

· 实验室研究 ·

# 结核分枝杆菌多位点可变数目串联重复序列分型方法标准化操作程序的建立

吕冰 Christine Pourcel 刘敬华 董海燕 张媛媛 蒋毅 刘志广 赵秀芹 万康林

**【摘要】** 目的 建立结核分枝杆菌多位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA) 的标准化方法, 评价该方法的分型能力、应用价值。方法 选取 15 个位点, 采用核酸提取、PCR 和琼脂糖凝胶电泳等技术, 结合 BioNumerics (Version 5.0) 软件, 对中国 54 株结核分枝杆菌临床分离菌株进行分型。结果 确定标准化的 MLVA 方法, 包括细菌分离培养、核酸提取、PCR、琼脂糖凝胶电泳等实验步骤及标化参数的相关数据分析软件的使用。VNTR 位点确定为 ETRA、ETRB、ETRC、ETRD、ETRE、MIRU10、MIRU16、MIRU23、MIRU26、MIRU27、MIRU39、MIRU40、Mtub21、Mtub30 和 Mtub39。结论 建立 MLVA 标准化技术方案, 该方法操作简便, 分型鉴定能力及实验室间结果可比性强, 便于网络化, 有利于结核病流行中追溯传染源, 分析流行趋势。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 多位点可变数目串联重复序列分析; 标准化操作程序

**Establishment of the standard operation program on multiple loci variable numbers tandem repeats analysis typing on *Mycobacterium tuberculosis*** LU Bing\*, Christine POURCEL, LIU Jing-hua, DONG Hai-yan, ZHANG Yuan-yuan, JIANG Yi, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, WAN Kang-lin. \*State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn

**【Abstract】** Objective To establish and evaluate the standardized protocol of multiple loci variable numbers tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA) for genotyping *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Methods 15 VNTR loci were chosen for genotyping 54 Chinese *M. tuberculosis* strains by PCR-electrophoresis-based VNTR analysis and the results were analyzed by software BioNumerics (Version 5.0). Results MLVA method was successfully established and standardized, including the standard protocol for bacterial culture, DNA isolation, PCR and agarose gel electrophoresis and the software analysis. 15 VNTR loci were confirmed, including ETRA, ETRB, ETRC, ETRD, ETRE, MIRU10, MIRU16, MIRU23, MIRU26, MIRU27, MIRU39, MIRU40, Mtub21, Mtub30 and Mtub39, to be suitable for MLVA analysis of *M. tuberculosis*. Conclusion The standardized MLVA method has been established successfully. This method is simple and has powerful capacity for genotyping and strain differentiation, can be used for the network surveillance on pathogens of *M. tuberculosis*, and the data are comparable between laboratories. It is valuable for tracing the source and studying the trend of prevalence during investigation of *M. tuberculosis* infections.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Multiple loci variable numbers tandem repeats analysis; Standard operation program

目前应用于结核分枝杆菌的基因分型方法主要分为两类: 一类是以限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 为

基础的方法, 常用片段有插入序列 6110 (insertion sequence 6110, IS6110) 等; 另一类是以对结核分枝杆菌基因组中特定多态性区域序列进行 PCR 扩增为基础的方法, 常用于扩增的片段有编码 16S、23S rRNA 基因分隔区、DR 及其间隔区和数目可变串联重复序列 (variable numbers tandem repeats, VNTR) 等<sup>[1,2]</sup>。各类方法都有自身特点和应用范围。尽管目前国际上将 IS6110-RFLP 方法作为结核分枝杆菌分型的金标准, 但是该方法存在的缺点也不可否

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771853)

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传染病预防控制国家重点实验室 (吕冰、刘敬华、董海燕、张媛媛、蒋毅、刘志广、赵秀芹、万康林); Polymorphism and Minisatellites (GPMS), Institute of Genetics and Microbiology (IGM), France (Christine Pourcel)

通讯作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

认,如需要大量的结核分枝杆菌,试验操作繁琐,技术含量高,需要多种昂贵的仪器,且实验结果不易分析,也不便于实验室间的比对<sup>[3]</sup>。与该方法相比多位点数目可变串联重复序列分析(multiple loci VNTR analysis, MLVA)是一种以 PCR 技术为基础的方法,其操作简单,分辨率高,结果分析容易,具有很高的可重复性,在实验室内和实验室间具有非常好的可比性,并能提供数字化的分型信息,适宜进行大量样本和网络化分析<sup>[1,4]</sup>。美国疾病预防控制中心已建议将 MLVA 作为结核分枝杆菌基因型分型的首选方法<sup>[5]</sup>。为达到该方法试验结果良好的可重复性及各实验室结果的可比性,将试验操作进行标准化十分重要,为此本研究是在应用标准化操作的基础上综合目前实验结果而得出的,今后随着研究工作不断深入,标准方案也会得到进一步完善。

