

河南省动物狂犬病的诊断与防制研究

夏平安, 崔保安, 张红英, 魏战勇, 王新卫, 陈红英

(河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州, 450002)

摘要: 从河南病牛脑组织中分离到 5 株牛狂犬病病毒, 用电镜、间接免疫荧光试验等方法鉴定分离病毒的生物学特性。通过微量免疫酶试验, 对疫区牛、马、猪、羊、犬、猫、鸡、鼠和蝙蝠 9 种动物的 1 138 份血清标本进行检测, 阳性率 12.65%; 其中, 疫点内牛、猪、犬、猫和鼠的血清阳性率更高, 为 20% 左右。

关键词: 动物狂犬病; 防制; 诊断; 流行病学

中图分类号: S858.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)01-0100-04

Diagnosis and Control of Animal Rabies in Henan Province

XIA Ping-an, CUI Bao-an, ZHANG Hong-ying, WEI Zhan-yong, WANG Xin-wei, CHEN Hong-ying

(College of Animal Science and Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Five strains of rabies virus were isolated by mouse brain from the brains of cattle affected with the so-called "Guai Jiao Bing" ("unusual hoarse bellow disease") in Nanyang region of Henan province. Electron microscope, a rapid fluorescent antigen test (RFAT) and mouse neutralization test (MNT) were used to identify characterisation of rabies virus isolated strains. Meanwhile micro-immuno-enzymatic assay was established for detecting neutralization antibodies of 1138 serum samples from 9 kinds of animals, including cattle, horse, swine, sheep, dog, cat, chicken, house rat and bat in the epidemic district. The results revealed that total antibody positive rate reached 12.65% the rates in cattle, swine, dog, cat and rat were about 20%. Practising a comprehensive measure consisting of strict management, mandatory vaccination and exterminating diseased animals by the local government in the last five years has resulted in marked effects on preventing rabies infection. The animal rabies has not happen in that area since 1992.

Key words: Animal rabies; Control; Diagnosis; Epidemiology

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人兽共患传染病, 也是迄今为止人类病死率最高的急性传染病之一。狂犬病在我国曾一度得到有效控制, 但近年来其疫情又快速回升^[1-3]。例如, 河南省某些地区黄牛和奶牛发生一种以流涎、异嗜和异常鸣叫等症狀为主的严重传染病, 仅南阳、周口和商丘等地区发病牛 10 913 头, 几乎 100% 死亡。同期, 人与犬的狂犬病发病率也明显增加, 不仅经济损失巨大, 而且

也严重威胁人畜安全和社会安定。为进一步做好狂犬病的防制工作, 我们从病原分离、病原生物学特性、流行病学和免疫预防等方面进行了全面系统的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒株 BHK-21 细胞株, 狂犬病

收稿日期: 2005-09-21

作者简介: 夏平安(1964-), 男, 湖北鄂州人, 副教授, 博士, 主要从事动物病原与分子免疫学研究。

病毒 Flury—LEP、CVS—11 和 D8202 株由河南农业大学牧医工程学院兽医微生物实验室保存。

1.1.2 血清 阳性血清购自武汉生物制品研究所。

1.1.3 试验动物 小白鼠、仓鼠和兔等,均系狂犬病抗体阴性健康动物。

1.1.4 主要试剂 DMEM 培养基购自 GBICO 公司;3,3',5,5'—四甲基联苯胺(TMB)、过氧化氢尿素和异硫氰酸盐荧光素(FITC)购自 Sigma 公司,驴抗兔酶标记抗体等购自军事预防医学科学院。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 从疫点无菌取病牛脑组织,脑内接种小白鼠分离病毒。

1.2.2 病毒特性鉴定 电子显微镜观察病毒形态,小白鼠中和试验鉴定分离病毒,单克隆抗体 ELISA (McAb—ELISA)方法检测病毒株的抗原差异,间接免疫荧光试验(RFAT)^[4]和小鼠脑内接种试验,分别测定病毒株的 TCID₅₀ 和 MLD₅₀。

