

兔瘟

的诊断与防制

王永坤 朱国强 著

江苏科学技术出版社



TU WEN
DE
ZHEN DUAN
YU
FANG ZHI



兔瘟的诊断与防制

王永坤 朱国强 著

江苏科学技术出版社

(苏)新登字第002号

兔瘟的诊断与防制

王永坤 朱国强 著

出版发行：江苏科学技术出版社

经 销：江苏省新华书店

印 刷：扬州印刷总厂

开本787×1092毫米 1/32 印张2.25 字数45,000

1993年1月第1版 1993年1月第1次印刷

印数 1—6,000册

ISBN 7-5345-1494-0

S·226

定价：1.50元

责任编辑 郁宝平

我社图书如有印装质量问题,可随时向承印厂调换。

前 言

兔生产是我国畜牧业一个不可缺少的组成部分。在我国人多地少,精饲料较为紧缺的情况下,发展养兔业是一项收效快、效益较高的致富项目。但随着养兔业的发展,兔病危害日益严重,尤其是后来发现的兔瘟,给生产造成极大的威胁。

1984年2月,江苏农学院牧医系和无锡县畜牧兽医站首先发现并研究了兔瘟这一新病。兔瘟又称兔病毒性出血症,是家兔一种急性烈性病毒性传染病。兔场一旦传入本病,常导致全群覆没。据不完全统计,从1984年发现至1985年底,本病在全国许多省流行发生,造成1000万余只家兔死亡,给养兔业造成巨大的经济损失。本病自1986年已波及亚洲、欧洲、非洲和美洲等四大洲,遍布近40个国家,造成较大损失,引起各国畜牧兽医科技工作者的高度重视。1991年8月由我国主持召开国际会议,专门交流本病的研究成果和防治经验。

1984年4月,我们研究成功了兔瘟灭活苗,有效地控制和扑灭了本病的流行。本病的研究成果于1986年获江苏省科技改进一等奖和农牧渔业部科技进步一等奖。参加本病研究的有江苏农学院王永坤教授,周阳生、李俊宝、许益民、田慧芳、高锦梁、王宝安等副教授,孙怀昌、俞荣林、秦爱建、霍金富等讲师,吉传义、蒋源、朱国强、段玉友等硕士研究生,无锡县畜牧兽医站的施大明、浦伯清、徐海祥等同志也参加了研究工作。

为了能较好地普及兔瘟的诊断和防制知识，更好地控制和扑灭本病，保障我国养兔业的健康发展，本书将结合国内外的研究成果，比较全面地介绍本病的病原特性、流行病学、临床症状、病理变化、诊断方法和防制技术等，供同行们参考。

由于作者的业务水平有限，本书一定存在错误和缺点，恳请广大读者和同行们批评指正。

王永坤 朱国强

1991年12月于江苏农学院

目 录

一、兔瘟的发生历史和分布	(1)
(一) 历史.....	(1)
(二) 分布.....	(2)
二、兔瘟的病原学	(5)
(一) 病毒形态与大小.....	(5)
(二) 病毒结构多肽.....	(11)
(三) 病毒核酸股型及分子量.....	(13)
(四) 病毒浮密度和沉降系数.....	(15)
(五) 病毒对理化因子的稳定性.....	(15)
(六) 病毒血凝特性.....	(16)
(七) 实验室宿主系统.....	(17)
(八) 病毒在体内的复制.....	(20)
(九) 病毒在体内的分布.....	(22)
(十) 病毒的抗原性.....	(22)
(十一) 病毒分类.....	(23)
三、兔瘟的流行病学	(26)
(一) 易感性.....	(26)
(二) 传染途径.....	(27)
(三) 传染来源.....	(27)
(四) 流行季节及特点.....	(27)
(五) 动物感染谱及致病性.....	(28)
(六) 野兔在兔瘟流行病学上的意义.....	(28)

