

WENMEI
BINGDU
CHUANRANBING

蚊媒病毒传染病

李 禾 吕沁风 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

蚊媒病毒传染病

李 禾 吕沁风 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

蚊媒病毒传染病 / 李禾, 吕沁风主编. —杭州:
浙江大学出版社, 2017. 8
ISBN 978-7-308-15189-4

I. ①蚊… II. ①李…②吕 III. ①蚊科—病毒病—
研究 IV. ①R511

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 232465 号

蚊媒病毒传染病

李 禾 吕沁风 主编

责任编辑 杜希武

责任校对 陈静毅 舒莎珊

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 浙江时代出版服务有限公司

印 刷 浙江良渚印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 13.5

字 数 295 千

版 印 次 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-15189-4

定 价 49.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行中心联系方式 (0571)88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

本书编委会

顾 问 徐日新

主 编 李 禾 吕沁风

副主编 郑 伟 吴忠华

编 委 (按姓氏笔画为序)

吕沁风 李 禾 李 莉 杨永耀 吴忠华 何 蕾

沈若川 陈淑丹 罗 鹏 郑 伟 徐 琦 蔡玉峰

前 言

本书介绍了一组由蚊虫为传播媒介而引起的病毒性传染病,主要有黄热病、登革热、流行性乙型脑炎、西尼罗热、裂谷热等。蚊媒病毒传染病主要通过蚊虫叮咬传播,大多为急性传染病,临床症状多为发热、头痛、肌肉痛等,严重者可出现中枢神经系统症状、出血等,甚至可致死。

蚊媒病毒传染病在全球广泛流行或者区域内流行,特别在热带欠发达地区,由于医疗卫生条件落后,蚊媒病毒传染盛行,阻碍了当地的经济的发展,造成了巨大的医疗负担。WHO(世界卫生组织)每年投入大量的人力、物力帮扶非洲、南美等地区控制传染病疫情,但由于当地的生活方式较落后、经济水平也较低,此类传染病仍然频发。近年来,由于国际交流日益增多,特别是我国与非洲地区的贸易往来频繁,人员、货物的流动造成国内输入性疾病多发。某些疾病目前虽然尚未传入中国,但国内人群普遍缺少对此类疾病的免疫力,因此,提高对此类疾病的认识,做好公共卫生安全的应对措施,具有重要的现实意义。

本书旨在为从事传染病防治的基层一线检疫人员、医务人员及从事该领域研究的科研人员提供参考。书中对几种较常见的蚊媒传染病的起源、流行病学、临床表现、实验室检测、治疗以及监测等方面进行了阐述,以帮助医务工作人员能够早发现、早诊断、早隔离、早治疗,从而能够尽早控制疫情,防止疫情的发生和扩散。本书由浙江国际旅行卫生保健中心编写,不足之处恳请读者多提宝贵意见。

目 录

第一章 黄热病	(1)
第一节 黄热病的概述	(1)
一、背景概论	(1)
二、黄热病毒	(3)
三、黄热病的流行	(7)
第二节 黄热病的诊断	(12)
一、临床表现	(12)
二、诊断	(15)
三、鉴别诊断	(17)
第三节 黄热病的实验室检测	(19)
一、样品采集	(19)
二、样品的保存	(20)
三、样品的运送	(20)
四、样品的接收	(20)
五、实验室检测	(20)
第四节 黄热病的治疗	(24)
一、治疗原则	(24)
二、一般治疗	(24)
三、对症治疗	(24)
四、并发症治疗	(25)
五、预后	(26)
第五节 黄热病的监测和预警	(26)
一、黄热病的监测	(26)
二、黄热病监测内容	(28)
三、黄热病监测相关标准	(32)
四、黄热病的预警	(34)
五、全球疫情警报和反应网络简介	(36)
第六节 黄热病的预防	(39)
一、黄热病疫苗	(39)
二、黄热病疫苗接种的对象	(42)
三、黄热病疫苗接种的禁忌证	(43)
四、黄热病疫苗的不良反应	(43)

