

# 湖南省 2008—2009 年狂犬病病原学监测及病毒基因特征分析

高立冬 蔡亮 刘富强 张红 胡世雄 陶晓燕 李浩 刘佳惠  
王世清 唐青 刘运芝

**【摘要】** 目的 分析 2008—2009 年湖南省狂犬病病原学监测结果及新分离病毒的 N 基因分子特征。方法 采用直接免疫荧光法 (DFA)、巢式 PCR 检测狂犬病监测标本,阳性标本应用 ABI3730 测序仪对 N 基因进行全序列测序;运用生物信息学方法分析 N 基因特征及序列同源性,构建系统进化树,分析新分离病毒株遗传特征并与以往分离株比较。结果 1451 份监测犬脑组织标本中 DFA 初筛阳性 31 份,阳性率为 2.14%;31 份 DFA 阳性标本经巢式 PCR 复核,17 份阳性,阳性率为 1.17%;巢式 PCR 检测疑似狂犬病病例唾液、脑脊液、血清及尿液标本 56 份,3 份阳性,阳性率为 5.36%;新分离的阳性株与巴斯德株进行 N 基因序列比较,核苷酸和氨基酸同源性均在 87.2%~87.9% 之间;成功构建系统进化树,新分离的 20 株病毒全部属于基因 I 型。新分离病毒株与湖南省内、邻省和国际株比较存在不同的亲缘关系。结论 湖南省狂犬病病例及犬携带病毒的情况较为稳定,流行株仍为基因 I 型,未发生变异。

**【关键词】** 狂犬病; 流行特征; 系统进化

**Surveillance on the etiology and genetic characteristics of rabies in Hunan province, from 2008 to 2009** GAO Li-dong<sup>1</sup>, CAI Liang<sup>1</sup>, LIU Fu-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, HU Shi-xiong<sup>1</sup>, TAO Xiao-yan<sup>2</sup>, LI Hao<sup>2</sup>, LIU Jia-hui<sup>1</sup>, WANG Shi-qing<sup>1</sup>, TANG Qing<sup>2</sup>, LIU Yun-zhi<sup>1</sup>. 1 Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China; 2 State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: LIU Yun-zhi, Email: hncdcliu@163.com

This work was supported by grants from the Science Foundation of the Health Department of Hunan Province (No. A2007-008, B2009-088).

**【Abstract】** **Objective** To analyze the etiology of rabies in Hunan province and the genetic characteristics of rabies N gene isolated from 2008 to 2009. **Methods** Direct immunofluorescence assay (DFA) and nested PCR were employed to detect the monitoring samples including brain tissues of dogs and saliva, serum or urine which were collected in 2008 to 2009, from the rabies patients. Positive samples were sequenced by ABI3730 gene analyzer for the full length of the N gene target. The homology and hpylogeography of the rabies virus were analyzed after the phylogenetic tree was constructed by Blast, Clustal W and Mega 4.0 software. **Results** Of the 1451 tissue samples from the dogs' brain, 31 were positive under DFA and the positive rate was 2.14%. The DFA positive samples were re-detected by RT-PCR and the positive rate was 1.17%. 56 samples of saliva, serum and urine samples were detected by RT-PCR from the rabies patients, with 3 positives and the positive rate was 5.36%. The length of nest PCR products were 255 bp. The rates of homology to the nucleotide and the amino acid of rabies N gene were 87.2%~87.9% after compared to the pasture strain. The phylogenetic tree was successfully built and 20 strains isolated lately belonged to the rabies gene type I. **Conclusion** The epidemic situation of human and dogs rabies in Human were relatively stable, with all the isolated rabies virus belonging to genotype I, without any variation.

**【Key words】** Rabies; Epidemiological characteristics; Phylogeography

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.011

基金项目:湖南省卫生厅科研基金(A2007-008, B2009-088)

作者单位:410005 长沙,湖南省疾病预防控制中心 湖南省微生物分子生物学重点实验室(高立冬、蔡亮、刘富强、张红、胡世雄、刘佳惠、王世清、刘运芝); 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(陶晓燕、李浩、唐青)

通信作者:刘运芝, Email: hncdcliu@163.com

我国狂犬病主要集中在湖南、广西和贵州省(区),发病例数占全国总病例数的 46.12%<sup>[1,2]</sup>。狂犬病毒基因组长约 12 kb,从 3' 端至 5' 端依次排列着 N、P、M、G 和 L 共 5 个结构蛋白基因,分别编码核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白和转录酶大蛋白<sup>[3]</sup>。N 基因由于点突变较少,高度保守且高效表达,常作为基因分型与种群变异的判断指标<sup>[4]</sup>。本研究对 2008—2009 年湖南省狂犬病监测标本进行病原学检测,对新分离的 20 株病毒进行遗传特征研究。

