

我国狂犬病流行现状及检测预防

姜 辉¹, 丛晓丽²

1. 黑龙江省卫生信息统计中心, 哈尔滨 150090;
2. 黑龙江省皮肤病防治所, 哈尔滨 150090

摘 要: 狂犬病是动物源性传染病, 可引起人类感染。一旦发病, 死亡率近乎 100%, 目前尚无有效治疗方法。介绍了狂犬病病毒的生物学性状, 阐述了狂犬病在我国的流行现状及新近发展的诊断技术及预防措施, 有利于狂犬病在中国的控制和消除。

关键词: 狂犬病; 流行; 诊断; 预防

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.01.07

Current Situation of Prevalence, Diagnosis and Prevention of Rabies in China

JIANG Hui¹, CONG Xian-li²

1. The Health Information Statistics Center of Heilongjiang Province, Harbin 150090, China;
2. The Dermatitis Prevention & Treatment Institute of Heilongjiang Province, Harbin 150090, China

Abstract: Of a serious zoonosis, rabies can cause human infection with mortality of 100% almost, and there is no effective method for case treatment so far. This paper introduces the biology character of rabies, elaborates current prevalence state in China, newly developed diagnosis techniques and prevention measures. It would be helpful to control and eliminate rabies in China.

Key words: rabies; prevalence; diagnosis; prevention

狂犬病是人畜共患的自然疫源性传染病, 可引起多种野生动物和家畜等自然感染, 可在动物间传播, 并可通过咬伤、抓伤或密切接触等形式传播给人, 引起人类感染。一旦发病, 死亡率近乎 100%, 目前尚无有效治疗方法。当今, 世界各地和我国仍有很高的发病率, 因此了解狂犬病的病原学特点、流行情况, 追踪其发生发展, 对预防和控制传染病发生极为重要。

1 狂犬病病毒的生物学性状

狂犬病由狂犬病病毒引起, 该病毒为一种嗜神经病毒, 属于弹状病毒科 (Rhabdoviridae)、狂犬病病毒属 (Lyssavirus)。病毒主要由包膜和核衣壳组成, 包膜表面有许多糖蛋白刺突, 与病毒感染

性、血凝性和毒力等有关。病毒基因组为单负链 RNA, 长约 12 000 bp, 从 3' 到 5' 端有 3 个区, 依次为先导序列、结构基因区及非编码区, 其中结构基因区分别编码核蛋白 (N)、膜蛋白 (M1、M2)、糖蛋白 (G) 和 RNA 聚合酶 (L)^[1]。病毒感染动物范围广, 可在狼、狐狸、浣熊、蝙蝠等野生动物和狗、猫等家畜中自然感染与传播。病毒在易感动物或人的脑组织, 特别是大脑海马回锥体细胞中增殖, 在细胞质内形成内基小体, 可用以辅助诊断狂犬病。该病毒对热、紫外线、日光和干燥抵抗力弱。但脑组织内的病毒, 在室温或 4℃ 条件下的传染性可保持数周。狂犬病病毒可发生毒力变异, 根据此特点制备灭活疫苗, 可用于预防狂犬病发生。

