

分子流行病学研究及其应用

V. 分子流行病学在传染性疾病研究中的应用

段广才 祁国明

传染性疾病千百年来一直严重危害着人们的健康和生命。目前仍是全球性的公共卫生问题。霍乱、伤寒、痢疾、流脑、流行性出血热、病毒性肝炎、艾滋病、疟疾等，在世界范围的危害极其严重。继续加强传染性疾病的研究和控制是预防医学的重要内容。在传染病预防、控制、及流行规律的研究中，人们的注意力集中在病原体、媒介生物及人群易感水平等方面。分子流行病学用于传染病的研究最早，使过去无去解决和比较困难的问题，得到了解决或正在得到解决。

一、传染源分析：及时、准确发现传染源是预防和控制传染病流行、描述疾病流行规律的重要研究内容。过去在分析传染源时，由于应用的检定方法不够特异和灵敏，经常遇到传染源无法确立的情况，给防治工作带来很多难题。应用分子流行病学方法，基本上使这些问题得到了解决。

1. 病毒性疾病：艾滋病是目前危害人体健康和生命最严重的传染病之一。早期确立传染源无疑是非常重要的。过去常有病人将HIV病毒传播给医护人员的报道，但作为医生，尤其是那些与病人伤口和血液接触的医护人员，如果带有艾滋病毒，其危害将更为严重。1992年Ou等报道，一例艾滋病人没有明确的艾滋病人接触史，也不具有HIV感染的危险因素。进一步调查发现，这个患者曾接受一个牙科医生的治疗，检查发现这个医生为HIV阳性，还有六名接受这个牙科医生治疗的病人都感染有艾滋病毒。为确立他们之间的传播关系，Ou等对这七个病人、一个牙科医生和当地收集到的其他35例艾滋病毒感染的病人血清进行研究。他们首先把病人的血清进行PCR扩增，然后做核酸序列分析。研究结果表明，5例病人的病毒与牙科医生的病毒有克隆关系，从而认为这些病人的HIV是他们在接受牙科医生的手术时感染的。

2. 细菌性疾病：1984年在Arizona的Pima县发生了痢疾流行，流行率为32.4/10万。为调查其流行来源，Litwin等进行了分子流行病学研究。他们首

先从不地区采集了79个病人的标本，分离出当地最常见的宋内氏痢疾杆菌。由于宋内氏痢疾杆菌仅有一个血清型，无法确立相互间的关系。进一步做质粒谱分析发现，它们可以分为7个质粒谱群，优势群包含17个菌株，与新近到Mexico旅行有关。在这个群中有12株菌含有特征性的5.1kb质粒，称为Mexico相关质粒。用这个质粒作探针与其它菌株进行分子杂交发现，79株菌中有50株与其有同源性，表明这次流行主要由Mexico相关质粒菌株所引起。Tenover等1984年对一个家庭空肠弯曲菌肠炎爆发进行调查，他们发现四天前这个家庭收养了一只小狗，第四天主妇及其10个月的婴儿发生腹泻，一周后其第二个孩子也发生腹泻。经质粒图谱分析，从三个患者分离的空肠弯曲菌与小狗的菌株具有相同的质粒图谱，从而确认这只小狗是这起家庭爆发的传染源。唐毅等1983年对一起医院内鼠伤寒沙门氏菌感染爆发进行分子流行病学研究，从17名腹泻患儿中分离到的菌株的质粒谱和质粒酶谱均与首发患儿母亲分离的菌株相同，而与另一患儿母亲所带菌株的质粒酶谱不同，所以，可以认为这起爆发的传染源是首例患儿的母亲。

Kostman等的研究表明，在细菌的16S和23S rRNA基因之间的连接区域具有多态性，他们应用保守序列的特异引物进行PCR研究，通过扩增产物的多态性分析，可以有效地区分不同的*P. cepacia*菌株。对具有人-人传播关系的菌株进行检定，都具有特征性的扩增产物谱型，为传染源的确立提供了快速、有效的手段。

二、传播途径分析：

1. 细菌性疾病：军团菌自1973年发现以来，不断有病例发生的报道，尤其在医院感染中，常有爆发报道。在临床分离的菌株中，大多属于1血清群，美国

为61%，法国为89%。Tram等1990年报道，在法国巴黎南部的两所医院中发生了军团菌的医院感染。从病人和水管中分离的军团菌都是3血清群。为研究爆发的传播途径和这些菌株之间的关系，他们作了进一步的分析，在对这些菌株进行质粒谱分析时发现，其都不含质粒。他们又用从大肠杆菌中克隆的16S和23SrRNA基因为探针对这些病人菌株和环境菌株进行转印杂交检测，结果这些菌株都表现为同一谱型，但在用从军团菌3血清群菌株克隆的15kb的基因片段为探针进行检测时，发现这些菌株可以分为3个型。一个型包括所有从Neker医院病人和水管中分离的菌株，第二个型是从Pitie医院病人分离的菌株，另外一型是参考菌株。这表明两起爆发是不相关的，Neker医院的爆发是由污染的水所引起。

