

狂犬病病毒时空进化研究进展

顾春英 曹广文 王群

【关键词】 狂犬病病毒；时空进化

Progress on the study of spatio-temporal evolution of rabies virus GU Chun-ying, CAO Guang-wen, WANG Qun. Department of Epidemiology of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Key words】 Rabies virus; Spatio-temporal evolution

目前人类正处于传染性疾病全球性危机的境地,任何一个国家都不可能幸免新老传染病的威胁。之所以不断有新病原体产生是因为传染病病原体一直在变异,这种变异来源于对外界环境阻力和免疫压力的反应,通过变异企图突破阻力进一步扩散或逃过宿主的免疫压力继续生存。因此传染病的发生和不断流行都与病原体的变异有关,这种变异就是进化,具体表现在两个方面,一方面病原体空间扩展过程中受生态因素的影响(如动物种群、气温、植被、河流等)而发生的不断变异以突破阻力,另一方面病原体在不同宿主之间或同一宿主内随时间和环境的变化而做出的相应变异以继续生存。因此传染病发生和流行扩张的原因主要体现在传染病病原体的时空动态进化过程中,掌握传染病流行的时空动态进化规律,对预测传染病的发生、发展及新发传染病病原体的出现都有至关重要作用。下面就传染病病原体尤其是研究最多的狂犬病病毒的时空动态进化研究进展作一综述。

1. 相关概念:传染病病原体的时空动态进化概念出自系统发生地理学(phylogeography),该学说源于生物分子种系进化的研究,是指研究与种系的地理分布原则和过程相关的内容和方法的科学,其核心是绘制种内系统发生树^[1]。将此概念引入传染病中,就形成了传染病病原体的系统发生地理学。传染病的系统发生地理学是研究病原体种系的空间和时间进化模式及它们之间的相互作用关系的科学^[2]。关键是测定不同来源病原体的基因序列,根据序列差异将其进行空间聚集的分布及传播模式研究来分析其空间动态进化;根据病原体标本采集时间按序列一致性对病原体种系进行基因型和进化分析来研究其时间进化。

2. 传染病病原体时空动态进化研究现状:有关传染病病原体的研究一直在进行,但是病原体进化和流行过程之间的关系仍不清楚,而这个问题涉及到药物耐药性和病原体毒力的演变、疫苗研制及新发传染病的出现等问题^[3]。因此传染病病原体的时空动态进化受到广泛关注,成为传染病研究的热点之一。其中研究最多的是人类病毒性传染病,尤其是 RNA 病毒病,因为 RNA 病毒在人群中比 DNA 病毒更容易

引起发病和流行;很多 RNA 病毒突变率高(<15 kb 的病毒基因组每复制一次就会出现一个错误),进化快,容易进行空间和时间变化模式的“实时”观察;病毒群大;传代时间短,导致其核苷酸置换率比真核生物和 DNA 病毒高 6 个数量级^[2,4]。这些使病毒在短时间内即发生大量变异,即便在宿主内感染不久后也是如此,且很多单链 RNA 病毒重组率很低,重组引起的序列改变对进化研究不会产生很大的混杂偏向,可以忽略不计^[4],适合于系统发生地理学的研究。因此研究主要集中在 RNA 病毒类病原体上,如登革病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒等,尤其是狂犬病病毒,由于具备完整的监测资料,相关的研究最深入广泛。

