

第八卷

流行病学进展

郑锡文 主编 钱宇平 顾问



中国科学技术出版社

内 容 提 要

本套书旨在介绍国内外流行病学的新进展，逐年不定期分卷出版。本书是第八卷，共13章，内容包括：国内外流行病学的实际应用和理论研究的新动态及流行病学研究方法的新进展；急性传染病包括艾滋病、病毒性肝炎、脊髓灰质炎及霍乱的流行病学研究以及评论。本卷还包括药物流行病学、车祸流行病学；在方法学方面，除遗传流行病学中的双生子法研究外，还有分子流行病学中的分子生物学方法。

本书着眼于进展和应用，内容翔实，材料新颖，行文通达准确，流行病学观念上有新的突破。因而，本书不仅可供医务、公共卫生、防疫保健、药物生产与检测等方面的实际工作者和管理人员参考；也适于医学院校师生、医学研究者、健康教育工作者及科普工作者阅读；国家卫生行政部门的官员、计划生育工作者阅读此书，也将获益匪浅。

流行病学进展

(第八卷)

郑锡文 主编

钱宇平 顾问

责任编辑 王 蕾

*

中国科学技术出版社出版(北京海淀区白石桥路32号)

北京星城印刷厂印刷

*

开本：787×1092毫米 1/16 印张：16.75 字数：416千字

1995年7月 第1版

1995年7月第一次印刷

印数：1 500 定价：20.00元

ISBN 7-5046-1428-9/R·520

前 言

随着医学科学的迅猛发展和多学科研究工作的开展, 流行病学日益受到人们的重视和关注。流行病学研究早已不仅限于急慢性传染病, 还包括种种慢性病、地方病、营养缺乏病、环境医学、劳动卫生、计划生育、围产期保健、先天缺陷以及临床各科的多发病。这些方面的疾病防治与科研实践, 又反过来促进流行病学方法和应用向纵深发展。为了向广大读者介绍国内外流行病学原理、方法和应用的最新知识和信息, 以促进交流, 我们组织编写了《流行病学进展》。

《流行病学进展》自1981年以来, 已陆续有七卷与读者见面。它深受多门学科广大读者的欢迎, 为医学多方面的科研、教学以及流行病的实际防治工作起到了促进作用。

第八卷共有13章, 内容翔实新颖, 结合实际。对人民健康及生命危害较大的病毒性肝炎、脊髓灰质炎、霍乱分别详细论述; 对于目前呈全球蔓延的艾滋病, 作者参考国内外研究进展及个人经验, 作了全面介绍; 此外本卷另辟章节论述了一些新的研究领域, 如人类疱疹病毒六型、幽门螺杆菌感染的流行病学, 既总结了多年经验, 又从理论上加以概括。药物流行病学和车祸流行病学总结了国内外这两方面的实际经验, 也符合社会生活的实际需要。本卷还收集了两篇方法学方面的文章, 可供读者研究工作中参考。

本卷仍由中国科学技术出版社出版发行。在本书出版之际, 谨向曾对书稿审读、指导和提供意见的各位专家, 向给予本书出版以关怀和支持的诸多同道深表感谢。

由于编者水平所限, 在全书的内容、方法和编排上定有诸多不当之处, 恳望不吝指正。

《流行病学进展》编委会

一九九四年十二月

编委会名单

主 编 郑锡文

顾 问 钱宇平

编 委 郑锡文 吴系科 施侶元 李 竹 张宝安

撰 稿 (按论著前后顺序排列)

高守一 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

段广才 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

郑锡文 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

庄 辉 北京医科大学公共卫生学院流行病学教研室

吴系科 安徽医科大学公共卫生学院流行病学教研室

王声湧 暨南大学医学院流行病学教研室

胡毅玲 暨南大学医学院流行病学教研室

张荣珍 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

俞顺章 上海医科大学公共卫生学院流行病学教研室

陈 刚 上海医科大学公共卫生学院流行病学教研室

赵守军 上海医科大学公共卫生学院流行病学教研室

徐志一 上海医科大学公共卫生学院流行病学教研室

孙 伟 北京医科大学公共卫生学院流行病学教研室

萧 俊 北京医科大学公共卫生学院流行病学教研室

叶顺章 中国医学科学院皮肤病研究所

王千秋 中国医学科学院皮肤病研究所

陈志新 华西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

王建华 天津医科大学公共卫生学院流行病学教研室

刘汉明 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

俞东征 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

目 录

第一章

霍乱流行病学进展高守一 段广才(1)

第二章

艾滋病流行病学进展郑锡文(25)

第三章

病毒性肝炎流行病学研究进展庄 辉(65)

第四章

药物流行病学——药品上市后应用的群体研究吴系科(83)

第五章

车祸流行病学王声湧 胡毅玲(96)

第六章

消灭脊髓灰质炎流行病学进展张荣珍(117)

第七章

蓝绿藻毒素与原发性肝癌.....俞顺章 陈 刚(149)

第八章

乙型肝炎传播动态的数学模拟及其在免疫预防对策中的应用.....赵守军 徐志一(162)

第九章

人类疱疹病毒六型的研究进展.....孙 伟 萧 俊(176)

第十章

沙眼衣原体感染的流行病学研究进展叶顺章 王千秋(184)

第十一章

幽门螺杆菌感染流行病学研究进展陈志新(204)

第十二章

遗传流行病学中的双生子法研究王建华(222)

第十三章

分子流行病学中的分子生物学方法刘汉明 俞东征(245)

第一章 霍乱流行病学进展

高守一 段广才

要 目

- 一、引言
- 二、霍乱病原学
 - (一) 霍乱弧菌分型
 - (二) 霍乱弧菌毒力的分子生物学
 - (三) 霍乱的致病菌
- 三、霍乱流行病学
 - (一) 霍乱流行现状
 - (二) 传播途径和传染源
- 四、霍乱分子流行病学
 - (一) 流行性质和菌株类型的确定
 - (二) 传染来源的分析
 - (三) 菌群分布及相互关系分析
 - (四) 快速诊断和监测
- 五、霍乱预防及控制
 - (一) 霍乱菌苗研究
 - (二) 霍乱预防和控制
- 六、结语

