每个细胞有 50 到 200 个 PERV 序列复制体,科学家预言 PERV 是不可能从猪的基因组中消除的。

基于过往接触过家猪的人类的案例,一些科学工作者认为 PERV 对于人类的致病性低,而另外一些工作者则认为异体移植会产生相反的结果:

异体移植本身打破了像皮肤、黏膜这些病原体传播的屏障,导致了动物和人类细胞的长期混合培养。

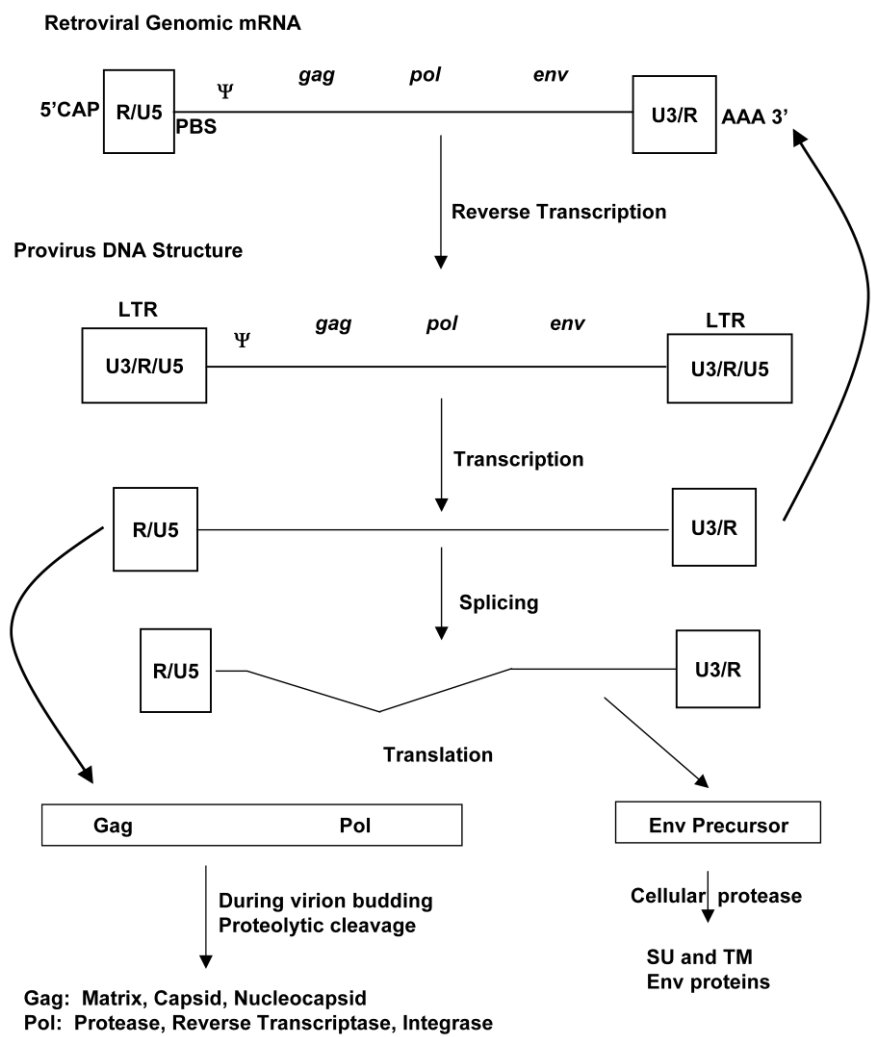
异体移植使接受者可能发生免疫抑制,这使得病原体绕过了另一屏障。

人类补充调节蛋白的转基因变体能够降低自然抗体的能力,该自然抗体主要阻止 PERV 的传播。

这些顾虑是有根据的，曾发生过病毒在移植受体上引起病症,而该病症在捐献动物从未出现过。比如，人们曾认为 HIV 是对人非致病性的动物病毒，结果证实是可使人致死的疾病（Hahn 等，2000）。因此，科学家们正努力防止或消除猪 PERV 的传播，一旦成功，将大大提高异体移植的安全性，同时降低其对公共卫生的影响。

病原学

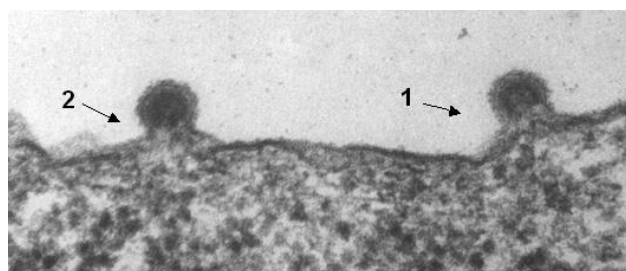
PERVs 属于 γ -逆转录病毒属，逆转录病毒科。该病毒粒子的典型形态为直径 100nm，外包原生质膜衍生的类脂双层膜和一个二倍体的单链 RNA 基因组。逆转录病毒的典型酶活性就是利用 RNA 依赖性 DNA 逆转录酶催化单链的逆转录病毒 RNA 基因组转录为双链 DNA 中介物（或者说逆转录）。另一种编码的病毒性酶，也就是整合酶，能够介导原基因组与双链病毒 DNA 的整合。



32.6. 猪内源性逆转录病毒基因组结构和基因表达图。

PERVs 的基因结构与其他 γ 属的逆转录病毒类似，并且具有开放阅读框，

Gag, pol 和 eny (Akiyoshi 等, 1998; Czauderna 等, 2000) (图 32.6). RNA 基因组也包括了 5'和 3'端的多聚腺苷酸化 (U5), 包装 (ψ), 逆转录 (引物结合位点, PBS) 以及 RNA 转录 (U3/R) 等元件。作为逆转录结果, U3/R/U5 这些基本元件都在每个双链 DNA 中介物的末端重复, 这些称为长末端基因重复, 或者末端重复序列(LTRs)。整合后, 启动子和增强子出现在 2 个信使 RNA 转录的 5' LTR 的 U3 处: 1. 用于壳体化病毒粒子以及转录 gag-pol 多聚蛋白的全长基因组 RNA; 2:编码外膜前体的剪接 mRNA。细胞蛋白酶把外膜前体分成成熟的包装糖蛋白表面 (SU) 和跨膜蛋白 (TM)。病毒粒子出芽时, 病毒的编码酶和蛋白酶自动将 Gag-pol 多聚蛋白水解分开(参考 图 32.6)。实际上, 正是这种溶蛋白性裂解使得 C 形电子密度的未成熟病毒粒子经过形态变化, 变为以球形核心电子密度为特征的成熟病毒粒子, 完成形态学的变化 (图 32.7)。



32.7. 猪源性逆转录病毒的电镜照片。PERV 感染人类细胞 (Hela) 并固定后负染色电镜观察。这是放大 25,000 倍的图象。标记粒子(1)是在出芽粒子内具有明显未成熟特征——C 形电子密度结构的未成熟病毒粒子。2. 经溶蛋白性裂解的, 成熟病毒体内具有球形电子密度结构的病毒粒子。

