

• 综 述 •

流感嗜血杆菌研究的现状

吴丽华

近几年来,国外对流感嗜血杆菌(Hi)的研究有大量的报道。我们已知Hi有两种:一是有荚膜,一时无荚膜。对有荚膜的Hi现在主要是集中在菌苗(多糖及结合菌苗),预防由b型引起脑膜炎的现场效果观察。迄今已有4种结合菌苗、多糖菌苗、DTP+Hib混合菌苗上市。无荚膜不可分型(NT)的Hi主要集中在急性呼吸道感染、会厌炎、中耳炎等疾病中所起的作用,以及外膜蛋白(OMP)及其作为组份菌苗可能性的研究。

Hi 疾病的流行病学

Hi主要引起脑膜炎、肺炎、气管炎等呼吸道感染,还会引起会厌炎、中耳炎等疾病。脑膜炎及部分重症肺炎主要是由b型引起的,其他则大多由不可分型的Hi引起,尤其是老年人的反复发作的慢性支气管炎。

Hib脑膜炎的年发病率在不同地区差异很大:英国只有20/10万~30/10万,美国一般地区为60/10万,斯堪的那维亚国家、美国、澳大利亚一些土著民族高达150/10万~450/10万,而美国的Apache^[1]和Navajo竟能高达692/10万。我国由Hib引起的脑膜炎发病情况尚不清楚。死亡率为5%~10%^[2],而由于神经系统损伤所造成的后遗症发生率为30%~50%。95%发生在<5岁儿童中,但是<6月龄的婴儿发病率在Apache高达40%。Alaskan为34%。

Makela^[3]分析了一些土著居民地区Hib发病率比一般地区高出10倍的原因:①细菌的毒力基因:通过电泳对1975株OMP的亚型分析发现,不同地区的型与疾病的不同发病率及年龄分布不一致。所以作者认为,可能有除细菌以外的因素在起作用。②宿主的因素:可能是遗传的敏感基因在起一定作用。免疫球蛋白的基因型对Hib的发病率可能有小的影响。黑人中发病率虽高,但当其他因素被控制时,能发现种族不是一个决定因素。③社会经济因素:作者认为幼儿日托是重要的危险因子。

由Hi引起的急性呼吸道感染(ALRI)的发病率是难以估计的。Lehmann^[4]报道了在巴布亚新几内亚ALRI的流行病学情况:在Tari,由于ALRI死亡的婴儿及1~4岁的幼儿,大约是死亡总数的1/2及1/3。为了更准确了解ALRI的发病情况,在Asarovelley。1985~1987年之间对156名儿童进行监测,发现<1岁儿童ALRI发病率平均3次,其中20%为中或重度,1.6次/11~23月,1.1次/29~35月,0.3次/36~59月,逐年下降。而由Hi引起的脑膜炎在该地区发病率不高,1980~1989年之间在住院儿童人数中只占3%,其中44%<6月龄,70%<1岁。ALRI对脑膜炎之比在<1岁年龄组为17:1,而后的死亡率为28%。对呼吸道疾病的病因分析,Shann^[5]等人报道肺组织及血培养的结果:Hi阳性占40%,肺炎链球菌阳性为34%,而Hi中b型占19%,其他血清型为25%,不可分型为56%。混合感染是普遍的,经常的。因此很难断定何种因子是原发何种是继发致病因子。我国卢竞^[6]曾报道了76例小儿急性细菌性肺炎的细菌检出率,以Hi最高,占36%,肺炎链球菌26.3%,二者混合感染占40%。

外膜蛋白(OMP)的研究

无荚膜不可分型的Hi对人的致病作用,现在已确定无疑。这在发展中国家如巴布亚新几内亚、巴基斯坦、澳大利亚的土著民族等均有报道。在儿童中主要引起肺炎、会厌炎、中耳炎,在成人中引起下呼吸道感染,特别是老年人的慢性、反复发作的支气管炎。作为人的病原菌的重要性已引起许多学者的兴趣:研制菌苗^[8],来预防人群中的这些感染。LPS被认为是不重要的,没有被考虑作为候选菌苗。Barenkamp^[7]认为,外膜蛋白中P₂、P₆及高分子量的OMPs是研究的焦点。