五、黄热病疫苗所致不良反应具体案例	(44)
六、黄热病疫苗接种引起不良反应的主要危险性因素	(46)
七、黄热病疫苗不良反应的预防与控制措施	(48)
第七节 黄热病的口岸检疫	(50)
一、我国卫生检疫的历史	(50)
二、我国的黄热病卫生检疫防控历史	(52)
三、我国的黄热病卫生检疫防控措施	(54)
参考文献	(57)

第二章 登革热	(59)
第一节 登革热的概述	(59)
一、登革热的命名	(59)
二、登革热的流行史	(60)
三、登革热的危害	(61)
四、登革热的分布	(61)
第二节 登革热的诊断	(62)
一、病原学	(62)
二、流行病学	(63)
三、临床表现	(64)
四、诊断	(65)
第三节 登革热的实验室检测	(67)
一、登革病毒的分离培养	(67)
二、血清学检测方法	(68)
三、分子生物学检测方法	(69)
第四节 登革热的治疗	(71)
一、普通登革热治疗	(71)
二、重症患者治疗	(72)
第五节 登革热的监测和控制	(73)
一、登革热病例监测	(73)
二、传播媒介的监测和控制	(75)
第六节 疫苗	(78)
一、减毒活疫苗	(78)
二、嵌合疫苗	(79)
三、DNA 疫苗	(79)
第七节 登革热的口岸防疫	(80)
一、口岸登革热检疫的监测对象	(80)
二、疫情监测	(80)

三、疫情信息收集	(81)
四、疫情报告	(81)
五、预警与预防	(81)
参考文献	(82)
第三章 流行性乙型脑炎	(91)
第一节 流行性乙型脑炎概述	(91)
第二节 流行性乙型脑炎病毒病原学	(92)
一、病毒对理化因素的抵抗力	(92)
二、病毒的分子生物学特性	(92)
三、病毒毒力	(93)
第三节 流行性乙型脑炎的流行病学	(94)
一、流行特征	(94)
二、流行模式	(96)
第四节 流行性乙型脑炎的临床诊断	(97)
一、乙型脑炎病理变化	(97)
二、乙型脑炎临床表现	(98)
三、乙型脑炎实验室检查	(100)
四、流行性乙型脑炎的诊断和鉴别诊断	(101)
第五节 流行性乙型脑炎的治疗	(103)
一、治疗原则	(103)
二、预后	(104)
第六节 流行性乙型脑炎的预防	(104)
一、控制传染源	(105)
二、切断传播途径	(105)
三、保护易感人群	(105)
第七节 流行性乙型脑炎的监测	(106)
一、监测目的	(106)
二、监测报告工作机制	(106)
三、监测病例定义	(106)
四、监测内容和方法	(107)
第八节 流行性乙型脑炎的口岸防控	(111)
一、卫生检疫口岸的防控流程	(111)
二、乙型脑炎防控挑战	(112)
参考文献	(114)

第四章 基孔肯雅热	(115)
第一节 基孔肯雅热的历史	(115)
一、基孔肯雅病毒	(115)
二、基孔肯雅热的流行史	(116)
第二节 基孔肯雅热的诊断	(118)
一、生物学特性及发病机制	(118)
二、流行病学	(119)
三、临床表现	(121)
四、诊断标准	(122)
第三节 基孔肯雅热的实验室检测	(123)
一、样品采集	(123)
二、实验室检测	(125)
第四节 基孔肯雅热的治疗	(129)
第五节 基孔肯雅热的监测、预防与控制	(129)
一、监测	(129)
二、基孔肯雅热的预防及控制措施	(130)
参考文献	(148)
第五章 西尼罗热	(149)
第一节 西尼罗热的概述	(149)
第二节 病原学	(149)
一、WNV 的生物学特性	(150)
二、致病机制	(151)
三、培养特性	(151)
四、抗原性	(152)
第三节 西尼罗热的流行	(152)
一、西尼罗热的流行史	(152)
二、西尼罗热的传播途径	(153)
第四节 西尼罗热的实验室检测	(156)
一、血清学检测	(156)
二、病毒的分离鉴定	(158)
三、核酸诊断	(158)
第五节 西尼罗热的防治	(160)
一、临床表现	(160)
二、临床治疗	(161)
三、预防接种	(162)
第六节 西尼罗热的预警及防控	(163)

