

# 浙江省山区狂犬病新宿主动物调查

雷永良 王晓光 李浩 陈秀英 叶碧峰 柳付明 兰进权 叶夏良 梅建华 唐青

**【摘要】目的** 了解浙江省狂犬病疫区野生宿主动物种类及感染状况。**方法** 采集浙江省丽水市和杭州市淳安县猫、鼬獾、黑线姬鼠、跳鹿、野猪脑组织标本共 160 份,分别取大脑、中脑、小脑和海马回部位组织,用直接免疫荧光试验(DFA)检测狂犬病毒特异性抗原和 RT-PCR 方法检测狂犬病毒特异性核酸,确定阳性标本。**结果** 脑组织抗原印片经特异性抗狂犬病毒核蛋白(NP)单克隆抗体免疫荧光染色后在荧光显微镜下可见大量的苹果绿荧光颗粒;狂犬病毒 NP 特异性目的基因 Nested-PCR 得到与预期结果大小一致的扩增产物,两种方法同时检出狂犬病毒阳性的野生宿主动物脑组织标本 5 份,其中鼬獾脑组织阳性标本 4 份,阳性率为 8.33%(4/48);黑线姬鼠脑组织阳性标本 1 份,阳性率为 1.75%(1/57);猫、跳鹿、野猪脑组织未检出阳性标本。**结论** 在浙江省生物多样性的山区检测出狂犬病毒感染阳性的野生动物鼬獾和野鼠,从病原学角度说明鼬獾和野鼠可能是人间狂犬病的传染来源和狂犬病毒的宿主动物。

**【关键词】** 狂犬病; 宿主动物; 山区

**New animal hosts of rabies virus in mountain areas in Zhejiang province** LEI Yong-liang\*, WANG Xiao-guang, LI Hao, CHEN Xiu-ying, YE Bi-feng, LIU Fu-ming, LAN Jin-quan, YE Xia-liang, MEI Jian-hua, TANG Qing. \*Lishui Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang 323000, China  
Corresponding author: TANG Qing, Email: qtang04@sina.com; Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

**【Abstract】Objective** To understand the prevalence of rabies among wild animals and the animal species in rabies epidemic areas of Zhejiang province. **Methods** One hundred and sixty samples were collected from the brain tissues of cats, stoats, *Apodemus agrarius*, *Moschus chinensis*, and *Sus scrofa* in Lishui and Chunan cities of Zhejiang province. Each sample was divided into four parts: cerebrum, mesencephal, cerebellum and gyrus hippocampi which were used to determine the positive samples by detection of rabies virus specific antigens and nucleotides, using DFA and RT-PCR methods. **Results** Positive slides in the tests contained a glaring, apple green brilliance fluorescence using rabies virus specific monoclonal antibody against nucleoprotein. Using Nested-PCR method targeted at part of N gene, five positive samples were identified which consisting of four positive samples from stoats with positive ratio as 8.33% (4/48) and one positive sample from *Apodemus agrarius* with positive ratio as 1.75% (1/57). However, no positive result was found from cats, *Moschus chinensis*, and *Sus scrofa* samples. **Conclusion** Rabies virus positive samples were identified from stoats and *Apodemus agrarius* in the mountain areas with biological diversity in Lishui and Chunan cities of Zhejiang province, indicating that stoats and *Apodemus agrarius* might have played a role in human rabies and acted as host of rabies virus. In order to effectively prevent and control rabies virus under these complicated geographical and ecological environment, we must understand and evaluate the infection situation among animals in these regions.

**【Key words】** Rabies; Animal host; Mountain areas

狂犬病是由狂犬病毒侵入人及所有温血动物中枢神经系统而引起的急性致死性人兽共患传染

病,许多种类的哺乳动物都与狂犬病的传播和维系有关。自然界中狂犬病主要易感动物是食肉类和翼手类哺乳动物,自然储存宿主以犬及狼、狐、浣熊、臭鼬、蝙蝠等野生动物为主<sup>[1]</sup>,我国近年来报告的病例中 95% 以上是由犬类咬伤后致病,2% 为猫咬伤后发病,2% 由其他动物咬伤所致<sup>[2]</sup>,在我国发现的储存宿主除犬、猫外还有狼、狐狸、鼠、蝙蝠等动物<sup>[3,4]</sup>,国际上在外观明显健康的动物体内已经检测到抗狂