3. 狂犬病病毒的时空动态进化研究进展:狂犬病病毒是一种单股负链 RNA 病毒,长约 12 kb,根据抗原和遗传分型可分为 7 个亚型:经典狂犬病毒(RABV)、澳大利亚蝙蝠狂犬病毒(ABLV)、Duvnhage 病毒(DUVV)、欧洲蝙蝠狂犬病毒 1 型(EBLV-1)、欧洲蝙蝠狂犬病毒 2 型(EBLV-2)、莫科拉病毒(MOKV)和拉哥斯蝙蝠病毒(LBV),能致人和其他陆栖脊椎动物感染发病的主要是经典狂犬病毒型^[2,5,6],且往往发病很急,病死率高。第二次世界大战后全球曾在动物中出现三次主要流行,分别在欧洲、美国东部和加拿大。欧洲狂犬病流行主要和病毒在红狐中传播有关;美国流行则和带有狂犬病毒变异株的浣熊从佛罗里达迁移到西弗吉尼亚/弗吉尼亚边界导致病毒扩张有关,从 20 世纪 70 年代中期开始,这种新的浣熊狂犬病传遍了美国东部,流行了几十年;加拿大的流行和狂犬病毒在北极狐中扩散有关,扩散到加拿大南部各省,尤其是到了安大略省后狂犬病病毒从北极狐传给了红狐^[7,8]。目前狂犬病毒成了重要的世界公共卫生问题,除了野生动物外,家犬也可传播,在非洲和亚洲,家犬是主要传染源。可以说狂犬病是最重要的病毒性动物传染病,每年发展中国家约有 3 万~5 万人死于狂犬病,发达国家在狂犬病防治中的投入非常大,1997 年,美国投入了近 3 亿美元用于狂犬病的控制^[9]。因此世界上对于狂犬病的传播动态非常重视,对于这种重新出现的公共卫生威胁,完全预防很难,控制的关键是能预测哪里将出现新的暴发以及病毒如何传播,这就依赖于对狂犬病时间和空间动力学的了解。

在欧洲和北美洲对狂犬病暴发自 40 年代起都有详细记录^[8],包括野生动物中的发病和流行情况也有完整的监测资料,因此狂犬病病毒成了极有价值的探索生态和进化过程在宿主和病原体之间相互作用的对象,完整历史资料的积累为其空间动态进化的研究奠定了基础。对该病毒的时空进化研究主要在以下三个方面:

(1)通过空间进化分析探索生态环境和遗传进化的关系:有人专门研究了狂犬病毒进化和当地环境条件之间的关系,利用从狐狸中分离的 83 株狂犬病毒标本,根据限制性位点多态性和糖蛋白 G 基因编码序列分成 20 个不同基因型,对空间分布情况进行研究,结合地理地图绘制了相应地图。并用最大似然法(ML)进行系统发生分析,基因序列采用 G 基因的 1572 bp 片段,建立了来自 20 个不同基因型的系统发生关系,发现基因序列进化在时间和地理方面具有相当大的聚集性。研究还提示,序列的地理聚类归因于生态学基础——病毒群所在地特殊的生长环境。通过对近期疾病暴发的监测发现变异不总是存在于特异地区,但确实受宿主动物迁移和生活所在地区特征的影响^[7,10]。Leslie 等^[7]在此基础上进一步进行了研究,利用狂犬病在加拿大向安大略东部和南部流行扩张过程中的病毒进化建立空间分析模型,来阐述一种世界性的重要病原体的空间分布形式受生态学和进化动力学的共同作用。其分析所用的资料来源于疾病预防控制中心(CDC)和加拿大实验室收集的关于狂犬病的长达 30 余年的资料,以 G 基因的 1060 bp 对原有 83 株分离病毒株重新进行测序,又获得了 35 个不同的序列,加上原有的 20 个,用最大似然法对 55 个标本进行系统发生分析,获得相似结果^[7]。并利用地图资料通过数字影像计算了 83 株样本间的欧几里德距离(地理距离),利用 Mantel 统计方法通过回归分析确定了地理位置和遗传距离之间的空间联系,两者显示出了很强的关系($r^2 = 0.90, df = 44, P < 0.001$)。研究者还探索了距离最近共同祖先(Most Recent Common Ancestor, MRCA)的时间,因为序列变异可用于评估距离 MRCA 的时间,用分子时钟法测试分子进化过程,SRDT(Single rate dated tips)模式获得了估计进化率为 $(3.64 \pm 0.40) \times 10^{-4}$ /位点/年,由此推测狐狸狂犬病毒的最近共同祖先可追溯到 1960 年(CI, 1958 - 1963 年)^[7]。在病毒扩散过程中,如果发生新的病毒变异,则扩散波的前部可反映病毒序列的最近进化,扩散波的遗传距离可综合反映病毒群的生态和进化史,他们还通过狂犬病扩散波的遗传距离和距 MRCA 时间之间的相互关系测定流行起源,发现安大略省狐狸狂犬病毒并非来自同一祖先,部分和西部起源支有关,部分起源于东部支,这东西部地区的栖息地和地形学完全不同。通过狂犬病毒研究可见遗传进化和空间生态学密切相关,不同生态环境群体遗传差异是自然选择的结果^[7]。

