

· 现场调查 ·

湖南省武岗市洞口县狂犬病流行病学研究

张永振 熊成龙 邹洋 李明慧 肖奇友 王祥迪 唐茂晟 杨安保
朱学识 陈碧云 Zhen FU

【摘要】 目的 分析 2003-2004 年间在湖南省武岗市与洞口县发生的狂犬病并探讨局部地区流行的因素。方法 对狂犬病进行个案调查,用直接免疫荧光法检测犬脑组织中的狂犬病毒抗原,用 RT-PCR 法扩增 N 基因片段,测定核苷酸序列并构建系统发生树进行遗传特征分析。结果 自 1991-2002 年武岗市与洞口县仅各报告 1 例人狂犬病,但 2003-2004 年间,分别报告 30 例人狂犬病。62 例狂犬病患者中 61 例被犬所伤,1 例被猫所伤。在有完整记录的 50 例患者中,平均潜伏期为 44.18 天。其中 7 例(14%)狂犬病患者的潜伏期 ≤ 15 天,16 例(32%)潜伏期 ≤ 20 天。在疫点周围采集的 99 只犬脑组织中,13 只犬脑组织狂犬病毒抗原阳性,阳性率为 13.13%。将 Wg13 与 Dk13 株病毒的部分 N 基因核苷酸序列与已报道中国病毒株比较,发现 2 株病毒与广西及安徽的毒株有最高的同源性,构建的系统发生树也分在同一分支。用全 N 基因核苷酸序列分析发现,Wg13 与 Dk13 毒株全为 I 型狂犬病毒,2 株病毒之间的同源性为 99.4% 以上。比较分析 2 株病毒 N 基因编码的氨基酸序列,发现包括第 IV 抗原位点区在内的多个氨基酸位点发生了氨基酸的替代。结论 引起武岗市与洞口县的狂犬病流行的病毒不是新型狂犬病毒,犬饲养量大与病毒携带率高是狂犬病暴发的直接原因。

【关键词】 狂犬病; 流行特征; N 基因; 遗传特征

An epidemiological study on rabies in Wugang and Dongkou counties, Hunan ZHANG Yong-zhen*, XIONG Cheng-long, ZOU Yang, LI Ming-hui, XIAO Qi-you, WANG Xiang-di, TANG Mao-sheng, YANG An-bao, ZHU Xue-shi, CHEN Bi-yun, Zhen FU. *National Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To study the human rabies cases occurred in 2003 and 2004 in Wugang and Dongkou areas in Hunan province, and to explore the possible factors causing the epidemics. **Methods** Each case of rabies was investigated. Brains of the canines were collected, and direct immunofluorescence assay was used to detect rabies virus antigen in the brains. N gene was amplified by RT-PCR, and then sequenced. The phylogenetic trees were constructed to study the genetic characters of rabies virus. **Results** From 1991 to 2002, only one of the human rabies case was occurred in the area of Wugang or Dongkou but 30 cases of human rabies were reported in the same areas in 2003-2004. Among 62 cases, 61 were attributed to dog bites, and one was reported to be bitten by a cat. Median incubation period was 44.18 days for the 50 cases with clear history records. However, it was noticeable that 7(14%) and 16(32%) of the 50 cases developed the disease within 15 days and 20 days after the exposure. A total of 99 dog brains were examined for rabies viral antigen by IFA, and 13(13.13%) showed positive. Data from the sequences of partial N gene on 2 isolates of the rabies virus showed that they had high homology with the known isolates from Guangxi and Anhui. The phylogenetic tree constructed with the entire N gene sequence showed the two isolates were rabies virus and the homology of nucleotides sequences between the two isolates were 99.4%. They also had 86.1%-89.1% nucleotide sequence identity with vaccine strains, CTN, aG and PV. When comparing the deduced amino acid sequences of the two isolates, some amino acid residues, including the residues in the antigenic site IV, were substituted. **Conclusion** The virus caused the outbreak in Wugang and Dongkou did not seem to be a new type of rabies virus. The increasing number of dogs and the high rate of dogs carrying the virus might be responsible for the rabies outbreaks.