一、风险分析	(163)
二、口岸防控	(164)
参考文献	(164)
第六章 裂谷热	(166)
第一节 裂谷热概述	(166)
一、裂谷热病毒	(166)
二、裂谷热的致病性	(167)
第二节 裂谷热的流行史	(168)
一、裂谷热的流行史	(168)
二、裂谷热的流行分型	(169)
三、裂谷热的流行分布	(170)
第三节 裂谷热的诊断	(170)
一、裂谷热的病原学	(170)
二、裂谷热的流行病学	(171)
三、临床表现	(172)
第四节 裂谷热的临床和实验室诊断	(173)
一、临床诊断	(173)
二、实验室一般诊断	(174)
三、实验室血清学和病原学诊断	(174)
四、诊断依据	(174)
五、鉴别诊断	(175)
第五节 裂谷热的防治	(175)
一、治疗原则	(175)
二、预防措施	(176)
第六节 裂谷热的口岸检疫	(177)
一、我国国境口岸加强对裂谷热早期预警的措施	(177)
二、利用遥感探测技术建立裂谷热预测的气候模型	(177)
三、裂谷热相关的法律法规	(178)
第七节 总结	(178)
参考文献	(178)
第七章 Coltivirus 病毒	(180)
第一节 Coltivirus 病毒的历史	(180)
一、Coltivirus 病毒	(180)
二、Coltivirus 病毒的流行史	(183)
第二节 Coltivirus 病毒的诊断	(186)

一、Colti 病毒的病原学	(186)
二、Colti 病毒的流行病学	(187)
三、Colti 病毒感染的病理学	(187)
四、Colti 病毒感染的临床表现	(188)
五、Colti 病毒感染的临床和实验室诊断	(188)
六、Colti 病毒感染的鉴别诊断	(189)
第三节 Colti 病毒的防治	(189)
一、治疗原则	(189)
二、预防措施	(189)
第四节 Colti 病毒的口岸检疫	(189)
第五节 总结	(190)
参考文献	(191)
第八章 Zika 病毒	(192)
第一节 Zika 病毒的历史	(192)
一、Zika 病毒的命名及起源	(192)
二、Zika 病毒的基因组学	(192)
三、Zika 病毒的致病性	(192)
四、Zika 病毒的流行史	(193)
五、Zika 病毒的流行分型	(193)
六、Zika 病毒的流行分布	(196)
第二节 Zika 病毒的诊断	(196)
一、Zika 病毒的病原学	(196)
二、Zika 病毒的流行病学	(196)
三、Zika 病毒感染的临床表现	(197)
四、Zika 病毒感染的临床和实验室诊断	(198)
五、Zika 病毒感染的鉴别诊断	(199)
第三节 Zika 病毒的防治	(199)
第四节 总结	(200)
参考文献	(200)
学术名词	(201)

第一章

黄热病

第一节 黄热病的概述

一、背景概论

黄热病(Yellow fever, YF)是一种能够引起发热、剧烈头痛、黄疸和出血等症状的急性病毒性传染病,俗称“黄杰克”“黑呕”,又称美洲瘟疫,目前主要流行于南美洲和非洲热带地区,是在世界卫生组织(WHO)和《中华人民共和国国境卫生检疫法》中规定的国际检疫传染病之一,也是唯一需要进行国际旅行预防接种的传染病。该病的病原体为黄热病毒(*Yellow fever virus*, YFV),属于黄病毒科黄病毒属,是第一个被发现能感染人类的“滤过性颗粒”。黄热病是第一个被证实是由蚊类媒介传播的疾病,主要传播媒介是蚊类,主要有埃及伊蚊、辛普森伊蚊、非洲伊蚊,以及趋血蚊属和煞蚊属等。

黄热病临床表现多样,从不明显的感染到伴随高死亡率的烈性高烧,病情并不千篇一律,而且“城乡有别”,根据流行病学的特点分为丛林型和城市型,暴发在城镇的和非本地人身上的往往要更严重。全球黄热病的病死率可达16%~38%,有20%~50%的严重疾病患者死于该病。黄热病较难诊断,尤其是在初期阶段,容易与疟疾、伤寒、登革热、肝炎和其他疾病以及中毒症状相混淆。血清学检测可检出因感染产生的黄热病抗体,使用其他一些手段来确定在病人死亡后收集的血液标本或肝组织中的病毒,这些检验需要训练有素的实验室人员和专业设备及材料。