P₂:是不可分型Hi外膜蛋白的主要成份之一,

它占其总量的~50%。Murphy^[9,10]用亲和层析,通过免疫纯化方法从人的血清中纯化 P₂ 抗体,并证明它为杀菌抗体。然而 P₂ 作为菌苗的价值是有限的,由于抗原的异源性及于不可分型 Hi 表面暴露的抗原决定簇的保守 (conservation) 抗原的缺乏。SDS-PAGE 证明了,菌株的 P₂S 具有不同的分子量,变化从 3.6 万~4.2 万,基于其不同的分子量亚型系统已经建立,并应用在不可分型的 Hi 的病原学及流行病学的研究中。

菌苗预防

已有的 Hi 菌苗的基础是多糖,虽然无荚膜的 Hi 在人类能引起广泛的疾病,但是其防疫制品—菌苗,目前仍在研究中。

由于 b 型 Hi 毒力强、致病力强,它在 6 个血清型中它的发病率占绝对优势。所以目前的菌苗也是针对 b 型的。

1974~1976 Peltola^[15]等人用 b 型多糖菌苗 (PRP) 在芬兰进行了现场试验,接种了 5 万名 3 月~5 岁的婴幼儿,另 5 万名接种 M-A 作对照,注射后局部及全身反应轻微。用放免法测出血清抗体浓度,发现抗体应答强烈依赖年龄。在 3~17 月年龄组免疫组与对照组之比为:0.36:0.34 μ g/ml;在 18~23 月年龄组则是 0.72~0.4 μ g/ml;24~71 月年龄组是 2.51:0.51 μ g/ml。现场观察 2 年,结果如下:3~17 月免疫人数: HibV 为 11 584 人, M-AV 为 10 864 人,未接种约 6 000 人。Hib 病例数第一年分别是 7、1、2,第二年分别是 1、3、2。在 18~71 月年龄组免疫人数是: HibV 为 37 393 人, M-AV 为 38 431 人,未接种约 26 000 人。Hib 病例数:第一年分别为 0、11、5,第二年分别为 2、5、1。结果表明,17 月以下年龄组 Hib 多糖菌苗是无效的;而 18~71 月年龄组其保护率达 90%。现场观察结果与血清学结果一致。作者认为这可能是由于多糖的非 T 细胞依赖性质及 2 岁前免疫系统未成熟的原因。由于这种不理想的结果,芬兰未将其列入常规接种计划。美国则于 1985 年取得许可证,在国家免疫实施咨询委员会的建议下,已将该菌苗列入常规的预防接种计划,对 2~6 岁儿童接种。实际应用中保护效率相差很大。在明黎苏达~58%,匹兹堡和达拉斯 88%,均比取得许可证前低。为了提高多糖抗原的免疫原性,将多糖与载体蛋白结合,从而产生了第二代菌苗,在美国,1987.12 多糖与白喉类毒素 (PRP-D) 的结合菌苗取得许可证,并被推荐给 \leq 18 月龄儿童常规注射。二年后,另二个结合菌苗也取得许可证,即: Hib 寡糖衍生物与无毒变异株的白喉毒素 (Hbc) 及 PRP 与流脑 B 群外膜蛋白复合物的结合菌苗 (PRP-OMP)。在法国,PRP-T (与破类) 也得到了许可证。此外,1993 年,美国还上市了 DPT-Hib 混合菌苗。

Eskola^[16]1986 年在芬兰对 6 万名婴儿用 PRP-D 进行了观察,这些婴儿均为 1985.10.1 日到 1986.9.30 日出生,奇数日为接种组,偶数日为对照组,到 1987.2 月免疫组有二例病人,对照组有 12

