

浙江省丽水山区 134 份犬脑组织 狂犬病病毒抗原检测

雷永良¹, 陈秀英¹, 王晓光¹, 叶碧峰¹, 柳付明¹, 叶夏良², 兰进权¹, 林仁卫³, 梅盛华⁴, 梅建华¹

摘要: 目的 对浙江省丽水市山区犬脑组织标本进行狂犬病病毒抗原检测, 了解犬狂犬病毒感染状况。方法 收集丽水市山区狂犬病和疑似狂犬病犬以及外观健康犬脑组织标本 134 份, 用直接免疫荧光试验(DFA)检测狂犬病病毒抗原, 确定阳性标本。结果 134 份犬脑组织标本印片 DFA 检测 9 份为阳性, 占所检标本的 6.72% (9/134), 其中外观异常并攻击人/犬导致人或犬间疫情的犬脑组织标本 8 份, 均阳性; 外观正常犬脑组织标本共 126 份, 1 份阳性, 阳性率 0.79% (1/126)。结论 在丽水市首次用免疫学方法进行狂犬病病毒的实验室检测, 狂犬病病毒在丽水山区狂犬病疫区的犬间相互传播, 犬狂犬病疫情存在扩散的现象。

关键词: 狂犬病病毒; 直接免疫荧光; 检测; 感染率

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)06-0407-02

Detection of rabies virus antigen in 134 dog brain samples in Lishui LEI Yong-liang*, CHEN Xiu-ying, WANG Xiao-guang, YE Bi-feng, LIU Fu-ming, YE Xia-liang, LAN Jin-quan, LIN Ren-wei, MEI Sheng-hua, MEI Jian-hua.

* Lishui Municipal Center for Disease Control and Prevention, Lishui 323000, China

Corresponding author: CHEN Xiu-ying, Email: LS2123365@tom.com

Abstract: **Objective** To investigate the infection status of rabies virus in dogs by detecting the virus antigen in dog brain samples in the mountain area in Lishui, Zhejiang province. **Methods** A total of 134 brain samples from the sick dogs, the suspected sick dogs and the dogs looking health were taken, and the virus antigen was detected by using direct fluorescent antibody method (DFA). **Results** Nine samples were positive, accounting for 6.72% (9/134), and eight were from the dogs which looked abnormal and bit people or other dogs causing human or dog rabies. Among 126 brain samples of the dogs looking health, one was positive with the positive rate of 0.79% (1/126). **Conclusion** It was the first time to use DFA to detect rabies virus in Lishui, which indicated that rabies virus transmitted in dogs in the endemic area and the dog rabies epidemic was in expansion.

Key words: rabies virus; direct fluorescent antibody method; detection; infection rate

狂犬病是由狂犬病病毒侵入人及所有温血动物中枢神经系统而引起的急性人兽共患传染病, 通常由病兽以咬伤方式传播到人, 是目前人类病死率最高的急性传染病, 一旦发病, 病死率几乎为 100%。浙江省丽水市自 1986 年 1 月至 2006 年 11 月一直未见人狂犬病病例, 但 2006 年 11 月至 2008 年 3 月间相继于松阳县、遂昌县、青田县、龙泉市出现了新发人狂犬病病例 6 例, 为了解狂犬病病毒在犬间的感染状况, 丽水市疾病预防控制中心检验科收集疫区犬脑组织标本用直接免疫荧光试验

(DFA)对狂犬病病毒特异性抗原进行了检测。

1 材料与方法

1.1 犬脑标本的收集 2008 年 3 月至 2008 年 5 月间在丽水市出现人狂犬病病例或者出现疑似狂犬病犬伤人的山区村落收集村民处死的犬头颅标本 134 份(其中莲都区 7 份、松阳县 38 份、遂昌县 5 份、龙泉市 84 份), 134 只犬均为放养的未免疫犬, 其中具有攻击人/犬史或者被犬攻击史的疑似狂犬病犬 8 只, 外观正常犬 126 只, 在负压生物安全二级实验室内通过枕骨大孔快速采样法采集脑组织标本, 即时检测或 -70℃ 保存。

1.2 试剂与仪器 狂犬病病毒荧光抗体 (Rabies DFA Reagent, Chemicon 公司)、磷酸缓冲液粉剂 (PBS, Solarbio 公司)、牛血清白蛋白 (BSA V, Sigma 公司)、丙酮 (Acetone, 上海溶剂厂)、甘油 (Glycerin, 上海试剂总厂)、荧光倒置显微镜 (leica 公司)。所

作者单位: 1. 浙江省丽水市疾病预防控制中心, 浙江 丽水 323000;

