

猪感染流行性出血热病毒的流行病学 与 实 验 研 究

杨占清¹ 刘运喜¹ 彭佐林¹ 于晓敏¹ 乔正福¹ 吴钦永¹ 张 云² 陶开华² 郭进清³

摘要 为了解猪在流行性出血热(EHF)疫区的流行病学意义,探讨猪的感染与人群发病的关系,采用病原学、血清学和 PCR 技术对猪感染 EHF 病毒(EHFV)进行流行病学调查与实验研究。结果:猪不仅存在自然感染,而对 EHFV 敏感,随血液行播及多种脏器组织,在体内增殖并随排泄物排出感染性病毒。作者认为猪具备作为 EHF 传染源的条件。

关键词 流行性出血热病毒 流行病学 家畜

Epidemiologic and Experimental Studies on Epidemic Haemorrhagic Fever Virus in Pigs Yang Zhanqing, Liu Yunxi, Peng Zuolin, et al. Institute of Military Medicine, Jinan Command, Jinan 250014

Abstract In order to study the roles of pigs with epidemic haemorrhagic fever virus, epidemiologic and experimental studies were carried out in pigs. Aetiological, serological and polymerase chain reaction (PCR) techniques were performed. Resultes showed that not only pigs could be infected with EHFV under natural or experimental conditions but susceptible to EHFV as well. Virus may disseminate to many organs of the animals through blood and cause transient pathologic changes. EHFV duplicates inside the animal bodies and be excreted to cause pollution of environment. It is possible that pigs serve as sources of EHF infection. Our research data also showed for the first time that EHFV were vertically transmitted through the placenta of pigs. There was no evidence showing that people raising pigs were symptomatically sick due to EHF infection.

Key words Epidemic haemorrhagic fever virus (EHFV) Epidemiology Livestock

近年研究证实 EHF 宿主动物有向经济动物扩散趋势,有关猪的调查,仅从血清查出 EHFV 抗原与抗体^[1]。鉴于猪是我国农村饲养数量最多、分布最广的家畜之一,为了解猪在 EHF 疫区的流行病学意义,探讨猪感染与人群发病的关系,1986 年以来,我们对猪感染 EHFV 进行流行病学与实验研究,现将结果报告如下。

材料与方法

一、标本来源:从山东省莒南县和济南市

场或肉联厂采集猪血清、心、肝、脾、肺、肾等组织,以及猪尿、粪、唾液和圈内污物,置液氮罐内备用。如遇孕或分娩母猪及仔猪采集血清,并收集健康人、屠宰工人及饲养员血清, -20℃ 备检。

二、猪与人 EHF 发病关系调查:调查密切接触者(均有 3~5 年以上屠宰史)和从未与猪接触者的隐性感染,以及养猪户与未养猪户 EHF 发病和养猪感染者的病因。

三、人工感染实验:

1. 实验动物:系 30 日龄内仔猪,实验前一周采血 2 次查 EHFV 抗原与抗体,均阴性者用于实验。小白鼠为昆明系乳鼠(3 日龄内)作病毒分离和制备感染材料。

1 济南军区军事医学研究所 济南 250014
2 南京军区军事医学研究所
3 解放军 54871 部队医院

2. EHFV 株和感染材料制备: R₂₂ 株由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。毒株接种乳鼠脑内, 传至第 3 代, 以鼠脑“卅~卅卅”特异荧光者 (IFA) 用于制备感染材料。具体做法: 称取感染鼠脑无菌研磨, 用细胞生长液制成 10% 悬液, 冻融 3 次后, 2 000 转/分 20 分钟, 取上清液, 调 pH7.2~7.6, -30℃ 冰箱冷冻后, 移放液氮罐内备用。并以同法制备正常鼠脑悬液作对照。