一、引 言

霍乱是急性肠道传染病,发病急,传播快,波及范围广,危害十分严重。我国《传染病防治法》规定霍乱为甲类传染病,它也是目前三种国际检疫传染病中危害最为严重的一种。根据血清学分型将霍乱弧菌分为O1群和非O1群霍乱弧菌,世界卫生组织(WHO)规定O1群菌为霍乱病原菌,非O1群霍乱弧菌按一般腹泻病原对待。在O1群霍乱弧菌中,根据生物学分型又分为古典生物型和埃尔托生物型。到目前为止,已发生7次霍乱世界大流行,前6次均由古典型霍乱弧菌引起。1961年开始由埃尔托型霍乱弧菌引起的第7次霍乱世界大流行,34年来不断扩大蔓延,至今已波及五大洲140多个国家和地区,报告病例总数达350万。但实际发病人数远远超过这一数字。根据WHO的一次专家会议估计,全球每年约发生550万霍乱病人,引起亚洲10万和非洲2万人死亡。如不治疗,霍乱仍然是最危险的传染病之一,病死率仍可高达40%^{〔1〕}。特别是进入90年代,全球霍乱流行形势更为严峻。1991年拉丁美洲发生了本世纪首次霍乱大流行,不到一年报告病例近40万。同年非洲的病例数也大幅度增加,是1970年霍乱

入侵非洲以来报告病例最多的一年。1991年全球59个国家和地区报告病例近60万,是
年全球报告病例数的总和(表1-1)。1992年印度出现霍乱新菌型——霍乱弧菌O139。

表1-1 第七次霍乱世界大流行五大洲报告病例数

年代	报告霍乱		报 告 病 例 数				
	国 家 数	亚洲	非洲	欧洲	美洲	大洋洲	合计
1961	9	61456	—	—	—	—	61456
1962	11	41575	—	—	—	—	41575
1963	14	65357	—	—	—	—	65357
1964	17	81401	—	—	—	—	81401
1965	15	51338	—	—	2	—	51340
1966	12	33779	—	—	—	—	33779
1967	11	24167	—	—	—	—	24167
1968	11	27852	—	—	—	—	27852
1969	14	33040	—	—	—	1	33041
1970	36	33090	11195	6	—	—	44291
1971	36	97657	57196	95	—	—	154948
1972	35	62439	6654	4	—	44	69141
1973	36	99493	9193	302	1	—	108989
1974	40	99224	6951	2483	1	6	108665
1975	29	82253	6740	1474	—	—	90467
1976	27	65973	2791	13	—	—	68777
1977	35	50872	8791	7	4	1309	60983
1978	40	50820	23419	5	12	533	74789
1979	43	35196	19634	289	1	51	55171
1980	40	19505	18285	3	13	16	37822
1981	42	19828	17764	41	21	2	37656
1982	37	15191	37427	21	—	2217	54856
1983	33	27005	36722	12	3	319	64061
1984	35	11801	17060	11	1	20	28893
1985	36	13383	27108	9	4	6	40510
1986	36	5774	40626	52	18	3	46473
1987	34	17558	30929	14	5	1	48507
1988	30	20872	23223	14	10	1	44120
1989	36	18007	35951	11	1	—	53970
1990	37	30979	38683	349	7	66	70084
1991	59	49791	153367	300	391220	—	594694
1992	68	16299	91081	18	354089	296	461783
1993	78	90862	76713	73	209192	5	376845

乱,不到半年即席卷印度和孟加拉国^[2,3]。WHO要求各国一旦发现此种病例应按霍乱对待^[4]。有些学者认为这标志着第八次霍乱世界大流行的开始^[5,6]。1993年全球报告的病例总数虽然下降,但报告的国家数(78个)是历次世界大流行中最多的一年。特别是东南亚一些国家1993年出现了一次埃尔托霍乱的全面再发,使亚洲的病例数增加到1992年的5.5倍^[7]。我国经过1990~1992年病例数处于低水平之后,1993年也有较大幅度上升,同时在新疆出现了O139霍乱的局部爆发^[8]。1994年入夏以来,霍乱病例比头年又有上升。从全国来看,优势菌型仍为埃尔托生物型、小川血清型、1b噬菌体-生物型。O139血清群菌株仅占少数。近年来国内外学者对霍乱弧菌及霍乱流行病学进行了深入细致的研究,取得了很大进展。本文仅对此作一简要概述。

二、霍乱病原学

(一) 霍乱弧菌分型

1. 生物分型与血清分型方案 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*, 简称VC)是1883年第五次霍乱世界大流行时,德国学者Koch在埃及发现的。其后,1905年德国学者Gotschlich又在埃及西奈半岛的埃尔托 (El Tor) 检疫站从麦加朝圣者和其他一些疾病死亡的病人肠道中分离出6株弧菌,其与Koch发现的VC在形态、生化反应、血清学和其他特性方面极为相似,但具有溶血活性,被命名为埃尔托弧菌 (El Tor *Vibrio*,简称ETV)。当时该地并无霍乱,死者生前也无霍乱症状。此后从印度的河水 (Venkatraman等,1941)、中东一些城市的水源如麦加的Zam-Zam圣井水 (Abdoelrachman, 1944-45),以及无症状的人群中分离出这种弧菌,但均未因此引起霍乱问题。多年来一直认为埃尔托弧菌不致病或仅引起轻度腹泻。然而1937~1958年印度尼西亚西里伯岛 (现称苏拉威西岛) 发生由ETV引起的4次小流行 (Tanamal 1959)。由于病例数少,地区局限,国际上一直视为该岛的地方病。为区别于古典霍乱, de Moor称其为El Tor副霍乱 (de Moor, 1949)。然而1961年本病先在印尼国内传播,随后传至国外,首先波及亚洲各国,继之蔓延至非洲、欧洲、大洋洲的国家和地区。鉴于埃尔托霍乱与古典霍乱基本相同,1962年15届世界卫生大会决定将其列入《国际卫生条例》霍乱项内,按霍乱同样对待,并称这次流行为霍乱的第七次世界大流行。Hugh对大量菌株进行研究,认为ETV与VC的差异不足以证明它们是两个单独的种,提出将ETV作为VC的一个生物型 (Hugh, 1965)。后来将VC分为古典生物型 (classical biotype,简称CVC) 和El Tor生物型 (El Tor biotype,简称EVC)。