(2)通过建立时空分布模型预测疾病传播动态:狂犬病毒是一种多宿主寄生的病原体,一旦感染某种动物,则可能在该动物群中流行几十年,甚至几个世纪^[9]。在红狐中的传播动态研究不少,但其在浣熊中的流行情况则少为人知,事实上狂犬病在美国东南部的浣熊中至少流行了 50 多年,虽然发病率较低,但一直在缓慢流行。有报道在北美近期出现了一种和浣熊相关的狂犬病毒变异体,导致狂犬病的再次流行,因此对浣熊狂犬病的研究不断增多,特别是在美国。Coyne 等^[11]曾构建了狂犬病群体动力学模型来预测随浣熊

群体数量的变化狂犬病的流行周期,该模型做出如下定量预测:①狂犬病第一次在动物中的流行周期约 48 个月;②下一次流行周期将缩短;③动物中流行的幅度逐渐下降。通过这个模型可以预测狂犬病在浣熊中流行的时间模式,为了验证其真实性,Real 等^[9]从 CDC 获取了大量浣熊狂犬病的资料,对监测资料进行时间序列分析,发现第一次流行周期的中位数是 45 个月(不同地区在 41 - 60 个月之间),流行周期逐渐缩短,下一个流行周期比上一流行周期短 5 个月,其他资料也和预测结果基本吻合。可见该模型的预测能力较强,问题是该模型虽然可以预测流行周期,但对空间传播动态不适用。研究者试图建立空间模型,他们收集了康涅狄格州 1991 - 1996 年的监测资料,并开发了不连续事件模拟软件,假设每个城镇感染发生在一个惟一的时间点上,设一个感染城镇为 i ,其感染的临近一个城镇为 j ,感染率为 λ_{ij} ,城镇 j 被感染是因为狂犬病浣熊的迁入,设浣熊狂犬病的迁入率为 μ_j ,则第 j 城镇中的感染率为 δ_j , $\delta_j = \mu_j X_j + \sum_i \lambda_{ij} X_i (1 - X_j)$,城镇被感染时 $X_j = 1$,未被感染时 $X_j = 0$,则总的感染率为 $\Delta = \sum_j \delta_j$ 。在此基础上建立了浣熊狂犬病空间传播模型。而后验证了该模型的预测强度,即用该模型模拟了纽约州 754 个城镇浣熊狂犬病首次出现情况^[12],并和实际发生的感染比较,发现 48 个月内模拟结果和实际非常吻合,但 48 个月后有偏差,空间传播比实际发生高 30%。原因是模型模拟的条件前后一致,而实际上前后条件不同,第 49 个月出现了两个流行障碍:一个是配发了浣熊狂犬病疫苗,另一个是空间上遇到了 Adirondack 山,山上的植物是针叶类森林,不是浣熊喜欢寄生的落叶类,因此宿主群体密度显著下降。可见居住环境和森林植物成分的改变对浣熊群体密度和接触概率产生极大作用,影响了传播动力学^[9]。研究还发现较大的河流如康涅狄格河也能起到阻止传播的作用,导致狂犬病流行波的不规则性^[13]。事实证明上述模型的预测能力。

由于狂犬病广泛流行后美国很多地方通过在野生浣熊中配发带有狂犬病疫苗的鱼粉建立了疫苗带,限制了狂犬病在俄亥俄州地区的流行,因此从 1997 - 2004 年只有散发几例病例,且都在俄亥俄州东部和南部,但 2004 年突然在距离疫苗缓冲带 11 km 地区监测到狂犬病动物,因此俄亥俄州中部也面临狂犬病流行的危险。Russell 等^[14]又用随机特异模型预测了美国俄亥俄州狂犬病的可能空间传播路径,指出不太会出现狂犬病剧烈传播的景象,但狂犬病浣熊的远距离迁移可能性不能排除,而且俄亥俄州中部缺乏阻止狂犬病空间传播的生态障碍如高山、河流等,故狂犬病传播的速度可能比纽约和康涅狄格州更快,流行速度以其的 2.5 倍传播,且预测在 33 个月内传遍俄亥俄州中部,41 个月传遍整个州。这种每年 100 km 的传播速度远远高于原先的预计(每年 30 - 60 km),这个预测给狂犬病的控制和早期预防敲响了警钟,必须采取多种措施来预防和控制暴发,如建立新的疫苗带。此外作者提出早期监测和强有力的干预措施才能控制西部的流行^[8]。