在人类历史的记载中,1648年的西班牙探险者在墨西哥南部尤卡坦(Yucatan)地区最早描述了此病,此病可能是由交通工具携带埃及伊蚊从非洲传到西半球造成的。1778年,首次在非洲记载上出现了此病。在18、19世纪,此病是世界上最严重的疫病之一,曾波及南美、北美、非洲及欧洲等多个地区,造成了大量的人口死亡,给人类带来了巨大的灾难。

1907年,继天花、鼠疫、霍乱后,黄热病被当时的《国际卫生公约》列为国际检疫传染病。至今,此病仍流行于非洲和美洲,但黄热病从未在亚洲和澳大利亚被报道过。自20世纪始,黄热病的发生局限在中、南美洲及非洲中部地区。20世纪40—60年代,疫

情曾一度处于相对静息状态,流行次数与病例总数大为减少。但近十几年来,非洲地区的黄热病流行再次引人注意,由于卫生设施不足或者误诊等原因,黄热病病例漏报严重。据 WHO(世界卫生组织)估计,每年有 20 万人受到感染,并有 3 万人死于黄热病。为此,WHO 号召有关政府、部门和机构行动起来与黄热病做斗争。

1930 年,人们研究出了两株黄热病毒活疫苗:美国通过鸡胚组织培养出了 17D 疫苗株,法国在鼠脑组织中培养出了嗜神经毒疫苗株(FNV)。由于后者可引起接种者的嗜神经毒性,其在 1971 年停用。黄热病毒的抗原比较保守,17D 疫苗株可以抵抗目前所有的黄热病毒,一直沿用至今。WHO 在 1989 年曾建议:在呈地方性流行的 33 个非洲国家,在婴儿九个月龄时接种黄热病疫苗,作为婴儿常规免疫的一部分,计划免疫覆盖率为 80%;通过大规模疫苗接种运动和在城市中心控制埃及伊蚊数量,在高危地区预防暴发。据报道,这 33 个国家的总疫苗覆盖率在 1993 年仅为 7%。在 1998 年,非洲地区仅有安哥拉、中非、乍得、科特迪瓦、马里、塞内加尔、塞舌尔等 7 个国家向 WHO 报告儿童疫苗接种率,最高为塞舌尔的 96%,最低为马里的 10%,平均为 48%。因此,非洲地区黄热病疫情持续高发,且病例多为儿童。非洲的黄热病的发病数在全球所占的比重也不断上升,从 20 世纪 60 年代起,非洲超过了美洲,成为全球黄热病发病最多的地区。由于疫苗接种覆盖率在许多地区并未达到最佳的受控状态,世界卫生组织提议在这些地区建立敏感可靠的黄热病监测系统,包括实验室,以分析血样和确认疑似病例,同时通过开展大规模疫苗接种运动应对暴发。

2016 年上半年黄热病侵入我国,确诊多例病例,均为非洲归国人员,未发现二代病例,但我国南部省区如云南、海南、广东、广西等地的地理、气候、传播媒介(蚊)、传染源(猴)等条件与非洲及中、南美洲相似。随着全球经济的发展,全球贸易一体化和都市化生活等趋势使得病毒和传播媒介更易在各个国家之间传播,交通工具的变革使传染病的传播范围迅速增大。据世界旅游组织的统计,2012 年全球国际旅行人数首次突破了 10 亿大关,共有 10.35 亿人次,同比增长 4%,占全球总人口的 15%。每年有 300 万名以上旅行者出入黄热病流行区,对他们来说,黄热病是严重的健康威胁。我国的对外贸易规模逐年扩大,2009 年以来中国一直保持非洲最大贸易伙伴的地位,2012 年双方贸易额达到 1984 亿美元;目前,中国与南美的贸易额已经占南美贸易总额的 25%以上。随着经贸活动的繁荣,每年有大批的非洲商人到中国经商,2012 年在广州的非洲人数达到 20 万人左右,并且每年以 30%~40%的速度递增。目前,中国国内有多条非洲直航的航线开通,人员的大量流动给传染病的传播造成了便利。