1.2.3 流行病学调查

1.2.3.1 实地调查 建立狂犬病疫情监测系统,采用统一调查提纲和表格,调查疫情的发生和流行情况。

1.2.3.2 血清抗体检测 对发生过狂犬病(以牛为主)自然村的各种动物,采集血样,分离血清;用微量免疫酶试验(MIET)^[5]检测保护性中和抗体。

1.2.4 综合防制 制定综合防制措施,用兽用狂犬

病冻干苗免疫接种家犬、猪、牛和羊。犬 1.0 ml/只,颈部或股内侧皮下注射;牛 5 ml/头,肌注;猪和羊 2 ml/头,肌注。

2 结果

2.1 病毒分离

经小白鼠脑内盲传 3~5 代,先后从 5 份病料中分离到 5 株病毒,命名为 8801, 8802, 9001, 9002, 9003。

2.2 病毒特性鉴定

2.2.1 电镜观察 取感染鼠脑,制作超薄切片,电镜下见有子弹样病毒粒子。病毒粒子呈一端平、另一端钝圆。横断面为圆形,直径 90 nm;纵切面长约 180 nm,最外层为电子密度高的衣壳,其中心为等电子密度的核心,两者之间有一层电子透明区,病毒衣壳表面可见有微细突起,5 株病毒形态一致。

2.2.2 小鼠中和试验 分离病毒与 CVS 阳性血清作中和试验,中和指数在 63.1~199.5 之间;分离病毒与狂犬病相关病毒 Logos bat、Mokolat 和 Duvenhage 的免疫血清作中和试验,结果只有 Duvenhage 免疫血清对分离株病毒有 4/5 保护,其他均不保护。

2.2.3 单克隆抗体鉴定 用抗狂犬病病毒单克隆抗体(McAb)建立的夹心间接 ELISA,分别对分离病毒株和 CVS 标准株进行检测,结果 5 株病毒呈阳性,且与 CVS 没有明显差异(表 1)。

表 1 McAb—ELISA 检测结果(OD 值)

M cAb	病毒株						健康对照
	8801	8802	9001	9002	9003	CVS	
2	0.49	0.50	0.68	0.57	0.55	0.56	0.02
7	0.49	0.70	1.10	0.90	0.72	0.62	0.03
10	0.43	0.52	0.84	0.72	0.64	0.68	0.04
11	0.32	0.38	0.71	0.50	0.46	0.51	0.01

2.2.4 分离病毒株的 TCID₅₀ 测定 RFAT 测定 5 株病毒的 TCID₅₀,小鼠脑内接种法测定 5 株病毒的 MLD₅₀,结果见表 2。

表 2 分离病毒株的毒力测定(Log 10)

病毒株	TCID ₅₀	MLD ₅₀
8801	6.25	5.4
8802	6.0	5.6
9001	5.8	5.7
9002	6.0	5.5
9003	6.2	6.0

2.3 流行病学调查

2.3.1 动物狂犬病流行情况 南阳地区感染狂犬病的动物有黄牛、奶牛、犬、猫、猪、羊和马等,以黄牛多发。据 1980~1989 年统计,10 年共发生动物狂犬病 2 976 例,其中,黄牛 2 256 例,占 75.81%。1987 年为发病高峰年,共发生动物狂犬病 616 例,其中,黄牛占当年动物狂犬病总数的 20.7%。

黄牛狂犬病的发病年龄、季节、临床症状和感染途径:根据对 14 个乡(镇)1987 年发生的 132 例黄牛狂犬病调查,该病主要发生在 1 岁以下的犊牛,占发病总数的 74.24%,成年牛极少发病。发病季节性明显,以秋季偏高,占 28.03%。症状以兴奋型为

主,呈异常鸣叫者占 81.1%。病牛性别差异不明显,公、母牛比例分别为 50.8%和 49.2%。在 132 例中,畜主反映有明显咬伤史者 48 例,占 36.36%;其中 30 例(占 22.73%)为狂犬咬伤,另 18 例(占 13.64%)为外观正常犬咬伤,其余 84 例(占 63.64%)均无明显咬伤史。