**材料与方法**

1. 标本来源:检测标本来自湖南省内 14 个狂犬病监测点,包括疑似狂犬和健康犬脑组织及疑似狂犬病例唾液、血清与脑组织等。临床采集的病例标本遵守国家医学伦理学基本原则和有关法律法规的要求。

2. 主要实验试剂与仪器:包括 Trizol (Invitrogen, 美国)、RNA Extration Kit (Qiagene, 德国)、Light Diagnostics™ Rabies DFA Reagent (Millipore, 美国)、BigDye Terminator 3.1/1.1 Version Sequencing Kit (ABI)、One-step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, 美国)、Platinum® PCR Super Mix (Invitrogen, 美国)、Min Elute PCR Purification Kit (Qiagene, 德国)、荧光倒置显微镜 (DMLB2 Leica, 德国)、PCR 仪 (PCT-200 Thermal, 德国)、Applied Biosystems 3730 Sequencer (ABI, 美国),丙酮等化学试剂为国产分析纯。

3. 直接免疫荧光法 (DFA):犬、人脑组织标本采用 DFA 进行初筛,具体操作参照文献[5],DFA 阳性及疑似阳性标本采用巢式 PCR 复核。

4. 狂犬病毒 N 基因 PCR 扩增及测序:脑组织标本采用 Trizol 法提取总 RNA。唾液、血清标本采用 QIAGEN RNA Extration Kit 提取。反转录及巢式一次 PCR 反应采用 One-step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity 试剂盒完成,引物为 N127 (+)(10 μmol/L)和 N8m (-)(10 μmol/L);巢式二次 PCR 反应采用 Platinum® PCR Super Mix 试剂盒完成,引物为 N577 (+)(10 μmol/L)和 N829 (-)(10 μmol/L)。具体操作和反应体系参考试剂盒说明书。PCR 及测序引物序列由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(病毒所)脑炎室提供,参照巴斯德病毒株序列 (GenBank Accession No: PV-M13215),委托上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。提取巢式 PCR 阳性标本总 RNA,采用 N127 (+)、N829 (-)及 N577 (+)、NR-E 引物进行 N 基因

全序列的扩增,扩增产物电泳后由 Min Elute PCR Purification Kit 纯化回收,回收产物在 ABI3730 基因测序仪上参照 BigDye Terminator 3.1/1.1 Version Sequencing Kit 试剂盒说明书进行序列测定。

**表 1 PCR 扩增狂犬病毒 N 基因的巢式引物与测序引物序列**

名称	引物序列(5' ~ 3')	定位
N127(+)	ATG TAA CAC CTC TAC AAT GG	55 ~ 74
N8m(-)	CAG TCT CYT CNG CCA TCT	1570 ~ 1587
N577(+)	AAG ATG TGY GCY AAY TGG AG	644 ~ 663
N829(-)	GCC CTG GTT CGA ACA TTC T	881 ~ 899
NR-E	GGA TTG ACR AAG ATC TTG CTC AT	1515 ~ 1537

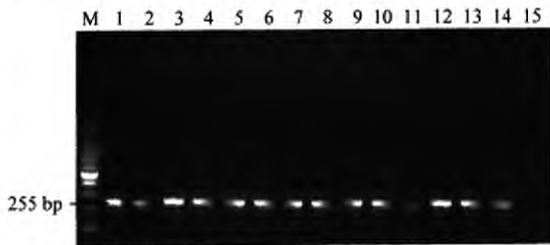
5. N 基因同源性及系统进化分析:从 GenBank 中查询湖南省、邻近省份及国际上从不同宿主、不同类型标本中分离到的狂犬病毒 N 基因序列(湖南省 20 株、邻近省份 6 株、国内疫苗株 1 株、国际 2 株),用于后续的分子进化分析(表 2)。测序产物经 ATGC 生物学软件 (Gentyx Co., Tokyo, Japan) 进行序列拼接与校对,应用 Blast 与 DNASTar (Lasergene® v8.0) 软件对测序结果进行核苷酸和氨基酸水平的同源性分析,Clustal W 软件 (Version 1.83) 进行多重序列比对, Mega4.0.1 生物学软件构建系统进化树。