【Key words】 Rabies; Epidemic character; N gene; Genetic characters

基金项目:国家“十五”科技攻关资助项目(2003BA712A08-02,2004BA718B03)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(张永振、熊成龙、邹洋、李明慧);湖南省疾病预防控制中心(肖奇友、陈碧云);武岗市疾病预防控制中心(王祥迪、唐茂晟);洞口县疾病预防控制中心(杨安保、朱学识); Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA(Zhen FU)

狂犬病是狂犬病毒引起的人兽共患传染病,主要经犬类等动物传播给人类^[1,2]。20 世纪 80 年代中国狂犬病流行严重,90 年代一度得到有效控制;然而近年来,我国狂犬病不但出现了第三次流行高峰,而且出现了一些新的流行特征^[3,4],严重威胁着人民的生命安全^[5]。自 1991-2002 的 8 年间,湖南省武岗市与洞口县仅分别报告 1 例人间狂犬病病例,但近两年出现流行。为此,我们对洞口县与武岗市进行了现场流行病学调查,对其流行特征、流行因素,以及当地流行的狂犬病毒遗传特征进行了分析。

资料与方法

1. 流行病学调查:病例资料来自 2003-2004 年发生在湖南省武岗市和洞口县的狂犬病病例。依据国家标准 GB/7014-1997“狂犬病诊断标准及处理原则”,病例的确诊主要根据临床症状和流行病学动物接触咬伤史。接到狂犬病病例报告后,武岗市与洞口县疾病预防控制中心(疾控中心)对每一病例进行个案调查,中国疾控中心传染病所与湖南省疾控中心进行了复核调查。周边地区疫情资料由省疾控中心疫情室提供。在疫点地区捕杀犬只,取头部,开颅后采集全部脑组织标本,-70℃ 保存备用。

2. 狂犬病毒抗原检测:采用直接免疫荧光法检测犬脑组织中的狂犬病毒抗原。剪取部分犬脑海马回组织,冷冻切片,加丙酮固定于载玻片上,用 PBS 及蒸馏水先后漂洗并吹干后备检。加抗狂犬病毒免疫荧光抗体,于 37℃ 温育 1 h,用 PBS 漂洗吹干后,荧光显微镜下镜检。抗狂犬病毒免疫荧光抗体购自美国 CENTOCOR 公司。直接免疫荧光检测阳性的标本用 RT-PCR 法扩增 N 基因上 400 bp 长的特异片段进行复核,RT-PCR 的方法及所用的引物参照文献[6]。

3. 病毒 RNA 的提取:参照 GIBCO/BRL 公司的 TRIzol RNA 提取试剂使用说明书进行。取 0.1 g 阳性脑组织,加入 1000 μ l TRIzol 试剂,充分研磨后-70℃ 过夜。取出后加氯仿 200 μ l,混匀静置 5 min,4℃ 15 000 r/min 离心 5 min。取上清,加等体积的异丙醇,于-20℃ 放置 10 min,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加 80% 乙醇 1000 μ l,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 20 μ l 无 RNA 酶的去离子水溶解,-70℃ 保存备用。

4. RT-PCR 及其产物的纯化和回收:用 RHN1 引物反转录 N 基因片段的 cDNA,用两对引物扩增

全 N 基因片段。引物的序列出处见表 1。引物由大连宝生物技术有限公司合成。

表 1 测序用引物

引物	引物序列(5'→3')	位置(bp)	参考文献
RHN1	ACAGACAGCGTCAATTGCAAAGC(+)	28~50	[7]
N8	GAGATGGCTGAAGAGACT(-)	1568~1584	[6]
N7	ATGTACCACCTCTACAATGG(+)	55~74	[6]
RHN3	CTAGGATGACAAAGATTTTGCTC(-)	1516~1539	[8]