根据菌体“O”抗原的不同, Gardner和Venkatraman (1935)^[9]应用血清学方法将霍乱弧菌分为6个O抗原群, O1群被认为是真正的霍乱病原菌。其后, Sakazaki等 (1970)^[10]、 Shimada等 (1977)^[11]用加热全菌“O”抗原, 制备免疫抗血清的方法, 曾将霍乱弧菌分出83个O血清群, 其中O1群为霍乱病原菌包括CVC和EVC, 其他群被称为不凝集弧菌 (NAG)、或非霍乱弧菌 (NCV)、或非O1群霍乱弧菌。1994年Shimada等^[12, 13]又将此种分型方案进一步扩大, 把霍乱弧菌分为155个O血清群, 其中O1群和O139群 (同义词Bengal) 为霍乱的病原菌。O1群的两个生物型都有共同的群特异性抗原成分A, 同时它们又有不同的型特异性抗原成分B和C^[14, 15]。因此, 两个生物型又可分为三种血清型: 小川型 (Ogawa, 抗原成分A和B, 及少量C)、稻叶型 (Inaba, 抗原成分A和C) 和彦岛型 (Hikojima, 抗原成分A、B和C), 由于后者容易发生血清型变异, 而成为小川或稻叶型, 所以又称为不稳定型。

2.噬菌体-生物分型与EVC的两类菌株^[16] 如上所述,同属埃尔托型由于来源不同,菌株的致病性和流行病学特点有显著不同。由于缺乏明确的区分方法,过去常给ETV冠以分离地区的名称,如西里伯株、埃及株或印度株等。第七次世界大流行后,此问题尤为突出。

1961年埃尔托霍乱传入我国并引起流行,1965年基本控制。但在流行后已无病人或很少有病人的情况下,经检索外环境水中仍不断查出EVC。当时无法区分这些水中菌株与流行期间病人菌株是否相同,给防疫工作造成很大困难。由原中国医科院流研所于1966年选出我国分离的5株弧菌噬菌体作为分型噬菌体,根据五株噬菌体的裂解模式不同对EVC进行分型。对来源不同的7273株菌分型,可分出22个噬菌体型。分析结果显示一个重要规律(表1-2),即来源不同的

表1-2 7273株不同来源EVC噬菌体分型*

噬菌 体型	疫区省流行年				疫区省非流行年				非疫区省			
	人		水		人		水		人		水	
	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
1~2	3396	95.91	158	76.70	17	14.91	84	2.55	0	0	0	0
3~7	125	3.53	20	9.71	9	7.89	309	9.38	0	0	9	7.69
8~12	19	0.54	20	9.71	72	63.16	2289	69.47	0	0	47	40.17
13~22	1	0.03	8	3.88	16	14.04	613	18.60	0	0	61	52.14
合计	3541	100.00	206	100.00	114	100.00	3295	100.00	0	0	117	100.00

* 按流研所1966年22型分型表

菌株在噬菌体型别的组成上明显不同:疫区省流行年从病人和带菌者分离的菌株89.3%属于对5株噬菌体全敏感的噬菌体1型,1及2型达95.9%。而疫区省非流行年和非疫区从水中分离的菌株88.1%和92.3%属于噬菌体8~22型,对分型噬菌体表现出不同程度的抗性,22型为全抗性。很明显,菌株的噬菌体型与其能否引起本病流行之间存在密切关系。从而在1966年分出22型的基础上,将EVC区分为两类不同菌株:对分型噬菌体表现敏感的“敏感株”和表现抵抗的“抗性株”,这两类菌株在流行病学意义上恰恰相当于“流行株”(epidemicogenic strain)与“非流行株”(non-epidemicogenic strain)。这一分型方案以后对历年菌株进行分型不断增加型别,于1978年达到全部的32型(表1-3)。与同年提出的生物分型(a~1型)(表1-4)相结合的噬菌体-生物分型方案,能分出更多型别,区分两类菌株也更准确(表1-5)。根据这一分型方案,噬菌体型1~5和生物型a~f结合起来为流行株,其它各型为非流行株。流行株是具有引起霍乱流行和大流行潜力的菌株。如第七次世界大流行开始时,印尼菌株和传入我国的EVC菌株均为小川1a,1964年以后的小川1b,1978年以后的稻叶1d均为常见的流行株。1991年拉美大流行株也是稻叶1d。非流行株多不致病,或引起轻度腹泻。1905年的埃尔托弧菌原始株,1960年泰国乌汶轻型腹泻病人株,1957年印度河水株和1978年巴西的污水株分别属于18e、22l、31e和28k的EVC非流行株^[17,18]。我们的研究表明,两类菌株的毒力、定居能力和产毒能力等均有显著不同。分子遗传学证实,流行株具有特征性的染色体酶谱,而非流行株酶谱类型繁多,但与流行株酶谱不同。霍乱毒素(CT)基因探针杂交证明,流行株具有CT基因,非流行株则无。噬菌体-生物分型、染色体酶谱和CT基因检测三项试验在区分两类菌株上结

表1-3 埃尔托型霍乱弧菌噬菌体分型 (1978年)

噬菌		对分型噬菌体的敏感性					噬菌		对分型噬菌体的敏感性				
体型	VP1	VP2	VP3	VP4	VP5		体型	VP1	VP2	VP3	VP4	VP5	
1	+	+	+	+	+		17	-	-	-	+	+	
2	+	+	+	-	+		18	-	-	+	-	+	
3	+	+	-	+	+		19	-	+	-	-	+	
4	+	-	+	+	+		20	+	-	-	-	+	
5	-	+	+	+	+		21	-	-	+	+	-	
6	+	+	-	-	+		22	-	+	-	+	-	
7	-	+	+	-	+		23	+	-	-	+	-	
8	-	-	+	+	+		24	-	+	+	-	-	
9	-	+	-	+	+		25	+	-	+	-	-	
10	+	-	-	+	+		26	+	+	-	-	-	
11	+	-	+	-	+		27	-	-	-	-	+	
12	+	+	-	-	+		28	-	-	-	+	-	
13	-	+	+	+	-		29	-	-	+	-	-	
14	+	-	+	+	-		30	-	+	-	-	-	
15	+	+	-	+	-		31	+	-	-	-	-	
16	+	+	+	-	-		32	-	-	-	-	-	

表1-4 埃尔托型霍乱弧菌生物分型(1978年)

生物型	生物学性状			
	溶原性	对溶原噬菌体的敏感性	山梨醇发酵	溶血试验
a	+	-	-	+
b	+	-	-	-
c	-	+	-	+
d	-	+	-	-
e	-	-	-	+
f	-	-	-	-
g	+	-	+	+
h	+	-	+	-
i	-	+	+	+
j	-	+	+	-
k	-	-	+	+
l	-	-	+	-

