

流感不断的挑战

The ongoing challenge of flu

作者: Marie Gramer

译自: Hanson Lecture

译者: 张桂红

在过去的二十年中，人们比以往任何时候都更加关注流感病毒。这种关注多半归因于，在亚洲出现了能引起人感染并引起感染者高死亡率的高致病性禽流感病毒。在此之前，无论是对是错，有人认为，人类感染的流感病毒通常需要一个哺乳动物中间宿主作为“混合器”，如猪。这个能够绕过猪直接从鸟类传染给人的流感病毒是全新的，且可能十分危险。这种状况带给人们新的紧迫感，以及关注若干相互关联的问题：究竟这株病毒发生了多少以及什么样的变化，足以使病毒逃避宿主的免疫功能；究竟猪在未来流感大流行中扮演了多么重要的角色；以及我们如何能够更准确地和快速诊断猪流感。

病毒亚型及基因的种间重组

流感病毒是分节段的，负链RNA病毒。它们的遗传物质至少编码10种病毒蛋白。在三种流感病毒中，A型流感感染禽类、猪、人、其它哺乳动物并可以进行种间传播。A型流感病毒根据2种表面蛋白可区分为不同的亚型，2种表面蛋白分别是血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。这些表面蛋白同时也可刺激宿主免疫系统产生免疫反应。流感病毒共有16种血凝素亚型(H1-H16)和9种神经氨酸酶亚型(N1-N9)。在1998年之前，猪仅感染一种亚型的流感—即H1N1。这种“古典”的H1N1病毒已经相对稳定超过60年。但在1998年，在猪群中出现了H3N2亚型的猪流感病毒。这些H3N2病毒大多数是三重组病毒，含有人流感、禽流感和猪流感毒株的基因片段。自从1998年以来，又相继出现了一些其它的重组病毒，例如1999年出现的H1N2亚型流感病毒、大约在2001年出现的含有禽类基因的H1N1亚型的“变异株”病毒。最终，经过或缓慢或更迅速的遗传变化，出现了能够共同感染畜禽的病毒，造成或者抗原变异（由于HA基因序列突变造成的微妙变化）或抗原漂移（由于病毒间病毒基因片段重组或交换造成巨大变化）。病毒在某种程度上改变了抗原的性质，以使免疫系统再也不能识别他们，这就是抗原变异和抗原漂移的结果。

当前流感病毒的挑战

北美猪群流感分离株基因突变速度加快导致疾病的爆发，甚至发生在那些已经进行常规免疫的猪群中。猪流感病毒的基因和抗原的变化使现有的诊断、控制和预防措施更为复杂。人们需要不断地研究新的方法，或对原有的方法加以改进，以便更准确地检测哪些猪感染，更全面、充分的理解所感染病毒的生物学特征，确定为什么猪的抗体无法抵御野毒的感染，并揭示猪流感病毒的变异可能对猪的健康、公共卫生和流感的种间传播的机制。

研究目的

为了评估猪流感病毒生态学的不断变化，几个研究课题组已完成的研究目的是：1) 建立并验证快速逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测方法，以检测所有 A 型流感病毒；2) 评估该检测方法对不同类型拭子的检测敏感性；3) 了解北美发现的 H1 和 H3 亚型的猪流感病毒基因和抗原的特征；4) 鉴定在美国新发现的人/猪重组 H1N2 亚型的流感病毒、研究其生物学特性和流行病学特点；5) 评价商品疫苗和实验性中试疫苗对变异猪流感病毒的免疫保护力。

快速准确的猪流感病毒检测方法的开发与评估

应用 RT-PCRs 技术，以核蛋白 (NP) 基因为模板进行检测，该方法对 A 型流感病毒是特异的。此方法由美国明尼苏达大学建立，具有较好的敏感性和特异性，与病毒分离、免疫学、免疫组化等方法进行符合性试验，对肺组织的检测的敏感性和特异性分别为 97% 和 98%。通过病理组织学变化、临床症状也证实了该方法的有效性。但使用尼龙或人造纤维制成的鼻拭子时，用此方法检测的敏感性和特异性略差。