收稿日期: 2011-06-11; 接受日期: 2011-07-01

作者简介: 姜 辉, 副主任医师, 硕士, 研究方向为公共卫生管理。E-mail: jianghui55cn@yahoo.com.cn

2 我国狂犬病流行特点

在中国,狂犬病已再度出现并成为主要的公共健康问题之一^[2],特别是近年来随着我国“宠物热”的出现,犬、猫的饲养量快速增加,被犬、猫等动物咬伤的人数也不断增加,狂犬病的流行呈上升趋势。自20世纪50年代以来,我国狂犬病流行出现3次流行高峰。第一次高峰出现在20世纪50年代中期,年报告死亡数最高达1 900多人。第二次高峰出现在20世纪80年代初期,1981年全国狂犬病报告死亡7 037人,是新中国成立以来报告死亡数最高的年份。整个80年代,全国狂犬病报告年死亡数都维持在4 000人以上,年均报告死亡数5 537人。2005年在被调查的全国31个省市自治区中,27个有人类狂犬病病例发生。这种地方性动物源性疾病主要分布在长江流域、广西、湖南、贵州、江西和广东等疾病高发区。自1996-2008年间,全国范围内报道了19 806个人类狂犬病病例,平均每年1 524例,发生率迅速增长,2007年达到第三次高峰(3 300例)。报道的50%左右病例集中发生在广西、湖南和贵州省^[3]。该三省的犬类狂犬病感染率为2.3%,60%调查城市犬接种疫苗率低于70%。在315例人类狂犬病中,66.3%没有接受任何咬暴露后预防(postexposure prophylaxis, PEP),27.6%没有接受足量的PEP,仅6%接受全程PEP^[4]。广西2004-2008年狂犬病共2 463例,遍及95个县,每年增加5例。其中83.79%受到狗的攻击,67.88%没有接受任何PEP^[5]。江苏省1999-2008年期间共有135例,其中84%患者为农民^[6]。2009年统计数据显示,全国24个省的近900个县共报告发病数2 213例,其中死亡2 131例^[7];狂犬病疫情波及范围不断扩大,90年代中期,全国仅有21个省(区、市)98个县区报告狂犬病疫情。2010年,仅广东省报告就有300人死于狂犬病,病死数居法定传染病的第二位,同年,青岛也至少已有6人死于狂犬病。

3 狂犬病的检测和诊断

人类狂犬病的诊断主要依据接触史,特别是被动物咬伤的情况,及临床症状和体征,但临床症

状仅限定狂躁型,对于麻痹型和非典型狂犬病仅依靠临床诊断是不可靠的,因为狂犬病易与格林巴利综合症、脊髓灰质炎和其他型脑炎相混淆,所以建立健全的感染性疾病检测系统必须依赖于可靠的实验室诊断^[8]。

实验室检测狂犬病病毒方法中,荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)是最常用的预初试验。狂犬病组织培养感染实验(rabies tissue culture infection test, RTCIT)或鼠接种试验(mouse inoculation test, MIT)可用于病毒确认试验;其他检测抗原、抗体的方法,如快速的狂犬病特异的酶联免疫吸附试验(rapid rabies-specific enzyme-linked immunosorbent assay, rapid-ELISA)和检测病毒核酸的逆转录聚合酶链反应(viral nucleic acids by reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)也越来越多的应用于诊断,结合核苷酸测序,常用于狂犬病的流行病学调查^[9]。

3.1 常规实验室检查

主要检测血常规、尿常规、脑脊髓液常规及脑电图等指标,用于区别狂犬病与其他脑脊髓炎。狂犬病患者外周血中白细胞总数有轻中度升高,中心粒细胞占80%以上;细胞数约200个/mm³,以淋巴细胞增多为主;糖及氢化物含量正常,但蛋白质轻度增加,尿常规检查常可发现有轻度蛋白尿,偶有透明管型;脑脊髓液压力正常或稍有增高。

3.2 血清学诊断方法

3.2.1 快速荧光灶抑制试验(fluorescent focus inhibition test, RFFIT) RFFIT是检测狂犬病病毒中和抗体的“金标准”^[10]。该方法重复性好,特异性高,广泛用于实验室检测。RFFIT由试验步骤为:用系列稀释的待测血清与一定浓度的已知狂犬病毒等量混合后接种于敏感细胞,置37℃ CO₂孵箱中培养24 h,固定后用荧光抗体染色,镜下观察并记录其荧光灶数量,根据病毒抗原出现荧光灶的数量计算待检血清的抗体效价。通过在实验室建立熟练的RFFIT试验可整体提高我国狂犬病的检测能力^[11]。

3.2.2 荧光抗体病毒中和试验(fluorescent antibody virus neutralization test, FAVN) FAVN是在最初的RFFIT试验基础上发展起来的,采用标准

方法筛选动物血清,并产生足量的抗病毒抗体。该方法主要是将狂犬病毒 CVS(适应细胞培养的标准攻毒毒株)与一定量的特异抗血清体外中和后,接种于敏感的细胞。一般采用 96 孔微量板的微量滴定方法。在为口服免疫接种的动物进行跟踪调查中,通过细胞培养做 FAVN 试验效果最好。但由于野外采集的血清质量低劣,FAVN 试验中,细胞对毒素过于敏感,可能产生假阳性结果^[12]。