表1-5 噬菌体-生物分型区分两类菌株的标准

噬菌		生物型										
体型		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k l
1	● ● ● ● ○ ○	△ △ △ △ △ △										
2	● ● ● ● ○ ○	△ △ △ △ △ △										
3	● ● ● ● ○ ○	△ △ △ △ △ △										
4	○ ○ ○ ○ ○ ○	△ △ △ △ △ △										
5	○ ○ ○ ○ ○ ○	△ △ △ △ △ △										
6	△ △ △ △ △ △	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲										
	△ △ △ △ △ △	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲										
	△ △ △ △ △ △	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲										
	△ △ △ △ △ △	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲										
32	△ △ △ △ △ △	▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲										

● 常见流行株
○ 不常见流行株

▲ 常见非流行株
△ 不常见非流行株

果一致，证明按噬菌体-生物分型区分两类菌株具有遗传学基础。通过多年的应用和实践，这种分型方案为研究霍乱流行规律、制订防疫对策，及对霍乱病原的研究提供了重要手段和依据。按两类菌株采取区别对待的防疫对策，集中力量加强对流行株的监测和控制，对非流行

株则按一般腹泻病菌处理,不仅提高了防疫效果,而且节省大量人力物力。

1977年Merson等^[19]在关岛的一次埃尔托霍乱小流行中,用检测霍乱肠毒素的血清学方法证明,从病人分离的EVC菌株为产毒株,而从外环境中分离的EVC菌株为非产毒菌株。此后从美国、英国、日本和巴西等国的外环境水中也分离出非产毒的EVC菌株,且周围未发现霍乱感染者。WHO科学工作组(1980年)称霍乱弧菌流行株为O1群霍乱弧菌,不产毒的为非典型O1群霍乱弧菌^[20]。多年来,国外学者应用噬菌体等分型方法对霍乱弧菌进行分型研究,虽取得了一定的进展,但未取得一致的结论和可供现场应用的有效方案。WHO科学工作组^[20]鼓励各国学者研究用噬菌体分型区分O1群和非典型O1群霍乱弧菌,但至今未见这方面的报道。关于产毒株、非产毒株与流行株、非流行株的概念两者基本一致,但不完全相同,即流行株必然是产毒株,但产毒株不一定是流行株。

3. 霍乱弧菌分子生物学分型和分类 近年来,分子生物学的研究和进展为霍乱弧菌分子生物学特性研究和分型、分类提供了许多有效的手段和理论依据。因此应用分子生物学方法进行霍乱弧菌的分型和分类研究方面也有很大进展。如Momen等^[21]应用酶电泳方法对巴西等地分离的49株O1群霍乱弧菌进行研究,根据几种酶的变化情况,将它们分为三个组群:第一组群包括从病人分离的EVC,第二组群为CVC,第三组群为其它有较大变异的菌株。Desmarchelier等^[22]应用多位点酶电泳(MEE)方法对澳大利亚分离的50株O1群霍乱弧菌和40株非O1群霍乱弧菌进行研究,O1群菌株分属9个型,非O1群菌株分属33个型。Wachsmuth等^[23]应用MEE法和分子杂交的方法,对197株世界不同地区霍乱弧菌进行研究,将O1群霍乱弧菌分为4个克隆。一个是第七次世界大流行的EVC流行菌株(即东方菌株),其它三个分别是:美国海湾分离的EVC产毒株、澳大利亚菌株和拉丁美洲正在流行的EVC。其它为过去从巴西、墨西哥和秘鲁分离的非产毒EVC。Alm等^[24]报道用特异的核酸探针能有效地区分EVC和CVC。Wright和Yoh等(1992)用酶标记寡核苷酸特异地检测霍乱肠毒素基因,用于区分产毒株和非产毒株。Koblavi和Popovic等^[25]报道根据16S rRNA基因酶切图谱,O1群霍乱弧菌可分为17和27个核糖体基因型。我们^[26]应用MEE方法将473株O1群VC(按噬菌体-生物分型区分为流行株366株,非流行株75株)分为71个ET型,其中流行株属于1~28ET型,其它为非流行株,相互间没有型别交叉。同时将98株非O1群菌株分为51个ET型,它们与O1群菌株之间也没有型别交叉。他们还应用核酸脉冲场凝胶电泳(PFGE),结合MEE和核酸分子探针杂交方法将46株霍乱弧菌分为24个基因型,经过数值分类和克隆分析,所有O1群流行株(包括CVC和EVC流行株)与O139菌株为一个克隆群,其遗传关系非常紧密,具有一致的霍乱病原菌的分子生物学特征。EVC非流行株和非O1群VC与它们之间的关系较远,进一步从分子生物学方面阐明了霍乱病原菌的特征,及其与EVC非流行株和非O1菌株的区别。为霍乱的分子流行病学研究及制定防制对策提供了进一步的依据^[27]。此外,我们的研究也表明,O139菌具有EVC流行株的很多特性。据Ramamurthy等^[2]报道,他们检测了从印度分离的48株O139霍乱弧菌发现。这些菌株都具有CT和Zot基因,而不与非O1群霍乱弧菌克隆的ST基因探针杂交。Shimada等^[28]报道,用CT基因探针检测了223株从印度和孟加拉分离的O139霍乱弧菌,结果全部为阳性。通常情况下,非O1群霍乱弧菌CT基因阳性的比例大约为1%,100%具有CT基因的非O1群霍乱弧菌从未发现,因此他们认为这个新型霍乱弧菌应按典型霍乱弧菌对待。

(二) 霍乱弧菌毒力的分子生物学

霍乱是可以引起世界大流行的疾病,因此霍乱病原菌已必然具有其独特的分子生物学特征和毒力特征。霍乱弧菌流行株可产生致泻性极强的霍乱毒素(cholera toxin, CT)^[39, 40],使胞内cAMP/cGMP比值上升,分泌增加,大量肠液积聚,形成严重的水样腹泻综合症。除此之外,霍乱弧菌流行株还有许多其它毒力因子和毒力相关因子,而且流行株毒力基因表达受一组调控基因的控制^[31~35]。近年来在这一方面的研究有许多重要进展,为认识霍乱弧菌的毒力特征提供了重要资料的依据。