**表 2 狂犬病毒 N 基因系统进化分析中相关参比病毒株及其来源**

病毒株	GenBank 登录号	国家/地区	宿主	分离年份
Hunan-Wg407	DQ666314	中国湖南	犬	2004
Hunan-Wg432	DQ666316	中国湖南	犬	2004
HuNPN16	DQ515993	中国湖南	犬	2006
Hunan-Wg27	DQ666312	中国湖南	犬	2004
Hunan-Wg12	DQ666308	中国湖南	犬	2004
Hunan-Dk13	DQ666307	中国湖南	犬	2004
Guizhou-A148	DQ666291	中国贵州	犬	2004
Hunan-Wg413	DQ666309	中国湖南	犬	2004
Hunan-Wg26	DQ666311	中国湖南	犬	2004
Hunan-Wg430	DQ666315	中国湖南	犬	2004
GX074	DQ866107	中国广西	犬	2007
Hunan-Xx35	DQ666319	中国湖南	犬	2004
Hunan-Xx33	DQ666317	中国湖南	犬	2004
Hunan-Xx34	DQ666318	中国湖南	犬	2004
HNDB33	EU008922	中国湖南	犬	2007
HNDB11	EU008919	中国湖南	犬	2007
HNDB28	EU008923	中国湖南	犬	2007
HNDB12	EU008920	中国湖南	犬	2007
HNDB18	EU008921	中国湖南	犬	2007
GXN119	DQ866111	中国广西	犬	2006
HuNPN01	DQ496219	中国湖南	猪	2006
Guizhou-A103	DQ666290	中国贵州	犬	2004
Guizhou-A158	DQ666292	中国贵州	犬	2004
Hunan-Wg22	DQ666310	中国湖南	犬	2004
Hunan-Wg68	DQ666313	中国湖南	犬	2004
ZAMRAV51/00	AB285215	赞比亚	犬	2006
GX304	DQ866117	中国广西	犬	2007
CTN181	EF564174	中国山东	疫苗株	1956
Pasture strain	M13215	法国	疫苗株	1993

结 果

1. 病原学检测: 2008—2009 年共检测健康犬脑组织标本 1451 份, 其中 DFA 初筛阳性 31 份, 阳性率为 2.14%。31 份标本经巢式 PCR 复核, 17 份阳性 (1.17%); 巢式 PCR 检测疑似狂犬病例唾液、脑脊液、血清及尿液标本 56 份, 3 份阳性 (5.36%)。巢式 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见一大小约 255 bp 的条带 (图 1)。20 份 RT-PCR 阳性标本送病毒所脑炎室复核, 阳性符合率为 100%。



注: M: 100 bp DNA ladder; 1: PCR 阳性对照; 2~14: 标本 HN0806、HN0807、HN0808、HN0809、HN0810、HN0811、HN0812、HN0813、HN0901、HN0902、HN0904、HN0906、HN0907; 15: PCR 阴性对照

图 1 RT-PCR 检测 DFA 阳性标本中狂犬病毒 N 基因

2. N 基因测序、基因特征与同源性分析: 在特异性测序引物作用下, 通过 ABI3730 基因测序仪分析, 得到 20 株覆盖 N 基因全长的 1353 bp 核苷酸序列, Blast 同源性分析表明, 20 株与狂犬病毒基因 I 型核苷酸同源性最高, 全部属于狂犬病毒基因 I 型。20 株病毒 N 基因编码区均从起始密码 ATG 开始, 以终止密码子 TAA 结尾, 完整开放阅读框 (ORF) 全长 1353 个核苷酸残基, 编码 450 个氨基酸, 含量最高的氨基酸为 ser (丝氨酸), 占总蛋白含量的 8.22% (37/450), 含量最低的为 trp (色氨酸) 占 0.67% (3/450)。从新分离的 20 株狂犬病毒中选择有代表

意义的 13 株与巴斯德病毒株的 N 基因进行序列比较, 核苷酸和氨基酸同源性均在 87.2%~87.9% 之间, 13 株病毒 N 基因间 ORF 进行核苷酸与氨基酸的同源性分析, 核苷酸、氨基酸的同源性分别为 87.2%~100.0% 和 89.5%~100.0% (表 3)。