P₆: 1986 年 Murphy^[11,13]报道了 P₆ 的抗原特性;①从一菌株分离出来的 P₆ 免疫家兔能产生抗体;②此抗血清对所试的 25 株 Hi 菌均有相似的滴度;③用 2 个 NT 菌免疫家兔产生的抗体,对 P₆ 均有滴度;④P₆ 的单克隆抗体能识别所试的 25 株中的 P₆ 决定簇;⑤健康成人血清中含有对所试的 25 株菌的 P₆ 抗体。所有 25 株菌来自美国的几个大城市,包括 OMP 的所有 8 个亚型和所有 6 个血清型。作者认为,该蛋白可能由多个抗原决定簇组成,是所有菌株共有的,存在于所有可分型与不可分型的 Hi 中。Munson^[12]等人对 P₆ 的抗原决定簇、基因序列、PFLP 进行了分析,发现 P₆ 是高度保守的抗原,能产生杀菌抗体,已知它是肽葡聚糖—脂蛋白 (Peptidoglycan associated lipoprotein) 其分子量是 1.6 万 D。在 OMP 的总量中只占 1%~5%。重组的 P₆ 同样能产生杀菌抗体,该蛋白有希望作为亚单位菌苗的组份之一。

高分子量 OMP: Barenkamp^[7]对 8 个由 NT 的 Hi 引起的中耳炎患者通过放射免疫沉淀试验来鉴定特异的表面暴露的蛋白。结果证明:恢复期杀菌抗体出现和对 100~250KD OMPs 的抗体出现之间的相互关系。为了进一步鉴定高分子量 OMP 的免疫原性,作者制备了 30 个单克隆抗体。这些单抗识别了二个 (100 及 250KD) 有区别但又相关的高分子量的 OMPs,通过杀菌力试验,试验了他们的功能活性。结果表明,某些高分子量的 OMP 能作为杀菌力试验的靶。作者还将这二个高分子量的 OMPs 的基因密码克隆并按顺序排列,他们的氨基酸序列是有区别的,但相关衍生的氨基酸序列有与百日咳杆菌鞭毛凝集素相似的序列。作者认为这些高分子量的 OMPs 的功能作用至今仍不十分了解,有待进一步研究。此外 Thomas^[14]也报道了具有 80KD 的高分子量的 OMP 这也可能是 b 型及 NT 的 Hi 的保护性免疫原。

人, 保护率为 83%, 抗体水平测定: 第三次注射后一月为 $0.42\mu\text{g/ml}$, Käyhty^[17] (1987) 比较了二组菌苗在婴儿中的免疫原性: PRP+DTP 及 PRP-D 分别为 29 及 24 人, 三次注射后, 抗体增加, 二者之比为 $0.26 : 1.56\mu\text{g/ml}$; 第 4 次免后为 $3.98 : 24\mu\text{g/ml}$ 。在 8 个月年龄组其抗体有 $98\% \geq 0.15\mu\text{g/ml}$; 而混合组只 41%; 在抗体 $\geq 1\mu\text{g/ml}$, 前者为 50%, 后者为 15%。免后 11 个月, 抗体水平大大下降, 但仍为 $0.16 : 0.26\mu\text{g/ml}$ 。

Eskola^[18] 1988~1989 年在芬兰对全体婴儿进行观察, 其中 1/2 接种 PRP-D, 另 1/2 接种 Hboc, 在 1990 年则对 3~6 月龄的全部婴儿接种 PRP-T, 注射三次, 分别为 4、6 及 14~18 月龄反应率分别为 18.6/10 万、19.9/10 万、17.8/10 万。跟踪观察结果表明: PRP-D 在二次注射后有 5 人发病, Hboc 有 2 人发病, 加强注射后均无发病, 而对照组有 61 人发病, Hboc 免疫原性似乎比 PRP-D 稍好。PRP-T 注射后情况目前仍在观察当中。Black^[19] 报道了 Hboc 的安全性、免疫原性和现场效率试验结果, 并与 PRP-OMP 进行了比较。结果表明, 30 例病人 26 例出现在未接种组, 而 4 例仅接受一次 Hboc 注射。血清抗体测定表明比 PRP-OMP 好。