近年来霍乱弧菌新的毒力因子不断被发现^[36~38]。Setarunnahar等^[39, 40]在CT基因阴性的O1群霍乱弧菌中发现有新的霍乱毒素,随后又有学者发现在CT基因阳性的O1群霍乱弧菌中也可产生这样的毒素^[41, 42]。Baudry等^[43]在研究霍乱毒素基因结构的同时发现CT结构基因上游的一段序列可以产生一种毒素物质,通过进一步的研究表明,这种物质作用于肠粘膜上皮细胞的紧密联结,增大细胞间隙而引起腹泻,他们将这种毒素命名为Zot,这种毒素广泛分布于O1群霍乱弧菌流行株中^[44~46]。随后,Trucksis等^[47]又在Zot基因的上游发现了另一种新的霍乱毒素,这种毒素类似于霍乱毒素,在家兔肠段结扎试验中可以引起兔肠段产生积液,因此他们将这种毒素命名为Ace。O'Brien等^[48]的研究表明,在霍乱弧菌产毒株中有许多可产生志贺样毒素(Slt),并认为Slt可能是霍乱毒素中的重要致泻因子。除此之外还不断有学者报道发现具有致泻活性或细胞毒性的溶血素,以及血凝素、粘附因子在霍乱弧菌毒力方面的作用。这些毒素因子可以在O1群霍乱弧菌中发现,也可在非O1群霍乱弧菌中发现^[49~51]。另一方面,在霍乱弧菌毒力因子的表达调控方面也有很大进展。Vasil等^[52]用结合转移的方法表明,某些基因可以决定霍乱肠毒素的表达。Mekalanos等^[53]应用诱发突变的方法获得霍乱毒素高表达菌株,并对霍乱毒素表达的调控基因进行了染色体定位。Miller等(1984)终于克隆到对霍乱毒素表达起重要调控作用的基因,并命名为toxR^[54~56]。将569B菌株的toxR缺失,其产CT能力下降几十到一百倍。随后他们又在toxR基因下游发现了toxS和toxT^[57, 58],它们与toxR一起共同作用于霍乱毒素的基因表达。由此可见,霍乱毒力是成组表达并受一组调控基因的调节^[59, 60]。如DiRita等研究表明,ToxR不仅调节CT基因的表达^[61, 62],而且也调节着Tcp菌毛基因的表达和抗细菌素的脂蛋白的表达^[63],目前已发现有17个基因的表达受ToxR这一调控系统的调节控制。还有研究表明,霍乱毒素基因在染色体上是多拷贝的,以起到基因放大作用,这一作用受recA基因的影响^[64, 65]。RS对霍乱弧菌毒力强弱的影响也是十分明显的^[32]。Goldberg等^[66]还报道铁调节蛋白在霍乱弧菌毒力表达方面也有重要作用。众多的研究表明,霍乱弧菌毒力是成簇表达的,毒力的表达受一种被称为连级调控系统的作用^[35]。最近的研究表明,O139菌同样具有这些毒力因子和上述毒力基因表达的调控系统。这一机理可能是霍乱作为烈性传染病并能造成流行和大流行的的重要原因。

(三) 霍乱的致病菌

1962年第十五届世界卫生大会在《国际卫生条例》所规定的检疫传染病中不再使用副霍乱一词,在“霍乱”项中包括O1群VC引起的古典霍乱和埃尔托霍乱。并称由EVC引起的霍乱大流行行为第七次世界大流行。一般认为非O1群霍乱弧菌不致病或仅引起轻度腹泻或肠道外感染^[67]。但越来越多的研究表明,在非O1群霍乱弧菌中也有很多可以引起较轻度或严重的腹泻^[68~73]。更为严重的是1992年在印度和孟加拉国的许多地区发生了由新型非O1群霍乱弧菌——O139霍乱弧菌引起的霍乱样大流行^[2, 3]。据报道O139菌具有引起霍乱样爆发、流行、甚至

大流行的潜力。研究表明:O139群VC具有ctx, tcpA等主要毒力基因及毒力调控系统,并具有EVC流行株的许多分子生物学特征,可划为一个克隆群。所不同的是与O1群菌相比,O139菌株的O抗原rfb基因有很大差别^[74]。WHO已要求世界各国如发现O139菌株引起的病例应按“霍乱”对待^[4]。因此,目前霍乱的病原菌应包括CVC、EVC流行株和O139霍乱弧菌(O139或BVC)。但为便于叙述不同病原菌所引起的霍乱流行情况,在此我们仍称它们所引起的霍乱为古典霍乱、埃尔托霍乱和O139霍乱。

三、霍乱流行病学

(一) 霍乱流行现状

第一至第六次霍乱世界大流行是由CVC引起的^[75]。由EVC引起的第七次世界大流行,从1961年至今已波及世界五大洲的140国家和地区,为在历次世界大流行中,流行时间最长,波及范围最广者,且疫情仍在发展中。30多年来,五大洲报告霍乱病例数见表1-1。1984~1993年亚洲、非洲和美洲报告病例数见图1-1^[76]。1993年这三大洲各国发病率见图1-2、1-3、1-4^[77]。

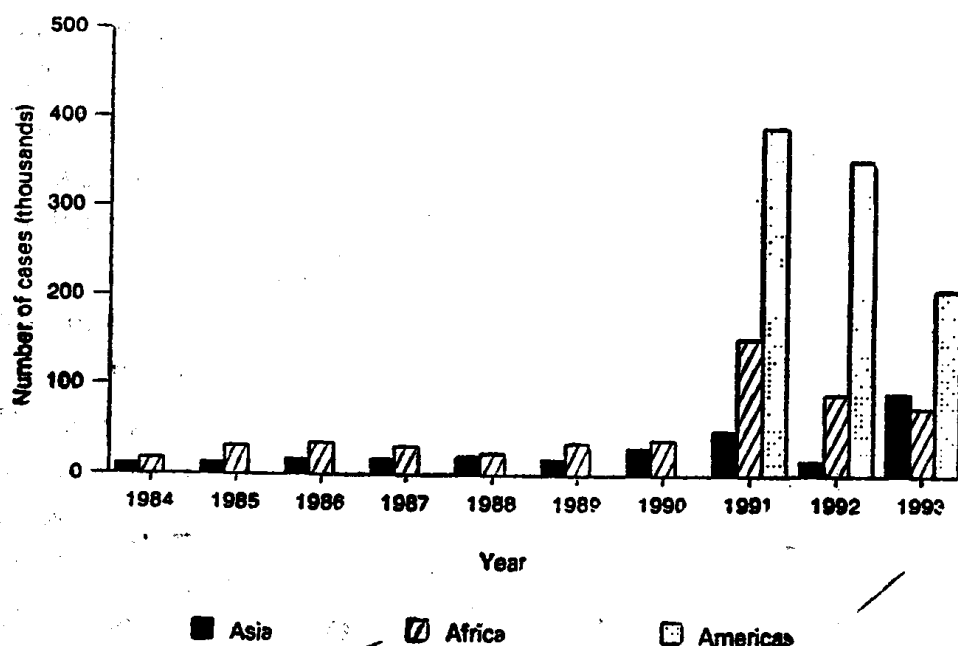


图1-1 1984~1993年三大洲报告WHO霍乱病例数
[引自: WER 1994 69(29):213]

