·现场调查·

中国狂犬病毒感染分布状况调查

于金宁 李浩 唐青 陶晓燕 吴慧 莫兆军 张红 王定明 翁景清 沈蕊华 朱凤才 王显军 刘红 申辛欣 王束玫

【摘要】 目的 了解中国狂犬病不同流行区狂犬病毒的感染分布情况。方法 采集中国狂犬病高、中、低发病区动物脑组织以及疑似病例标本，利用直接免疫荧光法(DFA)和RT-PCR法检测狂犬病毒感染。结果 DFA法检测3007份犬脑组织标本，狂犬病毒阳性率为8.4%(254/3007)，再经RT-PCR法验证，狂犬病毒阳性率为30.7%(78/254)。DFA法检测93份伤人犬和猫的脑组织标本，狂犬病毒阳性率为67.7%(63/93)，再经RT-PCR检测全部为阳性。此外，调查区域的黑线姬鼠、鼬獾和疑似病例标本中也检测到狂犬病毒。不同省份以及同一省份不同发病地犬狂犬病毒感染率差异无统计学意义。结论 中国狂犬病流行区家养犬(猫)中存在较高的狂犬病毒感染率，野生动物中也有狂犬病毒感染。

【关键词】 狂犬病；犬；检测

Study on the status of infection and distribution of rabies virus in China *YU Jin-ning*[1,2], *LI Hao*[1], *TANG Qing*[1], *TAO Xiao-yan*[1], *WU Hui*[1,2], *MO Zhao-jun*[3], *ZHANG Hong*[4], *WANG Ding-ming*[5], *WENG Jing-qing*[6], *SHEN Rui-hua*[7], *ZHU Feng-cai*[8], *WANG Xian-jun*[9], *LIU Hong*[10], *SHEN Xin-xin*[1], *WANG Shu-mei*[2]. 1 *State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 100052, China; 2 *Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University*; 3 *Guangxi Center for Disease Control and Prevention*; 4 *Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention*; 5 *Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention*; 6 *Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention*; 7 *Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention*; 8 *Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention*; 9 *Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention*; 10 *Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention*
Corresponding author: *TANG Qing*, Email: qtang04@sina.com
This work was supported by grants from Public Service Sectors (Agriculture) Research Special Fund of China (No. 200803014) *and Major Program of National Natural Science Foundation of China* (No. 306300492)

【Abstract】 **Objective** To investigate the status of infection and distribution of rabies virus (RV) in different epidemic areas in China. **Methods** Brain specimens from animals and suspected patients were collected at the districts of high-, medium- and low incidence rates of human rabies and detected by both direct Immunofluorescence assay (DFA) and RT-PCR. **Results** 254 of 3007 specimens of dog brains showed RV positive by DFA (positive rate of 8.4%). Among these 254 samples, 78 showed positive (positive rate of 30.7%) by RT-PCR. 93 specimens from dogs and cats that had attacked human beings, 63 of them showed positive by DFA (positive rate of 67.7%) and all of them were also positive by RT-PCR. In addition, RV could also be detected in Apodemus agrarius, ferret badger, and suspected patients specimens from the districts under survey. There was no statistical difference between the infection rates of RV in different provinces and regions with different incidence of rabies. **Conclusion** There might be a relatively high infection rate of RV among the domestic dogs/cats in the endemic areas in China. Wild animals might have been infected with RV in the districts under survey.