(七) 易感兔和非易感兔血清中血凝抑制抗体	
效价	(28)
四、兔瘟的临床症状	(30)
五、兔瘟的病理学	(34)
(一) 大体病理变化	(31)
(二) 组织学变化	(35)
(三) 超微结构变化	(37)
(四) 组织化学变化	(38)
六、兔瘟的发病机理	(40)
七、兔瘟的诊断	(41)
(一) 采样	(41)
(二) 动物接种	(42)
(三) 免疫试验	(42)
(四) 红细胞凝集试验和凝集抑制试验	(42)
(五) 间接红细胞凝集试验	(44)
(六) 中和试验	(45)
(七) 保护试验	(46)
(八) 琼脂扩散试验	(46)
(九) 对流免疫电泳	(46)
(十) 协同凝集和微球凝集试验	(47)
(十一) 荧光抗体染色	(47)
(十二) 免疫酶组织化学染色	(47)
(十三) 酶联免疫吸附试验 (ELISA)	(47)
(十四) 免疫电镜技术	(48)
(十五) 免疫转印	(48)
八、区别诊断	(50)
(一) 与急性巴氏杆菌病的区别诊断	(50)

(二) 与魏氏梭菌性肠炎的区别诊断·····	(51)
(三) 与兔痘的区别诊断·····	(51)
(四) 与粘液瘤病的区别诊断·····	(52)
(五) 与野兔热的区别诊断·····	(52)
(六) 与欧洲棕色野兔综合症的区别诊断·····	(52)
九、防制措施 ·····	(54)
(一) 无本病流行兔群的防制措施·····	(54)
(二) 有本病流行区域兔群的防制措施·····	(55)
(三) 兔瘟抗血清防制的效果·····	(55)
(四) 疫苗研制·····	(56)
主要参考文献 ·····	(60)

一、兔瘟的发生历史和分布

(一) 历史

1984年2月，在江苏省无锡、江阴等县市的一些兔场和许多养兔户发生一种以传染性强、潜伏期短、发病率和致死率均很高的国内外从未有过报道的家兔传染病，群众称为“兔瘟”。患病死兔的呼吸系统出血，肝、脾、肾等实质器官以郁血、肿大和出血为特征。该病的流行传播极为迅猛，在短短的两个半月内即流行于苏南数县市的许多兔场和养兔户。兔场一旦传入本病，兔群常在2~3天内几乎全部感染，青年兔和成年兔的死亡率高达90~97%，甚至达100%，但2~3月龄的病兔仅占很少部分，2月龄以下的幼兔极少发病死亡。自1984年5月中旬起，本病在江苏、上海、浙江、山东、安徽、河南等地流行暴发，随后又很快蔓延到全国大部分省市。根据江苏农学院1984年2月至1985年5月的调查统计，因本病死亡的家兔达1000余万只，给养兔业造成约5亿元以上的巨大经济损失。

江苏农学院牧医系病原微生物研究室和无锡县畜牧兽医站的兽医科学工作者在发现该病后，立即对本病的病原微生物、流行病学、临床症状、病理变化及诊断技术等方面进行广泛而细致的研究，确诊本病是由一种新发现的病毒所致的家兔病毒性传染病，并于1984年4月成功地研制出兔瘟组织灭活疫苗，为有效地控制和扑灭本病发挥了很大的作用。

自1984年以来,国内对本病进行了广泛的研究,先后报道的有:王永坤等(1984)、刘胜江等(1984)、周阳生等(1985)、孙怀昌等(1985)、张哲夫等(1985)、徐福南等(1985)、盛蕴纯等(1985)、许海祥等(1985)、徐忠俊等(1985)。王永坤(1984)、陈可毅(1986)等称该病为兔瘟,浦伯清等(1985)、曹树泽等(1986)称为兔病毒性出血性肺炎,谷振德等(1986)称为兔出血性肺炎,刘胜江(1984)、徐福南(1985)等称为兔出血症,张春秋等(1987)称为兔病毒性败血症。目前国内除西藏和台湾等地未见有公开报道外,其他省市均有流行。

自从中国发现并报道本病之后,在全世界不少国家也纷纷报道了研究情况。朝鲜Lee, C.S. (1984)曾报道本病, Park, N.Y. (1987)称本病为兔病毒性猝死(Rabbit viral sudden death); 1986年在意大利北部发现本病,至1988年已扩散到全国,该国学者称为X病(X disease); 原西德Ohlinger, V.F.等(1990), Parra, F.等(1990)和Valicek, L.等(1990)随后也对该病发表了研究报道。法国、捷克斯洛伐克、前苏联、西班牙和日本等国都有本病发生的报道。在欧洲,通常称该病为出血性支气管肺炎(Viral haemorrhagic pneumonia)。