某市1989年7月和10月分别发生了两起副溶血弧菌集体食物中毒。血清学检测在同一次食物中毒中可有不同的血清型，甚至在同一患者可以检测到不同血清型的菌株。这似乎并不支持食物爆发的共同来源。经细菌质粒谱分析发现，第一次爆发分离的菌株都有一个50MD的质粒，第二次爆发分离的菌株都含有70MD的质粒，同一次爆发分离的菌株质粒谱基本相同，从而证明是同源爆发。且两次爆发分别由不同的菌株克隆所引起。

2.病毒性疾病：丙型肝炎在人群中的危害已越来越受到重视。Okamoto等报道(1992)，他们利用HCV核心基因的序列变异情况，对44株有代表性的HCV病毒进行PCR研究，结果可以将HCV分为四组。通过一对广泛引物和四对特异引物可以有效区分这四组HCV。他们还发现Ⅱ型HCV在检测的献血员样本中占82% (131/159)，在非甲非乙型肝炎病人中Ⅱ型HCV占60% (48/80)，两者有显著性差异 ($P < 0.01$)。在11例接受凝血因子的血友病患者中，有5例Ⅰ型HCV，4例Ⅱ型HCV。在慢性非甲非乙型肝炎病人中，有2例同时感染两型HCV (Ⅰ和Ⅱ型，Ⅱ和Ⅲ型)。血友病人中有2例同时感染了两种HCV (Ⅰ和Ⅱ型，Ⅰ和Ⅲ型)。他们从两例婴儿HCV感染者发现，病毒型别与其母亲的型别一致。

三、人体易感水平研究：

1.易感基因或基因缺失：人们很早以前就发现不同的群体和个体对传染性疾病的易感程度是不同的，其中除了免疫方面的差异之外，是否还有遗传本质等方面的差异？分子流行病学的初步研究对这一问题给予了肯定的回答。研究认为，在艾滋病和许多肿瘤相

关的病毒性感染中，有些基因的存在使个体更加易感，而某些基因的缺失也可以使易感性升高很多倍。目前已有不少学者开始了这一方面的研究，但尚未获得准确、完整的资料。相信在不远的将来，这一领域的研究会使人们对传染病的认识有一个极大的飞跃，并在疾病防治中起重要作用。

2.群体进化变异：早期的研究表明，人类主要组织不相容性复合体基因具有高度多态性。有学者认为这种高度多态现象主要是由于传染性病原体感染的自然选择而发生的群体进化变异。也就是说，人类在漫长的历史进程中，随着群体进化变异，不同群体对病原体的易感水平是有很大的差异的。Hill等在非洲西部儿童中做了一个大型病例对照研究，探讨不同人类白细胞抗原(HLA)基因与疟疾患病的关系。结果表明，HLA I群抗原基因 (HLA-Bw53)和HLA II群抗原基因 (DRB1*1302-DQB1*0501)在西部非洲的儿童中很普遍，而这两组抗原基因在其它民族较少见，其与疟疾发病有着独立的相关联系。这种抗原基因可以减轻人体发生疟疾的严重程度，并降低发病率。

在对霍乱的研究中也表明，不同人群对霍乱的敏感程度是有差别的。有的研究显示，霍乱在O型血的人群中，表现较其它血型病人严重。在过去很少发生霍乱的南美洲，O型血的人所占群体中的比例较常发霍乱的孟加拉人群高得多。有学者认为，在霍乱常发地区，较多O型血的人被疾病夺去了生命，随着时间的推移，发生了群体遗传学上的进化变异。但究竟是O型血的人具有霍乱敏感基因还是其失去了具有保护作用的基因，尚有待进一步研究和探讨。

四、病原生物研究：

1.病原体检测：集聚性大肠杆菌 (EAggEC) 是近几年来发现的婴儿持续腹泻的病原体。病原体的确立需要做HEp-2细胞粘附试验，不能进行快速准确的诊断。Baudy等从EAggEC菌株中克隆了一个1kb的特异性基因片段，并以此为探针与分离菌株进行分子杂交，灵敏度达到89%，特异度为99%，为快速准确检测EAggEC菌株提供了可靠手段。登革病毒的分离、培养、鉴定目前仍需很复杂的程序。Lanciotti等应用逆转录PCR技术，通过扩增511个bp的基因片段，可以快速、准确地鉴定4种类型的登革病毒，应用特异引物可以区分不同型的登革病毒，用于诊断登革热早期病毒血症很有实用价值。1987到1988年南非共和国的Natal和Kwazulu地区发生了脊髓灰质炎流行。为证实这些毒株的关系和来源，Tsilimig-

