

湖南省 2006 年狂犬病病原学监测

戴德芳 张红 刘运芝 刘富强 唐青 李浩 陶晓燕

【摘要】 目的 了解湖南省狂犬病病毒的分布及来源,从病原学角度分析该省狂犬病疫情高发的原因。方法 采集湖南省人间狂犬病高、中、低疫区市售家犬脑组织及疑似病例、病犬标本,用直接免疫荧光法(DFA)和 RT-PCR 检测狂犬病病毒,RT-PCR 阳性标本进行狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列分析。结果 外观正常犬脑组织狂犬病病毒阳性率为 2.78%,23 株狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列同源性范围为 88.8%~100.0%,表明主要是同义突变,病毒株在省内的分布无明显的地域性。系统发生树揭示狂犬病病毒在湖南省省内及与周边省份(贵州、湖北、广西)和其他省份(江苏、河南)间存在扩散循环传播。疑似病例的唾液、尿液、血液标本均未检出狂犬病病毒,皮肤标本检出 1 例阳性。结论 湖南省内普遍存在狂犬病病毒感染犬只,省内与外省的病毒分离株有高度的亲缘关系,此为疫情高发的主要原因。

【关键词】 狂犬病病毒;病原学;监测

Viral surveillance on rabies in Hunan province, in 2006 DAI De-fang*, ZHANG Hong, LIU Yun-zhi, LIU Fu-qiang, TANG Qing, LI Hao, TAO Xiao-yan. *Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China

【Abstract】 Objective To understand the source and distribution of rabies virus (RV) in Hunan province with viral surveillance in order to provide scientific measures for prevention and control on rabies. **Methods** Brain samples from healthy-looking domestic dogs were collected in the agricultural markets at the districts of high, middle, and low incidence rates and detected by direct Immunofluorescence assay (DFA). Positive samples would be further detected by RT-PCR and the surveillance samples were detected by RT-PCR. The positive samples detected by RT-PCR were sequenced with *N* gene. **Results** The infection rate of those healthy-looking domestic dogs with rabies virus was 2.78% in Hunan province in 2005. 23 positive samples' *N* gene were sequenced and their similarities were 88.8%-100.0%. The results indicated that Hunan rabies virus *N* gene aberrance was mainly synonymous aberrance and did not carry obvious regional characteristics. The rabies virus were circulating among different districts in Hunan province, and the neighboring provinces such as Guizhou, Hubei, Guangxi, Jiangsu and Henan. There were no positive samples detected in salivary, blood and urine samples. There was one positive sample detected in two skin samples. **Conclusion** There are dogs infected with rabies virus found in Hunan province and this study showed that rabies virus detected in Hunan had a close genetic relationship with those rabies identified in other provinces, suggesting that study on the immunity and management of dog related rabies should be strengthened.

【Key words】 Rabies virus; Virology; Surveillance

近年来,我国狂犬病疫情一直呈上升趋势。湖南省作为老疫区,疫情更是持续上升,在全国的排名 1~4 位^[1]。2005 年卫生部下发了《全国狂犬病监测方案》,为更好控制狂犬病疫情,了解狂犬病的分布及病原学特点,2006 年我们依据该方案要求对狂犬病进行监测,结果报告如下。

资料与方法

1. 监测点的确定和标本采集:根据湖南省狂犬病发病率排序及专家意见,确定发病率 $\geq 1/10$ 万的地区为高发区,发病率 $\leq 0.2/10$ 万为低发地区,发病率居两者之间的地区为中发地区。按照分层抽样的原则,在湖南省选择狂犬病高发地区的永州、邵阳市,中发地区的常德、湘潭市和低发地区的湘西自治州 5 个市(州),每个市(州)选择 1 个县(分别为冷水滩区、邵东县、桃源县、湘乡市、泸溪县),由当地疾病预防控制中心(CDC)工作人员采集市售家

作者单位:410005 长沙,湖南省疾病预防控制中心(戴德芳、张红、刘运芝、刘富强);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(唐青、李浩、陶晓燕)

犬的脑组织,同时在国家级监测点狂犬病高发区邵阳、衡阳、永州市收集疑似病例的唾液、尿液、组织标本(皮肤、角膜等)和疑似病犬的脑组织标本,上述标本冷冻保存送湖南省 CDC 实验室检测。