使用 RHN1 引物及 AMV 逆转录酶于 42℃ 90 min 逆转录合成 cDNA。用 Taq 酶与 RHN1 与 N8 为外引物及 N7 与 RHN3 为内引物扩增 N 基因片段。PCR 的反应条件:94℃ 变性 5 min,进入循环 94℃ 1 min,37℃ 1 min,72℃ 3 min,扩增 10 个循环,然后是 94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 3 min,20 个循环。第二次 PCR 的反应条件是:94℃ 变性 5 min,进入循环 94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 1.5 min,共扩增 20 个循环。

上述 PCR 扩增产物经用凝胶回收试剂盒回收。方法简述如下:在紫外灯下切下含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶,用纸巾吸尽凝胶表面液体,切下凝胶条带并切碎,按 400 μ l/100 mg 胶重量加入结合缓冲液。于 56℃ 完全溶化凝胶。将融化的胶溶液转移到 UNIQ-10 柱中,室温放置 2 min。于室温离心 1 min(4800 r/min)。取下 UNIQ-10 柱,弃废液,将 UNIQ-10 柱放回收集管中,加入 500 μ l 洗液,10 000 r/min 于 4℃ 离心 30 s,该步骤重复一次后;将 UNIQ-10 柱置于新的 1.5 ml 离心管上,加入 30 μ l 洗液于柱膜中心,室温静置 2 min 后,10 000 r/min 离心 1 min,收集 DNA 置-20℃ 保存备用。

5. 克隆和测序:将上述纯化的 N 基因片段克隆到 pMD18-T 载体,连接后的产物转化到 JM109 感受态细胞中。挑选阳性克隆,送大连宝生物技术有限公司进行序列测定。

6. 系统发生分析:文件转换使用 DNASTAR。使用 MEGA3(3.1)软件以邻位相连法(NJ)构建系统发生树。分析采用 500 个多序列组(replicates)。研究中用于比较分析的其他狂犬病毒 N 基因序列来自于 GenBank(表 2),中国株的部分 N 基因核苷酸序列(1094~1384)参照文献[9]。

结 果

1. 武岗市与洞口县狂犬病的流行情况:武岗市

与洞口县相邻,地处湖南省西南部,隶属于邵阳市,总人口分别为 73.10 万人、78.75 万人。自 1991-2002 年间,武岗市于 1998 年报告 1 例狂犬病,洞口县于 2002 年报告 1 例狂犬病。但 2003 年武岗市与洞口县分别报告狂犬病 7 例与 22 例,发病率分别为 0.096/10 万与 0.279/10 万;2004 年分别报告狂犬病 23 例与 8 例,发病率分别为 0.315/10 万与 0.102/10 万。

表2 研究中的相关比较毒株及来源

毒株	宿主	国家	序列号
CTN	犬	中国	AF367863
SRV9	-	中国	AF499686
3ag	犬	中国	L04522
8615POL	棕蝠	波兰	U22844
86132AS	人	南非	U22848
9007FIN	人	芬兰	U22846
Ballina	<i>Pteropid alecto</i>	澳大利亚	AF006497
Insectivorous bat	食虫蝙蝠	加拿大	AF351850
BBCAN	大棕蝠	加拿大	AF351833
Raccoon	浣熊	加拿大	U27221
SC97-01	犬	印度尼西亚	AB154233
SW01-11	犬	印度尼西亚	AB154239
I294	犬	斯里兰卡	AY138549
SRL1077	獐	斯里兰卡	AB041967
India	犬	印度	AF374721
9218TCH	犬	乍得	U22644
1500AFS	黄鼬	南非	U22628
RVHK	人	俄罗斯	AY352462
483a	北极狐	俄罗斯	AY352487
RV61	人	印度	AY352493
Komatsugawa	犬	日本	AY352494
V590	犬	墨西哥	AY854589
V684	臭鼬	墨西哥	AY854593
CVS	-	法国	AF406696
ERAN	-	美国	AF406695
SAD B19	-	-	M31046
PV	-	法国	X03673
92RABL00867	臭鼬	加拿大	AF344306
RC-HL	-	日本	D16331
Eth2003	埃塞俄比亚狼	埃塞俄比亚	AY500827
RV308	人	俄罗斯	AY352497
8619NGA	黄果蝠	尼日利亚	U22842
MOK	猫	赞比亚	U22843