3. N 基因进化分析: 从新分离的 20 株狂犬病毒中选择有代表意义的 13 株及从 GenBank 选取的 29 株狂犬病毒, 其 N 基因序列构建的系统进化树大致可分为 I、II、III 3 个群 (图 2), 每群所包含的病毒株均来自全省不同的地区, 其中 I、II 群中包含了 7 个不同地区不同宿主的病毒株, 如 I a 含 HN0810 (张家界市, 人源) 和 HN0806、HN0809 (郴州市, 犬源)、HN0807 和 HN0811 (张家界市, 犬源)、HN0808 (永州市, 犬源)、HN0812 (湘西州, 犬源); II a 含 HN0904 (衡阳市, 人源)、HN0906 (株洲市, 人源)、HN0907 (邵阳市, 人源) 和 HN0813 (永州市, 犬源)、HN0901 (邵阳市, 犬源)、HN0902 (岳阳市, 犬源)。13 株病毒与省内、邻省和国际株比较存在不同的亲缘关系, I a 包含的所有病毒株与 2006 年湖南省分离株 HuNPN16 及广西壮族自治区分离的 GX074、GX304 有着较近的亲缘关系; II a 分支中国疫苗株 CTN181 完全与湖南省 5 个不同地区分离到的来自宿主犬和人的 6 株在同一分支上, 表明当前疫苗株 CTN181 具有免疫原性, 能有效保护机体抵御狂犬病毒感染, 且 II a 分支与 2006 年自病猪中分离的 HuNPN01 和 2004 年贵州省分离株 Guizhou-103 处于同一分支上, 亲缘关系更加接近; 但与巴斯德疫苗株分在不同组内, 进化关系较远。

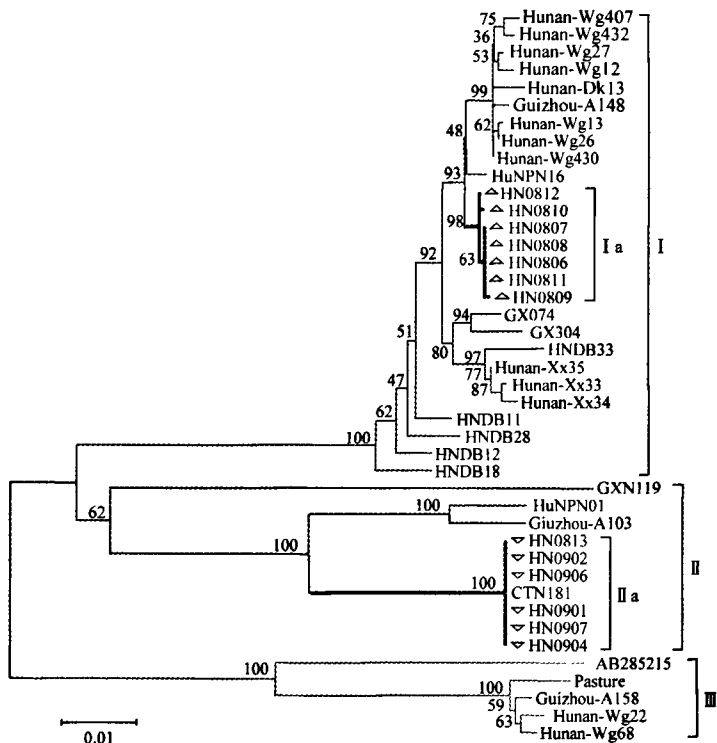
讨 论

本研究分析了 2008—2009 年湖南省狂犬病病原学检测及病毒基因进化情况。狂犬病毒 N 基因位于 59~1483 位核苷酸之间, ORF 为 1353 个核苷

表 3 2008—2009 年湖南省 13 株狂犬病毒 N 基因核苷酸与氨基酸同源性分析

Seq-	HN0813	HN0902	HN0901	HN0907	HN0904	HN0906	HN0806	HN0807	HN0811	HN0808	HN0809	HN0812	HN0810	Pasture
HN0813		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0902	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0901	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0907	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0904	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0906	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.896	0.895	0.879
HN0806	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895		1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.898	0.873
HN0807	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	1.000		1.000	1.000	0.999	0.999	0.898	0.873
HN0811	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	1.000	1.000		1.000	0.999	0.999	0.898	0.873
HN0808	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	1.000	1.000	1.000		0.999	0.999	0.897	0.872
HN0809	0.896	0.896	0.896	0.896	0.896	0.896	0.999	0.999	0.999	0.999		0.998	0.899	0.874
HN0812	0.896	0.896	0.896	0.896	0.896	0.896	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998		0.899	0.874
HN0810	0.879	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.998	0.998	0.998	0.998	0.997	0.999		0.875
Pasture	0.897	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.873	0.873	0.873	0.873	0.872	0.874	0.875	

注: 白体字为核苷酸同源性, 黑体字为氨基酸同源性



注: △代表 I a 分支部分; ▽代表 II a 分支部分

图 2 2008—2009 年湖南省 13 株狂犬病毒 N 基因核苷酸全序列种系发生树 (N-J 法)