基于 M (基质) 基因建立的实时 RT-PCR 技术也被用来对猪的组织样品进行检测，这种技术可准确进行活体诊断和尸体诊断，该检测方法具有巨大的应用潜力。M 基因 RRT-PCR 技术最初是由斯帕克曼等建立，以用来检测禽流感病毒。由于 M 基因在所有 A 型流感病毒中都是保守的，所以它也能够用来检测猪流感病毒。对于 M 基因 RRT-PCR 检测方法，明尼苏达大学进行了评估实验，检测了在实地收集的 88 份鼻拭子和 222 份肺组织样本，结果检出的阳性样本数量要比 NP-PCR 检出的多很多。另外，M 基因 RRT-PCR 检测的敏感性也更好，比起 NP-PCR 他能检测到小于 2 log 的病毒。通过对采集的鼻拭子进行这种准确、快速流感病毒检测，对控制猪场中的流感十分有帮助。

确定和了解北美猪中存在的许多猪流感病毒变异株

抗原变异和漂移导致一些 H1N1 和 H1N2 亚型的猪流感病毒的变异株的出现。在北美的猪群中流行着古典的 H1N1, A/Swine/Indiana/2000 H1N2, H1N1 重配株，以及与人流感血凝素基因型相似的流感病毒，H1 亚型在北美猪群中为优势的基因型。抗原漂移导致了 H3N2 亚型病毒的出现，这种亚型的病毒与遗传发育树分支 III 的变异株有相似 HA 基因。但是，HA 基因与遗传发育树分支 III 中参考毒株 A/Swine/Illinois/1999 的核酸相似性却小于 90%。另外，遗传发育树分支 III 中的 H3N2 亚型的毒株与遗传发育树分支 III 参考毒株的血清学交叉反应比与 A/Swine/Texas/1998 H3N2 毒株的交叉反应明显。

类人流感的猪流感病毒的出现

类人流感病毒的 H1 亚型猪流感病毒首先于 2003 年被分离，它的 HA 基因与 2002/2003 年世界范围内流行的 H1 亚型人流感病毒相似。神经氨酸 (NA) 基因

与猪的相似，表明这是一株人与猪基因重组的H1N2亚型病毒。这个毒株（A/Sw/Colorado/597/2003）最初经过NP RT-PCR 鉴定，随后又进行了病毒的分离，基因组测序及抗原的生物学特性研究。血清学监测结果证实了被A/Sw/CO/597/03病毒感染的猪传入到科罗拉多猪群中。通过对自2003年以来在猪群中流行的与人H1亚型相似的流感病毒的大范围监测，从11个地区的猪中分离到150株这样的流感病毒，这表明这种与人流感病毒相似的病毒能够适应宿主猪，而且容易传播到其它地区的猪群，并能够导致猪的呼吸系统疾病。在美国猪群中存在猪流感病毒许多的变异株，这众多的变异株使得灭活的二价H3N2和H1N1疫苗在实验条件下对于感染重组H1N1亚型病毒或H3N2亚型病毒变种体的猪的免疫保护力下降。H3N2病毒变异株导致疫苗的免疫保护力差。但通过同源免疫接种有所改善，换句话说，即免疫接种含有与感染毒株100%相似的自家病毒株。

新疫苗技术以提高免疫保护力

SIV疫苗能够诱导不同亚型毒株之间产生交叉免疫保护作用，这一点是非常重要的。所以，美国农业部-农业研究服务-国家动物疾病中心已经将这一致弱（NS1蛋白缺失）的H3N2亚型流感病毒作为可能的、改良的活病毒疫苗株（MLV），该毒株MLV没有致病性，并且可以对同源病毒的攻击产生较好的保护作用。用H1N1 SIV对免疫猪攻毒，与没有免疫直接攻毒的猪相比，产生了较轻的肺组织病理变化，且大大降低了呼吸道排出病毒的量。另外，所有免疫接种猪有明显的HI血清抗体反应，并且在肺灌洗液中检出流感特异性的粘膜免疫球蛋白。