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.009

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划(SQ2006AA02Z112882); 国家自然科学基金(30630049)

作者单位: 323000 浙江省丽水市疾病预防控制中心(雷永良、王晓光、陈秀英、叶碧峰、柳付明、兰进权、叶夏良、梅建华); 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(李浩、唐青)

通信作者: 唐青, Email: qtang04@sina.com

犬病病毒抗体<sup>[5]</sup>。浙江省丽水市于 1985 年后的 20 年内未出现狂犬病疫情,但自 2006 年 11 月以来,相继出现人狂犬病例,绝大多数是暴露于犬;此外,杭州市淳安县部分病例为鼬獾攻击后发病,鼬獾咬伤致人狂犬病的疫情已有报道<sup>[6-8]</sup>,但未见病原学调查的结论。本实验室自 2008 年 3 月以来共检测狂犬、疑似狂犬和外观健康犬脑组织标本 220 份,其中检测出 12 份阳性,阳性率 5.45%。丽水市为低山、丘陵和山谷盆地,森林覆盖率 79.1%;淳安县境内山峦连绵、群峰迭起,森林覆盖率 73.9%,两地生态环境良好,非常利于野生动物生存,由于我国尚未开展系统的动物与人间狂犬病流行病学调查,目前暂不清楚狂犬病宿主动物的种类以及在每种动物中的流行情况,为此我们采集丽水地区猫、鼬獾、黑线姬鼠、跳鹿、野猪脑组织和淳安县鼬獾脑组织标本<sup>[6]</sup>,应用直接免疫荧光试验(DFA)和 RT-PCR 方法进行狂犬病病毒的实验室筛查,以了解浙江省狂犬病疫区野生宿主动物种类以及狂犬病病毒的感染状况。

### 材料与方法

1. 标本采集:在丽水地区采集动物脑标本共计 139 份,其中猫 19 份、鼬獾 27 份、黑线姬鼠 57 份、跳鹿 20 份、野猪 16 份;在淳安县采集鼬獾脑标本 21 份。标本均冷冻保存。脑标本在负压生物安全二级实验室生物安全柜内直接剖开动物头颅分别取大脑、中脑、小脑和海马回组织置于冻存管中并存放于 -70℃ 待检。

2. Nested-PCR 检测用引物:特异性扩增狂犬病病毒核蛋白(NP)基因片段的巢式 PCR(Nested-PCR)所用的引物序列<sup>[9]</sup>,外引物: N<sub>127</sub>: 5'-(55)ATG TAA CAC CTC TAC AAT GG(74)-3', N<sub>8m</sub>: 5'-(1587)CAG TCT CYT CNG CCA TCT(1570)-3', 理论扩增产物长度为 1533 bp;内引物: N<sub>577</sub>: 5'-(644)AAG ATG TGY GCY AAY TGG AG(663)-3', N<sub>829</sub>: 5'-(899)GCC CTG GTT CGA ACA TTC T(881)-3', 理论扩增产物长度为 256 bp,引物位置参考 PV 株(M13215)序列,引物由上海生物工程技术有限公司合成。

3. DFA 检测病毒抗原:不同部位的脑组织(大脑、中脑、小脑、海马回)印片,冷丙酮室温固定 10 min,用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBSA 溶液 1:50 倍稀释荧光素标记的抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体(CHEMICON,美国)滴加在固定好的脑组织印片上,37℃ 湿盒孵育 30 min;缓流水冲洗 3~5 s, PBS

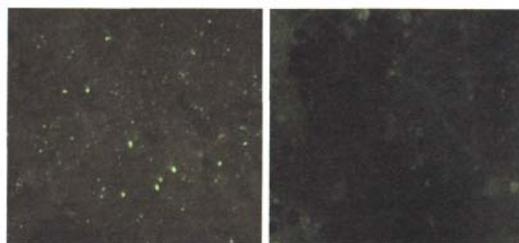
振洗 2 次,蒸馏水振洗 1 次,每次 2 min,90% 甘油(PBS 稀释)封片后在荧光显微镜下观察结果。