### 材料与方 法

1. 试验菌株:54 株结核分枝杆菌,其中包括 H37Rv 结核分枝杆菌参考株,均由中国疾病预防控制中心提供,其中 53 株临床分离菌株采集于 2004-2006 年,来源于北京、甘肃、广西、河南、四川、新疆、西藏等省、市、自治区。实验菌株的培养包括痰标本分离培养及传代培养,培养基为改良罗氏培养基,37℃ 培养箱培养。生长状态良好的菌株用生理盐水下洗,制备成菌悬液,沸水浴方法提取细菌 DNA。

2. 菌株分型:采用 MLVA 分型方法,即选取基因分型所用的位点,设计引物,然后提取 54 株结核分枝杆菌核酸、进行 PCR 反应、琼脂糖凝胶电泳等方法,根据电泳图片计算位点重复次数,结合 BioNumerics (Version 5.0) 软件进行聚类分析。

3. 实验材料与仪器: Taq DNA 聚合酶、琼脂糖购自天根生化科技(北京)有限公司(BBI 进口分装)。生物安全柜、PCR 仪、电泳槽、读胶仪等仪器均由中国疾病预防控制中心提供。

### 结 果

通过反复多次的研究,初步确定标准化的 MLVA 方法,包括 VNTR 位点的确定、细菌分离培养、核酸提取、PCR、琼脂糖凝胶电泳等实验步骤及标化参数的相关数据分析软件的使用。

#### 1. 菌株培养和 DNA 标本制备:

(1) 痰标本分离培养:培养基为改良罗氏培养

基。吸取 4% NaOH 处理后的痰液 0.1 ml,均匀接种在整个培养基斜面上。接种后,放入 37℃ 培养箱培养,水平放置 24 h。然后塞紧试管胶塞,直立放置,37℃ 继续培养。接种后第 3 天、第 7 天观察,以后每周观察一次,记录细菌生长情况。

(2) 传代培养:用无菌生理盐水 0.5 ml 将培养好的菌株从斜面上洗下,用 1 ml 吸管吸取 0.2 ml,接种改良罗氏培养基,每支接种 0.1 ml,将菌液铺满斜面,放入 37℃ 培养箱培养,水平放置 24 h。然后塞紧试管胶塞,直立放置,37℃ 继续培养。接种后第 3 天、第 7 天观察,以后每周观察一次,记录细菌生长情况。

(3) 细菌的收集:生长状态良好的菌株用生理盐水下洗,制备成菌悬液,浓度约 10 mg/ml,分装至 1.5 ml Eppendorf 管中。

(4) 样本 DNA 的准备:取上述菌悬液适量,80℃ 灭菌 30 min;离心收集菌体,1 ml TE 重新悬菌;95℃ 水浴(或沸水浴)15 min,12 000 r/min 离心 3 min;取上清,-20℃ 保存备用。

2. VNTR 位点的确定:根据中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核病实验室和法国巴黎 XI 大学遗传学和微生物学研究所 [Institute of Genetics and Microbiology (IGM), Université Paris XI, France] 近几年合作研究的结果初步确定 15 个 VNTR 位点<sup>[6,9]</sup>,见表 1。

#### 3. PCR:

(1) PCR 预混液的制备:PCR 反应体系预混液中各成分的组成,见表 2。

(2) PCR 标准反应体系:见表 3。

(3) PCR 扩增程序:预变性 94℃,5 min;变性 94℃,30 s;退火 62℃,30 s;延伸 70℃,45 s;35 个循环。最后延伸 72℃,10 min。PCR 产物 4℃ 保存。