在西北部与洞口县接壤的洪江市与溆浦县自 1991-2003 年无疫情,但 2004 年分别报告 3 例与 18 例;会同县仅于 1991-1992 年间报告 3 例,随后至 2004 年无病例报告。自 1991-2003 年,在南部与武岗市与洞口县接壤的城步县无疫情,绥宁县仅于 1991 年报告 1 例狂犬病,但两县 2004 年分别报告 2 例与 3 例狂犬病。然而自 1991-2001 年期间,

在东南部与武岗市接壤的邵阳县虽然无病例,新宁县仅于 1991 年报告 1 例狂犬病,但 2002-2004 年两县均有疫情报告,邵阳县共报告 48 例,新宁县报告 27 例;在北部相接壤的隆回县于 1992-1993 年各报告 1 例狂犬病,2002-2004 年报告 20 例狂犬病。另外,上述疫区的病例在公路沿线分布较多。

2. 流行病学特征:

(1)患者的年龄与职业分布:2003 与 2004 年报告的有清楚个案记录的 50 例狂犬病患者中,男性 35 例,女性 15 例。年龄分布从 2~78 岁。其中:≤14 岁少年儿童占 32%,大部分患者的年龄在 15~64 岁之间,占 58%,≥65 岁占 10%。从患者职业分布看,33 例为农民,有 9 例散居儿童和 8 例学生,占 34%。

(2)暴露程度:50 例狂犬病患者中,咬伤部位在头面部的有 9 例,在上肢的有 19 例,在下肢的有 17 例,多处混合伤的有 5 例(表 3)。39 例为Ⅲ度暴露(单处或多处破皮肤的咬伤或抓伤,黏膜被舔或唾液污染),占 78%;11 例为Ⅱ度暴露(轻咬裸露的皮肤,轻度的抓伤或擦伤但未出血,舔到有破口的皮肤),占 22%。

表3 狂犬病患者不同部位暴露后的潜伏期

潜伏期 (d)	头面部	上肢	下肢	混合*	合计
≤15	2(22.22)	3(15.79)	-	2(40.00)	7(14.00)
16-	7(77.78)	3(15.79)	7(41.18)	-	17(34.00)
31-	-	6(31.58)	5(29.41)	2(40.00)	13(26.00)
61-	-	5(26.32)	1(5.89)	1(20.00)	7(14.00)
≥91	-	2(10.52)	4(23.51)	-	6(12.00)
合计	9(100.00)	19(100.00)	17(100.00)	5(100.00)	50(100.00)

注:括号外数据为患者例数,括号内数据为构成比(%);* 包括头面部、上肢、下肢等两处或以上

(3)暴露后的预防处理:50 例狂犬病患者中,39 例未进行任何的伤口处理,11 例仅进行简单的清洗。19 例接种疫苗,50 例均未注射抗狂犬病毒血清或人抗狂犬病病毒免疫球蛋白。在接种疫苗的 19 例中,12 例在暴露后能及时接种疫苗,其余的 7 例均未及时接种疫苗,甚至 1 例患者在暴露后的第 53 天才接种疫苗。

(4)潜伏期:50 例患者中潜伏期最长的为 120 天,最短为 3 天(为 3 岁男性儿童,头面部多处被深度咬伤),平均为 44.18 天。不同暴露部位的潜伏期见表 3。从表 3 可见 7 例狂犬病患者的潜伏期≤15 天(14%),24 例的潜伏期≤30 天(48%),潜伏期>