PERV 比起其他的 γ -属逆转录病毒有点不稳定。研究表明 PERV 在 70°C 中储存时感染性降低了 100 倍 (Wilson, 未发表的数据), 而同样条件下一般的病毒的感染性只降低 5 到 10 倍。同样地, 一种可以浓缩其他 γ -属逆转录病毒而轻微影响其感染性的造粒离心方法, 却能完全消灭 PERV 的感染性 (Wilson, 未发表的数据)。

根据超感染干扰以及在活体细胞内的趋向性研究, PERVs 分为 3 种受体类别。PERV-A 和 PERV-B 利用各不同的受体, 但都能感染人类细胞, 而 PERV-C 本质上只能在活体内感染猪细胞。这 3 类受体都可以通过利用经典的逆转录技术, 在已建立的细胞株上培养。PERV-A 和 PERV-B 在人类胚肾细胞株 (HEK293 细胞) 中复制最为有效, 这 3 类受体中任何一类都能在猪睾丸细胞株, ST-IOWA

中有效的复制 (Takeuchi 等, 1998; Wilson 等, 2000)。

流行病学

所有种群猪的基因组中都携带有内源性逆转录病毒的成分。并不是所有的基因组成分都编码复制逆转录病毒,并不是猪基因组编码的逆转录病毒都能够感染人类细胞 (Oldmixon 等, 2002)。实际上, 来自猪科和西瑞科的代表族群 DNA 分子水平分析表明, 野猪的基因组中存在与家养猪 PERV 类似的成分 (Patience 等, 2001; Tonjes 和 Niebert, 2003), 这表明野猪驯化以前, 逆转录病毒序列就存在于其基因组中。与这些观察一致的是如下报道:迄今为止所有品种的家猪都可鉴定出 PERV 序列 (Edamura 等, 2004; Jin 等, 2000)。

在一些种内繁殖的小型猪已进行一些很具体的 PERV 基因型和表型的研究。研究表明内源性逆转录病毒成分的遗传异质性决定了在同一猪群内是否存在感染性病毒,以及该病毒能否体外感染人体细胞 (Oldmixon 等, 2002)。同样不能预测的是, 某特定猪种群表达出来的 PERV 能否在人类细胞中复制, 因为每个动物特性不同。这个发现是很有前景的, 因为它提供了一个鉴定和有选择地繁殖那些不表达对人类有趋向性的 PERV 的方法。

尽管还没有报道过 PERV 在不同猪组织细胞表达的全面测试的数据, 但仍有一些关于特定品种猪及组织的可用数据。对大多数内源性逆转录病毒来说 (比如, 那些鼠逆转录病毒), 它们通常保持在一种转录沉默的状态, 在特定的条件下才能表达 (比如免疫激活), 而 PERV 则可能跟它们不一样。例如, 感染性 PERV 能在猪的血浆内直接培养出来, 这表示猪体内某些组织能连续不断的表达感染性 PERV (Takef-man 等, 2001)。同样地, 未激活的内皮细胞以及未激活和激活的猪骨髓单核细胞的原代培养同样能表达出感染性 PERV (Martin 等, 1998; McIntyre 等, 2003)。PERV 也可以在促有丝分裂的外周血单核细胞的原代培养中分离出来 (Wilson 等, 1998), 也能在猪胰岛中培养 (van der Laan 等, 2000)。研究表明 PERV RNA 能在不同的猪体组织中表达 (Clemenceau 等, 1999), 暗示着也许病毒能在合适的条件下从各种不同类型的猪细胞中分离出来。总体说, 报道说明组织特异性的表达不一定对应的跨越不同种群, 就是说, 种群的一头猪能表达 PERV 不代表同种的其他个体也能表达该病毒 (Wilson, 2001)。

诊断

尚无研究表明 PERV 能使猪致病，同样，也没在其他动物身上（鼠，荷兰猪，除人类外的灵长类）中观察到由于接触 PERV 而产生的病症，尽管应当在这些研究中发现少数或无病毒复制（Argaw 等，2004; Martin 等，1999;van der Laan 等，2000）。

由于 PERV 是内源性逆转录病毒，用 PCR 或 Southern 杂交法检测 PERV DNA，所有猪都会呈阳性（表 32.2）。同样地，用 RT-PCR，Southern 杂交法或者检测逆转录酶（RT）活力的方法来检测 PERV RNA 的表达，只表明 PERV 的基因位点或基因座，具有转录活性。然而，RNA 表达或 RT 活性并非跟感染性病毒有必然联系，因为很多基因座编码的 PERV 由于删除或点突变而有缺陷。因此，美国食品与药物监督管理局建议用培养试验（参考 FDA 工业指导：关于用于人类异体移植的源动物、产品、临床前及临床事项的管理办法—4/3/2003）来检验临床异体移植采用的猪组织或细胞是否合格。最可靠的 PERV 检测方法是将可疑细胞和目标细胞联合培养。FDA 已建议细胞试验应当包括目标细胞株 ST-IOWA（用来检测 PERV-C）和 HEK293（用来检测 PERV-A 和 B）。目前报道的大多试验表明原代猪细胞往往表达低水平的 PERV，因此建议最少培养 30 天。在培养的末期（或者说在培养期的某设定的时间点），可用以下两种方法作为细胞感染的证据：a 逆转录酶检测，传统方法或 PCR 扩增两种（Phan-Thanh 等，1990; Takefman 等，2001）；b 用常规或定量 PCR 或 RT-PCR 检测 PERV DNA 或 RNA（Argaw 等，2002）。FDA 建议，要判定为阳性反应，病毒信号细胞经连续传代后显示的信号，必须是该感染性病毒在实验条件下复制产生的信号，这种情况才可判断为阳性。

表 32.2. PERV 的诊断方法

方法	检测目的	样品	备注
DNA PCR 或 Southern 杂交	PERV RNA	猪细胞	可能所有组织阳性
RT-PCR 或 Northern 杂交	PERV RNA	猪细胞	可能是阳性；可能与感染性病毒无关
反转录酶法	反转录酶的活性	猪细胞	可能是阳性；可能于感染性病毒无关
培养法	感染性病毒	猪细胞与 ST-IOWA 或 HEK-293	最好的检测感染性病毒的方法；与转录酶法和 RT-PCR 或 DNA-PCR 连用以增加准确性。
ELISA 或 Western 杂交	PERV 的免疫	人血清	异体移植受体对 PERV 的反

除了细胞培养方法之外（参考表 32.2），一些实验室还应用血清学方法来检测 PERV 特异性抗体（Galbraith 等，2000; Matthews 等，1999; Tacke 等，2001）。这些方法无法筛选猪只，因为猪只很可能对 PERV 耐受。然而血清学方法已经应用于动物模型的抗 PERV 反应研究(Argaw 等，2004; Specke 等，2002)或人类异体移植课题的临床试验中。