3.2.3 酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA) 最初 ELISA 应用于狂犬病领域是确定用于病毒中和抗体的滴度。Atanasiu 等^[13]应用该方法用荧光标记的 IgG 抗体确定了狂犬病抗原含量。随后, Perrin 等^[14]又发展了 ELISA 方法,建立了快速狂犬病酶联免疫诊断(rapid rabies enzyme immunodiagnosis, RREID)方法,用于检测脑组织内的病毒核衣壳抗原。ELISA 方法快速、廉价且易于操作,由于不需要接触感染性病毒故安全性好,易于在发展中国家推广使用。目前,国内外许多公司都开发了狂犬病 ELISA 诊断试剂盒,使用方便、简单快速,可用于大批量样品的流行病学调查。

3.2.4 鼠病毒中和试验(the mouse neutralisation test, MNT) MNT 与 RFFIT 一同被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)定为标准检测狂犬病的方法。MNT 的原理是:以已知滴度的血清为参照,用待滴定的系列稀释的抗血清与 CVS 病毒株共同孵育,接种成年小白鼠脑内,统计鼠的病死率和保护 50% 动物的抗血清滴度。该试验虽然可定量检测狂犬病毒中和抗体效价,但费时、操作繁琐、需专门培训技术操作人员,且实验需要较多小鼠,成本较高,因此不适用于快速诊断。

3.2.5 直接快速的免疫组化试验(direct rapid immunohistochemical test, DRIT) 直接快速的免疫组化试验可用于狂犬病的实验室监测。该方法是美国疾病预防控制中心新近发展的一种诊断技术,适用于经费短缺、技术薄弱的基层实验室,其敏感性和特异性等同于直接的荧光抗体试验和 RT-PCR 技术^[15]。

3.2.6 免疫色谱试验条(immunochromatographic test strip, ICTS) ICTS 是一种快速检测狂犬病病毒的方法^[16],用胶质金颗粒标记的狂犬病病毒糖蛋白作为标记,检测抗狂犬病病毒抗体。该法与 FAVN 试验相比,特异性分别为 98.2% 和

90.4%。该试验条在 4℃ 条件下,特异性和敏感性可保持 15 个月;室温下可保存 12 个月不变性,故本法可用于无专门设备的实验室快速检测狂犬病病毒特异性抗体。

3.3 分子生物学诊断技术

常规方法(如:组织培养感染实验和鼠接种试验)虽然特异性高,但耗时长。分子生物学方法不仅敏感、精确,且耗时短,几小时内即可完成,因此开始广泛用于当今狂犬病病毒的检测。

3.3.1 逆转录 PCR(reverse transcription PCR)

逆转录 PCR 法可用于扩增样品中病毒特异、保守的核蛋白(N)基因。该方法检测标本种类多,如动物的唾液、脑脊液、皮肤、脑组织标本、感染病毒后的细胞培养物和鼠脑等,均可用于病毒核酸的检测。该技术具有高灵敏度、高特异性、检测结果直观、容易判定等优点,可用于大规模样品的初步筛选。但由于受病毒核酸非特异性序列的变异性、病毒标本稀释的间断性、标本采集的类型和时间等的影响,其试验结果易出现假阴性,需要注意。

3.3.2 逆转录半巢式 PCR(reverse transcript hemi-nested PCR, RT-hnPCR) 半巢式 PCR 是巢式的一种特殊类型,可扩增获得比普通 PCR 实验更小的片段,从而增加特异性。该方法易于诊断包括生活期间和死亡后的狂犬病患者,可从疑似病人中采集唾液、尿液或皮肤组织活检标本进行检测。采用皮肤组织活检,该方法的敏感性可达 98%。实验所用仪器简便、廉价,因此极易在发展中国家推广使用^[17]。

3.3.3 实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR) Real-time PCR 技术以 GeneBank 上公布的狂犬病病毒核蛋白基因序列为基础,设计病毒特异的引物和探针,敏感性、特异性、重复性好于普通的 PCR 方法。不易受病毒污染,可检测极少量的病毒 RNA。田云等^[18]根据猪伪狂犬病毒 gD 基因序列,设计合成了一对特异的可用于检测伪狂犬病毒的 PCR 引物和一条 Taqman 荧光探针,建立了一种可实时定量检测猪伪狂犬病毒的荧光定量 PCR 技术,比常规 PCR 灵敏度高 100 倍,与病毒分离培养和常规 PCR 相比较,该方法具有快速、灵敏、特异、定量、重复性好的优点,可望用于狂犬病的检测和病毒分布的研究等^[19]。