3. 动物分组与感染方式: 依动物体重从小到大编号, 采用随机数字表法分 4 组, 每组 3 只动物, 分别皮下、口腔和肺内等 3 种部位注射鼠脑悬液 (接种前先经口腔粘膜擦伤), 每只接种 1.5ml, 对照组注射等量正常鼠脑悬液, 隔离饲养, 并定期测定体温和观察动物的变化。

4. 病毒定位与排毒途径: 仔猪人工感染后, 定期采血, 收集新鲜尿、粪、唾液, 观察 EHFV 抗原与抗体消长。定期宰杀取各种组织检查病毒分布和病理变化。

四、检测方法:

1. EHFV 抗原与抗体检测: 采用 RPHA 和 RPHI 或 HRP-SPA 法, 组织 EHFV 抗原检测用 IFA 法。成套试剂和兔抗 EHFV 血清购于南京军区军事医学研究所, 抗兔 IgG

荧光抗体由浙江省玉环生物试剂厂生产。同时用 PCR 技术^[2]检测 EHFV-RNA。

2. 病毒分离: 取 PCR 检测 EHFV 抗原阳性标本制成无菌滤液, 分别接种乳鼠脑和 Vero-E₆ 细胞分离病毒和 ID₅₀ 定量测定, 其操作见文献^[3]。

3. 动物试验: 取 EHFV 抗原阳性血、尿、粪和肺组织制成无菌滤液分别接种乳鼠, 每份各 6~8 只, 每只腹腔注射 0.2ml 或脑内注射 0.02ml, 乳鼠由母鼠哺育, 二周剖取鼠脑或肺检查 EHFV 抗原。

结 果

一、猪各种标本 EHFV 抗原阳性率: 从 10 种标本中检出 EHFV 抗原, 其荧光强度均在“卅”以上, 经双盲法检测结果一致 (附表)。IFA 检出心、肺、肝、脾和肾 EHFV 抗原阳性者再用 PCR 检查均检出 EHFV-RNA, 并分离到病毒。

二、EHFV 分离和 ID₅₀ 测定: 心、肺、肝、脾、肾、血、尿、粪等各 3 份制成无菌滤液和 10⁻¹~10⁻⁵ 不同稀释度滤液分别接种乳鼠和 Vero-E₆ 细胞, 传 4 代后, 除粪标本因污染丢弃外, 其余均分离到 EHFV。定量测定结果见附表。

附表 各种标本 EHFV 抗原、抗体检测及 EHFV 分离结果

标本名称	检测份数	EHFV 抗原		EHFV 抗体		EHFV 分离		EHFV ID ₅₀ 定量测定
		阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	份数	株数	
心	120	4	-	-	-	3	1	10 ⁻²
肺	530	22	-	11	-	3	2	10 ⁻⁵
肝	120	5	-	-	-	3	1	10 ⁻³
脾	120	6	-	-	-	3	1	10 ⁻⁴
肾	120	5	-	-	-	3	2	10 ⁻⁴
血液	245	9	-	14	-	3	2	10 ⁻⁵
尿液	199	14	-	7	-	3	1	10 ⁻²
粪便	199	5	-	3	-	3	-	-
唾液	5	2	-	2	-	-	-	-
圈内污物	54	3	-	0	-	-	-	-

三、孕猪及乳猪抗原阳性率: 从一头孕猪血清及所产 7 只乳猪血清、尿、粪、唾液均检出 EHFV 抗原。乳猪上述标本抗原阳性率分别为 100%、28.57%、4.19% 和 14.29%,

并从乳猪脾、肺、肾和脑组织检出 EHFV 抗原。

四、人工感染:

1. 临床表现和病理学检查: 接种仔猪全

部感染成功。其感染后体温仅个别达 40.3℃(1~2 天)。感染第 6 天仔猪食欲减退,喜卧,活动减少。尿蛋白阴性。肺毛细血管轻度扩张淤血,间质水肿,少数肺泡内有出血;肾小球毛细血管可见淤血,内皮细胞肿胀,肾小管水肿;肝细胞呈水样变性及气球样变性,部分区域有出血;脾脏及大血管未见明显异常。对照组各种组织正常。