1. 埃尔托霍乱流行情况 1961年开始的霍乱第七次世界大流行,从其传播和扩展进程大致可以分为三个阶段,第一阶段为1961年从印尼传出,先后侵犯西太区和东南亚地区。至1969年共波及26个国家和地区,每年报告病例2.4~8万。第二阶段开始于1970年,流行范围扩展到非洲。其后20年间每年约有30~40个亚、非、欧、美和大洋洲国家报告3~16.5万病例。第三阶段是1991年开始,从1月份侵入秘鲁发生霍乱大流行,并迅速波及几乎全部中南美洲国家。以致近三年来每年有59~78个国家和地区报告38~60万病例。1992和1993年中南美洲霍乱病例数虽有下降,但亚洲、非洲疫情仍很严峻。不难看出,第七次世界大流行后,

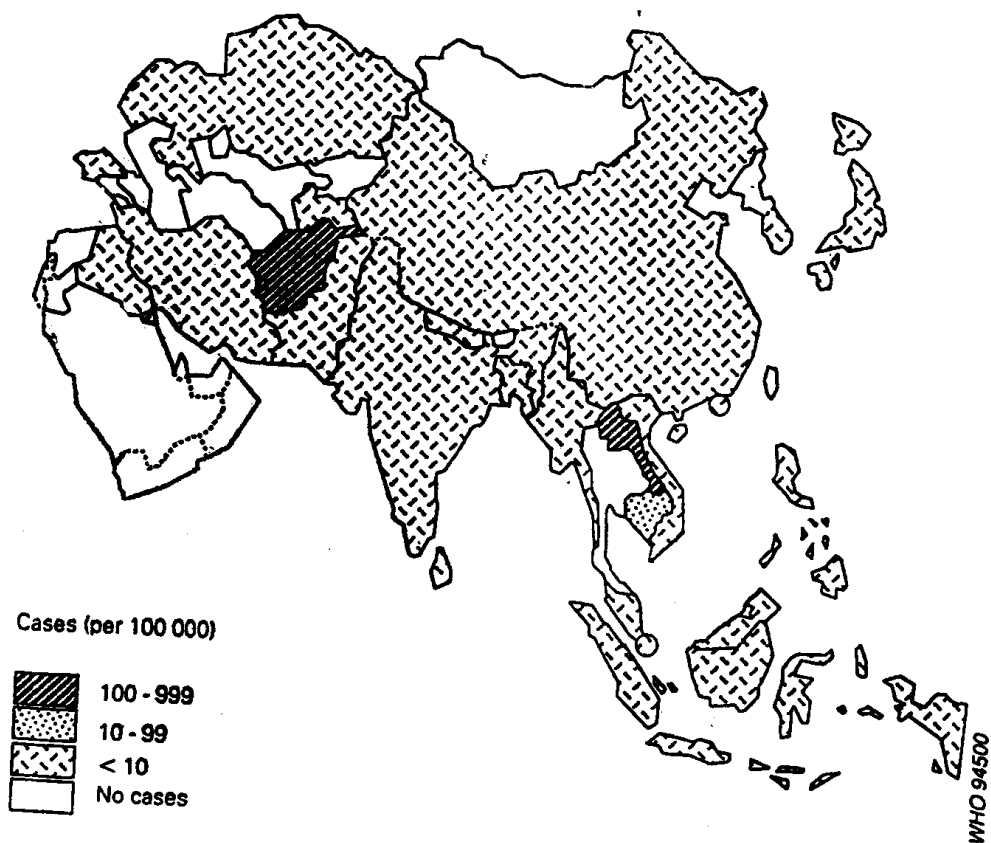


图1-2 1993年亚洲霍乱发病率
〔引自: WER 1994 69(28):205〕

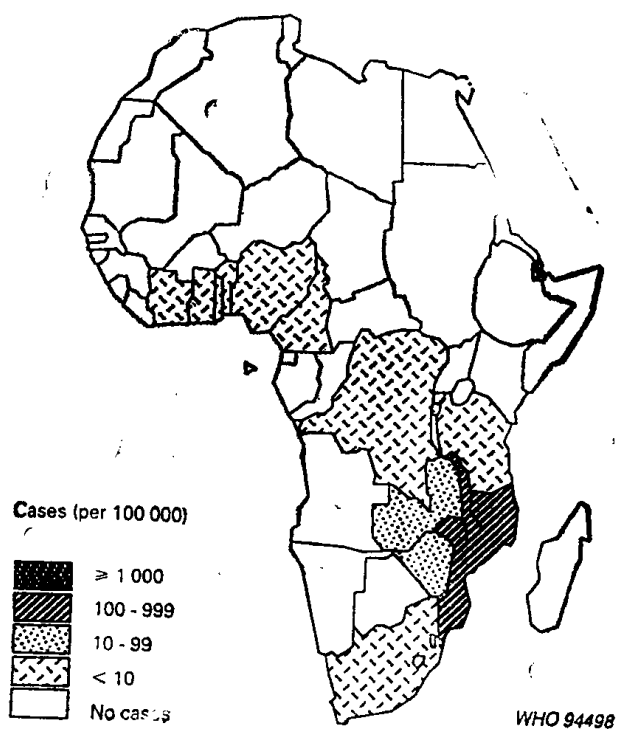


图1-3 1993年非洲霍乱发病率
〔引自: WER 1994 69(28):205〕

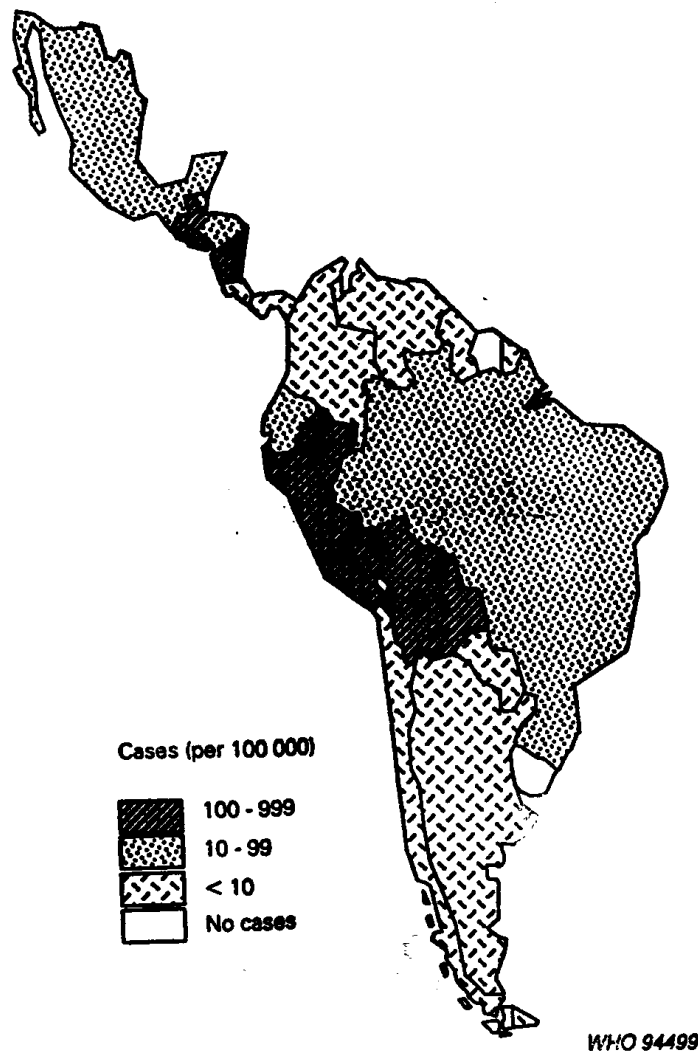


图1-4 1993年中南美洲霍乱发病率
〔引自: WER 1994 69(28):205〕

EVC仍继续具有引起大流行的能力, 而且报告霍乱的国家数和病例数, 一个阶段比一个阶段增多。近年来霍乱的流行情况如下。

美洲 埃尔托霍乱于1991年1月侵犯秘鲁后, 在仅有2200万人口的国家里, 头4个月平均每天发生1700多例, 至流行的第7、8、9周(3月份高峰)每周报告达2万例。在秘鲁先是侵犯沿岸地区, 随后蔓延至山区和丛林地区。三种类型地区传播途径不尽相同, 主要是街头小贩售卖受污染的食物和饮料, 饮用的河水、井水和城市供水系统受污染。秘鲁疫情全年未断, 每周均有报告。七月以后每周在2500例左右, 11月开始回升, 1992年2月第一周上升到10305例, 进入高峰月份。秘鲁1991年霍乱发病率为1333/10万, 但病死率低(0.95%)。据认为这是由于: ①秘鲁有较好的沿岸交通, 可以及时运送病人去治疗中心; ②秘鲁已有几年的口服补液计划; ③迅速安排资金组建霍乱治疗中心。然而, 某些地区由于地区分散, 在几次小流行中延迟了送病人的时间, 以致病死率仍高达20%。1992年和1993年美洲报告病例数分别为35.4万和20.9万例, 仍居各大洲之首。