4. RT-PCR 检测病毒核酸:DFA 检测阳性的脑组织标本用 TRIzol (Invitrogen, 美国)抽提细胞总 RNA,具体操作按试剂说明书进行;以 RNA 为模板,用随机引物 pd(N)(TaKaRa, 大连)、Ready-To-Go<sup>®</sup> You-Prime First-Strand Beads(GE, 美国)反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,Nested-PCR 扩增 NP 特异性目的基因片段。

用 GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, 美国)进行 Nested-PCR 扩增,反应体系参照试剂盒说明书。反应条件:94℃ 预变性 3 min;一次扩增:94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 100 s;二次扩增:94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 40 s;72℃ 再延伸 10 min,于 4℃ 终止反应,均 34 个循环。1% 琼脂糖(OXOID, 英国)凝胶电泳鉴定扩增结果。

### 结 果

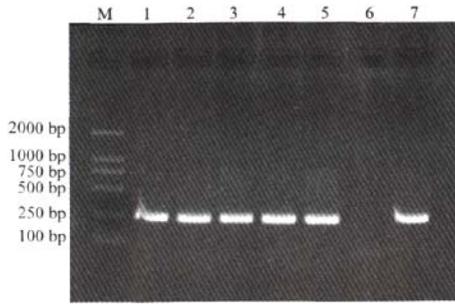
1. DFA 检测狂犬病病毒特异性抗原:脑组织抗原印片经特异性抗狂犬病病毒 NP 单克隆抗体免疫荧光染色,在荧光显微镜下可见大量的苹果绿荧光颗粒,呈不同的形状和大小,荧光颗粒大小范围在 0.24~27 μm,较大的圆形或椭圆形发强烈荧光者为内基氏小体(Negri bodies),而似沙粒或灰尘的较细小的荧光粒子及丝状荧光物为神经元或树突中含有的狂犬病病毒颗粒(图 1)<sup>[10]</sup>。



注:左图为阳性,右图为阴性(10×40)

图 1 DFA 检测动物脑组织标本的荧光显微镜观察结果

2. RT-PCR 检测狂犬病病毒核酸:狂犬病病毒 NP 特异性目的基因 Nested-PCR 扩增产物片段大小为 256 bp,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,5 份不同动物脑组织标本以及阳性对照均扩增出 250 bp 左右的片段,大小与预期结果一致,而阴性对照未见特异扩增条带,表明这些标本中均含有狂犬病病毒 NP 特异性基因片段,为狂犬病病毒感染阳性(图 2)。



注: M: DL2000 分子质量标准; 1: 黑线姬鼠脑组织标本; 2~5: 鼬獾脑组织标本; 6: 阴性对照; 7: 阳性对照

图 2 动物脑组织标本 RT-PCR 扩增电泳检测结果

3. 宿主动物感染情况: DFA 方法初筛和 RT-PCR 方法复核检测共检出脑组织阳性标本 5 份, 其中鼬獾阳性标本 4 份 (来自丽水市 1 份、淳安县 3 份), 阳性率为 8.33% (4/48), 除丽水市采集标本时鼬獾呈明显病态外, 淳安县 3 只鼬獾均为外观健康; 黑线姬鼠阳性标本 1 份, 阳性率为 1.75% (1/57), 为外观健康野鼠; 猫、跳鹿、野猪脑组织标本均显示阴性。

### 讨 论

虽然人狂犬病主要由犬传播, 但是狂犬病病毒的主要储存宿主是野生食肉动物, 包括 5 个科 16 种野生动物均可感染狂犬病<sup>[11]</sup>。浙江省近几年狂犬病疫情逐渐上升, 疫区范围不断扩大, 已经发现作为狂犬病野生宿主动物的鼬獾咬伤致病的情况, 但是对狂犬病的诊断多为通过患者/犬的临床症状来判断, 一般没有经过实验室检测诊断, 对狂犬病的确诊缺乏充分的科学依据。