(二) 分 布

兔瘟除在亚洲、欧洲许多国家流行外,也传播到非洲的埃及和突尼斯,以及美洲的墨西哥和澳大利亚(见表1)。目前该病已成为全世界养兔业的大敌。

1980年以来,欧洲的瑞典、意大利、原西德、法国、丹麦、比利时、英国等一些国家相继报道,在野兔密集区及野

表1 兔瘟(兔病毒性出血症)在各国出现时间

国 家	出现时间 (年份)	国 家	出现时间 (年份)
中 国	1984	澳大利亚	1989
朝 鲜	1984	比 利 时	1989
意 大 利	1986	德 国	1989
前 苏 联	1986/1987	波 兰	1989
捷克斯洛伐克	1987	罗马尼亚	1989
匈 牙 利	1987	黎 巴 嫩	1989
法 国	1988	留尼汪岛	1989
葡 萄 牙	1988	突 尼 斯	1989
西 班 牙	1988	丹 麦	1990
瑞 士	1988	希 腊	1990
埃 及	1988	马 尔 他	1990
墨 西 哥	1988	日 本	1991

兔饲养场暴发一种欧洲野兔综合症(EBHS),病程短,死亡率高。饲养场的野兔临床症状表现为精神沉郁、食欲不振,肌肉震颤,瘫痪和偶有鼻蛆。营自由生活的病野兔处于濒死期时偶尔见到瞎眼、共济失调、僵直、不能跑动、痉挛等现象,最后衰竭而死。病理变化为肺、脾、肝肿大充血。此病的传播方式、临床症状和病理变化很类似于兔瘟,其肝脏损害的显微变化很类似于兔瘟肝病变和人类的病毒性肝炎,尤其是非甲非乙型肝炎,所以欧洲许多国家又把兔瘟和欧洲

棕色野兔综合症称之为传染性坏死性肝炎。棕色野兔综合症病原研究目前仍在进行中。

由于兔瘟和EBHS都具有较高的发病率和死亡率以及只感染成年易感兔，而40天以内的兔则很少受影响，致使一些学者认为兔瘟和EBHS是相同的疾病。Capucci et al L., (1991)最近研究证明，EBHS病毒类似于兔瘟病毒，是一种萆状病毒。

二、兔瘟的病原学

目前, 由于本病病毒还很难在体外细胞培养获得成功, 因此对本病病毒特性的研究仅能用病兔肝等组织抽提液进行。通过电镜观察到病毒颗粒为无囊膜, 大小为32~34nm, 正二十面体对称, 纯化病毒经紫外线扫描, 呈现典型核蛋白吸收曲线, 最大吸收值在260nm左右。病料抽提液回归兔可致易感家兔发病死亡, 引起典型兔瘟病理变化特征, 并能从人工感染家兔肝中回收到同样的病毒。由此证明本病为病毒性传染病。病原命名为兔瘟病毒(Rabbit Pest Viruse, 简写RPeV)或兔出血症病毒(Rabbit Haemorrhagic Disease Viruse, 简写RHDV)。

(一) 病毒形态与大小

1. 纯化 在进行病毒形态结构及颗粒大小、病毒抗原蛋白的分离提纯、病毒化学成分、病毒核酸结构以及病毒核酸分子的杂交等方面的研究时都需要一定量的高纯度的病毒样品, 因此, 病毒的提纯是病毒学研究的重要前提。根据本病毒的特性, 目前国内外报道纯化兔瘟病毒的方法多采用含毒量较高的病死肝组织, 有时也采用脾组织及血液作为病毒提纯材料。通过饱和硫酸铵沉淀法, 氯仿、正丁醇、异戊醇等有机溶剂抽提法, 聚乙二醇(PEG)法, 葡聚糖硫酸盐(Dextran Sulphate即DS)和聚乙二醇(PEG)两相溶剂间分配系数法以及人“O”型红细胞吸附法, 或用凝胶层析和免疫亲和