4. 琼脂糖凝胶电泳:①琼脂糖凝胶的配制:配制 2% 的琼脂糖溶液,用 0.5× TBE 作为溶剂,灌胶长度约 12 cm;②加样方案:每个电泳凝胶方块为 8 个泳道,包含 5 个样品、1 个 H37Rv 和 2 个 DNA Marker(图 1);③凝胶电泳:电泳电压采用 1~10 V/cm 的电压(按两极间距离计算),指示剂迁移到距凝胶边缘 2 cm 左右,终止电泳;④凝胶染色:将凝胶放入浓度为 0.5 μg/ml 的 EB 染色液中,放置水平摇床上染色 30 min,蒸馏水洗涤脱色 15~30 min;⑤凝胶成像:采用紫外凝胶成像仪读胶、成像,图片保存为 TIFF 格式(图 1)。

表1 15 个位点的引物、H37Rv 标准株上的重复单元、扩增片段长度及重复次数

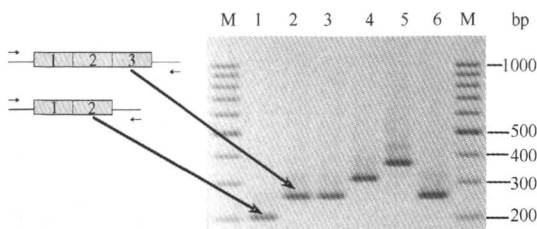
位点	引物(5'~3')	重复单元长度(bp)	PCR 产物长度(bp)	H37Rv 中的重复次数
ETR	ETRA L)ATT TCG ATC GGG ATG TTG AT R)TCG GTC CCA TCA CCT TCT TA	75	397	3
	ETRB L)GCG AAC ACC AGG ACA GCA TCA TG R)GGC ATG CCG GTG ATC GAG TGG	57	292	3
ETRC	L)GAC TTC AAT GCG TTG TTG GA R)GTC TTG ACC TCC ACG AGT GC	58	346	4
	ETRD L)GCG CGA GAG CCC GAA CTG C R)GCG CAG CAG AAA CGT CAG C	77	330	3
ETRE	L)ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA R)GTG CCG ACG TGG TCT TGA T	53	651	3
	MIRU MIRU10 L)GTT CTT GAC CAA CTG AGT CGT CC R)GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT	53	643	3
MIRU16	L)TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A R)CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC	53	671	2
	MIRU23 L)CAG CGA AAC GAA CTG TGC TAT CAC R)CGT GTC CGA GCA AAG GGT AT	53	873	6
MIRU26	L)CCC GCC TTC GAA ACG TCG CT R)TGG ACA TAG GCG ACC AGG CGA ATA	51	613	3
	MIRU27 L)TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA R)GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A	53	657	3
MIRU39	L)CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC R)CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT	53	646	2
	MIRU40 L)GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T R)GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA	54	407	1
Mtb	Mtub21 L)AGA TCC CAG TTG TCG TCG TC R)CAA CAT CGC CTG GTT CTG TA	57	206	2
	Mtub30 L)AGT CAC CTT TCC TAC CAC TCG TAA C R)ATT AGT AGG GCA CTA GCA CCT CAA G	58	319	2
	Mtub39 L)AAT CAC GGT AAC TTG GGT TGT TT R)GAT GCA TGT TCG ACC CGT AG	58	515	6

表2 PCR 反应体系预混液成分

成分	体积(μl)	成分	体积(μl)
10× 缓冲液	1.5	Taq 酶(5 U/μl)	0.3
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	0.9	双蒸水	4.5
dNTP(1 mmol/L)	3.0	总体系	10.2

表3 PCR 反应体系成分

成分	体积(μl)	成分	体积(μl)
预混液	10.2	引物 R(5 μmol/L)	0.9
样本 DNA	3.0	总体系	15.0
引物 L(5 μmol/L)	0.9		



注:M:分子质量标准; 1:H37Rv; 2~6:试验菌株(GX06001、GX06002、GX06003、GX06004、GX06005)

图1 位点 Mtub21 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

5. 图片文件建立:建立 PowerPoint 文档,如图

2. 每张幻灯片包括位点名称、菌株来源、实验结果图片以及与之相对应的菌株号,6 个菌株(包括 1 株 H37Rv 标准菌株)为一组,与实验结果图片泳道相对应。该文档保存在 BioNumerics (Version 5.0) 软件根目录下的 data 文件中。

6. 位点重复次数计算:由表 1 已知 H37Rv 标准菌株的全基因序列在位点 Mtub21 的 PCR 产物为 206 bp,产物片段有 2 个重复单元,每个重复单元为 57 bp,如图 1 中第一泳道所示。通过 DNA Marker 和标准菌株 H37Rv 的 VNTR 位点重复单元的重复次数作标准参照,采用 BioNumerics (Version 5.0) 计算出被测菌株相同 VNTR 位点重复单元的重复次数。如图 1 中第二、第三和第六道为 3 个重复单元、第四道为 4 个重复单元、第五道为 5 个重复单元。