2. 松阳县疾病预防控制中心; 3. 遂昌县疾病预防控制中心; 4. 龙泉市疾病预防控制中心

作者简介: 雷永良, 男, 畲族, 浙江省丽水市人, 主要从事微生物检验检测工作

通信作者: 陈秀英, Tel: 0578-2211507, Email: LS2123365@tom.com

收稿日期: 2008-06-20

有实验试剂均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供。

1.3 直接免疫荧光试验(DFA)检测狂犬病病毒抗原 取不同部位脑组织(大脑、中脑、小脑和海马回)剖面均匀涂印在载玻片(提前浸泡于纯酒精中30 min)上,晾干印片,用4℃预冷的丙酮室温固定10 min,滴加1:50稀释的狂犬病病毒荧光抗体(60~80 μl)于制备好的抗原片上,37℃湿盒孵育30 min;取出抗原片缓流冲洗3~5 s, PBS振洗2次,蒸馏水振洗1次,每次2 min,吹干;用90%甘油封片,荧光显微镜观察结果。

2 结果

2.1 DFA法检测犬脑组织狂犬病病毒特异性抗原 犬脑组织印片经丙酮固定,抗狂犬病病毒荧光标记的单克隆抗体染色,在荧光显微镜下观察到点状或针尖状、呈现不同形状和大小的苹果绿色荧光者为初检阳性,共计9份。

2.2 犬感染情况 134份犬脑组织标本印片 DFA检测结果经病毒培养复核,9份为阳性,占所检标本的6.72%(9/134),其中外观异常并攻击人/犬导致人或犬间疫情的犬脑组织标本8份,均阳性;外观正常犬脑组织标本共126份,1份阳性,阳性率0.79%(1/126)。134份标本中松阳县有38份,6份阳性;遂昌县5份,2份阳性;龙泉市84份,1份阳性;莲都区7份,均为阴性。

3 讨论

狂犬病病毒是有包膜的单链(负链)RNA病毒,具有较强的神经组织嗜性,是致死性传染病——狂犬病的病原体,广泛存在于犬、猫、狐狸、狼和蝙蝠等多种动物体内,并在它们之间传播。各种动物对狂犬病病毒的敏感性不同,其中家犬属于中度敏感宿主,人体被宿主动物(犬、猫等)咬伤后,病毒通过伤口进入体内,在局部神经节进行繁殖,并进一步侵犯中枢神经系统,最终扩散至周围神经和唾液腺等组织。狂犬病的潜伏期一般为2~3周,个别病例

可长达数年,目前对狂犬病尚无有效治疗药物^[1]。狂犬病病原学检测目前大多采用免疫荧光法检测脑组织样品中的狂犬病病毒抗原^[2],欧美等国家对动物狂犬病的确诊除了通过症状判定外,必须有实验室诊断依据,中国对狂犬病的诊断多是通过患者/犬的临床症状来判断,一般没有经过实验室诊断,缺乏充分的科学依据。本研究通过直接免疫荧光方法,对所收集的犬脑组织标本进行了RV抗原的检测,且将DFA阳性标本委托武汉病毒所进行病毒分离培养,结果共检获9份DFA阳性标本,且均成功从对应犬脑组织中获得狂犬病病毒。阳性标本有6份在松阳县检出,其中4只犬存在流行病学联系:A咬伤B,B发病后撕咬C和D,表明狂犬病病毒在犬间通过相互撕咬传播;此外,在8份外观异常并具有攻击人/犬史或者被犬攻击史的疑似狂犬病犬脑中均检出狂犬病病毒,阳性率100%,占阳性标本的88.79%(8/9),检出率远远高于外观正常犬,故今后在疫区中,对于临床表现异常(流涎、攻击他人/犬)或者疑似狂犬病的犬要密切关注,同时在外观正常犬中检测到狂犬病病毒,说明在丽水地区存在狂犬病传染源,除了犬之外,由于动物的生活圈和流动性大,不同种动物之间还存在交叉传染的可能性,故在疫区中也可能存在除犬以外狂犬病病毒的其他动物宿主^[3],本中心在今后将继续加强对犬类及其他温血动物的监控,对狂犬病宿主带病毒率的监测将是下一步工作的重点。

(对中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、松阳县疾病预防控制中心、龙泉市疾病预防控制中心、遂昌县疾病预防控制中心在实验技术和标本的收集方面的大力支持表示感谢!)

参考文献

- [1] Jin Q. Medical. Molecular virology [M]. Beijing: Science Press, 2001:614. (in Chinese)
金奇,主编. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社, 2001:614.
- [2] Trimarchi CV, Smith JS. Diagnostic evaluation. In: Jacson AC, Wunner WH, eds. Rabies [M]. Academic Press, 2002:307-349.
- [3] Carnieli PJ, Fahl W, Castilho JG. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil [J]. Virus Res, 2008, 131(1): 33-46.