

马流感的研究现状

刘清海¹, 孙洪升², 车秀华²

(1.大庆油田公司昆仑集团, 大庆 163453; 2.大庆市兽医卫生防疫站, 大庆 163453)

马流行性感冒 (Equine influenza) 简称马流感, 是由正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 流感病毒属 (Influenzavirus) 马 A 型流感病毒引起马属动物的一种急性暴发式流行的传染病。马流感为高度接触性、呼吸道传染病。该病的临诊特征为发烧、结膜潮红、咳嗽、流浆液性鼻液-脓性鼻漏、母马流产等为主要症状。病理学变化为急性支气管炎、细支气管炎、间质性肺炎与继发性支气管肺炎。

该病广泛存在世界许多国家, 并在很早就有报道, 但在 1955 年以前, 由于缺乏对一群呼吸道感染病原学的研究, 因此, 当时报道的马流感, 还包括马传染性鼻肺炎、马病毒性动脉炎、马传染性支气管炎和鼻病毒感染等在内的一类疾病。近年来, 随着病原学和免疫学研究进展, 其结果表明, 1956 年 Sovinova 等在布拉格从流感病马体内分离到的病毒为甲型流感病毒, 命名为 A/马/1/布拉格/1/56 (马甲 1 型), 1963 年 Wad-dell 等在美国的迈阿密州从马体分离出的一株在抗原性上与马甲 1 型流感病毒不同的甲型流感病毒, 命名为 A/马/2/迈阿密/1/63 (马甲 2 型)。到目前为止, 马流感病毒只有这两个在抗原性上不同的亚型, 这两个亚型病毒具有甲型流感病毒共有的补体结合性抗原, 但血凝抑制试验和病毒中和试验有区别。由这两株病毒引起的马流行性感冒, 广泛分布于世界各地。我国于 1974 年夏到 1975 年春爆发了马流感, 证明是由马甲 1 型流感病毒引起的, 1989 年春又发现了由马甲 2 型病毒引起的马流行性感冒。近年来, 我国西北、东北等地区马流感发生间隔时间缩短, 危害愈趋严重, 给我国养马业造成很大的经济损失。

1 病原

1.1 马流感病毒特征

1.1.1 一般特征

马流感病毒属于正粘病毒科 A 型流感病毒, 典型的病毒粒子呈多形态, 多为球型, 直径约为 80~120 纳米。病毒具有脂质双层囊膜。其表面有致密排列的纤突, 其中 90% 为血凝素 (Haemagglutinin, H), 其余 10% 为神经氨酸酶 (Neuraminidase, N), 二者构成病毒的主要表面抗原。国际上根据流感病毒的 H 和 N 的不同, 将 H 分成 15 个型, N 有 8 个亚型。马甲 1 型 (H7N7) 和马甲 2 型分别属于 H7N7 和 H3N8 亚型。最近, 在迪拜举行的国际马流行感冒监测研讨会上, 有些科学家根据与疫苗毒株的交叉反应性, 将马流感病毒分为“欧洲样”毒株和“美洲样”毒株。

马流感病毒可在鸡胚中繁殖, 也可在鸡胚成纤维细胞、仓鼠肾细胞、猴肾细胞、犬肾细胞、牛肾细胞、仓鼠肺传代细胞等细胞生长, 但效果不如鸡胚培养。马流感病毒对外界的抵抗力较弱, 56℃数分钟即可使其丧失感染力。对紫外线、甲醛、稀酸等敏感, 脂溶剂、肥皂、氧化剂等一般的消毒剂均可使其灭活。

1.1.2 病毒分子结构及功能

马流感病毒核酸为单股负链 RNA, 本身不具有感染性, 可分为 8 个分子量不同的节段。上述 8 个节段分别至少编码 10 种蛋白质。

聚合酶蛋白 (PB2, PB1, PA) PB2 由 RNA 节段 1 编码, RNA 节段 1 是凝胶电泳中移动最慢的一类。PB2 作为一类蛋白复合物能够提供病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶活性。PB2 在蛋白识别和连接宿主细胞 mRNA 时, 在起始病毒 mRNA 转录中起作用。PB2 另一功能是使帽状结构与 mRNA 分开。PB1 由 RNA 节段 2 编码, 只有在 RNA 蛋白复合物中才能发挥作用。PA 聚合酶蛋白由 RNA 节段 3 编码, 位于感染细胞核内。