层析法，差速离心、等密度梯度法和平衡密度梯度法等超速离心分离方法等均可获得不同程度的纯化病毒液。

(1) 病毒材料：通常采用兔体传代肝脏毒株病料。将肝脏病料磨细，用灭菌Hanks液或灭菌生理盐水作1:10稀释，经3000r/min离心15分钟，取上清液，每ml加青霉素及链霉素各1000单位，于37℃温箱内作用30分钟，作为接种材料，或置-20℃冰箱保存备用。将接种材料经皮下或肌肉注射给青年、成年易感兔，每兔1ml。无菌收集攻毒后24~48小时死亡家兔的典型病变的肝脏病料，并用2%人“O”型红细胞作红细胞凝集(HA)效价测定。将每个血凝价在 $5 \times 10 \times 2^8$ HAU/g以上的肝脏病料集中于无菌瓶内，置-20℃以下冰箱冻结保存备用。

(2) 病毒粗提方法：从肝组织中粗提病毒有多种，现多采用下述两种方法。

1) 氯仿去脂—冻融交替处理—PEG反透析—Seph-rose 4B色谱法：该病毒能抵抗氯仿等有机溶剂和耐受冻融处理，采用氯仿除去病料中脂质，抽提过程中交替冻融，可除去大量杂蛋白，然后再用PEG沉淀法浓缩病毒，结果表明这一过程十分有效。将1份肝脏病料加入5份pH7.2(含2mM EDTA)0.01mol/L PBS缓冲液经高速组织捣碎机捣碎制成匀浆，于4℃浸出2小时，-20℃反复冻融3次，经3000r/min离心30分钟，吸取上清液，然后按下步骤进行。①加1/2体积的氯仿，充分混和振荡15分钟，经3000r/min离心30分钟，吸取上清液。必要时亦可适当重复获取清朗的病毒液。②清朗的病毒液滴加40% PEG(6000)和NaCl，使PEG最终含量为6~7%，NaCl为0.85%，边加边搅拌至完全溶解，于4℃作用6小时或过

夜, 经6000r/min离心30分钟, 离心所得的沉淀物用1/50体积的PBS悬浮后, 经2000r/min离心20分钟, 吸取上清液。③于上清液中加入1/2体积氯仿, 充分混匀静置20分钟, 待分层后经3000r/min离心30分钟, 吸取上层液体(上层为病毒液, 下层为氯仿, 中间为PEG及变性杂质)。如此反复1~2次。④将病毒液盛于透析袋内在高浓度PEG中经反透析浓缩至适当浓度1~4 mg/ml, 即为所获得的提纯病毒液, 分装-20℃保存。

2) 红细胞吸附和释放法: 病毒的红细胞凝集反应是病毒被红细胞表面糖蛋白吸附的现象。病毒在适宜的pH值和温度条件下能被人“O”型红细胞吸附, 而通过改变pH值或温度却能从红细胞上脱离下来, 因此常用此方法来提纯本病毒。①用淋巴细胞分层液分离净化人O型红细胞, 经3000r/min离心20分钟, 沉淀的红细胞以pH7.2 0.01mol/L PBS洗涤, 1000r/min 5分钟, 共3~5次, 最后所得的红细胞压积用PBS配成0.2%红细胞悬液。②1:5肝匀浆悬液-20℃冻融3次后, 经3000r/min离心30分钟吸取上清液。取2⁷HAu/0.1ml病毒上清液100ml, 加入0.2%红细胞悬液1ml, 在4~37℃下充分混匀, 作用15分钟后经1000r/min离心10分钟, 沉淀红细胞用PBS洗涤5次, 最后得到病毒红细胞沉淀物。上述每步骤吸出离心上清液, 如果血凝价在2⁷HAu以下即证明已经充分吸附。③在上述红细胞病毒沉淀物中加入10ml pH9.2的巴比妥缓冲液, 振荡作用30分钟释放病毒, 经2000r/min离心10分钟, 上清液以0.1mol/L盐酸生理盐水调节pH至7.0, 即得纯化的病毒液, 并可將病毒浓度提高10倍左右。为了便于红细胞贮存和使用方便, 可采用醛化的红细胞, 但在实际应用中常因红细胞发