ras等进行了寡核苷酸图谱研究,发现所分离的24个毒株都是单一野生株型,这个型毒株在流行期间的南非其它地区也可分离到,并持续到1989年。

结核杆菌的分离培养需要很长时间,灵敏度也不高。Body等应用基因探针检测结核杆菌,全部133株结核杆菌都作出了正确鉴定,且没有假阳性,灵敏度和特异度几乎百分之百,为结核菌的有效检测提供了极大方便。应用染色体DNA片段长度多态度分析的方法,Stevens等对Candida albicans菌进行了分型和流行情况的分析。91株细菌可以分为39个基因型,其中IA2型最为常见,占41%。在个体医疗点分离的菌株具有多态性,基因型随地理位置而分布不同。在一个患者的不同部位分离的菌株几乎都是同一型别。对患者的性伙伴进行的研究也显示其生殖器分离的菌株与患者相同。基因型和既往的表型分型之间没有很密切的关系。根据表型分型认为属同源发病的一组医院感染病人分离菌株,用基因分型的方法研究表明是多型性的。他们的研究还显示,定居的菌株在发生侵袭后表型可以发生改变。应用这种方法可以解决临床上的一些疑难问题。

肠溶组织阿米巴自1875年发现以来被认为是引起阿米巴痢疾的病原体,但尽管全世界每年有大量人群感染,却仅有少数人发病。发病和死亡情况也随地区和人群的不同而变化。最近的研究表明,肠组织阿米巴具有两种类型,一种是致病性的,另一种是非致病性的。用DNA探针杂交、MEE分析和单克隆抗体检测可以有效地区分这两种类型的阿米巴。

2.病原生物特征:痢疾杆菌的许多毒力因子和保护性抗原都是由质粒编码的,研究痢疾杆菌的质粒特征对了解其致病作用非常重要。Litwin等利用质粒图谱对168株病人菌株进行了分型,发现不同群的痢疾杆菌具有特征性的质粒图谱。77%的福氏痢疾杆菌可以归入7个质粒谱型,89%的宋内氏菌可以分为7个型,12株鲍氏菌可以分为6个型。进一步研究表明,有一个5.1kb的质粒与在Mexic旅游分离的宋内氏菌有关。用这个质粒作基因探针发现,其与许多志贺氏菌具有同源性。核酸限制性内切酶谱分析显示,有一个1.1kb的Ava I-Ava II片段在志贺氏菌中普遍存在。他们研究的这个菌株群体中,这一特异片段的高度保守性提示其可能含有与致病或生存有关的基因。

3.群体遗传结构:血吸虫病曾是我国江南地区流行极为严重的寄生虫病。何毅勋等对我国安徽、湖北、广西、四川、云南五地日本血吸虫自然隔离群进

行遗传多态度研究。通过9个遗传位点的检测,计算出它们之间的遗传距离为0.001~0.039。平均杂合度为0.332。说明它们的基因结构基本相似,亲缘关系密切。通过各地群体间的比较,可以看出它们的相对进化关系。伤寒不但是发展中国家的一个重要问题,在较发达国家也经常有伤寒的爆发。Nastasi等应用rRNA-DNA杂交技术对意大利南部1975~1988年分离的109株伤寒杆菌进行了研究,结果表明,染色体DNA用Cla I酶切电泳后进行rRNA-DNA杂交,所有爆发中分离的噬菌体型C1和D1流行菌株,都呈现一致的谱型,为引起爆发的同一克隆菌株。有12株噬菌体型C4的菌株可以区分为两个距离很远的类型,构成两个不同的克隆。散发菌株的遗传多态度很高。这些结果说明rRNA-DNA方法可以有效地解决噬菌体分型无法解决的问题,也说明引起伤寒爆发流行的菌株仅是少数克隆。

4.进化变异规律:最近一时期在法国及其它一些国家和地区有接种狂犬疫苗失败的报道。是由于疫苗本身引起的,还是野生株发生了重要变异? Sacramento等对这一问题进行了研究。狂犬病毒pseudogene Ψ 是表现多态度最高的基因区域,可作为最佳时钟来研究病毒的进化问题。他们应用对PCR扩增产物进行直接序列分析的方法,比较了野生株和疫苗株的进化变异情况。结果显示,无论什么宿主和地点来源野生株,这一序列都表现为极强的保守性,支持狐狸是唯一储存宿主的观点。而另一方面,遗传学和地理学上很好的一致关系表明野生株随着时空的变化进化较慢。野生株多态度仅为2%。而野生株和疫苗株之间的遗传多态度高达14.7%,说明野生株和疫苗株之间有很大差异。