(3)通过时空进化研究了解宿主转化及地区传播过程: 狂犬病毒是一种多宿主感染的病原体,可以在各种陆栖肉食动物如犬、狐狸、狼、浣熊、臭鼬及蝙蝠等中形成持久传播网,成了系统发生地理学研究的最具特征的有趣例子。因为不同宿主可能有不同的传播模式,而且存在动物流行病学区域,即病毒感染某一动物的情况在地理上局限于某些地区,而不太会出现一个地区多种感染宿主同时存在的情况。只要生态条件允许,病毒在某一种宿主中广泛传播是可能的^[2]。在 20 世纪 30 年代以前,狂犬病只在犬中存在,主要在非洲和中东,30 年代以后病毒成功传至红狐,先是在欧洲东北部,逐渐向西南方向播散,在 60 年代末到达法国。通过狂犬病病毒群体动力学和分子种系分析就可发现该传播波, Bourhy 等^[15]结合狂犬病毒糖蛋白 G 基因和核蛋白 N 基因建立了系统树。该树显示了狂犬病毒的空间动态传播波,从 30 年代欧洲红狐开始,传播到浣熊狗系统树的根部是分离自犬的病毒,而犬目前仍然是非洲和中东地区的主要传染源^[15]。

传染病病原体的时空动态进化研究已成为传染病研究的热点之一,对传染病的发生、发展趋势的预测和传染病控制意义较大。狂犬病是一种重要的人畜共患病,其近乎 100% 的病死率和不断传播扩散的趋势已引起了全球关注。我国狂犬病疫情也不容忽视,据国家卫生部门对法定传染病疫情通报显示,近几年位居病死率榜首的仍是狂犬病,而且发病数以每年 50% 甚至 60% ~ 70% 的速度递增^[16]。而我国对狂犬病防制的研究仅限于对犬类等的管理,对狂犬病在野生动物中的发病情况缺乏资料,而狂犬病病毒进化方面的研究几乎空白。其他传染病病原体时空进化方面的研究也是刚刚起步,应该加强这方面的研究。

参 考 文 献

[1] Avise JC. Phylogeography: the History and Formation of Species. Harvard University Press, London, 2000:1-447.
 [2] Edward C Holmes. The phylogeography of human viruses. Molecular Ecology, 2004, 13:745-756.
 [3] Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. Science,

2004, 303(5656):327-332.
 [4] Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. J Molecular Evolution, 2002, 54(2): 156-165.
 [5] Badrane H, Bahloul C, Perrin P, et al. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. J Virol, 2001, 75(7):3268-3276.
 [6] Smith JS. Molecular epidemiology//Jackson AC, Wunner WH (Eds.), Rabies. Academic Press, Boston, 2002: 79-111.
 [7] Leslie A Real, Caroline Henderson J, Roman Biek, et al. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. PNAS, 2005, 102(34):12107-12111.
 [8] Forecasting the path of a raccoon rabies epidemic. PLoS Biol, 2005, 3(3):e115.
 [9] Real LA, Russell C, Waller D, et al. Spatial dynamics and molecular ecology of North American rabies. J Heredity, 2005, 96(3):1-8.
 [10] Nadin-Davis SA, Sampath MI, Casey GA, et al. Phylogeographic patterns exhibited by Ontario rabies virus variants. Epidemiol Infect, 1999, 123:325-336.
 [11] Coyne MJ, Smith G, McAllister FE. Mathematic model for the population biology of rabies in raccoons in the mid-Atlantic states. Am J Vet Res, 1989, 50:2148-2154.
 [12] Russell CA, Smith DL, Waller LA, et al. A priori prediction of disease invasion dynamics in a novel environment. Proc R Soc Lond B, 2004, 271:21-25.
 [13] Grenfell B. Rivers dam waves of rabies. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3365-3367.
 [14] Russell CA, Smith DL, Childs JE, et al. Predictive spatial dynamics and strategic planning for raccoon rabies emergence in Ohio. Plos Biol, 2005, 3(3):382-388.
 [15] Bourhy H, Kissi B, Audry L, et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. J General Virol, 1999, 80: 2545-2558.
 [16] 张家崢,汪剑,张华,等. 加深对狂犬病的认识和正确防制. 中国动物保健, 2006, 9(1):17-18.

(收稿日期:2006-12-21)

(本文编辑:尹廉)