预防与控制

由于 PERV 是植入基因组，因而不可能预防 PERV 感染猪。然而，最新的研究表明对人类趋向性的 PERV 可能引起某些品种猪外源性感染(Wood 等,2004)，有的猪种系可能并不包含增殖性人类趋向性 PERV（Scobie 等，2004）。这些表明：在不包含人类趋向性 PERV 序列的种群中,选择性的对个体进行繁殖并形成种系，这样可形成不表达人类趋向性 PERV 的动物种群。有建议使用转基因方法敲除那些编码感染性 PERV 的位点，但并未尝试。最近有报告利用这种技术敲除编码猪 α -1,3-半乳糖基转移酶基因（Phelps 等，2003），表明了这种基因敲除方法是可行的。另外，更新的技术在不断开发中。例如，重链可变区针对 PERV 基质蛋白（gag 的一部分）的胞内表达，阻止了猪细胞产生感染性 PERV（Dekker 等，2003）。本结果可进一步应用于制造可表达该基质蛋白的转基因猪，以获得不表达 PERV 的猪。另外，由于 siRNA 可阻止一些病毒的复制，因而含有 PERV 特异性 siRNAs 的转基因猪可能会阻止感染性 PERV 的表达（Joost Haasnoot 等，2003）。

除了尝试调节 PERV 在猪的表达之外，科学家还研究现存抗病毒药物对 PERV 感染的治疗效果（Qari 等，2001; Wilhelm 等，2002）。例如，据报道一些 RT 抑制因子在体内能降低 PERV 的感染性，但要获得跟抑制 HIV 同样的效果，RT 的浓度要高出 IC50。相反，HIV 蛋白酶抑制因子对 PERV 的感染性毫无作用。

自然状态下，人类血清可出现针对 PERV 外膜（猪细胞分离）糖类 α -1,3-半乳糖基抗原簇的外生型抗体，该抗体能阻止 PERV 对细胞的体内和体外感染（Fujita 等，2003; McKane 等，2003）。这些数据表明，自然状态下人类对 PERV 感染有抵抗作用，而最新的对猪的遗传修饰技术（例如对 α -1,3-半乳糖基转录酶的功能性删除）可能使人类对 PERV 感染的免疫保护机制失效（Chapman 和

Wilson, 2003)。

猪的嗜淋巴疱疹病毒

X.J. Meng, P.G. Halbur

目前，猪上只发现两种疱疹病毒：伪狂犬病毒(PRV)和猪的巨细胞病毒(PCMV) (Chmielewicz 等, 2003a; Murphy 等, 1999)。PRV 是一种 α -疱疹病毒，它能引起猪的呼吸系统、生殖系统和中枢神经系统的疾病。PCMV是一种 β -疱疹病毒，它能引起猪的包涵体性鼻炎等疾病。1999年之前，人们不知道 γ -疱疹病毒能感染猪。通过全疱疹病毒的PCR检测，Ehlers等(1999 a)在猪上发现了两种相关的 γ -疱疹病毒，命名为猪嗜淋巴疱疹病毒1、2 (PLHV-1、PLHV-2)。最近又发现了一种与PLHV-1和PLHV-2序列相差甚大的新型猪 γ -疱疹病毒，命名为PLHV-3(Chmielewicz 等, 2003b)。在不同地区的家猪的血液和淋巴样品组织样中可频繁检测到这三种病毒。新型 γ -疱疹病毒的发现提高了人们对动物性病原体的警惕，这些病原体可以通过移植猪的细胞、组织和器官传染给人类。(Chmielewicz 等, 2003b; Tucker 等, 2002, 2003)。然而，这些病毒是单独致病还是与其他病原体联合致病的问题及其临床重要性尚不清楚。

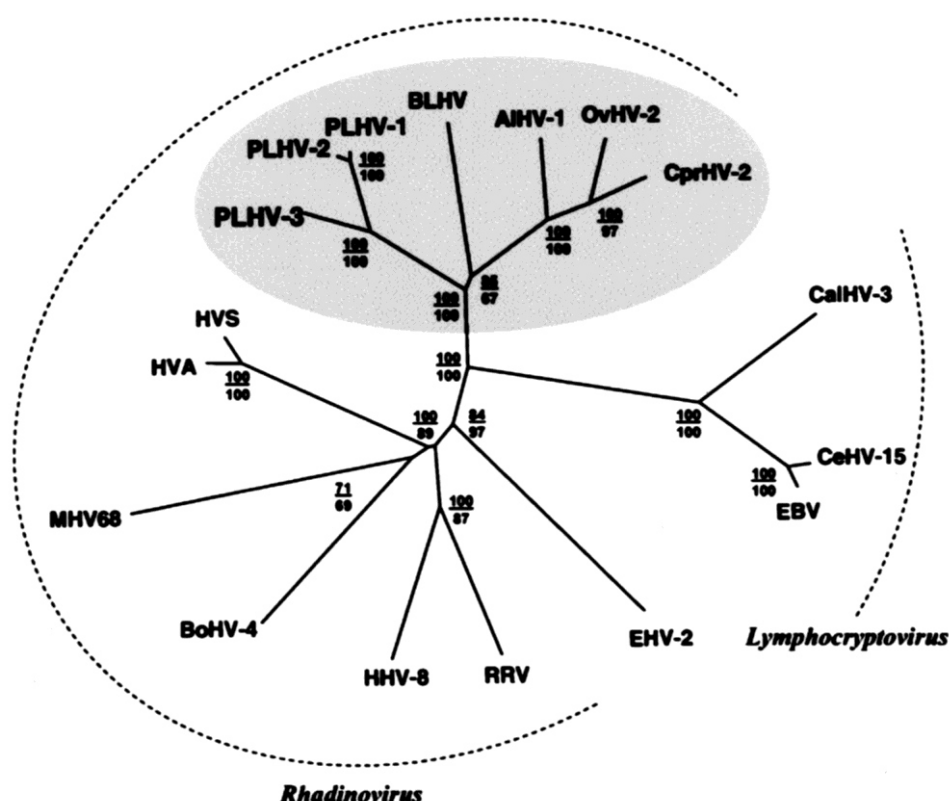
病原学

PLHV病毒属于疱疹病毒属疱疹病毒亚属(Ehlers 等, 1999a)。基于部分DNA聚合酶基因的氨基酸序列分析显示：PHLV-1和PHLV-2显示出与反刍动物 γ -疱疹病毒最高的(68%)的序列同源性，反刍动物 γ -疱疹病毒包括狷羚疱疹病毒、羊的疱疹病毒-2 (OvHV-2)；PHLV-1、-2大约与牛嗜淋巴疱疹病毒(BLHV)有67%序列同源性；但只与猪 α -疱疹病毒PRV的41%和 β -疱疹病毒PCMV少于45%序列同源性(Ehlers 等, 1999a。)

从核苷酸序列水平看，编码PHLV-1和PHLV-2的全部DNA聚合酶基因有7%的不同；而从氨基酸的水平分析，二者则有5%的差异。由于PHLV-1和PHLV-2的DNA聚合酶基因有50个氨基酸序列不同，因此这两个病毒属于不同种属而不是同一种属的不同株(Ulrich 等, 1999)。