生溶解，可改用制备红细胞膜吸附病毒法。红细胞膜制备方法是：用 0.01mol/L pH7.2 PBS（含NaCl 0.85%）将保存于Alsever氏液中的人O型红细胞洗涤3次。按红细胞压积配成50%悬液（V/V），在 -20°C 冰箱和 37°C 水浴冻融3次，经 10000r/min 4°C 下离心2小时去除上清液。用PBS洗涤3次，每次离心1小时，最后按原红细胞悬液体积的10%以PBS悬浮红细胞膜沉淀物， -20°C 冰箱内保存。

（3）纯化病毒制剂的提纯方法：将粗提的病毒液用Sepharese 4 B柱进行柱层析分离，柱高50cm，直径2.5cm，上样量约1~2ml，用 0.01mol/L pH7.2（含2mM EDTA）PBS缓冲液洗脱，经紫外波段扫描且测定 OD_{280} 吸收值，并分别测定HA价，分段收集血凝峰及其他各吸收峰。所在峰与血凝峰相对应各峰溶液分别经适当浓缩后，以1%醋酸铀负染5~10分钟，电镜观察其病毒颗粒的大小、均一性，并研究其形态结构特征，收集浓缩的血凝峰即为纯化的病毒制剂。

粗提的病毒液也可应用蔗糖密度梯度离心。将粗提病毒液首先铺于20%蔗糖柱上（20%蔗糖柱用无离子蒸馏水按重量比配成），经 40000r/min 2小时离心后，用少量PBS液悬浮沉淀物加入20~60%蔗糖线性梯度柱上（用PBS缓冲液配成66%饱和蔗糖液，然后再稀释成20、30、40、50、60% 5个浓度，由离心管底从高浓度到低浓度等体积加入，于 4°C 过夜，以达到人工制备的20~60%蔗糖线性梯度。也可用密度梯度仪制备20~60%的蔗糖柱）。经 26000r/min 3小时（Beckman SW₂₈）离心完毕，用密度梯度收集器结合部分自动蛋白收集仪进行收集。经HA试验和电镜观察检测病毒峰的位置，将所含病毒峰的蔗糖液用PBS液充分透析除

盐，透析后的样品在高浓度PEG中进行浓缩。浓缩样品经低速离心，去除已变性的蛋白质颗粒，即为纯化的病毒制剂。

也可采用亲和层析法纯化病毒，即用高纯度的兔瘟病毒抗体（抗兔瘟IgG）吸附在Sepharose 4 B柱上，用pH7.5含0.5mol/L NaCl、0.1mol/L PBS平衡层析柱把部分纯化的浓缩样品加到层析柱上，室温作用8小时后，用pH7.5 PBS洗脱杂蛋白，再用pH6.1 3 mol/L硫氰化钾洗脱，用以收集病毒液。浓缩后加样于25%蔗糖柱上，经40000r/min离心2小时，取沉淀样品于电镜下可见高纯度病毒子。国内外一些学者也采用氯化铯密度梯度离心用以进一步纯化病毒。但由于氯化铯昂贵，离心时间长，一般试验中较少应用。

（4）病毒制剂的检测：纯化的病毒制剂常用24孔塑料板按常规玻板凝集方法检测病毒液HA价。1 kg病料肝脏得到1ml纯化兔瘟病毒制剂，测得最终血凝价达 $2^{10} \sim 2^{10}$ ，用负染电镜方法观察病毒特征性形态、大小及背景清晰度等。纯化兔瘟病毒用已知的抗兔瘟高免血清作琼脂双扩散或对流免疫电泳，通过形成琼扩沉淀线，检测到特异性，而同步处理的正常肝组织均呈阴性；用紫外分光光度计在紫外波段扫描测定其核蛋白最大吸收值、 OD_{260} 与 OD_{280} 吸收比，纯化的兔瘟病毒经紫外线扫描，呈现典型核蛋白吸收曲线，最大吸收值在260nm左右；用高效液相色谱和凝胶电泳法检查其洗脱峰和条带，纯化病毒液仅能形成均质单一的蛋白质洗脱峰和蛋白质条带。

2. 形态和大小 病毒的形态特征是病毒鉴别的重要依据之一。王永坤等（1984）报道，用兔瘟肝脏传代病料粗提的病毒液加入等量抗血清作用后经18000r/min离心1小时，免