DFA 是目前狂犬病病毒实验室诊断最精确、快速和可靠的方法<sup>[10, 12]</sup>, 对新鲜标本和甲醛固定标本的狂犬病病毒抗原检出率的一致性高于 99.8%<sup>[13]</sup>, 以提纯的狂犬病病毒核衣壳免疫实验动物制备的多克隆抗体或抗核衣壳单克隆抗体与异硫氰酸荧光素偶联后, 用荧光抗体试验 (fluorescent antibody test, FAT) 可特异地与存在于被狂犬病病毒感染的细胞内由病毒核衣壳聚集而成的包涵体结合, 该方法 1958 年由 Goldwasser 首创, 后经 Dean 和 Kissling 改进, 目前已广泛应用于人及动物狂犬病感染的诊断<sup>[10]</sup>。PCR 技术于 1990 年首次应用于鼠脑内狂犬病病毒的检测, 后用于狂犬病的诊断, 唾液、脑脊液、皮肤或脑组织标本以及感染病毒后的细胞培养物或鼠脑均可用于病毒核酸的检测, 由于不同型别及病毒

株的狂犬病病毒 NP 具有较高的保守性、同源性及高度一致的抗原性, 因此 NP 更多的应用于狂犬病的基因诊断, 通常是通过 RT-PCR 方法直接扩增 N 基因或是通过间接杂交技术检测扩增后的 N 基因, 且 RT-PCR 对稀释的样品检测的敏感性较传统 FAT 要高, 法国巴斯德实验室曾经对患者死后 1 个月的脑组织标本用 RT-PCR 作出狂犬病的诊断<sup>[14]</sup>, Rafael 等<sup>[14]</sup>也用同样的方法对动物死后 36 天的脑组织标本作出狂犬病的诊断, 并且 RT-PCR 可以在感染期检测狂犬病病毒或是对暴露后的患者检测是否暴露于带病毒动物。

本实验室通过 DFA 和 RT-PCR 方法, 对所采集的野生动物脑组织标本进行狂犬病病毒特异性抗原与核酸的检测, 为更加准确的诊断狂犬病提供了良好的实验室基础。在生物多样性的浙江省丽水和杭州市淳安山区野生动物鼬獾和野鼠中检测出狂犬病病毒, 从病原学角度说明鼬獾和野鼠可能是人间狂犬病的传染来源和狂犬病毒的宿主动物, 其中鼬獾检测阳性率为 8.33%, 野鼠为 1.75%。本研究结果提示, 狂犬病病毒存在野生宿主动物感染和扩散危险<sup>[15]</sup>。丽水、淳安山区, 山脉连绵, 不能排除病毒通过这些野生动物在各地区之间传播, 并在鼬獾、犬、野鼠等动物中进一步扩散的可能。以往报道均为居民捕捉闯入村户中的鼬獾时被咬伤而感染, 调查发现发病村庄既往不同程度存在鼬獾病死或家畜 (犬、猫、猪) 被鼬獾咬伤后致死的现象, 从上述情况来看, 对于这种生活习性改变, 特别是从野外闯入居民区的鼬獾应引起高度重视, 这些动物极有可能携带狂犬病病毒, 并向犬及其他温血动物传播。因此, 在地理和生态环境都很复杂的山区, 预防控制狂犬病就必须了解各种动物的感染状况, 以便采取有针对性的监控措施。

狂犬病呈全球性分布, 亚洲是高发地区, 我国狂犬病病例数仅次于流行最严重的印度, 近几年每年数千例<sup>[2]</sup>。目前我国对狂犬病宿主动物的研究范围主要集中于犬, 但在一些消灭了家畜狂犬病的欧美国家地区, 狂犬病的传染源已从传统的犬、猫易位于野生动物, 由于我国对野生动物狂犬病的研究相对较少, 大量的家犬免疫可能会导致狂犬病病毒向野生动物转移, 因此狂犬病病毒在野生动物中的携带和传播将变得非常重要, 所以探明狂犬病病毒在疫区野生宿主动物间的流行情况、野生宿主动物种类以及外观健康的动物携带病毒状况, 为后续分子流行病学从病毒来源、宿主动物及传播方向等方面的

研究提供基本依据,对流行地区野生动物狂犬病的免疫及防控均具有重要意义。

(感谢杭州市淳安县疾病预防控制中心在脑组织标本的采集处理方面给予的支持)