1993年美洲报告病例比1992年减少了41%, 仍为21个国家报告病例。玻利维亚、秘鲁、厄瓜多尔、委内瑞拉和巴拿马报告病例减少, 阿根廷、巴西、危地马拉、洪都拉斯和尼加拉瓜报告病例增加。1991年美国报告24例霍乱病人, 其中16例直接同拉美大流行有关, 多因吃了从厄瓜多尔买回来的蟹肉, 也有的是在厄瓜多尔

或秘鲁被感染的旅游者。1992年2月14日一架由布宜诺斯艾利斯飞往洛杉矶的阿根廷航班,中途在利马停了一下,到洛杉矶时机上有336名乘客和20名机组人员。2月19日洛杉矶和加利福尼亚卫生部门收到报告:从这架班机上5名患腹泻病的乘客中分离出EVC。2月26日机上31人确诊为EVC感染:10名在洛杉矶,8名在加利福尼亚其他地区,9名在内华达,3名在日本,1名在阿根廷,1名死亡。还有54名其他乘客报告有腹泻病。1972年由巴林飞往澳大利亚和新西兰的一架国际航班乘客中也发生过43例霍乱病人和1例死亡。

非洲 1970年本病首次传入西非几内亚。至1971年底有25个非洲国家报告57196例病人,病死率16%。20年来逐渐蔓延至非洲大部分地区,52个非洲国家有45个报告病例,1982年以后非洲每年报告的病例数已超过亚洲。1991年非洲又发生大的霍乱再发:1975年以来无霍乱的乍得、1984~1988年无霍乱的赞比亚也发生流行,病人都超过万例;1990年未报告霍乱的尼日利亚报告了5万多例病人。1991年非洲共报告约15万病例是非洲1970年以来报告最多的一年,总病死率为10.2%,是拉美霍乱病死率的10倍。霍乱在非洲已形成地方性,1992年和1993年霍乱在非洲仍保持较高的发病率,报告病例数分别为9.1万和7.7万,病死率为3%~6%。

亚洲 1985年以来亚洲每年报告霍乱病例数多在2万例左右。但近几年有所增加,1990年30979例,主要是尼泊尔加德满都谷地由于供水污染,发生了特大爆发(23888例)。1991年亚洲报告4.5万多例,其中尼泊尔30648例(死亡873例)。印度尼西亚病例也由1990年的155例增至1991年的6202例。WHO《流行病学周报》1980~1992年都没有霍乱高发区孟加拉国报告的霍乱病例数字。Siddique等报告,1991年孟加拉国霍乱病人多达21~23.5万,死8000多人^[77]。1992年和1993年亚洲报告霍乱的国家 and 地区有所增加,分别为18和25个,病例数1993年为90862人,是1975年以来亚洲报告霍乱最多的一年。