2. 狂犬病病毒抗原检测:采用直接免疫荧光法(DFA)。每份脑组织标本在二级生物安全柜内取不同部位的横断面直接印片(玻片经 100% 乙醇浸泡 30 min 处理),患者皮肤和角膜采用冷冻切片,室温干燥后冷丙酮(4℃)固定 30 min,用荧光素标记的抗狂犬病病毒核衣壳蛋白单克隆抗体(Chemicon 公司, Rabies DFA Reagent Cat. No. 5100)染色,37℃ 湿盒孵育 30 min, PBS 缓冲液振荡 2 遍、蒸馏水振荡 1 遍,吹干,90% 甘油封片,荧光显微镜观察结果。

3. 狂犬病病毒特异性核酸检测:DFA 初检阳性的标本和患者体液标本采用 RT-PCR 进行狂犬病病毒特异性核酸的检测。巢式 PCR 引物由中国 CDC 病毒病预防控制所脑炎室提供。用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA。以随机引物 Pd(N)6(TaKaRa 公司),反转录试剂盒(Ready-To-Go Amersham 公司)进行反转录,得到 cDNA 作为 PCR 检测的模板。PCR 反应试剂为 GoTaq Green Mix(Promega 公司),巢式外引物为 F1-N127(+), R1-N8m(-)。第 1 次 PCR 反应产物作为第 2 次 PCR 反应的模板,以巢式内引物(F2-N577 和 R2-N829)扩增约 250 bp 的 N 基因片段。PCR 反应结果用 2% 琼脂糖(Sigma 公司)凝胶电泳检测扩增条带。RT-PCR 法所用引物见表 1。

表1 RT-PCR 法所用引物

引物	序列	引物位置
N127(+)	5'-ATG TAA CAC CTC TAC AAT GG-3'	55~74
N8m(-)	5'-CAG TCT CYT CNG CCA TCT-3'	1570~1587
N577(+)	5'-AAG ATG TGY GCY AAY TGG AG-3'	644~663
N829(-)	5'-GCC CTG GTT CGA ACA TTC T-3'	881~899
NR-B	5'-CT-MGG-ATT-GAC-RAA-GAT-CTT-GCT-CAT-3'	1515~1540

注:引物位置以 PV 株(M13215)为准

4. N 基因片段扩增及测序:两种检测方法均为阳性的标本,用于 N 基因片段(704~1423 bp)的测序。以巢式 PCR 第一次反应产物为模板,反应引物为 N577(+)和 NR-B, PCR 反应结果用 1% 琼脂糖(Sigma 公司)凝胶电泳检查扩增条带。PCR 产物用 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen 公司)纯化后,送北京利嘉富诚生物技术有限公司进行测序。此项工作由中国 CDC 病毒病预防控制所脑炎室

完成。

5. 核苷酸序列分析:用 ClustalX 及 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件比对核苷酸序列的同源性。用 MEGA3(3.1 版)软件中的 NJ 法构建种系发生树。分析中引用的 N 基因序列均来自 GenBank。

结 果

1. 正常犬带病毒率:5 个地区共采集外观正常犬脑组织 683 份, DFA 初筛阳性为 31 份, 经 RT-PCR 确认阳性为 19 份, 阳性率为 2.78% (表 2)。

表2 湖南省正常犬狂犬病病毒携带情况调查

地 点	标本份数	DFA 初筛阳性份数	RT-PCR 确证阳性份数	阳性率 (%)
湘西州泸溪县	152	3	3	1.97
常德市桃源县	102	10	4	3.92
湘潭市湘乡市	114	4	3	2.63
永州市冷水滩区	163	4	3	1.84
邵阳市邵东县	152	10	6	3.65
合 计	683	31	19	2.78

2. 疑似病犬及患者标本检测:全年共收集疑似病例的体液及组织标本 36 份,其中阳性 8 份,阳性率 22.22%。36 份标本中包括 2 份疑似病例尸检的脑组织及皮肤标本(分别为海马回 2 份,脑干、小脑、白质、灰质、眼角膜、脊髓各 1 份,背部皮肤 2 份,咬伤处皮肤 1 份),其中 8 份阳性分别为海马回 2 份,脑干、小脑、白质、灰质、脊髓各 1 份,背部皮肤 1 份;收集疑似病犬脑组织 2 份,结果均为阳性。