30 天且 ≤90 天狂犬病患者共 20 例(40%)。头面部受伤患者均在暴露后 30 天内发病,潜伏期明显低于其他部位。另外,值得注意的是潜伏期 ≤20 天的病例有 16 例,占 32%。50 例患者的病例的病程最长的为 15 天,短的 2 天,平均为 4.7 天。

3. 犬的饲养量、免疫率及病毒抗原检测:62 例狂犬病患者中,被犬伤害的有 61 例(98%),被猫伤害的有 1 例。调查显示,近年来在武岗市与洞口县农村地区犬饲养量大,几乎 70% 的家庭饲养犬 1 条以上,饲养方式以放养为主,很少栓养,主要用于看家护院。城镇犬饲养量小,且主要为栓养。不完全统计,武岗市与洞口县的犬饲养量均在 10 万只以上。但犬的免疫率很低,不足 2%。在引起 61 例人狂犬病的犬中,均没有免疫史。

在武岗市与洞口县的疫点周围,分别随机捕犬 82 只与 17 只。取脑组织,采用直接免疫荧光法检测及 RT-PCR 法复核后,武岗市 82 只犬脑组织中共检测到 12 只有狂犬病毒抗原与核苷酸阳性,洞口县的 17 只犬脑组织中检测到 1 只有狂犬病毒抗原与核苷酸阳性,阳性率分别为 14.63% 与 5.88%。

4. 2 株犬携带病毒的遗传学分析:采用 RT-PCR 法直接从武岗市与洞口县阳性犬脑组织(Wg13, Dk13)中扩增狂犬病毒的 N 基因,并测定出其基因序列。测序结果发现,2 株狂犬病毒的 N 基因均由 1458 个核苷酸组成,只有一个读码框(ORF),编码长 451 个氨基酸的核蛋白前体。这 2 株病毒之间核苷酸与氨基酸的同源性分别为 99.4% 及 99.1%; Wg13 株与中国疫苗株 CTN 株和 aG 株,以及赛诺菲巴斯德维尔博疫苗 PV 株的核苷酸同源性(氨基酸)分别为 89.4% (98.2%)、86.1% (95.1%) 及 87.1% (97.3%); Dk13 株与中国疫苗株 CTN 株和 aG 株,以及赛诺菲巴斯德维尔博疫苗 PV 株的核苷酸同源性分别为 89.1% (98.0%)、86.1% (94.9%) 及 87.0% (97.1%)。与其他国家地区分离到的狂犬病毒株的 N 基因核苷酸序列相比发现,2 株病毒与印度尼西亚的狂犬病毒分离株的同源性最大,分别为 92.8% 及 93.2%,而与包括印度、日本及斯里兰卡在内的等其他国家的 I 型狂犬病毒分离株同源性相对较小,为 89.1% ~ 83.9% 之间。

将 Wg13 与 Dk13 病毒株的 N 基因氨基酸序列与已知的 I 型狂犬病毒株比较发现,在第 22 氨基酸位点, Wg13 株由苯丙氨酸替代异亮氨酸,在第 42 氨基酸位点, Wg13 株与 Dk13 株均由丝氨酸替代苏

氨酸,在第 179 位点, Dk13 株由丙氨酸替代缬氨酸替代,在 379 位点, Wg13 与 Dk13 株均由亮氨酸替代缬氨酸,在第 438 位点, Dk13 株由亮氨酸替代苯丙氨酸。

用全 N 基因核苷酸序列构建的系统发生树见图 1。由图 1 可见,武岗市与洞口县犬中携带的 2 株病毒均为 I 型狂犬病毒,而且 2 株病毒分在了同一亚支。这 2 株病毒株与中国的疫苗株之一的 CTN 株分在同一组内,但与中国的另一疫苗株 aG 株及赛诺菲巴斯德维尔博疫苗 PV 株分在不同的组内,进化关系较远。值得注意的是,这 2 株病毒却与印度尼西亚分离的 2 株病毒在同一分支,进化关系最近。

