

Study on Clinical Efficacy of Chinese Medicine Assisted Treatment of Canine Distemper by ELISA

Yongxia Zhang, Jinfu Wang

Shanghai Vocational Technical College of Agriculture & Forestry, Shanghai
Email: zhangyx@shafc.edu.cn

Received: Jan. 2nd, 2018; accepted: Jan. 16th, 2018; published: Jan. 23rd, 2018

Abstract

Based on the study of assisted treatment of canine distemper with heat clearing Chinese medicine, In this study, 186 sickness dogs infected with CDV from 3 pet hospitals in Shanghai from 2014-2016 were randomly allocated to two groups. The first group 96 was cured by western medicine. The second group 90 was treated by Traditional Chinese Medicine (TCM) adjuvant treatment based on conventional western medicine. Randomly selecting 64 sickness dogs (32 in each group), the CDV antigens in peripheral blood serum before treatment and 7 days of post-treatment were detected by ELISA. The results showed that before treatment, the average viral content in the TCM adjuvant treatment group was higher than western medicine group. But after the t test, $P > 0.05$, the difference was not significant. The average virus content of 7 days of post-treatment in the TCM adjuvant treatment group was significantly lower than single use of western medicine group. By t test, $P < 0.01$, the difference was very significant. It showed that Chinese medicine assisted treatment can kill CDV effectively.

Keywords

ELISA, Chinese Medicine Assisted Therapy, Canine Distemper Virus

ELISA技术检测犬瘟热病的中药辅助治疗临床效果的研究

张永霞, 王金福

上海农林职业技术学院, 上海
Email: zhangyx@shafc.edu.cn

收稿日期: 2018年1月2日; 录用日期: 2018年1月16日; 发布日期: 2018年1月23日

摘要

在前期应用中药胶囊辅助治疗犬瘟热研究的基础之上, 本研究将上海三家宠物医院2014~2016年就诊的186只犬瘟热病犬随机分成两组, 第一组96只, 仅用西药治疗。第二组90只, 在西药治疗的基础上用课题组研发的中药胶囊进行辅助治疗。后随机选取64只(每组32只), 采集治疗前和治疗7天后的外周血清中的犬瘟热病毒抗原进行ELISA检测。结果显示: 用药前中药辅助治疗组的平均病毒含量高于单用西药组, 但经t检验后, $P > 0.05$, 差异不显著; 用药7天后中药辅助治疗组的平均病毒含量显著低于单用西药组, 经t检验, $P < 0.01$, 差异极显著, 表明中药辅助治疗能有效地杀灭犬瘟热病毒。

关键词

ELISA, 中药辅助治疗, 犬瘟热病毒

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

犬瘟热(canine distemper, CD)也称 Carre 氏病, 是由犬瘟热病毒感染犬和肉食目中许多动物的一种高度接触、致死性、传染性疾病。患病犬早期表现为双相热、急性鼻卡他, 后以严重的胃肠炎、支气管炎、肺炎及抽搐等神经症状为特征。个别病例可出现鼻和足垫的重度角化。该病的病死率可达 80% [1], 对宠物行业的影响巨大。犬瘟热的治疗情况一直不够理想, 临床上, 主要采用注射大剂量高免血清或犬瘟热病毒单克隆抗体, 如继发细菌感染, 可用阿奇霉素等抗生素治疗, 结合用强心、补液、解毒、退热等对症治疗的措施[2]。此前, 犬瘟热课题组已研发出治疗犬瘟热的清热类中药制剂的处方并制成中药胶囊, 而且进行了为期一年的宠物医院临床用药病例记录及统计, 最终研究发现, 课题组研发的清热类中药胶囊对犬瘟热患病犬有较好的辅助治疗效果。本研究通过 ELISA 技术对比应用中药治疗和不用中药辅助治疗的患病犬的外周血清中 CDV 含量的检测, 初步探索出中药对犬瘟热患犬辅助治疗有一定效果的机理, 为课题组研发出的中药胶囊大量应用于临床奠定理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 药品

中药胶囊中的中药生石膏、黄芩、黄连等均从上海余天成药店购买; 犬六联高免血清产自军医大学兽医学院生物制品研究中心; 犬瘟热单克隆抗体生产于北京世纪元亨动物防疫技术有限公司; 诊断试纸为韩国瑞必诊犬瘟快速诊断试纸。

2.1.2. 试剂

犬瘟热病毒(CDV)ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。

2.1.3. 仪器

北京普朗 DNM-9606 酶标分析仪。

2.1.4. 试验用犬

来自于上海三家宠物医院 2014~2016 年期间就诊的 186 只年龄在 3 个月至 12 个月的犬瘟热病犬。

2.2. 方法

2.2.1. 犬瘟热病的诊断

用犬瘟快速诊断试纸检测为阳性, 并结合出现发热、腹泻、流水样分泌性鼻液等一系列症状来确诊。

2.2.2. 病犬分组

将临床病例分为 2 组。第一组仅用西药治疗, 共 96 只, 即采用注射高免血清、免疫球蛋白、单克隆抗体和干扰素, 出现炎症加林可霉素等抗生素, 呕吐病例添加东莨菪碱。第二组是在第一组治疗的基础上, 用前期课题组研发的中药胶囊进行辅助治疗, 共 90 只。