3. 狂犬病病毒测序:23 份阳性标本(包括 19 份外观正常犬、2 份疑似病犬及 2 份疑似病例)经 RT-PCR 测序,分布情况见表 3。

表3 2006 年湖南省 23 株狂犬病病毒标本的地区和宿主分布

编号	分离地区	宿主	编号	分离地区	宿主
06HN01	邵东县	外观正常犬	06HN13	泸溪县	外观正常犬
06HN02	邵东县	外观正常犬	06HN14	冷水滩区	外观正常犬
06HN03	邵东县	外观正常犬	06HN15	冷水滩区	外观正常犬
06HN04	邵东县	外观正常犬	06HN16	冷水滩区	外观正常犬
06HN05	邵东县	外观正常犬	06HN17	湘乡市	外观正常犬
06HN06	邵东县	外观正常犬	06HN18	湘乡市	外观正常犬
06HN07	桃源县	外观正常犬	06HN19	湘乡市	外观正常犬
06HN08	桃源县	外观正常犬	06HN20	邵阳县	病犬
06HN09	桃源县	外观正常犬	06HN21	永州市	疑似病例
06HN10	桃源县	外观正常犬	06HN22	永州市	疑似病例
06HN11	泸溪县	外观正常犬	06HN23	湘西州	病犬
06HN12	泸溪县	外观正常犬			

4. *N* 基因片段核苷酸序列同源性比较:23 株狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列同源性范围为 88.8%~100.0%,其中一些标本相互间同源性高达 100%,06HN19、06HN11、06HN12、06HN01 的同源性为 100%,06HN18、06HN15、06HN05、06HN07 的同源性为 100%,06HN16 和 2006 年湘西州病犬的同源性为 100%,06HN17、06HN13、06HN04、06HN05、06HN04、06HN08 的同源性为 100%,永州市的两株病例标本(06HN21、06HN22)与 06HN16 和湘西州病犬的同源性高达 99.2%,06HN16 与 06HN19 的同源性最低,为 88.8%。除 06HN16、06HN23、06HN21、06HN22 外,其他 19 株毒株的同源性高达 97.2% 以上。

5. *N* 基因片段核苷酸序列种系发生分析:从种系发生分析树来看(图 1),23 株病毒大致可以分为 3 群(I、II、III),I 群包含 10 个病毒株,II 群包含 9 个病毒株,III 群包含 4 个病毒株,82.61%(19/23) 的病毒株集中分布于 I、II 群,每群所包含的病毒株均来源于全省不同的地区,其中 I、II 群中均包含 5 个监测点的病毒株,其在省内的分布特点无明显的地域性;Zhang 等^[2]2004 年在湖南省的武冈、湘乡、洞口等地从犬脑组织检测到狂犬病病毒,2007 年湖南省农业科技大学在湘西地区也检测出该病毒(表 4),将这些病毒株与湖南省 2006 年的分离株(100% 同源的取 1 株为代表)及部分外省狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列种系发生树进行比较(图 2)可以看出,湖南省 2004 年、2006 年、2007 年之间以及湖南省与外省间均表现出不同的亲缘关系,其中来自湖南省永州市的病例分离株(06HN21、06HN22)和湘西州病犬分离株(06HN23)与贵州的 Guizhou-A103 株有较近的亲缘关系,06HN22 与贵州的 Guizhou-A103 在同一分支上,亲缘关系更为接近;湖南省武冈的 Hunan-Wg22 和 Hunan-Wg68 与河南省的 Henan-Sq48 及江苏省 Jiangsu-Wx0(H)有较近的亲缘关系,特别是湖南省武冈的 Hunan-Wg68 与江苏省 Jiangsu-Wx0(H)在同一分支上;湖南省邵东 06HN02 和 06HN06、桃源 06HN10、冷水滩 06HN14 与河南省 Henan-Sq59 有较近的亲缘关系;06HN12 (湖南省泸溪犬中分离)与湖北省牛中检测的 hubei070308 有较近的亲缘关系;湖南省桃源的 06HN07、06HN09 与湘乡 Hunan-Xx33、湘西 HNDB28 表现出较近的亲缘关系;湖南省武冈的 Hunan-Wg12、Hunan-Wg26、Hunan-Wg27、Hunan-