血凝素 (HA) 由 RNA 节段 4 编码, 是马流感病毒主要表面抗原, 负责病毒粒子和宿主细胞的连接。转录后的 HA 经过加工、蛋白水解、糖基化和脂肪酸酰化, 新合成的 HA 去除 14~18 个疏水氨基酸, 这些氨基酸是转运到细胞膜的信号序列, 于是加上碳水化合物侧链。在 HA 末端附近的半胱氨酸加上棕榈酸, 最后 HA 裂解成 2 个亚单位 (HA1, HA2), HA1 和 HA2 之间通常由二硫键相连。HA 分子在成熟过程形成同源三聚体, 马流感 HA 完整三聚体的三维结构已搞清楚, 与其他流感病毒一样, 每个 HA 分子在杆上有一个球头, 球头是由大部分的 HA1 构成包括有受体连接部位和抗原位点, HA 的杆包括所有的 HA2 和部分 HA1, 在 HA2C 末端存在有疏水的跨膜序列。

核蛋白 (NP) 是由 RNA 节段 5 编码, 它被转运到感染细胞核, 连接并包裹病毒。目前认为 NP 在病毒 RNA 聚合酶活性从 mRNA 的合成到 cRNA 和 vRNA 合成转换中起作用。NP 在感染细胞中可大量合成。

神经氨酸酶 (NA) 由 RNA 节段 6 编码, 是马流感病毒另一个主要表面抗原, 其成分为整体膜糖蛋白, 主要是将唾液酸从糖蛋白和糖酯上切开, 使病毒粒子从宿主细胞受体解脱下来。

专论与综述

基质蛋白(M1)由RNA节段7编码,是病毒粒子中最丰富的蛋白质。基质蛋白形成包裹病毒核衣壳的外壳,在病毒囊膜之下。在感染细胞中M1既存在于细胞浆又存在于细胞核中。现在认为M1不具有酶活性,估计可能在前病毒装配起始中起作用。

非结构蛋白(NS1,NS2)是由病毒RNA节段8编码。这两种蛋白,尤其是NS1,在感染细胞中大量存在,但不嵌入前病毒。这两种蛋白在病毒复制中起作用。

1.1.3 马流感病毒的变异

马流感病毒与其他流感病毒相比,相对比较保守,但也易发生变异,仅限于2个血清型。流感病毒通过两种机制即抗原性的漂移和抗原性的转换改变其抗原性,抗原性的漂移是病毒全部基因片段变化的积蓄,此变化对经常受到宿主防御机制选择压力的表面糖蛋白尤为重要。自80年代以来,H7N7型马流感病毒在世界各国均未分离到,而近年来H3N8型马流感病毒频繁暴发,这恰恰说明马流感病毒的抗原性转换作用。马流感病毒血凝素是其主要表面抗原,血凝素(HA)基因是决定其毒力强弱的主要基因之一,也是EIV基因组中变化频率最高的基因。血凝素基因的变异直接影响着病毒侵袭宿主细胞的能力和致病力。马流感病毒血凝素基因通常以点突变为主,正由于与其他流感病毒一样,基因组是分段的,且其RNA聚合酶缺乏校正功能,马流感在进化过程中发生变异是必然的。

2 流行与分布

2.1 流行病学

自然条件下,只有马属动物具易感性,没有年龄、性别和品种差别。病马咳嗽喷出含有病毒的飞沫,经呼吸道传染是本病主要的传染方式。实验证明,此病可通过空气感染,也可通过污染的饲料、饮水经口感染。因为病毒在康复马匹的精液中存在很久,配种,尤其是本交也是此病的一种重要传播方式。

本病传播极为迅速,引进易感畜群,呈暴发性流行,经一周或稍多些时间,所有易感马都感染发病。由于病马感染以后能获得的长时间的免疫,因此,3岁以上的马匹都带有大量的各种抗体,所以在流行时发病的多是2岁以下的幼龄马。另外,由于两个亚型毒株之间交叉免疫保护力甚小,当它们在同时或相继在同一马群流行时,就会出现一再发生的波浪式流行。