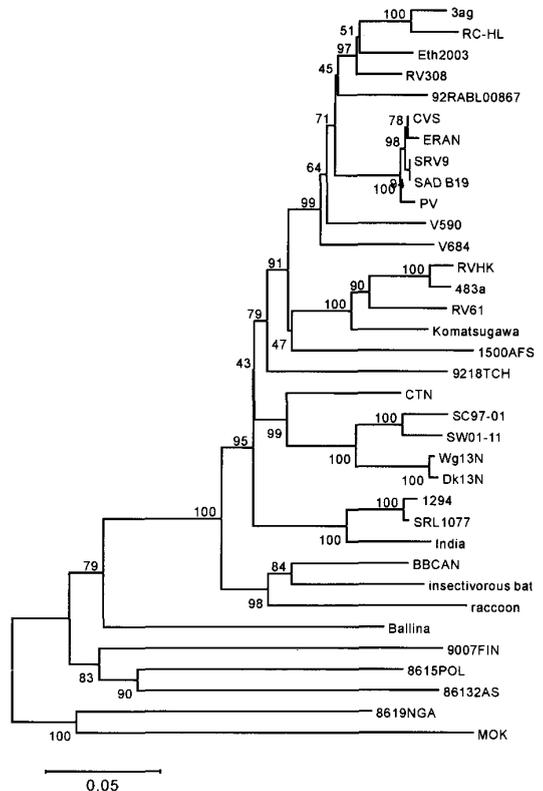


图1 2 株狂犬病毒以全 N 基因核苷酸序列用 NJ 法构建的系统发生树

进一步将 2 株病毒的 N 基因的部分核苷酸序列(1094~1384)与中国以前分离的病毒株的核苷酸序列构建系统发生树(图 2),发现这 2 株病毒仍分在一起,而且与在广西病毒分离株(Yue1、Yue2 及 Yue3)、安徽病毒分离株(Huai87、Huai69、Hefei、He County、Hexian、Feidong 及 Wangjiang)分在同一组

内,但与所有的疫苗株进化关系较远,均不在同一组。

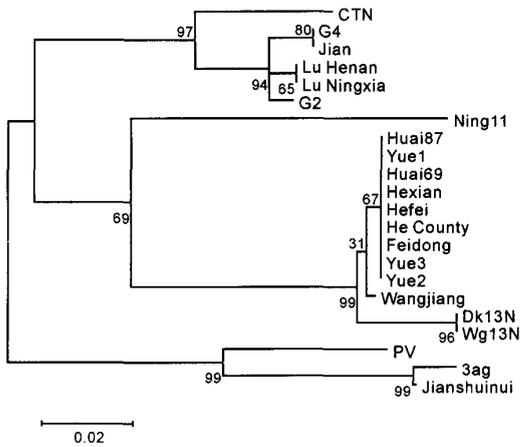


图2 2株狂犬病毒以部分N基因核苷酸序列(1094~1384)用NJ法构建的系统发生树

讨论

湖南省是中国狂犬病的高发地区,近5年来疫情呈快速上升趋势^[10]。自1991-2002年,武岗市仅于1998年报告1例狂犬病,洞口县于2002年报告1例狂犬病。但在2003与2004年,武岗市与洞口县先后发生狂犬病的疫情。这与贵州省安龙县在自1994-2003年的10年间无狂犬病病例报告,而于2004年出现暴发的流行特征相似^[4]。调查分析这种局部地区在若干年间无病例报告突然出现疫情的原因,将有助于揭示中国自1998年后狂犬病疫情快速回升的原因。