7. 数据库建立:将按照图 1 计算结果得到的所有菌株所有位点的结果输入 Excel 表格。见表 4。表 4 中的列名为各位点的名称,行名为菌株号。在 BioNumerics 软件中,菌株号的列名需要由 Key 表示,这一列数据是固定不再改变并且是惟一的,用于各个数据库间如实验结果和背景资料等数据的连接<sup>[10]</sup>。

8. 数据分析标准化: 利用 BioNumerics 软件进行聚类分析, 聚类方式用平均连锁聚类法 (UPGMA)。计算各个位点的重复次数后, 每株菌株就都被赋予了数字化的特征, 经过 BioNumerics 软件聚类分析, 特征相同或相近的菌株就被分为一型。图 3 是 BioNumerics 软件的数据分析界面, 图左侧的窗口是表示各菌株的实验结果 (标注 1), 各行名称是菌株号, 各列的名称是位点名称; 标注 2 是该实验的名称; 标注 3 所示的圆点是指能够用于试验结果分析的实验数据, 有这个圆点表示该菌株有相应的实验结果, 没有圆点表示无实验结果。

MLVA 结果经过聚类分析后的聚类图。图的左边是系统树图, 中间是菌株各位点的实验结果, 右侧是菌株号。按照预设的 Cluster-cut-off 值, 软件自动分析将菌株分为 A、B、C、D 共 4 簇。

表 4 根据图 1 电泳结果计算的位点重复次数

Key	试验编号	MIRU40	Mtub21	Mtub30	.....
H37Rv	H37Rv	.....	2	.....	.....
GX06001	2	.....	3	.....	.....
GX06002	3	.....	3	.....	.....
GX06003	4	.....	4	.....	.....
GX06004	5	.....	5	.....	.....
GX06005	6	.....	3	.....	.....