4 狂犬病的防治措施

目前,不连续的控制犬类狂犬病和病人不足量的 PEP 是导致我国人类狂犬病高发的主要因素。

据世界卫生组织统计,每年由地方流行的犬类狂犬病传染给人引起人类狂犬病的死亡数可达 55 000 例,仅亚洲就超过 31 000 例死亡人数。为引起人们对狂犬病的重视,自 2007 年起,每年的 9 月 28 日被定为“世界狂犬病日”,用以宣传通过防治动物的狂犬病可预防和制止人类该病的发生。通过“世界狂犬病日”,全球已有 85 个国家、超过 5 亿人接受了有关预防狂犬病的相关教育,人员涉及政府人员、医生、媒体工作者、教师等社会各个阶层,有望能在世界范围内消除狂犬病的地方流行。通过“世界狂犬病日”,人们获取了相关知识,改变废弃了过去治疗狂犬病土方土法,如伤口涂辣椒粉、念咒语、服用无效的中草药等,把暴露狂犬病的危险降到最低。由于发展中国家患狂犬病死亡的人数减少是源于犬类狂犬病的发生率降低,但在非洲等地区的犬类狂犬病并未得到很好控制,故以此消除、控制人类狂犬病的发生的可行性很低。

在狂犬病高发区,随着应用更好的监控方法对新近出现的动物源性狂犬病进行预测,并通过一定宿主确定地方性狂犬病的实际传播,采用后续干预措施如疫苗接种计划等,可以改善目前狂犬病流行状况,指导野生动物狂犬病管理程序。对于仅依赖口服狂犬病疫苗进行预防的地域,还需要司法合作干预。最近发展的一项监控计划,涉及到包括调查和控制的措施,已在很大程度上在边远地区促进动物狂犬病病例的检测,该项计划已经在加拿大、墨西哥和美国开始实施^[20]。

无论狂犬病暴露前和暴露后,疫苗都是最有效的干预方法。虽然狂犬病是所有感染性疾病中最严重者,死亡率达 100%,值得庆幸的是该病能通过安全有效的疫苗进行预防。由于狂犬病疫苗生产成本低且接种周期长,需接触前免疫接种 3 次,接触后再接种 4~5 次,因此在发展中国家很难全程使用这些疫苗。此外对严重咬伤者,除疫苗接种外,还需接种人源或马源的狂犬病免疫球蛋白做紧急预防。所以发展中国家亟需廉价、安

全的替代疫苗,要求这类疫苗单剂量使用且保护时间长。

21 世纪科学家的目标是发展制备新型狂犬病疫苗。利用重组和反向遗传学技术可以构建高免疫原性(插入一个或多个糖蛋白基因以增加免疫原性)的完全稀释减毒的狂犬病病毒疫苗。这类疫苗造价低,可在细胞培养系统大量扩增。迄今,已研制出相关的这类疫苗,在实验动物中取得满意的效果,进入临床试验阶段。

狂犬病疫苗的研究一直受到广泛重视,并不断取得重要进展。现在单剂量疫苗已应用于实验动物并显示出较好的保护作用;新型佐剂正在研制,在鼠内已取得疗效;转基因植物最终能否提供大量的狂犬病病毒可食或不可食用的亚单位蛋白产物正在研制,有望作为裸 DNA 疫苗;质粒 DNA 或者依赖于复制子自我复制的 DNA 疫苗具有明显优点,如易于大量增殖,比需要哺乳动物细胞培养纯化的亚单位疫苗更廉价等,但是治疗人类狂犬病的效果还有待于确定;转基因生产的 DNA 疫苗的免疫应答作用缓慢,使得它们对可疑的暴露后预防更为有效。其他正在研制的狂犬病疫苗包括重组异源的病毒载体,如各种类型的痘病毒和腺病毒载体。两个重组的痘病毒载体疫苗,一个用痘病毒的哥本哈根株(V-RG),另一个用金丝雀痘病毒(ALVAC),都表达狂犬病病毒的糖蛋白,已获得商业许可在野生动物中口服免疫接种(用于浣熊、山狗、猫等)。V-RG 疫苗在其他物种中(臭鼬属、狗)口服不能诱导足够的保护性免疫,所以选择口服疫苗需要确认是否适合这些物种,尤其是犬类。因为犬类是狂犬病在世界范围的主要贮存库,尤其是在亚洲和非洲。改良的痘苗病毒 ankara(MVA)被认为是可供选择的疫苗之一,尽管最初的观察发现,当口服该疫苗时,不能在已接种疫苗的狗和浣熊体内诱导记忆免疫。一种源于人和动物的不同血清型的重组腺病毒为载体制备也具有应用潜力^[21]。今后的工作重点是发现和发展已有的和其他新一代口服疫苗,不断发展新的诊断技术和预防措施,将有利于狂犬病在中国乃至世界的控制与消除。