科学家在德国一头家猪血液样品中第一次检测到PLHV-3，并发现它与PHLV-1和PHLV-2只有66%的氨基酸序列同源性(Chmielewicz 等, 2003b)。进化分析显示这三种病毒与反刍动物的 γ -疱疹病毒BLHV、AIHV-1、OvHV-2和

羊的疱疹病毒（CprHV-2）簇集在一起(图32.8)。然而，PHLV-3与PHLV-1和PHLV-2序列差异要比二者间的差异大(Chmielewicz等，2003b)。γ-疱疹病毒的保守基因组成一个公共块（common block）。PHLV-1约73kb的基因组序列已被确定，并发现其编码3到52的开放阅读框，这些阅读框包括了第一第二个完整的基因保守区和第三个保守区的开端(Goltz 等，2002)。另外，PLHV-1基因组还包含两个γ-疱疹病毒（E4/BALF1h 和 A5/BILF1h）的不保守ORFs、三个第二和第三保守基因块间的非保守ORFs，和保守基因块外的八个单独ORFs (Goltz 等，2002)。所得到的60kb的PLHV-3基因组序列包括第一个保守基因块和第二个保守基因块的大部分，这部分由3-46的ORFs、一个趋化因子以及一个v-bcl-2基因组成(Chmielewicz 等，2003b)。PHLV-3的基因结构与PHLV-1，PHLV-2在一些区域是相同的，这些区域的序列在三种病毒均可获得，包括了保守的疱疹病毒 ORFs; γ-疱疹病毒特有 ORFs 3、10、11、23和27; 和非保守的 ORFs E4/BALF1h和 A5/BILF1h(Chmielewicz 等，2003b; Goltz 等，2002)。



32.8.基于PLHV-1，-2，-3和其它相关疱疹病毒的gB和DPOL的保守区域的多联体氨基酸序列对比得出的系统树。分支点处标出的是100个复制子得出的引导值。上值由临近/连接分析得出，下值由节俭分析得出。如图所示的分为Rhadinovirus属和Lymphocryptovirus(淋巴滤

泡病毒) 属。灰色区域标出的是形成单独分支的PLHV和一些反刍动物的 γ 疱疹病毒。

(Reproduced with permission by Academic Press from Chmielewicz 等, 2003b)

最近没有用细胞来培养、繁殖、分离PHLV的报道, PHLV的理化和生物学特性还不清楚。然而, 在持续感染的猪B细胞系L23中检测到PLHV-3, 该系的每个细胞大约包含PLHV的400个基因组拷贝(Chmielewicz 等, 2003b)。

流行病学

关于PLHV的流行病学尚知甚少。为证实PLHV的感染, Ehlers 等 (1999a) 在德国检测了42头猪的外周血单核细胞(PBMC)和19头猪的脾脏样品, 发现有88%的PBMC样品和95%的脾脏样品呈阳性。8头西班牙猪中的3头也呈阳性。Chmielewicz 等(2003b)报道了来自德国16个不同种群的92头猪的外周血白细胞样品检验中, 47头PLHV-3 RNA呈阳性(占总数的51%)。16个猪群中大约88%(14/16)的呈PLHV-3阳性。运用实时PCR检测, 同一组样品中的PLHV-1、-2DNA阳性率分别为54%、16%(表32.3)。在肺组织样品中检测到PLHV-1、PLHV-2、PLHV-3DNA的分别为78%、41%、59%,在脾脏检测到的对应为59%、26%、62%。在20头意大利猪的中, 检测到PLHV-1、PLHV-2、PLHV-3DNA分别为80%、20%、20%(表32.3)。来自法国、西班牙和美国的猪同样检测到这三种PLHV。

表32.3. 商品猪PLHV致病性DNA流行情况

组织	农场	国家	被 测 样 品 数	通过下列方法检测 PHLV-3 DNA 呈阳性的		运用 gB 实时 PCR 检测为阳性的		
				样品数	样品数	样品号	样品号	样品号
				DPOL PCR	gB PCR	PHLV-1	PHLV-2	PHLV-3
血液	1	德国	5	2	2	2	2	4
血液	2	德国	6	2	2	2	0	6
血液	3	德国	6	3	3	3	1	1
血液	4	德国	5	4	5	5	1	4
血液	5	德国	7	7	6	6	1	4
血液	6	德国	6	2	3	2	0	5
血液	7	德国	5	3	3	3	0	3
血液	8	德国	5	5	4	4	2	5
血液	9	德国	5	1	1	0	0	3
血液	10	德国	5	5	5	5	3	2
血液	11	德国	5	2	2	2	1	3
血液	12	德国	5	3	3	3	0	1
血液	13	德国	5	4	3	4	1	3
血液	14	德国	8	4	5	3	2	0
血液	15	德国	5	0	0	0	1	0
血液	16	德国	9	0	0	0	0	6
	总数		92	47 (51%)	47(51%)	44(48%)	15(16%)	50(54%)

血液	意大利	20	nd	nd	13(65%)	4(20%)	16(80%)
肺脏	德国	27	nd	nd	16(59%)	11(41%)	21(78%)
脾脏	德国	34	nd	nd	21(62%)	9(26%)	20(59%)

nd = 没做。

本数据经Academic Press的 Chielewicz 等, (2003b)同意后修改。

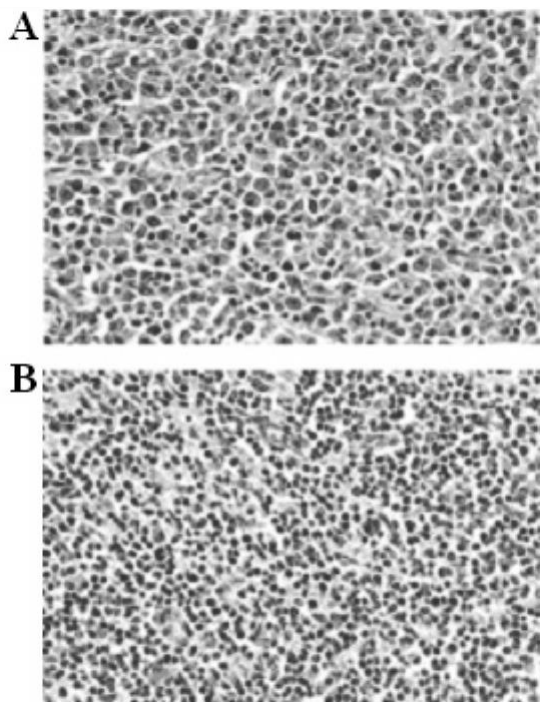
来自不同国家患病猪的 PLHV 序列分析结果显示各国间病毒基因型差异很小, 这表示 PLHV 基因型是稳定的, 与地区差异关系不大。大约 21% (9/44) 小型猪的 PBMC 也呈阳性(Tucker 等, 2003)。同样发现野猪也有很高的 PLHV-1、-2 感染率(Ulrich 等, 1999)。运用全疱疹病毒 PCR 检测法, Chmielewicz 等, (2003a) 分析了采集自 294 头猪的 495 份血液和组织件样品, 128 份 (26%) 检测到 PLHV 序列。这些分子水平流行病学数据显示商业猪场 PLHV 感染是普遍存在的。