犬饲养量大、免疫率低、病毒携带率高是武岗市与洞口县狂犬病流行的直接原因之一。在武岗市与洞口县农村调查显示,自90年代以来,出于文化传统等因素,越来越多的家庭养犬用来看家护院,以至于至今在武岗市与洞口县的农村地区,约60%~70%的家庭养犬1只或更多,两县市的养犬总数均在10万只以上。该地区犬的饲养数量与在贵州调查的结果相似^[4]。另外,养犬量增加的另一原因可能与我国剧毒类灭鼠药的停止使用有关。据不少农户反映,在90年代为了灭鼠,剧毒类灭鼠药物使用普遍,经常出现犬猫等家养动物中毒性非正常死亡,犬的寿命短,从而使得养犬的数量相对较少,以及也可能使得狂犬病毒在犬猫等家养动物中的流行强度降低。

加强犬的管理,提高犬的免疫率,能有效控制狂犬病的流行。然而在目前农村地区养犬量不断增加的同时,不但犬的饲养方式没有改变,而且更缺少登记注册与免疫犬猫动物等管理措施。我们进一步对该地区犬中狂犬病毒的流行情况调查发现,在武岗市与洞口县随机扑杀的犬中,犬脑组织中狂犬病抗原的检出率高达13%。这一结果与我们在安龙以及其他学者在我国狂犬病高发疫区犬中狂犬病毒携带率的研究结果相似^[4, 11]。另外,62例病例中的61例是由犬咬伤发病,进一步说明人感染狂犬病主要来源于犬。因此,由于在犬饲养量增加的同时缺少管理,犬免疫率低,使得狂犬病毒在犬中流行严重,是造成武岗市与洞口县2003-2004年狂犬病流行的直接原因,这也可能是其他地区近年来狂犬病快速回升的主要原因。

在1991-2002年的12年间,武岗市与洞口县仅分别于1998及2002年报告1例狂犬病,表明这期间该地区除犬等家养动物的饲养量低外,狂犬病流行的强度也应较低。由于自1992-2003年,在西北部与洞口县接壤的洪江市、溆浦县、会同县、城步县及绥宁县无疫情;而位于东部的邵阳县自2002年,以及与邵阳市东部接壤的永州、郴州及衡阳狂犬病流行严重^[10],因此,造成武岗市及洞口县狂犬病疫情的另一原因,可能是疫情严重地区的狂犬病毒扩散的结果,而且进一步向周边地区扩散。

人感染狂犬病病毒后的潜伏期一般为1-3个月,但也可短至1周,或长达几年^[12],而且与被动物咬伤的部位、伤口的严重程度,以及伤口感染病毒的量等因素有关。胡家瑜等^[13]对在1985-2000年间于上海发生的20例狂犬病病例分析发现,平均潜伏期为66.37天,咬伤头面部5例的潜伏期平均为41天,咬伤手指12例的潜伏期平均为59.42天,咬伤足部2例的平均潜伏期为187天;其他的研究也与胡家瑜等的调查结果相似^[14]。然而,我们的调查发现,武岗市与洞口县发生的50例狂犬病患者相应部位受伤后的潜伏期均明显短于以前的研究结果,但与我们对2004年安龙县发生的21例狂犬病调查的结果一致^[4]。印度学者也曾报道过潜伏期短的现象^[15]。由于潜伏期变短,这可能使得暴露后即使及时接种狂犬病疫苗也起不到保护作用,因此有必要进一步在更大的范围内调查这一现象的真实性及其普遍性。

为了进一步研究局部地区狂犬病突然流行及潜

伏期变短的原因,我们对武岗市与洞口县犬中流行的各 1 株病毒进行了遗传学分析。将部分 N 基因核苷酸序列(1094~1384)与我国以前分离的毒株比较^[9],发现目前在武岗市及洞口县流行的狂犬病毒 Wg13 与 Dk13 株与流行于广西及安徽地区的毒株有最高的同源性,分在同一分支。用全 N 基因核苷酸序列分析发现,Wg13 与 Dk13 毒株全为 I 型狂犬病毒,2 株病毒之间的同源性为 99% 以上,且与中国的疫苗株之一的 CTN 株分在同一组内。这说明引起目前武岗市与洞口县狂犬病流行的病毒不是由新出现的新型狂犬病毒引起。由于我们只进行了 2 株病毒的遗传学分析,还有待于进一步及更大范围内研究证实。