酸, 编码病毒 NP 蛋白<sup>[3]</sup>。WHO 推荐的狂犬病实验室诊断金标准为 DFA, 即应用荧光标记的抗狂犬病毒 NP 蛋白单克隆抗体检测标本中狂犬病毒 NP 蛋白抗原<sup>[6]</sup>, 通过对 1451 份犬脑组织标本进行 DFA 检测, 阳性率为 2.14%, 阳性标本经巢式 PCR 检测 N 基因复核, 阳性率为 1.17%, 与 Tao 等<sup>[2]</sup>对 2005—2007 年湖南省内犬脑组织标本检测的结果基本保持一致, 说明目前湖南省犬只携带狂犬病毒的情况维持在一个相对恒定的水平, 狂犬病毒在犬只间的传播能力未发生较大改变。

构建狂犬病毒 N 基因系统进化树是对序列进化关系的拓扑结构进行评估和模拟的过程, 能在一定程度上确定感染狂犬病毒的来源、传播路径及在宿主间的传播与历史变迁, 能应用于狂犬病毒感染的实验室诊断、分型和分子流行病学调查<sup>[7,8]</sup>。国际上根据 NP 蛋白基因 N 末端 500 个核苷酸和跨膜糖蛋白基因同源性的差异, 将狂犬病毒分为 7 个基因型<sup>[9,10]</sup>。本研究通过 PCR 技术及基因全序列的测定, 获得了 20 株狂犬病毒基因全序列, 其中 17 株来源于犬脑组织标本, 3 株来源于狂犬病患者唾液标本, 后经序列分析及标本采集信息的核实, 发现有 8 株犬脑组织病毒株的序列高度相似, 且在同一时间来自同一采集点, 可能与采集过程中标本受到污染

有关, 为使后续的分析结果能更真实反映病毒的流行, 剔除了其中的 7 份标本, 选择有代表意义的 13 株通过 N-J 法构建了 N 基因系统进化树, 进化分析结果显示所分离的 13 株病毒均属于狂犬病毒基因 I 型, 与湖南省往年分离的病毒株进行比较, 大部分病毒株均在同一组内, 空间分布上无明显的地域性, 与邻近省份 (贵州和广西) 分离的病毒株具有较近的亲缘关系, 病毒在人源性与动物源性之间存在交叉的现象。13 株中 N 基因 ORF 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 87.2%~100.0% 和 89.5%~100.0%, 病毒株间存在的核苷酸序列变异为同义变异, 氨基酸序列未发生改变。将此 13 株病毒 N 基因与巴斯德病毒株 N 基因比较, 核苷酸及氨基酸的同源性在 87.2%~87.9% 之间, 不在同一组内, 进化关系较远, 但与我国目前使用的人用狂犬病疫苗株 CTN181 的同源性非常高, 表明 CTN181 疫苗株能为机体提供有效的免疫屏障<sup>[11]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] WHO. Expert Committee on Rabies. Rabies: Fact Sheet N 99. 2010. [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en].
- [2] Tao XY, Tang Q, Li H, et al. Molecular epidemiology of rabies in southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1192-1198.
- [3] Pringle CR. The order mononegavirales. *Arch Virol*, 1991, 117 (1-2): 137-140.
- [4] Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, et al. The molecular biology of rabies viruses. *Rev Infect Dis*, 1998, 10: S771-784.
- [5] World Health Organization. WHO Expert Committee on Rabies. Eighth report. Technical report series. Geneva: Switzerland, 1992.
- [6] Bourhy H, Rollin PE, Vincent J, et al. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 519-523.
- [7] Bourhy H, Reynes Jean-Marc, Dunham EJ, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *Gen Virol*, 2008, 89: 2673-2681.
- [8] Li H, Tao XY, Zhang H, et al. Molecular epidemiology investigation of rabies virus nucleoprotein genes in China. *Chin J Exp Clin Virol*, 2010, 24(2): 82-84. (in Chinese)  
李浩, 陶晓燕, 张红, 等. 中国狂犬病 N 基因分子流行病学调查研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(2): 82-84.
- [9] Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, 1993, 194(1): 70-81.
- [10] Delmas O, Holmes EC, Talbi C, et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2057.
- [11] Liu FQ, Chen LZ, Gao LD, et al. Analysis of N gene sequences of 20 rabies virus strains in Hunan province and vaccine strains. *Chin J Mod Med*, 2010, 20(2): 221-226. (in Chinese)  
刘富强, 陈立章, 高立冬, 等. 湖南省 20 株狂犬病株与疫苗株 N 基因序列分析. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(2): 221-226.

(收稿日期: 2011-03-31)

(本文编辑: 张林东)