2. EHFV 在猪体内的分布:仔猪人工感染后 3 天肺、脾、肾、脑和淋巴结检出 EHFV 抗原,至第 10 天均阳性,第 20 天肺、脾仍检出阳性,心、肝、大肠、小肠、胃、膀胱、肌肉、血管未检出阳性。对照全部阴性。仔猪感染后第 3 天始从血、尿、粪、唾液检出 EHFV 抗原,第 10 天仍为阳性,检出阳性顺序是血→尿→粪→唾液。从第 7 天血清检出抗-EHFV 抗体。其抗体滴度逐渐上升,最高达 1:64(RPHI)。

3. 二次感染实验:取 EHFV 抗原阳性猪血、尿、粪各 4 份和人工感染仔猪肺、血、尿各 1 份,分别接种乳鼠脑,每份接种 6~8 只,感染后第 10~12 天即出现后肢瘫痪、萎缩、烦躁等症状,2 周后处死取肺或脑组织检查,前 3 种 EHFV 抗原阳性率分别为 33.33%(8/24)、25.00%(6/24)、20.80%(5/24)。人工感染仔猪标本接种乳鼠脑和肺组织均检出 EHFV 抗原。

五、猪 EHFV 感染与人群发病关系:

1. 密切接触者隐性感染:检测宰猪工人 256 人,饲养员 305 人和无接触史 285 人,抗体阳性率分别为 4.69%(12/256)、4.26%(13/305)和 1.40%(4/285)。有、无密切接触史间差异有显著性($\chi^2 = 4.24, P < 0.05$),其密切接触者隐性感染率与接触年限呈正相关。

2. 猪带毒率与人群发病关系:猪肺和血清 EHFV 抗原与抗体阳性率均为高发区>中发区>低发区,非疫区为 0,带毒率与当地人群 EHF 发病呈正相关($r = 0.89$)。1 234

户农村居民计 5 188 人近 2 年 EHF 发病 104 例,其中养猪户和未养猪户发病率分别为 2.11%(101/4 797)和 0.77%(3/391)。养猪户相对危险度为 2.7。

3. 危险因素调查:某部一名饲养员感染 EHF,经流行病学、临床和血清学确诊。病因调查结果表明从该患者所饲养的猪血清与粪污检出 EHFV 抗原,故认为本病例最可能为直接接触 EHFV 抗原阳性猪排泄物污染物经破损皮肤粘膜或吸入污染尘埃而感染发病。

讨 论

关于动物传染源的条件,本研究结果表明:①猪对 EHFV 易感;②感染后病原体能在猪体内繁殖,并能经不同途径排出体外;③排出的病原体具有感染力;④猪数量多,有一定的自然感染率,与人有较密切的关系;⑤猪感染率与人群感染率、发病率的相关性,并有自然感染的病例报告。从而证实猪具备作为 EHF 传染源的条件,并对人间 EHF 传播和自然疫源地的维持与演变起着不可忽视的作用,应引起重视。

在自然条件下猪与鼠极易相互感染,猪与鼠类在本病流行病学上并可能具有协同作用,因此,在 EHF 防治工作中除做好灭鼠防鼠外,还要不断加强对猪的管理和监测以及对养猪、宰猪人员的个人防护工作。然而有关猪排出感染性病毒导致人的感染主要途径与条件以及猪与鼠和人之间的关系尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 杨占清. 家猪作为 EHF 宿主动物的研究概况. 前卫医药杂志, 1990, 7: 191.
- 2 张云, 李越希, 陶开华, 等. 大白鼠吸入 EHFV 气溶胶后病毒在脏器分布. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9: 34.
- 3 张云, 赵学忠, 张炳根, 等. 从猪肺中分离到流行性出血热病毒. 中国公共卫生, 1988, 7: 18.

(收稿:1997-12-09 修回:1998-03-02)