本病一年四季均可发生,我国北方地区以春秋多发。有些地区则多发生于冬末春初,而另一些地区则流行于夏季。

2.2 分布

据资料记载,马流感在我国早已存在,50年代在我国河南、福建、内蒙古、辽宁、青海、宁夏、江苏、等省市、自治区就有该病的发生。

建国后,总的来讲,我国有三次马流感大流行。首先,在1974年6月,我国曾发生一次马流感大流行,首先从新疆与

前苏联接壤的伊犁、博尔塔拉、塔城等地区开始,很快蔓延至全自治区的11个市,新疆地区暴发马甲1型(H7N7)流感病毒引起的马流感,到1974年冬向南向东传播蔓延,其流行范围之广,是我国建国后的第一次,先后青海、甘肃、内蒙古、陕西、宁夏、河北、河南、吉林、辽宁、黑龙江、天津、山东、四川、西藏、贵州、福建等17个省(市)、自治区发生本病。这次马流感大暴发分离的毒株以A/马/京防74-1为代表,经鉴定属于马甲1型,与1956年国外首次发现并分离的代表株A/马/1/布拉格/1/56(马甲1型)相比,抗原十分相似,此次马流感与人的甲3型流感同时暴发,检查与病马密切接触人的血清,未发现马甲1型抗体,马甲1病毒已有近20年未再分离到,很可能此病毒现在已经消失。其次,另一次大流行是在1989年至1990年我国北方连续两次暴发马流感,主要发生在吉林省、黑龙江省和内蒙古,从这次大暴发分离出毒株为H3N8型马流感病毒(A/马/吉林/1/89,A/马/黑龙江/2/89),基因学分析表明A/马/吉林/1/89与当今马H3N8流行株在抗原性和遗传特性上有本质区别,病毒的6个基因与禽流感病毒有密切关系。据推测该变异株与马H3N8流行株重组为杂和病毒潜伏下来,发展趋势难以预测。最后一次大流行是在1992年秋至1994年,我国西部、西北、华北和西南地区马群中突然暴发了呼吸系统疾病,1993年5~8月在松花江、绥化、齐齐哈尔等市县暴发马流感,1994年从青海省暴发的马流感的病马中分离出A/马/青海/1/94毒株,经鉴定为H3N8型,该毒株与A/马/吉林/1/89毒株HA基因序列比较,同源性为76.9%,与1992年香港马流感H3N8的HA同源性为97.4%。此外,在1992年11~12月,我国香港赛马群暴发马甲2型(H3N8)马流感。我国马流感发生年代、分布及发病情况详见下表。

1980年以来,马流愠除一次是马病毒变异株引起外,1989年英国马流感和1992年香港赛马流感均由H3N8引起。基因学分析表明这些病毒的HA都经历了明显的抗原转移。

3 临床症状及病理变化

3.1 临床症状

本病的潜伏期为2~10d,多在经3~4d后发病。发病的马匹中常有一些症状轻微呈顿挫型经过的,或更多一些的呈隐性感染。典型病例先表现发热,体温上升到39.5℃以内,稽留1~2d,或4~5d,然后徐徐降至常温。如有复相体温反应,则有了继发感染。

最主要的症状就是最初2~3d内呈现经常的干咳,干咳逐渐变为湿咳,持续2~3周,亦常发生鼻炎,先流水样的而后变为很粘稠的鼻液。马甲1型病毒感染时常发生轻微的喉炎,有继发感染时才呈现喉、咽和喉囊的病症。

所有病马在发热时都呈现全身症状。病马呼吸加速、脉搏频数、食欲降低,精神萎顿。眼粘膜贫血浮肿,大量流泪。马甲1型病毒所致的变化,往往呈呼吸表浅加快,甚至有时气

专论与综述

喘。病马在发热期中常表现肌肉震颤，肩部的肌肉最明显，病马因肌肉酸痛而不愿活动。

马甲2型病毒较马甲1型病毒有较大的毒力而更呈趋肺性。由马甲2型病毒所致的病例则能观察到细支气管炎或扩散而呈支气管炎、肺炎和肺水肿。发热能达41.5℃。在欧洲发生的马甲2型病毒的流行时，多数马都在发病的第四天以后，因继发细菌感染，呈复相的发热。有些病畜在胸部、腹下和四肢发生水肿，有时发生腱炎和腱鞘炎，行走慢而不稳或跛行。有些病马发生卡他性甚至出血性炎，肾也可发炎受损。

本病血相并无特殊变化。发病初期通常呈轻度贫血和白细胞减少。血检时可发现嗜中性粒细胞左移，大单核细胞稍增多。如并发细菌性感染则白细胞增多。

本病常取良性经过，如无并发症的经一周恢复正常。死亡的多是幼驹或有继发性感染的病例。死亡率一般不超过5%。致死性病例的肺有水肿，支气管肺炎及胸膜炎。胸腔积液，喉周围常有胶样浸润。全身淋巴结浆液性炎。