2.2.3. 待测血清的制备

从上述 1.2.2 病犬中随机选取 64 只(每组中各选取 32 只), 取每只犬治疗前和治疗 7 天后犬的外周静脉血 2 ml, 1000 g 离心 20 min, 取上清液即可。

2.2.4. ELISA 检测 CDV 浓度

按照上海江莱生物科技有限公司的犬瘟热病毒(CDV)ELISA 试剂盒说明书进行检测: 从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出 96 孔板; 设置标准品孔, 标准品的浓度依次为 0、10、20、40、80、160 ng/ml, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L; 样品孔中加入待测样本 50 μ L, 空白孔不加; 除空白孔外, 标准品孔和样品孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的待测抗体 100 μ L, 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 60 min; 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液(350 μ L), 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次; 每孔加入 A、B 各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min; 每孔加入终止液 50 μ L, 15 min 内, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。以所测标准品的 OD 值为横坐标, 标准品的浓度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到直线回归方程, 将样品的 OD 值带入方程, 计算出样品的浓度。

2.2.5. 统计分析

所有数据利用 Excel 软件对两组用药前, 用药 7 天后的 CDV 浓度进行 t 检验。

3. 结果

3.1. ELISA 检测结果

3.1.1. 第一组

常规西药治疗组犬血清 CDV 浓度 ELISA 测定结果: 见表 1。

3.1.2. 第二组

中药辅助治疗组犬血清 CDV 浓度 ELISA 检测结果: 见表 2。

3.1.3. 两组治疗前后 CDV 含量对比结果

以治疗情况为横坐标, 以两组 CDV 浓度的平均值为纵坐标, 绘制柱状图见图 1。

从图中可见, 两组治疗 7 天后的血清病毒含量与治疗前相比均有明显下降。通过统计分析得出用药前第一组的平均病毒含量是 68.243, 第二组的平均病毒含量是 72.103, 用药前中药辅助治疗组的平均病

Table 1. Results of serum CDV concentration by ELISA determination in dogs treated with single use of western medicine group
表 1. 常规西药治疗组犬血清 CDV 浓度 ELISA 测定结果

病例号\CDV 浓度 ng/ml	治疗前	治疗 7 天
1	74.563	17.398
2	62.094	15.978
3	72.446	16.145
4	61.976	12.479
5	61.740	12.057
6	67.458	16.342
7	78.324	20.213
8	80.578	19.307
9	72.397	19.403
10	68.348	17.376
11	63.453	13.406
12	71.932	15.398
13	69.342	14.205
14	70.847	13.098
15	81.210	20.345
16	69.735	14.078
17	63.298	12.054
18	71.376	18.567
19	62.198	12.309
20	70.149	15.065
21	61.730	16.312
22	67.739	12.074
23	70.031	15.497
24	63.974	13.497
25	67.829	12.048
26	70.498	15.378
27	74.372	16.349
28	60.482	10.459
29	69.319	17.648
30	65.413	15.307
31	62.403	12.574
32	81.408	18.496
平均值	68.243	15.339

Table 2. Results of serum CDV concentration by ELISA determination in dogs treated with TCM adjuvant treatment group
表 2. 中药辅助治疗组犬血清 CDV 浓度 ELISA 检测结果

病例号\CDV 浓度 ng/ml	治疗前	治疗 7 天
1	88.634	9.14
2	73.087	7.092
3	76.203	6.042
4	80.583	7.306
5	69.245	10.567
6	70.134	8.048
7	68.307	6.397
8	69.398	8.94
9	89.230	5.305
10	94.302	9.391
11	101.387	11.302
12	60.234	5.389
13	72.045	8.207
14	84.024	9.357
15	88.497	7.176
16	69.987	6.302
17	65.578	4.398
18	79.307	7.94
19	80.297	9.002
20	94.309	10.392
21	62.510	3.287
22	74.392	6.493
23	60.367	4.397
24	69.987	3.297
25	74.301	8.004
26	83.047	9.987
27	82.098	9.94
28	62.976	3.309
29	61.583	2.198
30	71.593	5.603
31	89.302	9.403
32	65.104	4.197
平均值	72.103	7.119

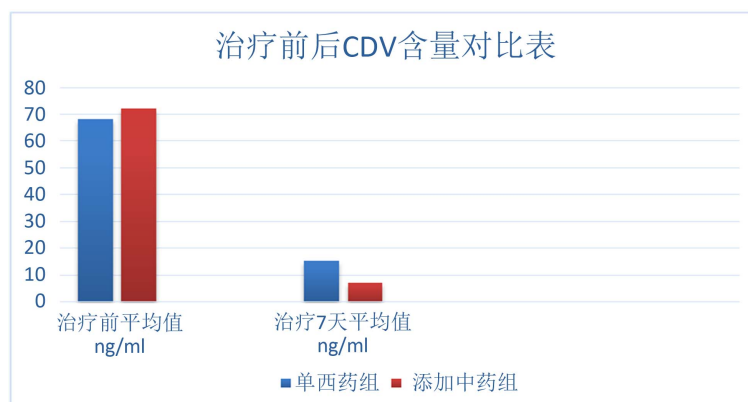


Figure 1. CDV content contrast table of two groups before and after treatment

图 1. 两组治疗前后 CDV 含量对比表

毒含量高于单用西药组,但经 t 检验后, $P > 0.05$, 差异不显著; 用药 7 天后第一组的平均病毒含量是 15.339, 第二组的平均病毒含量是 7.119, 经 t 检验后, $P < 0.01$, 差异极显著, 表明中药辅助治疗组的平均病毒含量显著低于单用西药组。