猪流感重组病毒的出现—有趣的流感病毒动态学研究

重组株的出现可能是由于人流感病毒和猪流感病毒同时感染猪（或禽流感病毒和猪流感病毒），两种病毒同时在宿主细胞内进行病毒增值、重组时发生基因片段的错配。猪气管上皮细胞内的受体可以被上述两种病毒同时感染，因为猪气管上皮细胞内的受体具有偏嗜人和禽流感病毒的结合受体。人/猪型H1N1和H1N2病毒更证明流感病毒能够在动物与人之间进行种间传播。除了发现人/猪型H1N1和H1N2亚型病毒，人/猪型H3N1和H2N3亚型也已被发现。来自美国各地的科学家与明尼苏达大学合作发现了新的H2N3亚型猪流感病毒株。H2亚型的流感病毒是猪所特有的，这种新的流感毒株的核酸发生了变异，是由禽流感病毒和猪流感病毒的基因共同组成的。分子研究表明，H2N3亚型流感病毒与绿头鸭中发现的H2N3亚型毒株密切相关。但是，这还是第一次从猪体内检测出这种亚型的病毒。自从1968年以来，H2亚型的流感病毒已经不再在人类中流行，因此这种病毒构成了在人类中大流行的风险。动物实验证实，该H2N3亚型病毒分离株在实验条件下，无需适应即可感染猪和小鼠使之发病。此外，该H2N3亚型的猪流感病毒还可在猪和雪貂中传播。综上所述，这些调查结果显示，H2N3亚型猪流感病毒已经适应了一些哺乳动物宿主，其传播机理应该受到人们的密切关

注。

病毒的疫苗免疫逃逸，禽流感的基因重要性

通过养猪生产者、专业医生、诊断专家以及研究人员一起努力来协作阐明感染美国猪群的H1N1, H1N2, H3N2以及变异的H1N1亚型病毒是非常有意义的。我们知道，如果感染毒株的HA与疫苗株相比发生抗原性和基因的改变，疫苗免疫失败就会发生。但是，我们并不知道到底是怎样确切的数量、怎样的基因亚型变化能够引起病毒免疫逃逸，导致疫苗免疫失败。我们认为详细分析HA基因序列和抗原特性是必要的，以确定哪些是“重大”的变异，哪些是漂移。更重要的是，在猪群中占优势地位的流感病毒，是否已经获得了禽流感病毒的基因，尤其是那些负责病毒复制的禽流感聚合酶（内部）基因的病毒。这已被英国，欧盟证实，现在又被美国证实，在出现三重重组H3N2亚型猪流感病毒（含有禽类、人类和猪的流感病毒的基因片段）已经代替二重重组的猪流感病毒（仅含有猪和人类流感病毒的基因片段）。另外，在美国，含有禽类内部基因的H1N1亚型流感病毒的变异株已经取代了传统的猪流感病毒，目前在中西部地区和东南部地区占主导地位。因此，含有禽的内部基因的流感病毒看起来似乎比其它病毒更有优势。病毒基因与禽源内部基因匹配的机制还需要进一步的研究。但人们可以推测，他们缺乏遗传校对的能力会产生更多的基因突变，从而更多的变异株可以逃脱免疫。