Peltola^[20] 报道, 芬兰在 Hib 菌苗使用的头 5 年中, 0~4 岁儿童的 Hib 脑膜炎病例数急剧下降, 从 1986 年的 30 例降到 1991 年的零。这种显著的下降与 80 年代中期呈现的上升趋势形成强烈对照。脑膜炎发病率的下降免疫接种看来是唯一可解释的原因。

Keusch^[21] 估计: 在发展中国家, 年发病率 500/10 万~1000/10 万, 且有较高的死亡率, 为节约经费, 因此提出是否考虑将其纳入扩大免疫规划 (EPI), 但这还需对这些国家的流行病学情况进行深入全面了解。

展 望

不可分型的无荚膜的 Hi 的广泛致病作用, 已引起人们的注意外膜蛋白的深入研究有希望作为组分菌苗的一部分。结合菌苗的应用, 虽然其保护率已达 $80\% \sim 90\%$, 但仍有免疫失败的^[22]。其原因有待研究, 以便进一步提高其保护率。在我国则首先需要了解 Hi 的发病情况。

参 考 文 献

1 Mathuram Santosham, Beth Rivin, Mark Walff, et al.

- Prevention of Haemophilus influenzae in Apache and Navajo children. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): 144-151.
- 2 吴丽华. 关于流感嗜血杆菌及其菌苗的研究. 微生物学免疫学进展, 1990, 3: 79.
 - 3 P. Helena Mäkelä, Aino K. Takala, Heikki Peltola, et al. Epidemiology of invasive Haemophilus influenzae type b disease. J Infect Dis, 1992, 165 (sup) s2-6.
 - 4 Deborah Lehmann. Epidemiology of acute respiratory tract infections, especially those due to Haemophilus influenzae in Papua New Guinean. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): s20-24.
 - 5 Shann F, Gratten M, Germer S, et al. A etiology of pneumonia in children in Goroka hospital Papua New Guinea. Lancet, 1984, 2: 537-41.
 - 6 卢竞, 王惠萍, 白常乐, 等. 小儿细菌性肺炎鼻咽分泌物中的细菌定量培养. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13: 134.
 - 7 Stephen J Barenkamp. Outer membrane protein and lipopolysacchrides of nontypable Haemophilus influenzae. J Infect Dis, 1992, 165 (sup) s181-184.
 - 8 PDR Johnson, SJ Macinnes and GL Gilbert. Antibodies to Haemophilus influenzae type b outer membrane protein in children with epiglottitis or meningitis and healthy controls. Infect Immunity, 1993, 61: 1531-37.
 - 9 Murphy TF, Bartos LC. Purification and analysis with monoclonal antibodies of P2, the major outer membrane protein of nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun, 1988, 56: 1084-9.
 - 10 Murphy TF, Bartos LC. Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun, 1988, 56: 2673-9.
 - 11 Murphy TF, Bartos LC, Campagnari AA, et al. Antigenic characterization of the P6 protein of nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun, 1986, 54: 774-7.
 - 12 Nelson MB, Munson RS, Apicella MA, et al. Molecular conservation of the P6 outer membrane protein among strains of Haemophilus influenzae analysis of antigenic determinants gene sequences and restriction fragment length polymorphisms. Infect Immun, 1991, 59: 2658-63.
 - 13 Timothy F, Murphy M, Bud Nelson and Michael A. Apicella The P6 outer membrane protein of nontypable Haemophilus influenzae as avaccine antigen. J