将 Wg13 与 Dk13 病毒株的 N 基因氨基酸序列与以前比较已知的 I 型狂犬病病毒株比较发现,在多个氨基酸位点发生了氨基酸的替代,尤其是在第 IV 抗原位点区的 379 位点,Wg13 与 Dk13 株均由亮氨酸替代缬氨酸。研究表明核蛋白(NP)能调控病毒的转录与复制^[16, 17],用 NP 免疫能诱导保护性免疫应答^[18]。因此,是否这些氨基酸位点的变化增加了病毒的毒力,使潜伏期变短或更有利于病毒的流行,还有待于进一步的研究。

另外通过 N 基因同源性比较发现,流行于武岗市及洞口县的毒株与疫苗株在核苷酸序列有 10%~14% 的差异,以及部分氨基酸位点发生了变化,不知这样的差异是否影响疫苗的保护力。因此,有必要系统开展狂犬病的分子流行病学研究,分析流行株与疫苗株之间的差异,以及评价与现有疫苗株抗原性之间的差异及其对保护力的影响。

参 考 文 献

- 1 Willoughby RE, Tieves KS, Hoffman GM, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*, 2005, 352:2508-2514.
- 2 俞永新. 狂犬病与狂犬病疫苗. 北京:中国医药科技出版社, 2001. 127.

- 3 Zhang YZ, Xiong CL, Xiao DL, et al. Human rabies in China. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 1983-1984.
- 4 张永振,熊成龙,冯子建,等. 贵州安龙县 21 例人狂犬病的流行病学调查. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 870-872.
- 5 张永振,肖东楼,孙玉辉,等. 中国 1984-2002 年狂犬病流行情况及防治对策. *中华流行病学杂志*, 2003, 24: 883-886.
- 6 Ito M, Itou T, Sakai T, et al. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J Vet Med Sci*, 2001, 63: 1309-1313.
- 7 Bourhy H, Kissi B, Audry L, et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J Gen Virol*, 1999, 80: 2545-2557.
- 8 David D, Jakobson B, Smith JS, et al. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other Middle- and Near-Eastern countries. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 755-762.
- 9 徐葛林, Li Ku, 吴杰, 等. 中国 19 个狂犬病毒毒分离株 N 基因的序列分析. *病毒学报*, 2002, 18: 48-51.
- 10 肖奇友,王祥迪,康肃帮,等. 湖南省近十年狂犬病流行情况分析. *中华流行病学杂志*, 2005, 26: 428-430.
- 11 杜福,文建华,梁凤屏,等. 广东省犬带狂犬病毒调查. *中国人兽共患病杂志*, 1992, 8: 39-41.
- 12 Mattos CA, Mattos CC, Rupprecht CE. Rhabdoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Fourth Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1245-1277.
- 13 胡家瑜,徐天强,伍稚梅,等. 上海市狂犬病流行病学分析及预防控制策略. *中华流行病学杂志*, 2001, 22: 11-13.
- 14 朱凤才,祖容强,吴扬生,等. 江苏省 1990-2000 年狂犬病流行情况及防治对策分析. *中华流行病学杂志*, 2001, 22: 14-16.
- 15 Lakhnpal U, Sharma RC. An epidemiological study of 177 cases of human rabies. *Int J Epidemiol*, 1985, 14: 614-617.
- 16 Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, et al. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. *J Virol*, 1999, 73: 1661-1664.
- 17 Toriumi H, Kawai A. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol*, 2004, 48: 399-409.
- 18 Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2001-2005.

(收稿日期:2005-12-15)

(本文编辑:尹廉)