这些三重重组的H3N2亚型的病毒和变异的H1N1亚型病毒不仅在美国的猪中占有优势，通过基因不断突变的积累，使病毒的抗原漂移几率更大，导致HA的改变。变化的HA已经不能被免疫系统完全的识别，猪流感的暴发可能发生在以前得过猪流感的（自然或疫苗接种）牲畜身上。病毒的不稳定性使其成为一个移动的目标，需要诊断实验室不断更新他们的血清学检测抗原，以更贴近当前流行的毒株或者在血清学检测中用当前实际感染的毒株来衡量同源病毒的免疫。通过分子的方法来检测病毒是具有挑战性的，因为如果使用引物扩增流感基因的特定片段，此片段以前被视为保守的，但现在发生了变异，势必会影响检测结果。

病毒的进化和保护动物种群

推测病毒变化的过程是十分复杂的。利用人的流感病毒进行的实验表明：疫苗的压力和产生的免疫力可能促使抗原的变异。病毒的流行爆发是病毒进化的结果。病毒变异的出现可能不完全是由于病毒变异和漂移，更可能是由于病毒突变和种群免疫的多种变化引起。当抗原变异数出现时，问题是如何控制它们的突变体，是否应选择变异株作为今后的疫苗株。我们的研究表明，在实验室条件下，疫苗的免疫情况可能仅影响个别动物。而在临床实地情况下，种群免疫必须要被考虑。虽然难以直接研究种群的免疫，但是数学模型可以提供间接地免疫结果，预测可能影响疫苗株选择的流感病毒的抗原进化。研究中使用人类流感病毒和交叉HI试验，假设病毒的“爆发”可能是由这样的免疫动态变化的结果，如1) 以

往接触病毒时获得的不完整的免疫交叉保护；2) 免疫反应用只针对以往的接触过的毒株，而不是目前的疫苗株（所谓的“原始抗原过失”）。因此，动物种群免疫状态的不断变化和病毒的变异使流感的控制变得相当复杂。

虽然人们已采取每年更新流感疫苗株的做法，试图尽量减少流感的发病率和死亡率，但控制猪群中的流感的工作一直不太顺利，因为更新流感病毒毒株的工作需要通过漫长的多年监测，且更新流感病毒毒株需要监管机构审查其安全性和有效性，该工作漫长且昂贵。下列几种策略可用于猪流感病毒在畜群中的控制或者感染一个以上亚型的地区的控制。自从90年代中期以来，接种灭活疫苗已经取得了多方面的成功。随着越来越多猪流感病毒株的出现，制药公司已经在其现有的商业化疫苗中加入现在流行的毒株，平衡疫苗中各亚型猪流感病毒的比例，制备二价和三价疫苗来诱导免疫。另外，当猪流感病毒流行株与商业疫苗病毒株相比出现抗原特性与基因的差异时，自身组织灭活疫苗越来越受到青睐。一般地，改变疫苗株要在一些问题被妥善处理后才建议进行，如抗原剂量、时间、佐剂和共同感染等问题。更多情况下，使用有针对性的、快速、廉价的自家灭活疫苗是更快速控制猪流感的最佳方法，用以解决仅仅靠使用商业疫苗不能解决的实际问题。

结论

人们对周围环境流感病毒的关注将会继续。正如我们研究这些病毒亚型的生物学特性，并进一步追溯这些病毒基因的起源一样，我们已经在猪中发现与人的相似的H1N2亚型病毒。这些新发现的重组病毒的意义还不十分清楚；但是，它们已经较好地适应了猪的呼吸道，正在导致重大的疾病，并且蔓延到其它的畜群（并可能威胁人类）。临床的部分经验和实验研究表明，必须准确、快速地诊断猪流感病毒感染，了解这些病毒的生物学特征，阐明为什么疾病会发生，为什么疫苗会免疫失败，揭示病毒重组后的新型病毒影响动物和人类健康的机理。我们应该继续检测畜群中新出现的病毒株，来预测新出现的毒株能够蔓延多远，是否能够在畜群中引起大流行。我们能够通过检测，了解流感病毒对于猪健康的影响，并警惕流感病毒株可能对人类健康造成威胁。