2.3.2 血清抗体调查 MIET 测定了仓鼠、豚鼠、马、牛、羊、鹿 6 种动物和人的 34 份狂犬病免疫血清及相应的 6 种健康动物和健康人血清 7 份,并与小鼠中和试验进行了统计学比较。34 份免疫血清 MIET 中和效价均数为 1:474.22,小鼠中和试验中和效价均数为 1:382.92,变异系数分别为 4.09%和

3.58%,相关系数分别为 0.996,呈直线正相关。

应用该法对采集疫区和新发病疫点内的未免疫 9 种动物 1 138 份血清进行检测,检出阳性 144 份,阳性率 12.65%。其中,由 15 个疫区乡非发病点采集 5 种动物 450 份血清,检出阳性 13 份,阳性率 2.89%。而从近 3 年内曾发生动物狂犬病的 12 个疫点内 9 种动物 688 份血清中,检出阳性 131 份,阳性率达 19.04%,其中以猪、牛、猫、鼠和犬的抗体阳性率为高,均接近或超过 20%(表 3)。

2.4 综合防制

采取以管(制)、免(疫)、灭(扑杀)为中心的综合防制对策,通过 1988~1989 年高密度防疫,犬的发

表 3 血清抗体检测结果

组别	项目	牛	猪	犬	猫	马	羊	鸡	鼠	蝙蝠	合计
疫点	血清数(份)	240	106	26	12	30	101	27	97	49	688
	阳性数(份)	57	45	5	3	0	1	0	20	0	131
	阳性率(%)	23.75	42.45	19.23	25.0	0	0.98	0	20.6	0	19.04
疫区	血清数(份)	183	52			40	135	40			450
	阳性数(份)	8	3			0	2	0			13
	阳性率(%)	4.37	5.77			0	1.48	0			2.89

病率 1989 年较 1987 年下降了 90.19%,牛的发病率下降了 94.16%,效果十分显著。免疫犬注射覆盖面在 80%以上时,对预防狂犬病有明显效果,低于 50%对控制该病效果不明显。自 1988 年开始采取综合防制措施后,该地区狂犬病逐年下降,1992 年至今未再发生。

3 讨论

从病牛脑组织中分离获得 5 株病毒,经小鼠脑内增殖传代,可在 8~10 d 内致死小鼠;电子显微镜检查,呈典型弹状病毒样粒子;用狂犬病病毒 1 型代表株 CVS 免疫血清对分离病毒作小鼠中和试验,中和指数在 50 以上,证明新分离 5 株病毒均为狂犬病病毒。用狂犬病相关病毒 Lagos bat、Mokola 和 Duvenhage(即狂犬病病毒 2、3 和 4 型)的免疫血清或免疫腹水与新分离病毒作交叉中和试验,结果除 Duvenhage 免疫血清能保护 4/5 小鼠免于死亡外,其余 2 型和 3 型血清均无保护作用,证明新分离病毒与 Lagosbat 和 Mokola 没有抗原联系。应用抗狂

犬病病毒核蛋白的单克隆抗体(McAb)检测 5 株病毒均呈阳性反应,且与 CVS 及其相互之间没有明显差异。由此认为,由河南省南阳地区病牛脑内分离的病毒属于狂犬病病毒,所谓牛“怪叫病”实际上就是牛狂犬病。至于病毒是 1 型还是 4 型有待进一步研究。

该研究检测了疫区内 9 种动物 1 138 份血清。抗体阳性率高达 12.65%,疫点内抗体阳性率更高,为 20%左右,说明南阳地区有大量隐性或潜伏性狂犬病感染存在。这些非致死性感染的狂犬病动物在该病流行中起什么作用,由于条件所限,未能进行专门和系统研究。但值得注意的是家鼠等啮齿动物,其血清抗体阳性率达 20.8%,这些小型啮齿动物出没于厩舍、料房和饲槽,很可能成为该病特别是黄牛狂犬病的重要传播媒介。有资料已证明经消化道或呼吸道等非咬伤途径可传播狂犬病,另外,美洲大陆一些吸血和食虫蝙蝠是动物狂犬病的主要传染源^[6,7],但我们曾采集 49 份蝙蝠血清,没有检出抗体,南阳地区黄牛狂犬病与蝙蝠的关系还有待进一