Wg430、Hunan-Wg432 与江苏省 Jiangsu-Wx1 和贵州省 Guizhou-A148 表现出较近的亲缘关系。

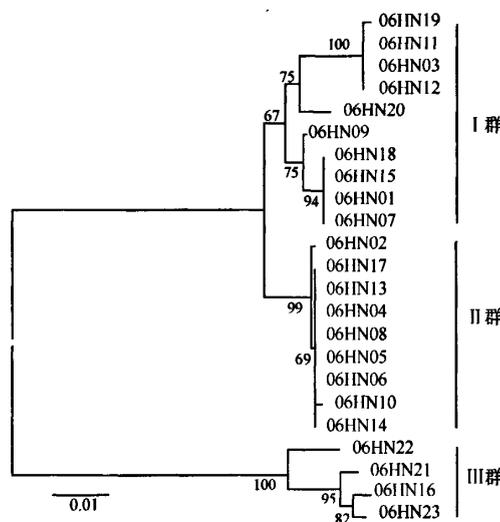


图1 2006 年湖南省 23 株狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列种系发生树

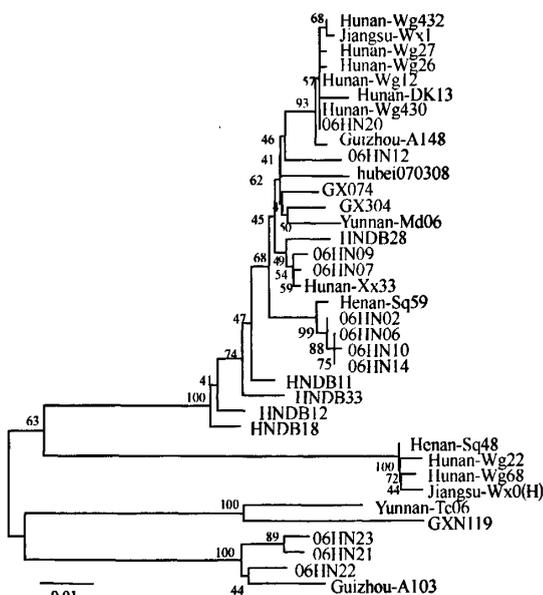


图2 湖南省与部分外省狂犬病病毒 *N* 基因片段核苷酸序列种系发生树

讨论

湖南省是我国狂犬病高发省份之一^[3],近几年一直呈上升趋势,其中 98% 以上的病例是犬伤所致^[4]。本次外观正常犬携带狂犬病病毒率调查中,阳性率为 2.78%,由此可知在湖南省内存在较多的外观“健康”而体内已感染病毒的犬,这些犬起到了

表4 用于系统分析发生的狂犬病病毒株 N 基因序列背景资料

编号	分离年份	分离地区	宿主	GenBank 号	编号	分离年份	分离地区	宿主	GenBank 号
Hunan-Xx35	2004	湖南湘乡	犬	DQ666319	HNDB33	2007	湖南湘西	犬	EU008922
Hunan-Xx34	2004	湖南湘乡	犬	DQ666318	HNDB28	2007	湖南湘西	犬	EU008923
Hunan-Xx33	2004	湖南湘乡	犬	DQ666317	HuNPN01	2006	湖南	猪	DQ496219
Hunan-Wg430	2004	湖南武冈	犬	DQ666315	Guizhou-A158	2004	贵州	犬	DQ666292
Hunan-Wg432	2004	湖南武冈	犬	DQ666316	Guizhou-A103	2004	贵州	犬	DQ666290
Hunan-Wg407	2004	湖南武冈	犬	DQ666314	Guizhou-A148	2004	贵州	犬	DQ666291
Hunan-Wg68	2004	湖南武冈	犬	DQ666313	Henan-Sq59	2004	河南	犬	DQ666306
Hunan-Wg26	2004	湖南武冈	犬	DQ666311	Henan-Sq48	2004	河南	犬	DQ666305
Hunan-Wg27	2004	湖南武冈	犬	DQ666312	GX074	-	广西	犬	DQ866107
Hunan-Wg22	2004	湖南武冈	犬	DQ666310	GX304	-	广西	犬	DQ866117
Hunan-Wg13	2004	湖南武冈	犬	DQ666309	GXN119	-	广西	犬	DQ866111
Hunan-Wg12	2004	湖南武冈	犬	DQ666308	hubei070308	2007	湖北	牛	EF611081
Hunan-DK13	2004	湖南洞口	犬	DQ666307	Jiangsu-Wx0(H)	2004	江苏	犬	DQ666320
HNDB18	2007	湖南湘西	犬	EU008921	Jiangsu-Wx1	2004	江苏	犬	DQ666321
HNDB11	2007	湖南湘西	犬	EU008919	Yunnan_Tc06	2007	云南	犬	EU275243
HNDB12	2007	湖南湘西	犬	EU008920	Yunnan_Md06	2007	云南	犬	EU095330