到目前为止,传染病仍是当前发病率和死亡率最高的疾病,一些新的传染病仍然在不断出现,如 2003 年的 SARS 疫情和 2009 年的甲型 H1N1 流感的大流行,给全球带来了巨大的损失。其中,在 SARS 疫情中全球有 800 多人死亡。据北京大学的学者研究分析,2003 年中国的对外旅游收入减少 50%~60%,损失 900 亿元,保守估计国内旅游收入减少 10%,损失 500 亿元,加上间接损失,估计经济影响总额达到 2100 亿元左右。公共卫生危机不仅威胁人民的生命安全,还给世界经济造成了重创。

由于黄热病的危害巨大,且目前中国国内民众绝大部分未接种疫苗,为黄热病的易感人

群,如有患者传入却未加控制,那么后果不堪设想。公共卫生的责任重于泰山。“工欲善其事,必先利其器”,对黄热病预先做好全面的认识,防患于未然,才能将其阻隔于国门之外。

二、黄热病毒

(一)命名和起源

1. 黄热病的命名

黄热病毒(*Yellow fever virus*, YFV),属于黄病毒科(*Flaviviridae*)黄病毒属(*Flavivirus*)。黄热病是一种由受感染的蚊虫传播的急性病毒性出血疾病,病名中的“黄”是指一些患者的黄疸症状,即出现眼球巩膜及皮肤变黄等症状,由拉丁文“黄色”(黄色物)命名。

1927年,通过接种猴和鼠,首先在西非分离出黄热病毒,为黄病毒科属的原型病毒。该病毒一般感染哺乳动物,能在多种细胞中生长,例如幼年仓鼠肾细胞(BHK),原代鸡胚细胞(CEF),兔肾细胞(MA-111),猪肾、绿猴肾细胞(Vero、MA-104)和蚊细胞(C6/36),具有嗜内脏性和嗜神经性。通常分离的病毒株多以病毒来源的区域进行命名,如西非型、南美型等。

2. 黄热病病例定义

2010年,WHO修订的黄热病病例定义如下。①疑似病例(Suspected case):急性发热伴2周内出现黄疸;或出现发热、黄疸3周内死亡。②确诊病例(Confirmed case):在疑似病例基础上被实验室检查确认;或具备流行病学史,并被实验室检查确认的病例。③暴发(Outbreak):至少出现一例黄热病的确认病例。

我国在《黄热病预防控制技术指南和临床诊疗方案》中给出的黄热病病例定义如下。①疑似病例:具有流行病学史和临床表现。②确诊病例:在疑似病例基础上具备诊断依据中的实验室检查的任一项检查为阳性者。

3. 起源

黄热病毒是第一个被发现能感染人类的病毒。17—19世纪,本病曾在美洲和非洲及少数欧洲国家流行,造成了大量的人口死亡。为了研究黄热病的发病原因,1900年,美国政府派沃尔特·里德和另外三位医学科研人员进行了调查。在古巴哈瓦那,一位名叫卡洛斯·芬莱的古巴医生花了19年时间试图证明:和疟疾一样,黄热病也是由蚊子引起的。但是,他所有的实验都失败了。沃尔特和他的研究小组同意芬莱的理论。

他们让已经叮过黄热病病人的蚊子叮咬自己。尽管他们都得了病并且其中一人因此而死亡,但仍然不能证明蚊子携带有黄热病毒。只有在医院的隔离帐篷内进行对照实验后,研究者们才能证明蚊子是罪魁祸首。一组待在隔离帐篷内的志愿者没有发病,另一组被蚊子叮咬过的人有五分之四患了黄热病。

随着现代分子生物学技术的发展,专家对黄热病的起源进行了研究。各流行区的黄热病毒基因序列结果表明,非洲黄热病毒比南美黄热病毒更有差异性,推断黄热病可能起源于非洲。从遗传学角度讲,东非及中非的病毒株比西非株更具有差异性,提示西