PLHV 的传播途径还不清楚。Tucker 等(2003)发现一般猪脾脏样品的阳性率约为 80% (15/15) (译者注: 本数据遵照英文原版内容), 但剖腹产的无限定病原体 (QPF) 猪只有 13% (6/47) 的脾脏样品 PLHV 呈阳性。通过剖腹产已经降低的发病率在严格的生物安全环境下再次反弹的事实说明, PLHV 的传播可能是产前垂直传播 (通过胎盘) 和产后水平传播 (小猪—小猪, 母猪—小猪) 相结合。然而, 一个小型的关于胎盘传播的研究显示 5 头母猪中 4 头为 PLHV 阳性, 然而 33 头剖腹产的仔猪只有一头阳性, 这表示 PLHV 胎盘传播是很少的(Tucker 等, 2003)。

发病机理, 临床症状和病理变化

自然条件下, 猪的 PLHV 感染与其他已知疾病没有关系。然而, 由于与诸如引起牛恶性卡它热的 AIHV-1 等强致病性 γ -疱疹病毒基因相似, PLHV 可能对猪致病。商品猪仅有的六个月左右的生活期, 可能发作不了本病, 特别是慢性发作时。然而, 最近有报道 PLHV-1 在小型猪造血干细胞移植后可能会导致移植后淋巴细胞增生症 (PTLD) (Goltz 等, 2002; Huang 等, 2001)。PTLD 猪的 PBMC 和淋巴结组织能大量检测到 PLHV-1 DNA (Huang 等, 2001)。更重要的是, 很多诸如急早期和晚期基因、G 蛋白偶联受体 (GCP) 基因, bcl-2 肿瘤基因的病毒同系物 (v-bcl-2) 的 PHLV 基因可以在 PTLD 猪身上转录, 但在健康猪身上则不能 (Goltz 等, 2002), 所有这些都支持 PLHV-1 是猪 PTLD 的病原体的假说。与 PLHV-1 比较, PLHV-2 和 PLHV-3 基因型更为接近, 可以假设 PLHV-2 和 PLHV-3

与猪的淋巴增生症有关。人工感染猪 PTLD 临床症状，诸如发烧、嗜睡、厌食、红细胞增多和可触淋巴结肿胀，与由人类 γ -疱疹病毒-Epstein-barr 病毒 (EBV) 引起的人的 PTLD 症状相似(Loren 等, 2003; Paya 等, 1999)。PTLD 病猪的肉眼典型病变是扁桃体增大和包括胃肠道和脾脏在内的全身淋巴结肿胀。肺脏淋巴结和扁桃体肿胀导致病猪通气障碍和呼吸困难(Huang 等, 2001; Talpe 等, 2001)。显微镜下淋巴结可见混有免疫母细胞、类浆细胞和浆细胞的多型 PTLD 细胞(图 32.9)



32.9. 猪嗜淋巴性 γ 疱疹病毒引起的移植后淋巴组织增生症 (PTLD) 组织病理学切片, HE 染色的肠系膜淋巴结组织, A 为 PTLD48 天时的图片, B 是 69 天 PTLD 完全消退。典型的免疫母细胞、浆细胞样细胞和浆细胞混合的多型 PTLD 在 48 天可见, 但是在 69 天时不可看到。(×500) (Reproduced with permission from Huang 等, 2001)

包括 AIHV-1 和 OvHV-2 在内的动物 γ -疱疹病毒与 PLHV 基因类型接近, 然而, 这些病毒对它们的天然寄主非洲大羚羊和绵羊无致病力, 但对牛和鹿则引起严重的淋巴细胞增生和炎症疾病(Goltz 等, 2002)。因此, 尽管 PLHV 在猪不产生任何疾病, 它可能在其它物种致病, 特别是在猪-人的异体移植情况下。异体移植时, PLHV 可以穿过粘膜表面的自然防御屏障利用感染的器官和细胞直接进入人体, 从而导致人猪之间的跨种传播。在免疫抑制的条件下, PLHV 可能使移植受体致病, 使人类产生同样的淋巴细胞增生症(Chmielewicz 等, 2003a; Goltz

等, 2002; Paul 等, 2003; Tucker 等, 2003)。也可能存在着来自供体的 PLHV 与人类已知 γ -疱疹病毒重组情况, 重组后病毒一般在移植后期复活。因而, 应当适当的避免供体猪的 PLHV 感染。

免疫

关于 PLHV 免疫及应答类型尚知甚少。一些证据显示 PLHV 有 B 细胞趋向性。研究发现 PLHV-3 有连续的猪 B 细胞系 L23(Chmielewicz 等, 2003b)。患有 PTLD 的免疫抑制猪, B 系细胞群寡克隆以大约 102 增殖, PLHV-1 基因组拷贝数量随之以 105 增长(Huang 等, 2001)。在猪 PTLD 组织中可检测到编码 B 细胞进入蛋白的两个 ORF(A7/BZLF2h 和 A8/BLLF1h)的转录活动(Goltz 等, 2002)。人工条件下, 血液和脾脏组织的 PBMC 中可大量检测到 PLHV(Chmielewicz 等, 2003a, b; Ehlers 等, 1999a; Ulrich 等, 1999)。总体看, 这些数据确切表明 PLHV 是侵蚀 B 细胞的。然而, 感染 PLHV 的猪 B 细胞变得缺乏抵抗力的原因尚不清楚。

诊断

PCR 是目前唯一可以应用于 PLHV 诊断的实验方法。研究人员开发了一种靶向于疱疹病毒 DNA 聚合酶基因保守区域全疱疹病毒 PCR 检测方法, 他可以检测出 20 多种不同的疱疹病毒(Chmielewicz 等, 2003a,b; Ehlers 等, 1999a, b)。这种将退化和含脱氧肌苷启动子的成套格式全疱疹一致 PCR 能很容易地检测到猪血液和脾脏组织中的三种 PLHV。研究人员也发明了一种实时定量 PCR 检测方法检测样品中的 PLHV-1、PLHV-2 和 PLHV-3 的 DNA 拷贝数量(Goltz 等, 2003)。Ehlers 等人 (1999a)还发明了一种鉴别性 PCR, 这种方法可以区分 PLHV-1 和 PLHV-2 的感染。作为嗜淋巴病毒的成员, 在血液 PBMC、脾脏、扁桃体和淋巴结等组织经常可以检测到 PLHV 序列片段。然而, 只有血液 PBMC 可以从活猪取来作诊断。尚没建立 PLHV 的有效细胞培养方法和血清学检验方法。

预防和控制

关于 PLHV 的一个很大顾虑就是异体移植猪的细胞、组织、和器官可能将这种病毒传染给人(Chmielewicz 等, 2003a; Tucker 等, 2002)。实验证明猪的 PTLD 与 PLHV-1 有关; 因此, PLHV-1 并不是只针对猪的潜在病原体, 他对异体移植的受体—人类也是有致病力的。因此, 接受异体器官移植的人应当仔细检测