流感病毒抗原性变异,尤其是抗原性大变异,与流感流行密切相关。大流行株从何而来?为何多首发于我国?至今仍不清楚。重组学说虽有不少人赞同,但无确凿证据。H1N1毒株在人群中消失20年后又重现,但又未取代H3N2亚型毒株,造成了流行史上未有的两个亚型毒株同时在人群中流行的特殊局面。给观察两个亚型毒株是否会在人群中进行重组而出现新亚型带来了良机。据郭元吉等报道,1989年国家流感中心在我国发现了H1N2新亚型毒株,随即对其来源进行详尽的研究,包括首发时间和地点、毒株抗原特性及毒株基因来源等方面的研究分析。结果表明,随机从不同实验室取出的7株H1N2毒株8个基因节段的电泳迁移率完全相同。而它们仅有编码HA

蛋白基因的迁移率与H1N1参考株相同,其它基因片段均类似于H3N2参考株。经核酸序列分析等进一步研究基本可以确定, H1N2新亚型是由H1N1和H3N2亚型在人群体内进行基因重组形成的。这一结果不仅解决了流感大流行的许多疑难问题,也为我们控制流感的大流行提供了新的线索和思路。

5. 媒介生物的研究: 媒介生物的生物学特征、群体遗传结构、进化变异规律以及病原监测等研究,对控制和消除某些传染病的流行有重要的科学价值。如Collins等1988年用DNA探针和传统的细胞学方法进行Anopheles gambiae复合群蚊虫的分型和群体遗传结构等方面的研究。这个复合群共包括6个形态学上不可区分的同属种,其中有非洲疟疾传播媒介。从

现场采集到的蚊虫经细胞学检查发现Kenya标本有88株为An. gambiae, 108株为An. arabiensis。Zimbabwe标本包含6个An. gambiae和55个An. quadriannulatus。所有三个种标本的主要染色体都是多态性的,这一点同以前在东部和南部非洲获得的现场蚊虫记录结果一致。用细胞学方法进行检定的蚊虫有97%可用DNA探针进行检定,两者结果一致性很好,但DNA探针方法要简单、快速得多。

此外分子流行病学还研究传染性疾病的流行规律、传染病检测、流行及疫情预测、预防措施评价、临床治疗评价、病原体和媒介生物在人群和环境中的分布等课题。

新疆英吉沙县努维西区戊型肝炎局部流行调查分析

张振东 鲁爱军 达毛拉 杨玉兰

1989年1~4月,新疆英吉沙县色提力乡努维西区,发生了一起戊型肝炎(HE)局部流行。现调查分析如下。

努维西区共有4个自然村,按主灌渠流向,分别为5、6、4和3村,其三面被沙包环绕,交通闭塞,处于一种半封闭状态,故经济文化落后,居民均饮用涝坝和渠水等地表水。

该区在1986年9月至1988年4月新疆南部三地州HE大流行之后(1989年1至4月)共发生45例肝炎病人,其中HE 40例,主要分布于6村和5村。经血清学确诊39例病人(3村1例未计),罹患率2.04%,无死亡。本组病例,男、女罹患率分别为2.19%(22/1006)和1.88%(17/903),经标准化后, $U_s=0.823$, $P>0.05$,性别无显著性差异。各年龄组均有发病,但以15~45岁组人群发病较多,罹患率为3.31%(32/967),占总病例数的82.05%。家庭引入率与发病在年龄分布上高度一致(一致性检验 $\chi^2=0.39$, $P>0.05$),提示青壮年是预防工作的重点人群。流行期间,对该区主灌渠上、中、下三段及其周围的涝坝水,进行了卫生细菌学检验,结果细菌总数及大肠菌群均超标,说明饮用水受到严重污染。因此,本次

局部流行的主要传播方式,与饮用被粪便污染的水源有密切关系。但发病地点不均衡,下游的4、3两村无病例,发病的6、5两村其病例在居民中分布呈高度的地方聚集性(将住户按门牌顺序每10户为一组,进行病户在各组的二项式分布拟合优度卡方检验,结果 $\chi^2=9.12$, $P<0.005$),并且病例在各不同人口家庭中不呈二项式分布($\chi^2=48.86$, $P<0.005$),具有明显的家庭聚集性,聚集率为35.71%,家庭续发率4.96%,故日常生活接触传播在本次流行也占有较大比重。

此外,采集部分病例急性期粪便标本,结果在42、61号病例粪便中,通过免疫电镜查到了27nm大小的病毒样颗粒,抗体桥清晰,从而在病毒学方面证实为HE流行。

从防制措施看,由于早期对所有病人进行了集中隔离治疗,病例明显减少,流行曲线时间对数分布呈负偏态(偏度 $U_g=-6.69$, $P<0.001$),说明防制有一定效果。

(收稿:1992-07-31 修回:1992-11-14)

本文作者单位:新疆喀什地区卫生防疫站 844000 喀什市