非病毒株由东非及中非的病毒株演变而来,南美病毒株更接近于西非病毒株。由此推断黄热病毒可能起源于东非和中非,传至西非,再由西非蔓延至南美。近年来,黄热病的流行有复燃的趋势,非洲流行区疫苗接种情况不甚理想,黄热病疫情时有发生。

(二)黄热病毒的基因组学及蛋白组学

1. 黄热病毒的基因组学

病毒颗粒呈球形,直径 37~50nm,外有脂蛋白包膜,包膜表面有刺突。黄热病毒基因组为不分节的单股正链 RNA,分子量约为 3.8×10^6 ,长度为 100500~110000 个核苷酸。由一个长的开放读码框架、5'非编码区(5' untranslated region, 5' UTR)和 3'非编码区(3' untranslated region, 3' UTR)组成,约 96%的核苷酸在开放读码框架(ORF)内。黄热病毒基因组分为两个区段:5'端的前 1/4 区域编码该病毒的前 3 个结构蛋白,即 C 蛋白(衣壳蛋白)、M 蛋白(膜蛋白)和 E 蛋白(包膜蛋白);3'端的前 3/4 区域编码 7 个非结构蛋白。从 5'端起,编码的蛋白顺序依次为:C、prM/M、E、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5。它们由基因组 5'端的前 1/4 区域编码,并与病毒 RNA 分子一起构成病毒颗粒。黄热病毒的 ORF 在第一个 AUG 处起始翻译,翻译终止时无强终止信号,且三个终止子 UAA、UAG、UGA 的出现概率相似。

YFV-17D 的 5'非编码区(5' UTR)长约 118 bp,具有典型的 I 型帽子结构(Type I Cap) m^7 GpppAmp 或 m^7 GpppGmp。在黄病毒属中,该结构保守性较差,其主要功能是在 RNA 复制过程中作为正链合成的起始位点。YFV-17D 的 3E 编码区长约 511 bp,无 poly(A)结构,包含一些保守序列折叠成的复杂结构,包括起始、调节基因组复制和转录的保守二级或三级 RNA 元件。如具有热力学稳定的保守茎环结构(stem-loop, SL, nt80—90),位于 Stem-loop 上游的短小序列有 CS1 (Conserved sequence 1, nt10748—10772), CS2 (Conserved sequence 2, nt10705—10729), RS (Repeated sequence, nt10333-10520)等。

研究显示 CS1 与 N 端 Capsid 蛋白内 5'CS 存在分子内相互作用,这种长距离的碱基配对对病毒复制尤为重要,在 Kunjin 病毒中首先证实了该碱基配对是 RNA 复制所必需的。黄热病毒在 5' UTR 和 3' UTR 中某些区域有缺失,如 $\Delta 5'$ -CS, Δ CS1-CS2, Δ CS1 或 Δ SS 的缺失均影响病毒 RNA 的合成,其为致死性缺失;而 Δ RS 或 Δ CS2 突变株虽然能够合成 RNA,但形成的病毒蚀斑较小,进一步说明了分子内的相互作用对病毒存活起到至关重要的作用。茎环是基因组转录的有效元件,缺失 SL 结构使得 RNA 无法合成,产生致死性突变,黄热病毒 RNA 的 SL 顶部凸起的五个核苷酸 pentanucleotide(PN)序列 5'-CACAG-3'具有相对的保守性,其中第 5 位 G 绝对保守,而第 2、3、4 位对突变则能够耐受,但第 1 位与第 9 位配对则显著影响病毒复制能力;相比而言,PN 序列的保守性对西尼罗河病毒(West Nile virus)的复制能力的影响更为显著。

最近研究显示黄热病毒感染细胞后,产生两个 0.3~0.5kb 的 sfRNA(Small flavivirus RNA),该 sfRNA 来源于 3' UTR SL-E 结构,是宿主核酸外切酶 XRN1 不完全降解病毒基因组 RNA 的产物;黄热病毒的 sfRNA1(5'端位于 10532 或 10533,330 nt)与

sfRNA2(235 nt)有相同的 5'末端,仅是 sfRNA2 在 3'端截短;sfRNA 对病毒致病性有着重要影响,黄热病毒在 SW13 细胞无 sfRNA 产生时,则无法产生病毒蚀斑。