9. 结果聚类分析: 图 4 是 54 株结核分枝杆菌

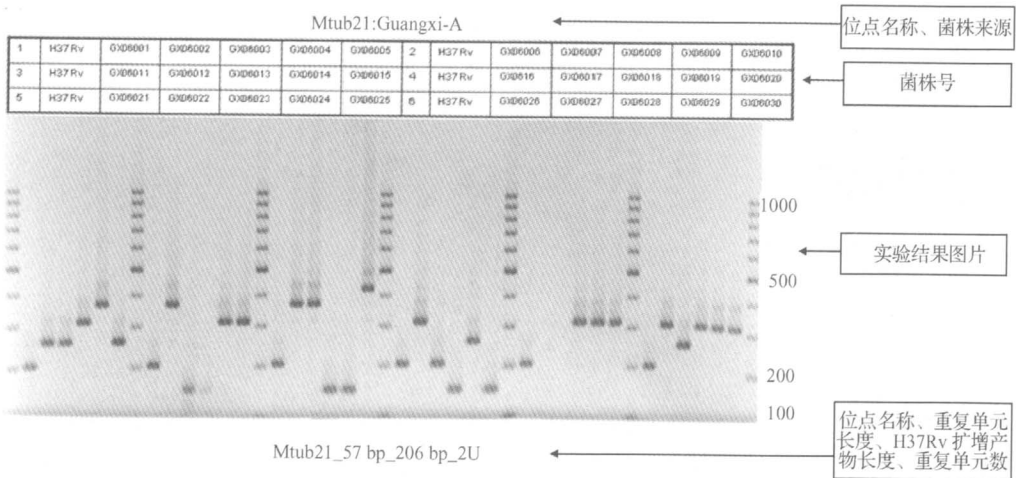


图 2 MLVA 图片文件示意图

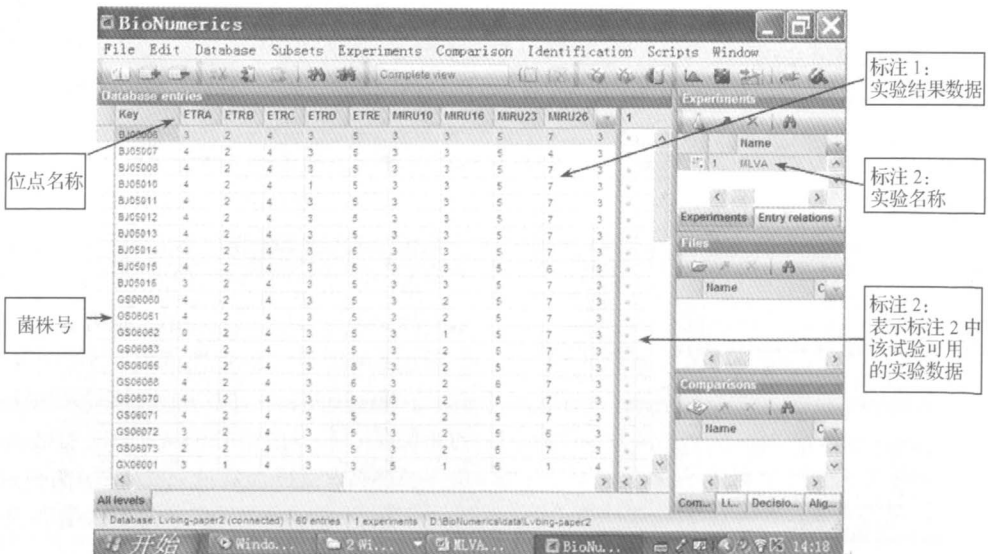


图 3 BioNumerics 软件的数据分析界面

讨论

在 20 世纪 80 年代,人们就已经认识到串联重复序列具有高度多态性,这种多态性的位点可以作为细菌分型的基础,例如用富含 GC 片段的探针检测的 PGRs 方法<sup>[11]</sup>,或者是用寡核苷酸探针检测的 Spoligotyping 方法等<sup>[12]</sup>。在目前已知的大量基因组序列数据的基础上,以 PCR 为主要试验方法的 MLVA 方法得到了快速的发展。

在 MLVA 的研究中,最常见的研究是关于 ETRs (exact tandem repeats) 位点、MIRUs (mutiple interspersed repetitive units) 位点、QUBs (for Queen's University of Belfast) 和 Mtubs 位点。ETRs 位点的重复序列长度范围在 53~79 bp,该类位点中只有 ETRA 位于 ORF 中,ETRs 位点的重复性、稳定性都比较好,经常用来做结核分枝杆菌 MLVA 分型研究以及菌株进化研究;MIRUs 位点的重复序列长度比较固定,都是 53 bp,这类重复序列多位于基因间;QUBs 位点也多位于基因间<sup>[13]</sup>。

在 MLVA 分型研究中,位点的选择是重要的。MLVA 位点作为分子标志,一个重要特性就是其恰当的稳定性。进化得太快的分子标志会含糊流行病学上的联系,但过于稳定的标志物又会导致人们得到那些并不存在的直接联系。本实验室近几年的研究中,总结了 15 个位点,作为结核分枝杆菌 MLVA 分型研究的标准操作位点。2006 年 Vergnaud 和 Pourcel<sup>[13]</sup>提到有 19 个位点,包括 5 个 ETRs、8 个 MIRUs 和 6 个 Mtubs 位点,对 50 株不同型别、不同分离地区的菌株 MLVA 分型得到了很好的结果,并且提出如果再加上一些 QUBs 位点,或是用 *M. bovis* 和 *M. tuberculosis* 基因序列上的差别区域设计新的位点,可能会得到更好的结果。

在我们确定位点后,位点的 PCR 产物大小,即为琼脂糖凝胶电泳的结果。在所选定的位点中,参考株 H37Rv 的产物大小都不超过 1000 bp,每个重复单元的长度都在 50 bp 左右 (ETRA 和 ETRD 较大,为 70 bp 多)。我们选择的 DNA 分子质量标准为 1000 bp 至 100 bp 的梯度 Marker,电泳上样时上样顺序为图 1、2 示意的一个 H37Rv 标准株和 5 个菌株