【Key words】 Rabies; Dogs; Detection

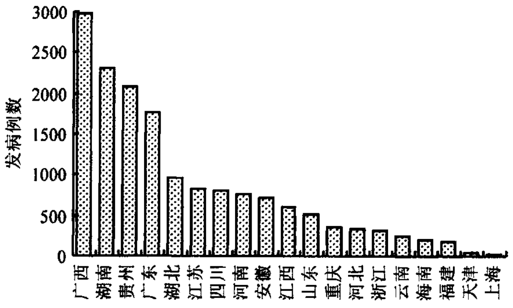
DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.011
基金项目：公益性行业(农业)科研专项基金(200803014)；国家自然科学基金(306300492)
作者单位：100052 北京，中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒基因工程国家重点实验室(于金宁、李浩、唐青、陶晓燕、吴慧、申辛欣)；山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所(于金宁、吴慧、王束玫)；广西壮族自治区疾病预防控制中心(莫兆军)；湖南省疾病预防控制中心(张红)；贵州省疾病预防控制中心(王定明)；浙江省疾病预防控制中心(翁景清)；上海市疾病预防控制中心(沈蕊华)；江苏省疾病预防控制中心(朱凤才)；山东省疾病预防控制中心(王显军)；安徽省疾病预防控制中心(刘红)
于金宁、李浩同为第一作者
通信作者：唐青，Email: qtang04@sina.com

狂犬病在中国持续存在,特别是自2003年以来疫情上升迅速,疫区范围不断扩大[1],已成为严重的公共卫生问题。其中西南部分地区狂犬病的流行尤为严重,华东地区疫情相对较轻。流行病学监测数据显示:家犬是中国狂犬病毒主要的储存宿主和传染源并引起人狂犬病病例发生[2]。

本研究对2003－2008年采集自中国狂犬病不同流行区宿主动物的脑组织标本和疑似病例的体液及脑组织标本,通过直接免疫荧光试验(DFA)和RT-PCR进行实验室检测,以了解狂犬病毒感染分布情况。

材料与方法

1. 疫情资料:狂犬病疫情资料来自于中国疾病预防控制中心疾病监测信息系统(图1)。



注:发病数<18例的省份未列出

图1 2003－2008年中国19个省份狂犬病流行情况

2. 采样点的确定和标本的采集:本研究选择广西、湖南、贵州和浙江作为采样省份,按照狂犬病的发病率将各个省的地级市分为高发病区和中低发病区,每一类中随机抽取1～2地级市,每个市内再随机抽取一定数量的区(县)作为标本采集点,于2005－2008年采集当地狗肉馆收集后用于销售的家犬脑组织标本,同时在浙江省收集野生动物鼬獾、跳麂和野猪以及黑线姬鼠的脑组织标本。此外于2003－2008年收集由浙江、山东、江苏、安徽、云南和上海等省(市)疾病预防控制中心(CDC)送检的伤人动物(犬和猫)的脑组织和疑似病例脑组织、脑脊液或唾液标本。

3. DFA法检测狂犬病毒抗原:在三级生物安全实验室生物安全柜内,每一份脑组织标本依次取海马回、大脑、中脑和小脑的剖面均匀印片(载玻片提前用无水乙醇浸泡处理),室温干燥后4 ℃预冷的丙酮固定30 min,用荧光素标记的抗狂犬病毒核衣壳单克隆抗体(美国Chemicon公司)杂交,37 ℃湿盒孵育30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)振摇洗2次,蒸馏水振摇洗1次,吹干,90%甘油(PBS稀释)封片,荧光显微镜观察结果[3]。如果在荧光显微镜下观察到亮黄绿色的点状荧光,检测结果判定为阳性,否则为阴性。

4. RT-PCR法检测狂犬病毒核酸:DFA初检阳性和疑似阳性的标本以及患者体液标本利用RT-PCR对狂犬病毒特异性核蛋白基因片段进行检测。用TRIzol提取脑组织细胞及病毒总RNA。以提取的RNA为底物,用随机引物pd(N)6(日本TaKaRa公司),反转录反应管(Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads)制备cDNA文库,以反转录得到的cDNA文库为模板,进行巢式PCR反应。巢式PCR反应试剂为Go Taq Green Mix(美国Promega公司),引物序列及位置见表1。第一次PCR采用外引物:N127(＋)和N8m(－),循环条件为:94 ℃预变性3 min; 94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸100 s,共35个循环;72 ℃延伸10 min。以第一次PCR的产物作为模板,采用内引物N577(＋)和N829(－)进行第二次PCR,反应条件为:94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸40 s,共35个循环;72 ℃延伸10 min[3]。巢式PCR的产物长度约为250 bp,用2%的琼脂糖(德国Sigma公司)凝胶电泳显示扩增结果。