在黄热病毒的非编码区中,短小保守元件的相互作用、复杂的茎环高级结构等与病毒 RNA 的复制、翻译等关键功能密切相关,因此,对这些序列的功能研究将推动对黄热病毒基因组的复杂结构、生活周期、致病性及其对免疫系统影响的认识深入。

2. 黄热病毒的蛋白组学

黄热病毒 RNA 翻译出的是蛋白多聚体,依次是结构蛋白(C-prM-E),非结构蛋白(NS1—NS5),呈 $\text{NH}_2\text{-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-COOH}$ 顺序排列。通过宿主细胞信号肽酶(Host cell signal peptidase)及病毒蛋白酶(Viral protease)进行翻译后修饰,形成多个具备独立结构和功能的结构蛋白、非结构蛋白。

(1) 结构蛋白(C-prM-E)

结构蛋白是形成病毒颗粒、维持病毒形态、影响病原性及免疫原性的重要蛋白。其中,E 蛋白具有几个重要的功能,如宿主细胞受体结合、膜融合活性和病毒组装等。E 蛋白(53kD)是主要的病毒颗粒表面糖蛋白,含有病毒血凝素和中和抗原决定簇,可能是某些宿主细胞表面受体的配体。当它与受体结合,可对细胞产生感染。E 蛋白可能是一种膜融合蛋白,可诱导病毒颗粒的包膜与宿主细胞膜融合,促使病毒颗粒进入细胞而引起感染。E 是 I 型膜蛋白,包含形成二硫键的 12 个保守的半胱氨酸以及 1 个糖基化位点。每个 E 亚基有 3 个结构域,I 结构域为 J3 桶状的中心结构域,II 结构域为同源二聚体穿膜区,两者形成不连续的多肽链,III 结构域是免疫球蛋白 Ig 样受体结合域,插入宿主细胞膜的融合肽位于 II 结构域的顶端。E 蛋白的 III 结构域的 Arg380 突变株增强了病毒与糖胺聚糖的亲和力,削弱病毒的传播能力,降低了病毒的毒力,为 YF-17D 疫苗株的减毒机制提供了依据。在成熟的病毒颗粒中,90 个 E 蛋白二聚体形成对称的网络结构,锚定于病毒表面,因此,膜蛋白 E 是诱导中和抗体的主要抗原和保护性免疫。它包含一个暴露的可溶性 Arg-Gly-Asp(RGD)序列,虽然在病毒入侵中并不发挥重要的作用,但它能够影响细胞膜上葡糖胺聚糖受体(如类肝素硫酸盐)以及通过膜融合实现的病毒内在化过程,而针对 E 蛋白抗原表位的抗体则干扰这些功能的发挥。在 I 及 II 结构域上存在两个特异性的中和表位,NMR 技术也证实黄热病毒的 III 结构域的 Ser305 和 Pro325 存在中和表位。同时,它也是一个主要的病毒抗原,作为黄热病毒致病性的一个基因编码决定簇,负责诱导抗体的产生。在 E 蛋白上,免疫抗原表位位点的获得和野生型抗原位点的缺失都直接影响到黄热病毒的减毒过程。

Membrane 蛋白(M 蛋白)能导致病毒的感染性增加,并形成病毒颗粒的表面结构。M 蛋白相对较小,prM(~26kD)是 M 糖蛋白的前体,通过 capsid 蛋白 C 末端疏水区域的信号肽定位于内质网膜上。对于 M 蛋白与 C 蛋白是如何分离的,曾有过争论。研究显示,当 NS2B/NS3 完成 C-prM 胞内区的剪切后,信号肽酶才能够剪切 prM 蛋白的 N 端位点,且信号肽酶剪切的速率会受到 E 蛋白表达的影响。但在无 NS2B/NS3 活性时,信号肽酶剪切受抑制,不完全归因于 C 蛋白。研究发现将 C 蛋白中带电荷氨基酸置换成不带电荷氨基酸或不相关氨基酸时,信号肽酶剪切抑制现象仍能表现出来。当