参 考 文 献

- [1] 谷鸿喜,陈锦英. 医学微生物学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2009,306-307.

- [2] Song M, Tang Q, Wang D M, *et al.* . Epidemiological investigations of human rabies in China [J]. BMC Infect. Dis. , 2009,21(9):210.
- [3] Hu R, Tang Q, Tang J, *et al.* . Rabies in China: an update. Vector Borne Zoonotic Dis. , 2009;9(1):1-12.
- [4] 莫兆军,莫 毅,周开姣,等. 广西 2004-2008 年狂犬病高发因素分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(2):88-90.
- [5] 姜仁杰,覃新程,金加洪,等. 江苏省盐城市 1999-2008 年狂犬病流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志,2010,31(3):300-303.
- [6] Zhao J, Liu Y, Zhang S, *et al.* . Analysis of an outbreak of human rabies in 2009 in Hanzhong district, Shaanxi province, China [J]. Vector Borne Zoonotic Dis. , 2011, 11 (1) : 59-68.
- [7] 周 航,满腾飞,李 群,等. 2009 年中国狂犬病监测分析 [J]. 疾病监测,2010,25(12):934-939.
- [8] Barrat J, Picard-Meyer E, Cliquet F. Rabies diagnosis [J]. Dev. Biol. (Basel). 2006;125:71-77.
- [9] Woldehiwet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus [J]. Clin. Chim. Acta. , 2005;351(1-2):49-63.
- [10] Moore S M, Hanlon C A. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease [J]. PLoS Negl. Trop. Dis. , 2010,4(3):e595.
- [11] 于鹏程,吕新军,申辛欣,等. 狂犬病毒中和抗体检测快速荧光灶抑制试验的建立 [J]. 中华流行病学杂志,2010,31(4):438-441.
- [12] Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody [J]. J. Immunol. Methods, 1998,212(1):79-87.
- [13] Atanasiu P, Savy V, Perrin P. Rapid detection of rabies antibodies by immunoenzymatic assay [J]. Ann. Microbiol. , 1977,128A(4):489-498.
- [14] Perrin P, Rollin P E, Sureau P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies [J]. J. Biol. Stand. 1986, 14(3):217-222
- [15] 陶晓燕,Niezgoda M,杜加亮,等. 直接快速免疫组化法在我国狂犬病诊断中的初步应用 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2008,22(3):168-170.
- [16] Wang H, Feng N, Yang S, *et al.* . A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody [J]. J. Virol. Methods, 2010,170(1-2):80-85.
- [17] Coertse J, Weyer J, Nel L H, *et al.* . Improved PCR methods for detection of African rabies and rabies-related *Lyssaviruses* [J]. J. Clin. Microbiol. , 2010,48(11):3949-3955.
- [18] 田 云,任裕其,屈源泉. 伪狂犬病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 广东畜牧兽医科技,2009,4(3):30-33.
- [19] 张 强,唐 青,刘卫滨,等. 狂犬病毒 TaqMan PCR 检测方法的建立 [J]. 中华流行病学杂志,2006,27(10):889-893.
- [20] Neilson A A, Mayer C A. Rabies prevention in travellers [J]. Aust. Fam. Phy. , 2010,39(9):641-645.
- [21] Wunner W H, Briggs D J. Rabies in the 21 century [J]. PLoS Negl. Trop. Dis. , 2010,30;4(3):e591.