传染源的作用,是造成湖南省疫情上升和高发的原因之一。犬只的带病毒情况一直备受关注,全国各地采用不同的方法对不同的标本做过多次相关的调查,1999年在四川省用快速狂犬病酶联免疫诊断试剂对15个地区抽样采集的3126份犬唾液标本进行检测,阳性率为1.95%,监测点的970份标本阳性率为2.89%^[5],广西在2005-2006年的食用犬脑组织标本狂犬病带病毒率调查中,阳性率也高达1.9%^[6]。这些结果充分说明“健康”犬携带狂犬病病毒在多个省份普遍存在,而湖南省的调查结果稍高于广西($\chi^2 = 2035.0, P = 0.000$)。由于湖南省当地有养犬的习惯,因此近几年饲养家犬有增多,在农村几乎家家养犬,被犬咬伤事件也随之增加,而犬只的管理和免疫在湖南省一直是狂犬病防制的薄弱环节,全省犬只免疫率(2.1%)距国际上流行病学公认的需要形成免疫屏障的的免疫率(70%)相差太远^[4],由于存在外观“健康”犬较高的狂犬病感染现象,所以应该加强犬只的管理和免疫。

N 基因片段核苷酸序列同源性及种系发生分析已广泛用于狂犬病病毒感染的诊断和调查^[7]。狂犬病病毒株相对固定不易发生变异,因此 N 基因核苷酸序列的变异主要是同义突变,Zhang 等^[2]研究发现,我国 2004 年及以前分离的病毒株都属于基因 I 型。湖南省 2006 年 23 株狂犬病病毒 N 基因片段核苷酸序列表现出不同的同源性(88.8%~100.0%),同源性为 100% 的病毒株来源于 5 个不同的监测点,而分离株在省内的分布特点无明显地域性,说明狂犬病在湖南省内不同地区间是广泛传

播并存在循环,由于犬只的流通性也很大,此结果与 Zhang 等^[2]在湖南省的调查结果相同,但在广西地区却具有高度的同一地域特点^[5],同时湖南省的病毒株与周边相邻省份(贵州、湖北、广西)表现出较近的亲缘关系,这可能是因为 4 省区地理位置相邻,经济交通联系紧密,狂犬病病毒在 4 省区间扩散,且湖南省与江苏、河南等省份的分离株也表现出较近的亲缘关系,表明狂犬病病毒在不同省份之间存在循环,此种传播的范围不仅局限于地理位置相邻的省份。本次结果与广西的调查一致^[6],即广西的病毒标本与湖南、贵州地区来源的病毒株亲缘关系较近,而且病毒在与广西、湖南、贵州不相邻的地区(如河南和江苏省)也有分布。因此在控制本省疫情的同时也要高度关注周边省份及全国疫情动态,做好动物检疫。

参 考 文 献

- [1] 唐青,赵秀芹,陶晓霞. 中国人间狂犬病流行近况分析. 中华流行病学杂志, 2001, 22(1): 8-10.
- [2] Zhang YZ, Xiong CL, Zou Y, et al. Molecular characterization of rabies virus isolates in China during 2004. Virus Res, 2006, 121(2): 179-188.
- [3] 郭绶衡,唐青,李浩. 中国 31 省 1991-2005 年狂犬病流行情况比较分析. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 374-376.
- [4] 唐青,谢世宏,郭绶衡,等. 湖南省狂犬病急剧上升原因调查分析. 疾病监测, 2002, 17(4): 376-377.
- [5] 余光开,陈小燕,余柯,等. 四川省犬只狂犬病携带的流行病学调查. 泸州医学院学报, 2000, 23(4): 286-287.
- [6] 莫兆军,李浩,陶小燕. 广西狂犬病病毒分子流行病学研究. 应用预防医学, 2007, 13(5): 257-262.
- [7] 唐青,杨为松. 狂犬病毒分子生物学及遗传变异研究进展. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(2): 77-81.

(收稿日期:2008-06-12)

(本文编辑:张林东)