3.2 病理学变化

3.2.1 病理剖检变化
眼观病变为结膜潮红、水肿、外翻，呈砖红色或淡黄色，常出现角膜浑浊。上呼吸道粘膜充血、水肿和渗出，上皮细胞脱落与局灶性糜烂。头、颈部淋巴结肿大。肺脏充血、水肿，扩张不全。肝脏一般无明显眼观病变。若病畜继发细菌感染时，则见喉头周围、胸部、腹下，肢体皮下呈胶样浸润与全身淋巴结肿大。胸腔经常充满液体与并发胸膜炎，偶见腹腔积液。肺尖叶、心叶、隔叶下部可见大小不等的暗红色或灰褐色实变区，支气管内有粘膜，脓性渗出物。肠粘膜附着粘稠渗出物，粘膜潮红，有大小不等的出血点。

3.2.2 病理组织学变化

表现为急性支气管炎与细支气管炎，以管腔内有多量嗜中性粒细胞渗出为主要特征。炎症为一过性，一般只见于发病后的头4d，其后炎症消退，粘膜内遗留有轻度淋巴细胞、浆细胞浸润。炎症也可转变为慢性支气管炎与细支气管周围炎，间质性肺炎。严重的病例为急性支气管间质性肺炎，表现为肺泡中膈普遍增厚，增生的细胞为组织细胞与淋巴细胞。肺泡腔和支气管腔内有浆液（少数为纤维素）、嗜中性粒细胞、巨噬细胞与淋巴细胞渗出物，支气管周围还有明显的淋巴细胞，浆细胞浸润，肺泡上皮呈立方状化生。肝脏可发现肝窦隙内有弥散性或结节性淋巴细胞、组织细胞浸润。由于自然病例和实验感染的马、驴、马胎儿乃至乳仓鼠都有这种变化，它可能是马流感病毒所引起的一种原发性变化。肠粘膜为卡他性或出血性肠炎、浆液性淋巴结炎。

4 诊断

根据流行情况和典型临床症状，一般可做出初步诊

断。进一步确诊需要进行实验室诊断。血清学试验常以血凝抑制试验测定病马急性期和恢复期的双份血清，如抗体升高4倍以上，即可诊断为流感病毒感染。目前，广泛应用而又具有相同效果的血清学试验有两种简单方法即血凝抑制试验(HI)和单向辐射溶血试验(SRH)，也可以使用补体结合试验，但它尚未标准化也不常使用。近年来随着免疫学以及分子生物学的迅猛发展，出现了一些用于快速诊断马流感的方法。

5 疫苗及防制

马流感病毒与其它流感病毒一样，容易变异，因此，给疫苗的研究带来困难。目前世界上大多数国家采用马流感病毒灭活苗。一般选用具有代表意义的甲1型和甲2型毒株制成二价苗或多价苗，并根据病毒分子流行病学的研究，针对本国实际情况，不断选取新的代表毒株制成疫苗。灭活的全病毒疫苗安全性好，抗原成分齐全，免疫原性强，不会出现毒力返强和变异的危险。在70年代，我国研制的马流感灭活疫苗有以下3种，但没有大面积应用，一旦马流感发生后，主要采取一些对症治疗措施。

马甲1型单苗，制苗毒株采用的是京防-74株，基础血凝滴度(HA)分为高价苗(HA640x)和低价苗(HA320x)两种。

马甲2型疫苗，制苗毒株采用美国迈阿密63株，基础血凝滴度为HA1280x。

马流感联苗，将马甲1型与马甲2型原苗按一定比例配合，加入豆油佐剂制成。

目前，对马流感疫苗的研究趋势主要有亚单位疫苗、基因疫苗和弱毒疫苗。Christopher等用杆状病毒作载体制成马流感病毒血凝素基因亚单位疫苗，同时将血凝素基因克隆到pWRG质粒上构成基因疫苗，分别对小鼠进行免疫，结果发现，杆状病毒体外表达的HA蛋白不能诱发机体产生中和抗体，进一步使用霍乱全毒素作为佐剂不仅不能增强免疫效果，而且会起到相反作用；基因疫苗在使用时两次免疫时间间隔9周才会获得良好的免疫效果。弱毒苗是将病毒连续在含有正常马血清的鸡胚尿囊腔中继代致弱的。采用鼻内接种具有良好的保护力。弱毒疫苗可诱发更强大的免疫应答，包括细胞免疫。但必须考虑返祖成为强毒的可能性，这也是弱毒苗应用不广的原因之一。

由于马流感呈暴发流行，传播迅速，加之抗原变异程度较大，给防制带来较大困难。香港92年暴发马流感过程中，有75%的注苗马不能抵抗感染。此外英国和瑞士也有类似报道。可见由于病毒的抗原漂移或变异，原有疫苗往往不能提供良好的保护力。造成病毒抗原变异的根本原因在于免疫选择压力。新变异株的出现必然要逃避原有宿主的免疫压力。这也是马流感防制过程中需要克服的主要矛盾。