- Infect Dis, 1992, 165 (sup) s 203-205.
- 14 Wayne R, Thomas Felicity S, Flack Marinella G Cal- low, et al. A High-Molecular-Weight outer Mem- brane Protein that is a potential target for protective immunity to type b and untypeable Haemophilus in- fluenzae. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): s75-76.
 - 15 Peltola H, Käyhty H, Sivonen A, et al. Haemophilus influenzae type b capsular polysacchride vaccine in children: a double-blind field study of 100, 000 vac- cines 3 months to 5 years of age in Finland Pediatrics. 1977, 60: 730-37.
 - 16 Eskola J, Peltola H, Takala AK, et al Efficacy of Haemophilus influenzae type b - diphtheria toxoid conjugat vaccine in infancy. New Eng J Med, 1987, 317: 717-22.
 - 17 Helena Käyhty, Juhani Eskola, Heikki Peltola, et al. Immunogenicity in infants of a vaccine composed of Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide mixed with DPT or conjugated to diphtheria toxoid. J Infect Dis, 1987, 155: 100-106.
 - 18 J Eskola, H Peltola, H Kayhty, et al. Finnish efficacy trials with Haemophilus influenzae type b vaccines. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): s 137-38.
 - 19 Steven B Black, Henry R Shinefield, Bruce Fireman, et al. Safety, Immunogenicity, and Efficacy in infancy of oligosacchride conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in a United States population: possible implications for optimal use. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): s 139-42.
 - 20 Heikki Peltola, Terhi kilpi, Marta Antila. Papid disap- pearance of Haemophilus influenzae type b meningitis of the routine children immunisation with conjugate vaccine. Lancet, 1992, 340:592-94.
 - 21 Gerald T. Keusch Should Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines be introduced into the EPI?
 - 22 Sandra J, Halmes and Dan M Granoff. The biology of Haemophilus influenzae type b vaccination failure. J Infect Dis, 1992, 165 (sup): s121-28.
- (收稿: 1994-08-17 修回: 1994-09-05)

中华医学会北京临床流行病学学会成立

临床流行病学是应用流行病学的方法进行临床研究的一门新的边缘学科。北京协和医院临床流行病学教研室、中国协和医科大学和兄弟院校流行病学教研室筹备了两年的临床流行病学学会北京分会于 1995 年 1 月 27 日正式成立。150 余名会员来自北京各区县, 远至平谷县医院, 昌平回龙观医院, 近至市中心的协和及北大医院。大会宣布委员会名单: 主任委员中国协和医科大学流行病学教研室张孔来, 常务副主任委员协和医院临床流研室张振馨 (神经科), 副主任委员安贞医院流研室吴兆苏、北医保健流研室李竹, 秘书阜外医院心血管流研室顾东风。名誉常委回龙观医院流研室费立鹏 (加拿大)。常委卫生部外事司李世焯, 中国预防医学科学院流研室曾光, 卫生部药品不良反应监察中心朱永琪, 北京协和医院徐苓 (妇科)、朱传酉 (儿科), 中医研究院研究生部尤江云, 北京神经外科研究所流研室程学铭, 北

京军区总医院神经科张葆樽, 儿研所内科陈再励。学会主任委员、中华医学会领导、兄弟学会代表和国际临床流行病网络驻华代表作了重要发言。指出临床流行病学学会的任务是: ①普及临床流行病学, 即向临床大夫和科研工作的带头人和决策人普及临床研究方法学; ②在临床医生中培养临床流行病学的师资队伍; ③为了提高人民健康水平, 扭转国内医学研究方向, 不要过分强调耗资巨大的高精尖的研究, 而应该两条腿走路, 加强投资少, 收效快的临床研究。全体会员决心为完成学会的任务而努力, 每季度举办一次讲座, 五月上旬在京举办全国医学研究讲习班, 以世界卫生组织编写的教材为讲义。

北京协和医院临床流研室 张振馨

(凡对学习班感兴趣, 需要购买讲义者, 请和张振馨教授联系 地址: 北京协和医院临床流研室 邮编: 100730)