表1 PCR反应引物

引物名称	序列(5'～3')	引物位置
N127(+)	ATGTAACACCTCTACAATGG	55～74
N8m(－)	CAGTCTCYTCNGCCATCT	1570～1587
N577(+)	AAGATGTGYGCYAAYTGGAG	644～663
N829(－)	GCCCTGGTTCGAACATTCT	881～899

注:引物位置以PV(M13215)为准

5. 统计学分析:为了解不同地区家犬感染状况的差异,利用SPSS 13.0软件对各地区内高、中低发病区标本检测的阳性率进行χ^2检验。

结　　果

1. 标本采集:本调查共收集标本3255份,其中采集动物脑组织标本3148份,包括犬(3007份)、黑线姬鼠(57份)、以及野生动物鼬獾(48份)、跳麂(20份)和野猪(16份)。送检的伤人犬和猫脑组织标本分别为84份和9份;疑似病例标本共14份,包括云南和湖南省各2份脑组织标本,山东省8份脑脊液标本和2份唾液标本。各省采集的犬脑组织标本及送检的伤人动物脑组织(犬和猫)标本检测结果见表2和表3。

表2 各省份采集的犬脑组织标本利用DFA及RT-PCR检测狂犬病毒的结果

省份	标本数量	DFA检测阳性例数	RT-PCR检测阳性例数
湖南	681	31	18(2.6)
广西	1352	160	29(2.1)
贵州	854	46	27(3.2)
浙江	120	17	4(3.3)
合计	3007	254	78(2.6)

注:括号外为阳性例数,括号内为百分比(%)

表3 各省份送检的伤人动物脑组织标本利用DFA及RT-PCR检测狂犬病毒的结果

省份	标本数量	DFA检测阳性例数	RT-PCR检测阳性例数
上海	32	32	32(100.0)
江苏	39	10	10(25.6)
浙江	6	6	6(100.0)
安徽	3	3	3(100.0)
山东	13	12	12(92.3)
合计	93	63	63(67.7)

注:江苏39份标本中9份是猫脑组织标本;括号外为阳性例数,括号内为百分比(%)

2. 标本的检测:对收集的标本进行DFA检测,采集的市售犬脑组织标本DFA初筛阳性为254份,78份经RT-PCR确认为阳性,阳性率为2.6%(表2)。送检的伤人动物脑组织标本DFA初筛阳性为63份,经RT-PCR确认阳性为63份,阳性率为67.7%(表3)。疑似病例的4份脑组织标本全部确认为阳性,体液标本中仅1份唾液标本确认为阳性。鼬獾和黑线姬鼠各确认阳性标本3份和1份,野猪、麂鹿未检测到狂犬病毒。

3. 调查地区狂犬病发病率的比较:对湖南、广西、贵州、浙江四省采集的犬脑标本RT-PCR的阳性率进行χ^2检验表明,四个省份标本的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=3.349, P=0.341$)。同时对湖南、广西和贵州三个省(区)内高发区与低发区犬脑标本RT-PCR检测,阳性率分别进行的χ^2检验表明,在各省区高、低发病区之间差异无统计学意义(表4)。

表4 狂犬病高发区与中低发区标本阳性率的χ^2检验结果

省份	类型	标本数	RT-PCR检测阳性例数	χ^2值	P值
湖南	高发	313	8(2.5)	0.017	0.896
	中低发	368	10(2.7)		
广西	高发	517	15(2.9)	2.282	0.131
	中低发	835	14(1.7)		
贵州	高发	427	16(3.7)	0.956	0.328
	中低发	427	11(2.6)		