步证实。

调查研究了 132 例黄牛狂犬病, 有明显咬伤史者 48 例, 其中 30 例为狂犬咬伤, 另 18 例为外观正常犬咬伤, 其余 84 例(占 63. 64%)均无明显咬伤史。由此可以得出 4 点结论: 一是黄牛狂犬病与犬的狂犬病有密切关系, 狂犬病是黄牛狂犬病的主要传染源之一; 二是外观正常的犬也是非常危险的传染源; 三是无明显咬伤史的病例中很可能是咬伤轻微或其他原因畜主没有发现; 四是存在除犬和犬咬伤之外的其他传染源和传播途径。

该研究用于狂犬病诊断的免疫学方法, 具有快捷、敏感和高度特异等优点。其中, MIET 能测出与保护性有关的中和抗体, 用于狂犬病病毒的分离鉴定和具有中和活性的 McAb 的检测, 可替代经典的小鼠中和试验, 应用前景较好。在流行病学调查时, 用微量免疫酶试验测定中和抗体, 既可以说明该病流行情况, 又能评估动物免疫后机体的保护能力。

参考文献:

[1] Coleman P G, FERE E M, Cleaveland S. Estimating the

public health impact of rabies[J] . Emerg Infect Dis 2004, 1: 140—142.

[2] Hendekli C M. Current therapies in rabies[J] . Arch Virol, 2005, 150(6): 1047—1057.

[3] 张永振. 中国狂犬病流行病学[J] . 中国计划免疫, 2005 (2): 140—143.

[4] 夏平安. 应用间接免疫荧光法检测狂犬病病毒[J] . 中国畜禽传染病, 1997(3): 33—35.

[5] 夏平安, 侯世宽, 杨盛华, 等. 测定狂犬病病毒中和抗体的微量免疫酶试验[J] . 兽医大学学报, 1991(4): 318—323.

[6] Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, *et al.* Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil[J] . J Vet Med Sci, 2005, 67(7): 647—652.

[7] Cunha E M, Lara Mdo C, Nassar A F, *et al.* Isolation of rabies virus in Artibeus fimbriatus bat in the State of Sao Paulo, Brazil[J] . Rev Saude Publica 2005, 39(4): 683—684.

(上接第 99 页)

性胸膜肺炎放线杆菌则有着较高的敏感性, 其中, 环丙沙星对 6 株中的 5 株所产生的抑菌环多在 3 cm 左右; 诺氟沙星对其中的 4 株菌株高度敏感, 抑菌环均在 2. 5 cm 以上, 其中 1 株菌株抑菌环达到 3. 7 cm, 说明环丙沙星和诺氟沙星的临床疗效确实。而其他药物则敏感性较低, 尤其是庆大霉素对各菌株均不敏感, 抑菌环为 0。

从链球菌耐药性检测结果可以发现, 来源于不同动物的 3 株链球菌均对氟乐美、庆大霉素、卡那霉素高度敏感, 抑菌环直径在 2. 0 cm 以上; 而对本应极为敏感的青霉素、红霉素则产生了极强的耐药性。但在葡萄球菌菌株中, 青霉素和红霉素对 2 株葡萄球菌均高度敏感, 抑菌环直径均在 2. 5 cm 以上。卡那霉素对链球菌作用较好, 但葡萄球菌对其则产生

了较强的耐药性, 2 株葡萄球菌对庆大霉素、卡那霉素、混感 I 号均不敏感; 诺氟沙星对大肠杆菌各菌株均不敏感, 而对葡萄球菌则作用较好, 抑菌环直径在 2 cm 以上。

参考文献:

[1] 邓舜洲, 张贻传, 全木华, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定[J] . 江西农业大学学报, 2003, 18(12): 913—914.

[2] 韩文瑜, 何昭阳. 病原细菌检验技术[M] . 长春: 吉林科学技术出版社. 2000. 321—325.

[3] 罗杰松, 简喻平, 邓舜洲, 等. 猪传染性胸膜肺炎的病原分离与鉴定[J] . 江西畜牧兽医杂志, 2003(6): 10.

[4] 曾元根. 猪传染性胸膜肺炎的诊断和治疗[J] . 动物医学进展, 2003(6): 82—83.