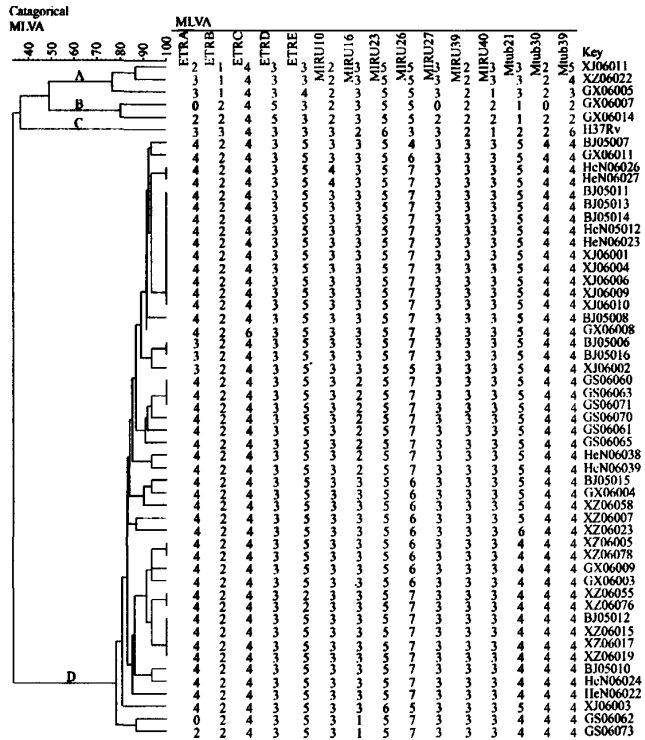


图4 54 株结核分枝杆菌 MLVA 分型结果的聚类图

一组,在图像中菌株结果很容易和 H37Rv 结果比较,这样能够快速目测实验结果,当实验结果有误时,也能较快地发现错误。我们用 BioNumerics 软件进行图像分析,计算在凝胶电泳图像上的条带大小,以及菌株在位点上的重复次数。

BioNumerics 软件是一个功能强大的数据库软件,该软件可以储存各种资料,包括菌株背景资料、实验室数据结果、核苷酸序列、生化反应结果、电泳图片结果等,并且进行数据分析<sup>[10]</sup>。在 MLVA 数据分析中,我们用这个软件进行聚类分析,用菌株各位点的数字资料得出聚类树状图,以此来阐明菌株间的亲缘关系。在结核病分子流行病学研究中用于追溯结核病传染源、研究传播机制并找出结核病在人群中传播的危险因素。

由于 MLVA 分型研究的诸多优点,已经被认为是目前最具有开发意义的分型方法,将成为 IS6110 金标准的替代方法<sup>[13]</sup>,而对 MLVA 分型方法的标准化更是具有重要意义,在大范围的流行病学调查和疾病监测中,达到不同实验室大量菌株的实验结果能够快速比对,由此可以建立我国结核分枝杆菌 MLVA 数据库,在结核病预防控制中追溯病例的传播途径,对预防控制工作起到重要的作用。

参 考 文 献

[1] 查佳,高谦. 新的结核分枝杆菌基因型分型方法简介. 中国防痨杂志, 2005, 27(3):189-191.  
 [2] 王惠民,李卫民. 结核分枝杆菌基因组 DNA 指纹技术在结核病流行病学中的应用. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(4):253-255.  
 [3] Sujatha N. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res, 2004, 120:233-247.  
 [4] 刘敬华,万康林,成诗明. 结核分枝杆菌株水平鉴定技术及其研究进展. 中华流行病学杂志, 2003, 24(12):1153-1157.  
 [5] Crawford JT. Genotyping in contact investigations: a CDC perspective. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(12):S453-457.  
 [6] 刘敬华, Christine Pourcel, 赵秀芹, 等. 7 个 VNTRs 用于 65 株中国分离的结核分枝杆菌基因多态性研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(9):733-737.  
 [7] 刘敬华,万康林,刘志广, 等. 5 个 VNTR 位点用于我国三省 65 株结核分支杆菌菌株基因型的研究. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(8):653-657.  
 [8] 曹晓慧,蒋毅,张媛媛, 等. 13 个 VNTR 位点用于 113 株结核分

枝杆菌的基因分型研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8):705-708.  
 [9] 蒋毅,张丽水,赵秀芹, 等. MLVA 技术用于福建 105 株结核分枝杆菌基因分型的初步研究. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(7):1-4.  
 [10] Bionumerics Manual, version 3. 5, Applied maths, Kortrijk, Belgium.  
 [11] Ross BC, Raios K, Jackson K, et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol, 1992, 30: 942-946.  
 [12] Vergnaud G. Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. Nucleic Acids Res, 1989, 17(19):7623-7630.  
 [13] Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis, molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. ISBN: 978-3-540-23155-4. 2006: 83-104.