讨　论

2003—2008年中国狂犬病疫情持续高发,年平均报告病例数约为2700例。在此期间广西、湖南和贵州三省(区)疫情最为严重,同期报告病例总数分别为2983、2361和2070例,位居全国前三位,年均发病率分别为0.999/10万、0.589/10万和0.887/10万,是中国狂犬病的高发病区;江苏、安徽、山东、云南和浙江省疫情相对较轻,各省报告病例总数311例到824例之间,年均发病率在0.095/10万～0.230/10万之间属于中发病区;而低发病区的上海市在2003—2008年发病总数仅19例,发病率为0.023/10万(各省2003—2008年狂犬病发病数排序见图1)。监测资料显示犬是主要的传染源和储存宿主[2],犬感染狂犬病毒一直备受关注。熊成龙等[4]对河南地区的121份家犬标本利用免疫荧光实验(IFA)、小鼠颅内接种实验(MIT)和RT-PCR法检测,阳性率为7.4%;刘浩等[5]在湖南湘西地区利用IFA和RT-PCR法对168份犬脑组织标本进行检测,IFA和RT-PCR均为阳性的标本占10.5%。上述调查主要集中在局部地区的家犬,有一定的局限性,为准确了解目前中国不同流行区狂犬病宿主动物的感染情况,本研究对收集自9省(市)的包括家犬、野生动物和疑似病例在内的标本采用两种方法进行实验室检测。DFA方法是狂犬病毒实验室诊断精确、快速和可靠的方法,是世界卫生组织推荐的狂犬病毒抗原检测的金标准[6];RT-PCR因其更高的特异性现已应用于狂犬病检测的研究[3]。本调查首先用DFA对样本进行筛查,将阳性标本和疑似阳性标本筛出,再用RT-PCR法进行复核。因此可以保证标本检测的敏感性和特异性,检测结果更加真实可靠。

本调查显示采集的市售家犬狂犬病毒的总体感染率为2.6%,在所有采集地点中仅有贵州省六盘水市没有检出阳性标本。本调查中采集的家犬由于没有明显的异常行为可以认定为狂犬或可疑犬,容易使人们疏于对这类动物的防范,因此其伤人所致狂犬病感染的问题不容忽视。目前中国犬只数量在8000万至2亿之间[7],犬狂犬病毒免疫覆盖率低,尤其是在犬养殖量巨大的农村地区不足10%[4],难以形成有效的免疫屏障。因此应提高家犬的免疫率以有效的控制狂犬病疫情。伤人动物狂犬病毒的检出率67.7%,远高于采集的家犬的感染率,提示动物咬伤后应进行及时的暴露后处理。

在浙江省采集的黑线姬鼠和鼬獾中也检测出狂犬病毒阳性标本,这提示家养动物和野生动物在传播狂犬病方面的潜在威胁。虽然犬一直是中国狂犬病毒的主要传染源和储存宿主,但是近年来家养动

物以及野生动物致人感染狂犬病的报道逐步增多。早在1994年的浙江省就有鼬獾相关的人狂犬病例的报道，1994－1995年、2002－2004年以及2007－2008年在鼬獾分布地区——中国的浙江和江西省的局部地区，先后出现3次鼬獾狂犬病的流行[8]。中国已从野生动物狼、貂、熊、野猪、鹿、兔和家畜牛、羊和马中检测出狂犬病毒[9]。近年来随着人们对野生环境的大力开发利用，野生动物与家养动物及人类的接触愈来愈频繁，因此极易造成狂犬病毒在野生动物与家养动物间的传播扩散，对人类构成的威胁逐渐增大。鉴于野生动物狂犬病的监测在中国还是一个空白，这就要求我们加强对野生动物感染状况监测，以评估野生动物在维持狂犬病毒循环中的作用以及对野生动物进行免疫的必要性。

不同发病区采集的市售家犬标本检测的阳性率2.1%～3.3%，差异无统计学意义，同时各省(区)内高发区与中低发区的阳性率也无统计学意义。这可能是由于采样数量和地点的限制，采集的标本无法完全代表调查地区的犬感染状况；同时狂犬病发病率的高低受多种因素的综合作用，比如暴露后是否进行及时的治疗以及治疗是否规范等[5]。而这些因素又受到当地的经济状况、人们对狂犬病知识的知晓程度等因素的影响。因此应继续对中国更广地域范围内的不同宿主动物的感染状况进行调查研究，同时需要综合流行病学、社会学的研究方法进行研究，可以为狂犬病的防治提供更可靠的科学依据。