### 参 考 文 献

- [1] 唐家琪. 自然疫源性疾病. 北京: 科学出版社, 2005: 358-392.
- [2] 唐青. 第一届亚洲狂犬病专家局会议报告. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3): 目录页4.
- [3] 张永振. 中国狂犬病的流行病学. 中国计划免疫, 2005, 11(2): 140-143.
- [4] 罗廷荣, 李开鹏, 刘芳, 等. 应用RT-PCR从蝙蝠和野鼠分离出狂犬病病毒. 广西农业生物科学, 2005, 24(4): 287-290.
- [5] Warrell MJ, Warrell DA. Rabies and other lyssavirus disease. Lancet, 2004, 363: 959-969.
- [6] 李奕新, 田建三, 徐志春. 脑组织咬伤引发7例狂犬病. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(12): 1103.
- [7] 王臻, 莫世华, 陈恩富, 等. 浙江省狂犬病疫情分析. 浙江预防医学, 2004, 16(11): 24-25.
- [8] 施柏年, 周建方, 俞润, 等. 脑组织咬伤致狂犬病7例. 中国人兽共

患病杂志, 1997, 13(5): 77.

- [9] 李浩, 陶晓燕, 宋森, 等. 狂犬病高发地区犬只感染情况调查分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(3): 161-164.
- [10] 徐葛林. 国内外狂犬病毒实验室检测与诊断技术的研究及进展. 中国计划免疫, 2005, 11(2): 147-150.
- [11] 费荣梅, 刘健. 野生动物狂犬病及其媒介作用. 畜牧与兽医, 2007, (1): 22.
- [12] Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4<sup>th</sup> ed, WHO, Geneva, 1996: 88-95.
- [13] Whitfield SG, Fekadu M, Shaddock JH, et al. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin fixed brain tissue specimens. Virol Methods, 2001, 95 (1-2): 145-151.
- [14] Rafael O, Neide T, Paulo B, et al. Human rabies. Emerg Infect Dis, 2006, 12(5): 869.
- [15] Bourhy H, Kissi B, Audry L. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. Gen Virol, 1999, 80(10): 2545-2557.

(收稿日期: 2008-10-13)

(本文编辑: 张林东)

## · 书 讯 ·

### 《空间流行病学》现已出版

作为流行病学的一个新分支——空间流行病学在近10年中发展较快,已被越来越多的国内外研究者应用于疾病预防控制与公共卫生等研究领域。由周晓农研究员主编的《空间流行病学》(ISBN 978-7-03-021980-0)一书于2009年1月正式由科学出版社出版。该书共分为理论篇、方法篇及应用篇共14章59.9万字,并配以丰富的图表加以说明。理论篇共计2章,包括总论、基本概念与理论,主要涉及空间流行病学的发展史与研究范畴、数据的特征与类型、空间流行病学研究的尺度和维度、空间流行病学的研究类型、空间流行病学的偏倚与混杂、空间流行病学数据的表达与可视化。方法篇包括空间流行病学基本方法与步骤、数据管理系统、地理信息系统、遥感信息技术、全球定位系统、空间统计技术等6章,其中以各类空间技术平台的基本概念与作用为重点,介绍空间数据的结构、分析方法步骤、表达方式等技术知识,并举例介绍各类空间数据的获取与管理以及国内外多种应用软件的使用方法。应用篇包括传染病预防控制中的应用、慢性非传染性疾病预防控制中的应用、环境卫生研究中的应用、伤害研究中的应用、卫生资源研究与服务中的应用等5章,以空间流行病学理论与技术的应用范畴为主线,配以丰富的图表举例描述各领域应用空间流行病学理论与技术的特点与方法。

该书以介绍近年空间流行病学的最新发展为主线,从理论、技术与实践3个层次分别对空间流行病学的发展趋势作了全面阐述,从而使本书为更多的读者服务。该书内容翔实,由浅至深,循序渐进,可读性强。该书为前沿专著,有较高的学术价值。不但可作为高级教学用书,还可成为专业参考书,能使学生和学者较快地掌握空间流行病学的理论,使研究人员能更好地深化空间流行病学的理论与技术,使公共卫生工作者能更好地应用空间流行病学方法,同样也可成为卫生管理人员的参考用书。