4. 讨论

1) 犬瘟热病的中药治疗方面只有高琳等少数人进行一定的研究[3] [4]。前期, 课题组研制成治疗犬瘟热的中药胶囊, 而且进行了为期一年的宠物医院临床用药情况的记录和统计, 研究表明, 课题组研发的治疗犬瘟热的中药胶囊对犬瘟热患犬有比较好的辅助治疗效果。本研究是通过 ELISA 技术检测对比应用中药治疗和未用中药辅助治疗的患犬的外周血血清中 CDV 含量, 结果表明中药辅助治疗 7 天后, 血清中 CDV 的含量明显低于单独使用西药组, 这说明中药辅助治疗能够有效杀灭病犬体内的犬瘟热病毒, 为在临床上大量应用此前课题组所研发的治疗犬瘟热的中药胶囊提供理论依据, 同时为犬瘟热的中药治疗提供了一定的参考。

2) 中医理论认为鱼腥草、生石膏、黄芩、大黄均性寒, 具有清热解毒的效果, 主治温热性疾病, 中医研究表明鱼腥草、黄芩、大黄等有明显的抗病毒作用[5] [6] [7], 犬瘟热病属于瘟热性疾病, 课题组研发的中药胶囊中含有桔梗、葶苈、黄芩、炙麻黄、知母、大黄、鱼腥草、杏仁、生石膏、柴胡等中药, 本项研究表明鱼腥草、黄芩、大黄等有一定的抵抗犬瘟热病毒的作用。

3) ELISA 技术将酶促反应的高效率和免疫反应的高度专一性有机的结合起来, 具有灵敏度高、特异性强、对仪器设备要求不高、成本低、操作简便快捷、无放射性污染、自动化程度高、试剂保存时间长等优点, 成为最具推广价值的诊断方法[8]。本研究采用的 ELISA 试剂盒, 最低检测浓度为 1.0 ng/ml, 板内变异系数小于 10%, 板间变异系数小于 15%, 适用于大批量的检测工作。

4) 本研究是将确诊犬瘟热的 186 只病犬, 分成两组: 即仅用西药治疗组 96 只和添加中药辅助治疗组 90 只; 后从中随机选取 64 只(每组中各选取 32 只)进行 ELISA 技术检测中药辅助治疗效果的研究, 符合统计的随机原则。

5. 结论

本研究通过 ELISA 技术对比检测应用中药治疗和未用中药辅助治疗的犬瘟热患犬的外周血血清中 CDV 含量, 结果表明中药辅助治疗 7 天后, 血清中 CDV 的含量明显低于单独使用西药组, 这说明中药辅助治疗能够有效杀灭病犬体内的犬瘟热病毒, 研究表明课题组研发的中药胶囊中的鱼腥草、黄芩、大黄等有一定的抵抗犬瘟热病毒的作用。本研究为在临床上大量应用此前课题组所研发的治疗犬瘟热的中药胶囊提供理论依据。

基金项目

上海农林职业技术学院科研资助项目(KY1-0000-14-07)。

参考文献 (References)

- [1] Yoshida, E., Iwatsuki, K., Miyashita, N., *et al.* (1998) Molecular Analysis of the Nucleocapsid Protein of Recent Isolates of Canine Distemper Virus in Japan. *Veterinary Microbiology*, **59**, 237-244. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00194-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00194-6)
- [2] 李清艳. 动物传染病学[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 235-237.
- [3] 高琳, 汪崇, 等. 中药疗法和干扰素对犬瘟热治疗效果的比较研究[J]. 现代畜牧兽医, 2012(5): 44-47.
- [4] 郭洋, 马晓威, 等. 清痘败毒饮联合西药对犬瘟热治疗效果的研究[J]. 当代畜牧, 2015(4Z): 86-90.
- [5] 姜茗宸, 汪受传, 徐秋月. 黄芩素抗病毒作用研究[J]. 吉林中医药, 2016, 36(7): 753-756.
- [6] 张薇, 卢芳国, 等. 鱼腥草中挥发油的提取分析及其抗菌抗病毒作用的研究[J]. 实用预防医学, 2008, 15(2): 312-316.
- [7] 杨宏博, 冯平, 李宝才. 大黄抗病毒作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 428-430.
- [8] Gooch, J.A., Depaolar, A., Kaysmer, C.A., *et al.* (2001) Evaluation of Two Direct Plating Methods Using Nonradio Active Probes for Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 721-724. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.721-724.2001>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8880, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: acrpvms@hanspub.org