参 考 文 献

[1] Tang Q, Li H. Epidemic situation and related factors analyses of rabies in China. Chin J Epidemiol, 2005, 26(3): 223-224. (in Chinese)
唐青，李浩. 中国狂犬病流行近况及相关因素分析. 中华流行病学杂志，2005, 26(3): 223-224.

[2] Song M, Tang Q, Xu Z, et al. Analysis on the factors related to rabies epidemic in China, in 2005. Chin J Epidemiol, 2006, 27(11): 956-959. (in Chinese)
宋淼，唐青，徐真，等. 中国2005年狂犬病流行相关因素分析. 中华流行病学杂志，2006, 27(11): 956-959.

[3] Li H, Tao XY, Tang Q, et al. Survey and anslysis of infection rate of dog rabies in the regions with high incidence of human rabies. Chin J Exp Clin Virol, 2008, 22(3): 161-164. (in Chinese)
李浩，陶晓燕，唐青，等. 狂犬病高发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.

[4] Xiong CL, Shao ZJ, Jiang QW, et al. Survey of rabies virus carried by domestic dogs in different endemic areas rabies in China. China Trop Med, 2008, 8(3): 14-15. (in Chinese)
熊成龙，邵中军，姜庆五，等. 不同疫区家犬携带狂犬病毒的比较研究. 中国热带医学，2008, 8(3): 14-15.

[5] Liu H, Jiang Y, Wang LL, et al. Investigation on rabies virus carried by dogs with healthy appearance in Xiangxi district Hunan province. Chin J Animal Health Inspec, 2007, 24(9): 17-19. (in Chinese)
刘浩，江禹，王莉莉，等. 湖南湘西地区外观健康犬携带狂犬病病毒的调查研究. 中国动物检疫，2007, 24(9): 17-19.

[6] WHO. Export Committee on Rabies. Geneva, WHO, 1992.

[7] Tang X, Luo M, Zhang S, et al. Pivotal role of dogs in rabies transmission, China. Emerg Infect Dis, 2005, 11(12): 1970-1972.

[8] Zhang SF, Tang Q, Wu XF, et al. Rabies in Ferret Badgers, Southeastern China. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6): 946-949.

[9] Yu YX. Rabies and rabies vaccine. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 2009: 172-187. (in Chinese)
俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗. 北京：中国医药科技出版社，2009: 172-187.

(收稿日期：2009-11-05)
(本文编辑：万玉立)

·征订启事·

本刊2010年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊，2004－2008年被中国科学技术信息研究所定为“百种中国杰出学术期刊”，并被美国国立图书馆医学文献联机数据库(Medline)和美国化学文摘社(CAS)收录。读者对象为医学(预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学)和健康相关学科的科研、疾病控制、临床、管理和教学工作者。刊稿范畴：重点或新发传染病现场调查与控制；慢性病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价；伤害的流行病学与防控；环境污染与健康；食品安全与食源性疾病；临床流行病学和循证医学；流动人口与疾病；行为心理障碍与疾病；分子和遗传流行病学与疾病控制；我国西部地区重点疾病的调查与控制；理论流行病学；流行病学教学与实践等。本刊设有述评、论著(原著)、现场调查、监测、实验室研究、临床研究、疾病控制、基础理论与方法、国家课题总结、国外杂志华人研究导读(科海拾贝)、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

全年出版12期，每期定价9元(含邮费)，全年108元，由全国各地邮局统一订阅，邮发代号：2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址：北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部，邮编：102206，电话(传真)：010-61739449，58900730，Email：lxbonly@public3.bta.net.cn　欢迎广大读者踊跃投稿(http://www.cma.org.cn)，积极订阅。

本刊编辑部