(收稿日期:2008-04-21)  
 (本文编辑:张林东)

• 巴斯德医苑 •

8158 例动物咬伤者流行病学分析

王传林 李英杰

目前狂犬病仍然是发展中国家重要的公共卫生问题。我国随经济发展,饲养宠物的家庭增多,动物咬伤病例也逐年增加。为了解被动物伤害人群的流行病学特点,掌握动物伤人的现状和规律,对 2006 年在北京大学人民医院急诊外科就诊的所有动物咬伤病例进行流行病学特征分析。

调查对象的暴露伤口按卫生部颁发的狂犬病暴露后处置工作规范(试行)进行分级。共收治 8158 例动物咬伤患者,其中男性 3649 例(44.73%),男女性比为 1:1.2。各年龄组均有暴露,高发年龄组分别是 20~29、40~49 和 50~59 岁,发病例数分别为 2349、1443 和 1454 例,明显高于其他年龄组,共占 43.2%。全年均有暴露,但以 5-8 月份最多(均在 800 例以上),共 3556 例(43.6%)。咬伤部位主要为上肢,共 5486 例(67.25%),其次为下肢 1980 例(24.3%)。伤口数目以一处居多,共 7156 例(87.7%)。I 度伤口 172 例(2.1%),II 度伤口 4179 例(51.2%),III 度伤口为 3807 例(46.7%)。

8158 例伤者中既往接种过狂犬病疫苗 982 例(12.04%),其中疫苗接种时间在 6 个月至 1 年之间的有 524 例,占接种人数的 53.36%,接种时间在 1~3 年之间的有 247 例(25.15%)。注射抗血清有 526 例(6.45%)。被咬伤后在 24 h 内就诊的为 6372 例(78.11%),24~48 h 内就诊的有 1478 例(18.12%),48~72 h 就诊的有 121 例(1.48%)。

伤人动物有犬、猫、鼠、兔、猴、猪等,其中以犬致伤最常见,共 5573 例(68.31%);其次为猫 2509 例(30.76%)。伤人动物主要以自家饲养为主,共 5833 例(71.5%),他人饲养 1655 例(20.29%)。伤人动物未免疫的 5323 例(65.25%)。

讨论:我国是狂犬病高发国家之一,且发病逐年增多<sup>[1]</sup>。对 8158 例动物咬伤患者分析发现,暴露者以青中年为主,其原因可能是该年龄组爱好养宠物,与宠物接触机会较多,暴露率较高。女性多于男性,可能是男女饲养习惯不同,女性与动物接触较密切,易被其致伤所致。但 0~9 岁组男性多于女性,可能与男孩的活动范围较女孩广泛,因此受到动物攻击的机会较高有关,与文献报道一致<sup>[2]</sup>。本研究还表明伤者在夏季最多。可能因为夏季人们穿的衣服较少,肌体暴露部位多,外出频繁,犬在外面的活动增多,增加了被犬咬伤的机会。因此夏季应作为防范被犬类动物咬伤的关键时期。被动物咬伤病例伤口部位以上肢为主,也与国内相关报道一致<sup>[2]</sup>,表明咬伤与人主动密切接触宠物有关。伤口以 II、III 度为主,提示在与宠物嬉戏时一定要注意防范,保护好自己。本研究中大部分病例能在 24 h 内就诊,但仍有部分人不能及时就诊,既往接种过疫苗与免疫球蛋白的比例低(分别为 12.04% 和 6.45%)。说明应继续加强预防狂犬病的意识,另外应提倡暴露前免疫。致伤动物种类仍以犬为主,其次为猫,且伤人动物主要为自家饲养动物,而动物免疫接种率仅为 34.75%,与印度 2003 年的研究结果(32.9%)一致<sup>[3]</sup>。

参 考 文 献

[1] 张永振. 中国狂犬病的流行病学特征及防制建议. 动物保健, 2006, 8:7-10.  
 [2] 鲍亚萍,胡端萍. 北京市崇文区 1991-1995 年被犬、猫等动物咬伤人群的流行病学分析. 中华流行病学杂志, 1997, 18(3):155.  
 [3] Suarshan MK, Mahendra BJ, Madhusudana SN, et al. An epidemiological study of animal bites in India: results of a WHO sponsored national multi-centric rabies survey. J Commun Dis, 2006, 38(1):32-39.

(收稿日期:2008-04-21)  
 (本文编辑:张林东)