2. 古典霍乱流行情况 自埃尔托霍乱世界大流行以来,几乎所有受波及的原为古典霍乱的国家 and 地区都由埃尔托霍乱所取代,仅孟加拉国的情况有所不同。1963年孟加拉国首次发现EVC,但直到1972年底原有的CVC仍占优势。在1973~1979年间,共查出5例古典霍乱病人,这时CVC几乎被EVC所取代。然而,1982年孟加拉国再次出现以CVC为主的霍乱流行^[78]。随后,Siddique等^[79]通过对孟加拉国不同地区分离的霍乱弧菌进行分析发现,从南部7个地区分离的霍乱弧菌79%为CVC,而从北部以及中部地区分离的霍乱弧菌99%为EVC。因此,他们认为O1群霍乱弧菌的两个生物型在孟加拉国同时存在,由它们引起的霍乱流行也同时出现在孟加拉国。到1983年孟加拉国的霍乱流行主要由CVC引起,但十余年来CVC引起的霍乱除在孟加拉国不断发生以外,并没有波及更广泛的地区。至于CVC能否象过去那样重新引起霍乱世界大流行,学者们认为仍不能掉以轻心。

3. O139霍乱流行情况 据报道,1992年10月19日开始,沿孟加拉湾的沿岸城市包括印度的马德拉斯和加尔各达以及孟加拉国南部发生了典型霍乱样的腹泻病流行^[80]。最初在印度的马德拉斯爆发,随后在另两个城市相继发生爆发,分离的124株霍乱弧菌在O1群霍乱弧菌诊断血清中不凝集,用日本国立预防卫生研究所生产的非O1群霍乱弧菌(O2-O138)诊断血清也不能分群,因而认为这种细菌属尚未记载的新型霍乱弧菌。1992年11月到12月底,印度加尔各达传染病医院检查的霍乱样病人中,非O1群霍乱弧菌的比例高达95%以上,这些菌株同样不能用现有诊断方法分型。1993年1月1日至4月16日入加尔各达传染病院的13275例腹泻病人中434人(3.2%)死亡^[80]。1993年1月中旬到2月中旬,孟加拉国南部发生成年人腹泻爆发流行,大约万人发病,500人死亡^[81]。实际上流行是从1992年12月由南部开始很快波及全国,

到3月底已报告107 297例病人,1 473例死亡^[81]。

Shimada等^[82]用最初从印度马德拉斯爆发中分离的MO45菌株加热杀死的全菌免疫家兔制备的抗血清经粗糙型霍乱弧菌吸收后,命名为霍乱弧菌O139群抗血清,该型细菌被命名为霍乱弧菌O139或Bengal。用该抗血清对印度和孟加拉国分离的爆发菌株进行检查发现,在241株被检菌株中,223株为该血清群,1株为O1群,14株为其他非O1群,3株属霍乱弧菌粗糙型。霍乱弧菌O139具有和CVC、EVC流行株相同的毒力特征,其引起的腹泻在临床上和流行病学上与霍乱弧菌O1引起的霍乱不能区别。因此,世界卫生组织要求各国如发现这种新型霍乱弧菌引起的腹泻病例,应按《国际卫生条例》中“霍乱”的有关规定报告^[4]。Swerdlow指出,以往非O1群仅引起散发腹泻和小爆发;O139在印孟引起广泛流行标志非O1群首次引起的大流行。这些流行也可能标志第八次世界大流行的开始,提请亚非拉美国家卫生部的重视^[6]。

1993年报告O139霍乱的国家除印度、孟加拉国外,还有泰国、中国、巴基斯坦、马来西亚、尼泊尔、斯里兰卡和沙特阿拉伯等。泰国曼谷1993年4~6月从急性腹泻病人中分离出17株非O1霍乱弧菌,其中9株为O139,这些O139菌株都能产生霍乱毒素^[82]。我国新疆南部柯坪县1993年5月出现O139霍乱爆发流行,发病以青壮年为主。至9月15日两个地区五个县共报告200病例,4人死亡。海南省1993年10月也发生12例O139霍乱。1994年4月缅甸仰光三角州地区发生O139霍乱爆发。仅报告输入性病例的国家和地区有美国、英国、新加坡、日本、爱沙尼亚、德国、瑞士和香港等。根据不同地区爆发和流行中主要是青壮年,而且印度和孟加拉国均为O1霍乱的地方性疫区,但O139霍乱的流行依然很严重。说明O139霍乱与O1霍乱之间没有交叉免疫保护作用。Albert等^[83]用家兔作为动物模型,对此进行实验,结果也表明,用O1菌株免疫的动物不能有效保护O139菌株的感染发病。

近些年来人们发现了一些新型的病原体,这些病原体有些可能早已存在,只是没有被认识和发现;另一方面,有些病原体可能是某些病原体的较大变异所造成的。新型O139菌的出现,为我们揭示这些可能性提供了良好机会。Jesudason等^[84]报道,印度南部城市Vellore近5年来(1988~1992)从腹泻病人分离的O1群和非O1群霍乱弧菌,分别为O1群:109、165、127、260和16株,非O1群:31、29、26、77和134株。可以看出,非O1群的分离比例从1991年开始有所增加。因此他们判断该类型的出现可能是1991年或1992年的早些时候。该城市1992年发生O139霍乱后,原有的EVC曾一度被O139所取代,但EVC并未从此地消失,而且存活下来,并且再现。O139菌也在该地成为地方性流行^[85]。WHO也曾指出,随着O139引起流行,接着是O1霍乱弧菌出现再发的地方性局面(WER 1994,69:13)。最近又指出,O139菌是否能取代O1群作为亚洲流行性霍乱的主要病原以及它是否具有世界大流行的潜力还不清楚。为掌握新血清群的传播将取决于良好的实验室和流行病学监测^[76]。

(二) 传播途径和传染源

1. 传播途径 霍乱传播途径是粪-口途径。多年的研究和调查,虽然仍证明这一途径是霍乱的基本传播途径,但在传播环节上也有不少发现和补充^[86]。首先,在霍乱的新发地区,主要传播途径是经水和食物传播。这些食物不仅包括海产品,而且有很多是非海产品和食品加工过程中的污染,细菌在其中可以较长期保存或繁殖,从而成为重要传播途径。其次,在霍乱的地方性疫区,没有能找到主要的传播途径。研究表明,各种食物、水、媒介生物,以及生活接触都可以成为传染来源,从而造成霍乱爆发、流行或散发病例。

2. 传染源 一般认为人是霍乱唯一的传染源。在常发地区冬季做了大量的疫源检索,但