PLHV 的传播情况。运用 PCR 方法来筛选供体猪，对于预防异体移植受体的感染是很重要的。

合适的育种程序可以降低甚至消除 PLHV 的感染风险。最近一项研究表明：通过剖腹产和隔离饲养的方法可以生产出无 PLHV 的小猪(Tucker 等, 2003)。因此，严格的育种和生产过程可以生产出无 PLHV 感染的异体移植供体。

马脑脊髓炎病毒

F. Elvinger, C.A. Baldwin

马脑脊髓炎病是 (EEE) 是一种地方流行病，存在于美国东部 (亚特兰大和 Gulf 沿岸)、美洲中南部国家，以及加勒比群岛地区。1972 年第一次报道猪自然感染 EEE (Pursell 等)，该报道称在美国佐治亚州一个 200 头猪的猪群中，在一次该病的爆发中有 160 头死亡。在佐治亚州，麻省以及威斯康星州等地区，早期血清学监测显示家猪和野猪都接触过此病 (Feemster 等, 1958; Karstad 和 Hanson 1958, 1959)。在兽医诊断实验室里猪病材料中偶尔能诊断出此病，但有人不这样认为。

马脑脊髓炎病毒 (EEEV) 的病原体在美国被归类为生物危险 B 类，这由于它比较容易传播，中等程度的致病率，但在人类有高致死率，及它对疾病预防控制中心 (CDC) 的诊断、监视和反应能力潜在影响。

病原学

EEEV 是披膜病毒科 α 病毒属的单链 RNA 病毒。 α 病毒属中有 26 个成员，其中包括西部马脑脊髓炎病毒 (WEEV) 以及委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (Hahn 等, 1988)。1933 年报道了 EEEV 并证实其与 WEEV 的血清学差别 (TenBroeck 和 Merrill)。

核酸分析表明 EEEV 已经独立进化为北美和南美抗原变种体 (Casals 1964; Weaver 等 1991)，它们各自具有独有的病毒特征 (Walder 等, 1980)，经过一段不连续时间传播，隔离群在同一地区有稳定遗传性。

流行病学

EEEV 可在一些鸟群中传播，这些鸟群一般为该病毒的宿主且扩增病毒。EEEV 主要以物脉毛文属 (*Culiseta melanuris*) 蚊子为媒介在鸟-鸟之间传播。其它伊蚊属和按蚊属蚊子同样能够传播 EEEV。蚊子在鸟类和哺乳动物身上获取

营养的习性是这种病毒在哺乳类动物中呈地区性传播的原因。EEE 在哺乳类动物中的出现与气候条件是有关系的，因为气候可影响昆虫媒介物活力和数量（Francy 和 Wagner 1992; Letson 等，1993）。

据报道佐治亚州和佛罗里达州曾爆发过该病（Elvinger 等，1994, 1996b; Pursell 等，1972）。在佐治亚州，最近一次对 45 个农场的猪进行血清学测试时，有 9 个（20%）存在 EEEV 的抗体，而佐治亚州障壁岛的 376 头野猪中有 16% 有该病毒的中和抗体，滴度从 4 到 128 不等（Elvinger 等，1996b）。

一般认为哺乳动物是该病的终末宿主，因为它们身上的病毒滴度太低，不足以感染昆虫媒介物。然而，人工感染的保育猪出现了长达 168 个小时的高滴度病毒血症。在给病毒 96 小时后，口咽和直肠拭子上病毒仍可复活，并且猪在人工感染 20 天之后可以在其扁桃体分离出病毒。另外在人工感染的研究中，接触病猪的对照组猪有血清转化情况（Baldwin 等，1993; Karstad 和 Hanson 1958）。因此，家猪可作为病毒源传播给昆虫媒介物，并且能直接传播给与其相近的哺乳动物。

临床症状

EEEV 主要感染保育猪。其临床症状包括精神抑郁、厌食、共济失调、衰竭、侧卧、痲疯，并最终死亡。然而，在人工或者自然状态下接触 EEEV 的猪一般不表现临床症状。即使口服、皮下或静脉注射高剂量的 EEEV，大多数家猪也只表现出短暂的体温升高症状（Baldwin 等，1993; Elvinger 等，1996a）。其它因素，包括恶劣环境或并发症，可导致猪 EEE 自然爆发时的高死亡率（Elvinger 等，1994; Pursell 等，1972）。人工感染老龄动物并未出现临床症状（Karstad 和 Hanson 1959）而且并没有成年猪感染 EEE 的报道。在所有报道 EEE 症状的猪中最大的为 2 月龄母猪（Pursell 等，1983），幼龄爆发此病，其成年后仍能检测到血清变化（Elvinger 等，1994）。

发病机理

自然条件下，吸血寄生物传播病毒而感染猪，同样的，人工条件下颅内、皮下、静脉和口腔给毒也可发病（Baldwin 等，1993; Elvinger 等，1994, 1996a; Karstad 和 Hanson 1959; Pursell 等，1972）。所有试验猪给毒后的 24 小时内直肠温度升高，并可持续 12 小时以上。但只有少数试验猪在给毒后的 18—72 小时

出现中枢神经系统症状(Baldwin 等, 1993)。无论什么途径, 给毒后 6 小时就可在血液中分离到病毒, 并可持续到 168 小时。大约人工感染后的 120 小时可检测到中和抗体。急性毒血症期后, 只能在扁桃体和中枢神经系统内分离到 EEEV。直到人工感染后的 20 天, 利用寡核苷酸探针仍可在扁桃体分离并鉴定出病毒。所以, 感染猪的扁桃体可能成为主要的病毒散播源, 特别是从接触期到发病期时候(Baldwin 等, 1993; Karstad 和 Hanson 1958)。寡核苷酸探针表明了 EEEV 在候鸟肝脏的病变, 肝脏病变出现在毒血症的早期, 早于心肌细胞和中枢神经系统出现病变(Baldwin 等, 1993, 1994a, b)。病毒在肝脏出现病变表明它具有嗜肝性并可在肝脏复制。

病理变化

自然和人工感染的猪均未发现肉眼病变 (Baldwin 等, 1993; Elvinger 等, 1994, 1996a; Karstad 和 Hanson 1959; Pursell 等, 1972)。显微镜下, 人工感染猪肝脏在 12 个小时后出现坏死性肝炎, 再 24 小时时病灶增大, 48 个小时之后部分溶解, 72 个小时之后完全溶解 (Baldwin 等, 1993)。在疾病的急性期中, 可能没有中枢神经系统的损害。最早的脑损害大约发生在感染后 48 个小时。这些损害与心脏的轻微损害以及肝脏的溶解损害并发。脑炎的典型特征包括: 炎症细胞渗出, 血管周围袖套现象, 神经坏死, 嗜神经现象, 神经胶质增生和软化 (Baldwin 等, 1993; Elvinger 等, 1994, 1996a; Pursell 等, 1972), 但观察不到病毒包涵体的存在。最初, 在渗出液和血管袖套中主要是嗜中性粒细胞, 后期出现大量淋巴细胞。另外, 也能观察到巨嗜细胞, 外膜细胞, 嗜酸性细胞和细胞碎片。在血管中能发现有玻璃状或颗粒状的血栓。损伤主要发生在大脑灰质和脊髓中, 白质也会受到影响。在脑膜中能看到炎症细胞斑。据报道在自然感染猪可看到多发性局部心肌坏死并在人工感染病例中可再现 (Baldwin 等, 1993; Elvinger 等, 1994, 1996a)。那些经人工感染而存活的猪一般无明显症状, 偶尔出现伴有袖套现象的中度脑炎病变和神经胶质细胞增生, 以及被巨噬细胞包围并部分矿化的心肌坏死病灶 (Baldwin 等, 1993)。