将位于信号肽位点侧翼的 C 域(C-region)用疏水性残基替代突变时,则在不切除 C 蛋白的条件下,即有 prM 明显剪切释放,说明了突变株显著降低了信号肽酶识别位点的敏感性,且该后处理过程并不完全受 capsid 蛋白影响。prM 的 C 域(C-region)突变(YF17D)VPQAQA 突变体为致死型,当出现第二位点再次突变后则能够恢复存活。prM 在合成后能够快速折叠,与 E 蛋白迅速形成一个异源二聚体复合物,且 E 的正确折叠需要有 prM 的辅助,这揭示了 prM 在 E 的折叠过程中具有分子伴侣的活性。在成熟过程中,prM 被高尔基体上的成对碱性氨基酸蛋白酶(Golgi-resident furin)或成对碱性氨基酸蛋白酶样蛋白酶(furin-like enzyme)剪切成 pr 及 M 蛋白,该结果显示 pr 可能起到稳定 E 蛋白的作用。pr 的 N 端含有 2 个 N-连接糖基化位点及 6 个能形成二硫键的半胱氨酸。

碱性蛋白 capsid(~11kD)是结构蛋白中最小的,其参与病毒组装过程等重要过程,如 C 蛋白 N 端和 C 端的荷电氨基酸促使其与病毒 RNA 相互作用。Patkar 研究显示 C 蛋白 N 端的 39 个氨基酸、C 端的 23 个氨基酸对病毒的组装无影响,N 端的 16 个氨基酸的缺失突变未影响组装,说明 capsid 中的环化序列不影响基因组的包装或病毒的组装,但影响病毒 RNA 的复制。因此,在以黄热病毒为嵌合病毒疫苗载体的研究中,通常都会保存 capsid 蛋白的 N 端域,以保证病毒的正常复制与组装。在未成熟的 capsid 蛋白中,含有一个 anchC 小蛋白,其 C 端的疏水基团是 prM 移位于内质网上的信号肽,在 capsid 成熟后被病毒的丝氨酸蛋白酶切除。

(2)非结构蛋白(NS1—NS5)

对黄热病毒的非结构蛋白中的 NS1、NS3、NS5 三个大蛋白,已明确其相应的功能,如 NS1 涉及 RNA 的复制及免疫应答,NS3 具有丝氨酸蛋白酶及 RNA 解旋酶的活性,而 NS5 则是关系 RNA 复制的重要酶。

NS1(~46kD)是含有 2 个 N-糖基化位点的糖蛋白,包含形成二硫键的 12 个保守的半胱氨酸。NS1 定位于内质网膜上,通过宿主信号肽酶的剪切从 E 蛋白的 C 端释放出来。对于 NS1/NS2A 之间的剪切的详细机制仍不明确,已知 NS1 的 C 端的 8 个氨基酸及 NS2A 的 140 个氨基酸参与剪切过程。在机体感染中,NS1 蛋白能够诱导较强的免疫应答,因此,其是除 E 蛋白外较强的免疫原。研究显示,对 NS1 上第一个或两个糖基化位点进行突变,将显著影响病毒 RNA 的复制与病毒的形成;同样,对 NS1 蛋白进行丙氨酸替代突变实验(Alanine-scanning),产生的一个温度敏感型突变导致 RNA 合成降低;反式互补研究显示,NS1 在 RNA 复制的早期起到重要作用,并且黄热病毒 NS1 的缺失导致 RNA 负链合成水平下降。上述研究均显示 NS1 对 RNA 的复制过程十分重要,但具体机制仍然不明。

NS3(~70kD)是具有多种酶活性的蛋白。通过序列比对发现,NS3 的 N 端的 1/3 部分具有胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶活性(Trypsin-Eke serine protease),通过在 NS3 的 His53、Asp77 及 Ser138 催化单位上的突变,证实了其蛋白酶功能;NS2B/NS3 能够剪切 NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5 及成熟 capsid 和 NS4A 的 C 端,但识别位点具有较高的保守性,通常要求 P1、P2 位是碱性氨基酸,P1 位是短支链氨基酸。NS3 的 C 端结构域涉及 RNA 的复制功能,高度同源 supergroup2