诊断

保育猪出现本病神经系统症状后, 若出现死伤, 则表明病毒处于活动期, 尤其当气候条件适宜昆虫媒介物的生长繁殖时。组织病理学的损伤最先出现在肝

脏和心肌。可能 EEE 引发的脑损伤还未出现,病猪就因毒血症死亡。

最准确的诊断方法是病毒分离、RNA 或抗原的检测。存活猪血清抗体出现是 EEE 病毒处于活动期的一个标志, 尽管抗体滴度取决于早期接触患病母猪情况或通过初乳传递的。

为诊断自然或人工感染的 EEEV, 有很多方法可用, 可以是分离和鉴定病毒或其 DNA, 也可以是检测 EEEV 的对应抗体 (Tsai 和 Chandler 2003)。当怀疑某猪群感染 EEE 的时候, 需要新鲜的和经福尔马林固定的脑、脊髓、肝、心脏和扁桃体样品进行病毒分离和组织病理学检验。由于 EEEV 可在扁桃体存在, 因此可以采集猪喉头拭子分离病毒。 收集样本的时候必须谨慎操作以防意外的感染。 感染和未感染猪只的血清都应进行血清学检验, 尽管发病和死亡可能早于免疫应答的产生。

预防与控制

目前还没有尝试过对感染 EEE 猪的临床治疗。没有关于感染该病马匹的治疗报道, 对感染此病的人也只是针对症状简单治疗 (Craven 1991)。

有两种办法可以预防 EEE 的传播: 1.对高危动物免疫接种; 2.控制昆虫媒介物。 为母猪接种疫苗是猪场主防止因 EEEV 感染而造成损失的必要选择。把马的疫苗接种母猪, 可以使母猪通过初乳把抗体传给小猪, 这些抗体足以使早断奶仔猪抵抗感染 (Elvinger 等, 1996a)。母猪因接触病原或接种疫苗产生母源抗体, 该抗体通过初乳传给仔猪并在其体内持续 11 周时间, 应该能保护仔猪渡过疾病易感期。

第二种方法是控制 EEEV 的昆虫媒介物。以哺乳动物或鸟类偶尔发生的 EEE 病例为信号, 该信号表示需要启动地区或全国性的卫生保健措施。为保护公共卫生, 在流行该病地区使用空气杀虫剂, 本措施对猪场主是有好处的, 这些好处直接表现在可控制疾病爆发从而降低经济损失, 间接表现为阻止了 EEEV 在猪体内的复制, 这种复制的大量存在对生猪生产者有潜在的感染风险。

狂犬病

F.Elvinger

狂犬病是中枢神经系统 (CNS) 的急性、高致死、病毒性的人畜共患病。人们认为所有哺乳动物对其都易感, 尽管一些需要较高的剂量才能出现临床症状,

只有很少的肉食动物/杂食动物和蝙蝠类作为其主要宿主。

狂犬病发生遍及除南太平洋的一些岛国（新西兰等）之外的世界各地，这些岛国从来没有狂犬病的记录。在日本、美国、挪威和一些其它国家，该病已被根除。如果一个国家两年内没有确认狂犬病自然病例，世界卫生组织将把该国列为无狂犬病（**Rabies-free**）国家。在像澳大利亚的一些国家最近报道了蝙蝠的类狂犬病毒，该病毒可引发类狂犬病导致人和陆生哺乳动物的死亡。

狂犬病的发病率因地而异，由此造成的公共卫生和经济影响程度也因地区的发展程度，城市和农村的环境不同以及国内社会阶层的不同而各异。Meltzer 和 Rupprecht(1998a, b)创造了一个包含两部分的经济评价标准，在这个标准中他们评估一例人或动物的狂犬病例的损失程度，并将这些损失和不同模式相比较，这些模式包括控制狗和野生动物的发病和控制接触人和动物的治疗的方法。狂犬病的损失不仅仅是损失牲畜造成的经济损失，而且还包括日常调节、感染人员的治疗、和由于本人或者其家畜感染此病而造成的精神损失。

病原学

狂犬病病毒是子弹状，长 180 纳米、宽 75 纳米、单股、非节段、负链 RNA 病毒，属于单分子负链 RNA 病毒目弹状病毒科狂犬病毒属。弹状病毒属的另一成员为水泡病毒属，它包括水泡性口炎病毒。分子生物学分析和交叉保护反应把狂犬病毒属区分为 7 种不同遗传谱系：狂犬病病毒（经典狂犬病病毒 血清型/基因型 1）；包括非洲病毒 Lagos, Mokola, Duvenhage（分别为血清型/基因型 2, 3, 4）在内的狂犬病相关病毒；欧洲蝙蝠病毒 I 和 II（分别为基因型 5 和 6）；澳洲蝙蝠病毒（基因型 7），除 Lagos 外，其余均引起人类发病和死亡。另外，属于狂犬病血清群的狂犬病病毒属还包括分离自非洲苍蝇和蚊子的 Kotonkan 和 Obodhiang 病毒株，以分离自法国圭亚那（Guyana）蚊子的 Rochembeau 株，这些毒株现在只能在无脊椎动物宿主体内分离到。狂犬病毒颗粒有 5 种蛋白组成，其中两种是有特殊意义的。磷酸酯核蛋白（N）包括抗体结合表位，依据这些表位使病毒分成了不同种群。糖蛋白（G）包裹除平面末端的整个病毒粒子。五种蛋白中唯一结合病毒中和抗体的，糖蛋白的氨基酸序列不同而形成了不同的毒株差异。狂犬病毒血清型 1 的抗原差异并不影响常用疫苗的功效。

流行病学

狂犬病毒的传播分为两个流行周期。野毒期 (urban cycle)，街毒在粪便和家狗之间传播，在许多发展中国家这些街毒仍然对人类威胁很大。在发达国家已转变为变种期 (sylvatic cycle)，特征性的狂犬病毒变异体以个别的地方株在特定的野生动物宿主间传播。宿主包括不同种类的狐狸、豹类、丛林狼、浣熊、臭鼬、猫鼬和蝙蝠。狼和猫能很有效的传播狂犬病但其自身不是宿主。其它不会进一步传播该病的动物是该传染病的终末宿主。在欧洲和北美，在人类，伴侣动物以及家畜中的狂犬病是由于变种期引发的。

在北美，很少有猪感染狂犬病的案例。在加拿大，从 1998 年到 2003 年，2601 例的狂犬病案例当中有 2 例是发生在猪身上的 (Canada Food Inspection Agency 2004)；在美国，1991 到 2000 年间共有 89,011 狂犬病例报告，其中 14 例为猪感染。(Krebs 等，2001)。然而，国际兽医局每年都会收到各个国家的猪狂犬病例的报告 (OIE，2003)。

发病机理

患狂犬病的动物咬人后其唾液里病毒量相当于了一个皮下和肌肉接种量。过了病毒复制前的隐晦期后，通过外周神经或颅神经的轴浆将病毒转移至中枢神经系统。在接种和侵蚀神经之间的滞后期可能是稳定期，这段时间做的预防处理是非常有效的 (Acha 和 Szyfres，2003)。病毒在中枢神经系统复制后，病毒向外传输至非神经组织，如唾液腺和眼睛。在出现临床症状前、中、后期感染动物都可能随唾液排出病毒 (Rupprecht 等，2002)。

本病的潜伏期少则几天多则数月。潜伏期的长短取决于病毒株种、咬的部位及由此进入的病毒数量以及被咬人的年龄及免疫状况。一个单独的例子是五头母猪的两头和一头公猪被患狂犬病的狐狸给咬了，发病且死亡，潜伏期分别为 39、56 (公猪) 和 123 天 (Reichel 和 Möckelmann 1963)。Bear 和 Olson (1972) 记录了食用猪非致死感染的潜伏期为 32—47 天。被患病蝙蝠咬的小猪在 23—42 天后发病 (Mamatov 等，1974)。

临床症状

大部分动物经历以下三个临床症状期：前驱期，开始出现行为异常，但无明显的呼吸道、消化道、和中枢神经症状；骚动兴奋期，这时动物出现骚动和攻击性，进展为癫痫发作再至昏迷死亡；麻木期，以瘫痪、昏迷、死亡为特征。

像其他动物一样，猪的临床表现各异。关于食用猪的临床症状记录很少(Hazlet 和 Koller 1986)。报道的症状包括情绪不安、反应迟钝、共济失调、有攻击倾向、流涎/唾液、明显口渴、厌食、声音沙哑很少尖叫、前腿瘫痪、母猪鼻子颤搐、嘴急速咀嚼并大量流涎，间歇性痉挛、发热、全身瘫痪继而昏迷和死亡(Dhillon 和 Dhingra 1973; Hazlett 和 Koller 1986; Merriman 1966; Morehouse 等, 1968; Yates 等 1983)。据报道此病在猪的临床期缩短了，持续 12 小时到五天。有报道描述了 6 头被患病臭鼬咬的猪中 4 头中枢神经系统紊乱症状，包括从前腿开始的进行性麻痹，性亢奋。这些症状 1—2 周时间内减退，随着血清中和抗体水平的升高，这些猪全部存活，自到两月后的宰杀。有不少包括携毒状态的动物从狂犬病临床症状恢复且存活下来(Doege 和 Northrop 1974; Fekadu 1991)，这些情况也可能发生在猪上。

病理变化

猪上很难发现狂犬病的肉眼病变。患狂犬病的猪可能状况良好，饮食正常、尽管临床期缩短(Merriman 1966)。患病猪经常出现尼氏体缺失，尼氏体是被感染动物神经细胞和树突胞浆内的嗜酸性包含体(Merriman 1966; Morehouse 等, 1968; Reichel 和 Möckelmann 1963)。Morehouse 等(1968)给出了最详尽的组织病理学变化特征，他观察了密苏里州农场 16 头猪中的 5 头，这 5 头猪在一次经历 2 个月的狂犬病爆发中死亡。神经系统的镜下变化相差很大，从大脑轻微的血管炎和局灶性的神经胶质细胞增生到广泛性的脑膜脑炎和大脑、脊髓的神经细胞变性。

实验室检验

直接荧光抗体试验(FAT)一直是检测各类动物狂犬病的最常用方法。1958 年国际兽医局和世界卫生组织联合推荐了本实验方法(Aubert 等, 2000)。感染动物中枢神经系统的各个部分、角膜压迹和皮肤活体检查均可检测到抗原(Fekadu 和 Smith 1984; Smith 2003)。在检测取自延髓、大脑和海马(Ammon's horn)(报道称这些组织的抗原含量最高)的新鲜组织涂片时，本实验是最敏感的(接近 100%)检测方法。对个别组织而言病毒分离技术可能要比 FAT 更准确一点；然而，FAT 更常应用于由于组织腐败或抗体出现后病毒复制受到破坏的组织。FAT 检测新鲜的脑组织最精确，当检测福尔马林固定后的标本时其灵

敏度就降低（为新鲜组织的 90—100%）。据报道经小鼠接种实验证实为狂犬病阳性的病猪样品，FAT 试验可能出现假阴性(Dhillon 和 Dhingra 1973; Morehouse 等, 1968; Yates 等, 1983)。当 FAT 试验结果不确定或是阴性时，且人接触症状非常明显的动物时，要进一步做小鼠接种实验或细胞培养实验。经更精确方法检测呈阳性的样品只有 75—80%的样品看到尼氏体及胞浆内嗜酸性抗原聚集，(Fekadu 和 Smith 1984)，所以通过尼氏体来判断猪是否患狂犬病的准确性很低(Merriman 1966; Morehouse 等, 1968; Reichel 和 Möckelman 1963)。

预防和控制

保护人和动物不感染狂犬病主要靠预防措施。控制流浪狗，免疫家养狗能有效地减少人、伴侣动物和牲畜地发病率。

由于在美国、西欧和其它国家猪每年感染病例很少,可能是猪对狂犬病不易感造成的，一般不推荐使用猪的狂犬疫苗。美国现在没有批准猪的狂犬疫苗使用，预防接种需要别的动物狂犬病疫苗的标签外使用。

一旦接触，未免疫的牲畜应当及时宰杀：“如果在被咬后的七天内宰杀,除被咬的部位切下丢弃外，其余组织可以正常食用”(美国国家兽医公共卫生协会, 2004)。在美国这种动物可以屠宰后食用,但是,“国家肉品检查指导方针要求:任何已知在 8 个月内接触狂犬病的动物不应屠宰”。

接触后的预防性处理来救治珍贵动物或在那些不愿丢弃接触动物的宠物主人是有利的。Mitmoonpitak 等(2002)报道,由患病狗咬过鼻子、肩部、会阴和尾部等几处较深伤口后,11 头猪接受了单独的疫苗(法国 Rhone Merieux 生产的灭活的 Rabisin)或疫苗加马的的狂犬病免疫球蛋白(ERIG,40IU/Kg 体重, Pasteur Merieux Connaught, France)，14 天后所有接受处理猪均检测到狂犬病抗体，并且活了 1 年。因此,珍贵动物接触后紧急处理与直接宰杀相比是一种安全有效的选择.然而,需要指出的是：目前没有获批准的猪狂犬疫苗，狂犬病携带成为该病流行区的潜在隐患,卫生部门并且要求限制公众接触动物园里的和其它地方的猪(Massachusetts Department of Public Health 2004)。

（赵化阳 译 周海云 校）