

108244

登革热和登革出血热

——基础理论与实验技术

DENGGERE HE DENGGECHUXUERE
JICHULILUN YU SHIYANJISHU

主编
编者

杨保英 秦鄂德 同志赠
(以姓氏笔画为序)

中国人民解放军医学图书馆
李德荣 杨保英 高宝麟

苑锡同 欧武 秦鄂德

黄如统 黄祥瑞

主审 闫国珍

人民军医出版社

解放军医学图书馆(书)



C0200411

(京)新登字 128 号

图书在版编目(CIP)数据

登革热和登革出血热:基础理论与实验技术/杨佩英等主编.
—北京:人民军医出版社,1999.3

ISBN 7-80020-939-3

I. 登… II. 杨… III. 登革热-流行病学 IV. R512.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 00002 号

EX01/06

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

北京天宇星印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:850×1168mm 1/32·印张:9.75·字数:240 千字

1999 年 3 月第 1 版 1999 年 3 月(北京)第 1 次印刷

印数:0001~3000 定价:25.00 元

ISBN 7-80020-939-3/R · 865

[科技新书目:490-171②]

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

目 录

上篇 基础理论

第一章 历史背景与流行简史	(3)
一、历史背景.....	(3)
二、流行简史.....	(6)
第二章 病原学	(23)
一、病毒的形态与结构.....	(23)
二、病毒的理化性质.....	(24)
三、病毒的生物学性质.....	(24)
四、基因组 RNA 的结构及组织	(31)
五、病毒的复制.....	(34)
第三章 流行病学	(46)
一、流行环节.....	(46)
二、流行特征.....	(51)
第四章 临床表现与诊断	(55)
一、临床表现.....	(55)
二、临床诊断.....	(61)
第五章 病理生理学和发病机制	(66)
一、病理生理学.....	(66)
二、发病机制.....	(70)
第六章 治疗	(76)
一、登革热.....	(76)
二、登革出血热.....	(78)

三、登革休克综合征·····	(81)
第七章 实验室诊断 ·····	(85)
一、常规血清学方法·····	(85)
二、快速诊断方法·····	(88)
三、分子生物学方法·····	(93)
第八章 登革病毒的传播及其媒介 ·····	(98)
一、登革病毒的传播周环·····	(98)
二、登革热的传播机制·····	(100)
三、埃及伊蚊作为我国登革热的传播媒介·····	(110)
四、白纹伊蚊作为我国登革热的传播媒介·····	(114)
第九章 登革热媒介的监测与控制 ·····	(121)
一、登革热媒介的监测·····	(121)
二、登革热媒介的综合治理·····	(123)
第十章 登革疫苗 ·····	(132)
一、四价减毒活疫苗·····	(133)
二、灭活疫苗·····	(135)
三、重组亚单位疫苗·····	(136)
四、DNA疫苗·····	(139)

下篇 实验技术

第十一章 细胞培养技术 ·····	(145)
一、器材与试剂·····	(145)
二、细胞培养·····	(149)
三、注意事项·····	(151)
第十二章 病毒的分离鉴定技术 ·····	(152)
一、标本的采集、处理和保存·····	(152)
二、病毒的分离·····	(153)
三、病毒的鉴定·····	(157)
四、注意事项·····	(160)

第十三章 血凝与血凝抑制试验(微量法)	(162)
一、原理	(162)
二、器材与试剂	(163)
三、实验方法与步骤	(164)
四、注意事项	(167)
第十四章 补体结合试验(微量法)	(169)
一、原理	(169)
二、器材与试剂	(170)
三、实验方法与步骤	(170)
四、注意事项	(175)
第十五章 中和试验	(177)
一、原理	(177)
二、器材与试剂	(177)
三、实验方法与步骤	(178)
四、注意事项	(181)
第十六章 免疫荧光技术	(183)
一、原理	(183)
二、仪器与试剂	(183)
三、荧光抗体的制备	(184)
四、登革病毒抗体的制备	(189)
五、登革病毒抗原片标本的制备	(189)
六、染色方法	(190)
七、注意事项	(191)
第十七章 酶联免疫吸附试验	(192)
一、原理	(192)
二、试剂与仪器	(193)
三、方法与步骤	(194)
四、注意事项	(197)
第十八章 登革病毒的浓缩与纯化	(200)

一、病毒的浓缩	(200)
二、病毒的纯化	(202)
第十九章 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(207)
一、原理	(207)
二、仪器与试剂	(209)
三、操作步骤	(210)
四、注意事项	(211)
第二十章 蛋白质的免疫印迹技术	(213)
一、原理	(213)
二、仪器与试剂	(214)
三、操作步骤	(215)
四、注意事项	(217)
第二十一章 病毒蛋白的肽图分析	(218)
一、仪器与试剂	(219)
二、病毒蛋白的制备	(220)
三、蛋白质的修饰	(220)
四、病毒蛋白的水解	(221)
五、电泳-层析双向肽图分析	(222)
六、原位肽图分析	(222)
七、注意事项	(223)
第二十二章 病毒 RNA 的提取与鉴定	(225)
一、RNA 分离提取的一般原则	(225)
二、器材与试剂	(226)
三、病毒感染标本的制备	(227)
四、自病毒感染的细胞中制备 RNA	(227)
五、自病毒感染的乳鼠脑中制备 RNA	(228)
六、RNA 完整性的鉴定	(228)
七、注意事项	(229)
第二十三章 寡核苷酸指纹分析技术	(231)

一、原理	(232)
二、器材与试剂	(233)
三、病毒 RNA 的放射性同位素标记	(234)
四、同位素标记 RNA 的消化	(236)
五、双向凝胶电泳	(236)
六、注意事项	(238)
第二十四章 核酸杂交技术	(239)
一、斑点杂交法	(239)
二、原位杂交法	(243)
第二十五章 逆转录-聚合酶链反应	(247)
一、仪器与试剂	(248)
二、标本的采集与处理	(248)
三、病毒 RNA 的制备	(249)
四、引物设计原则	(250)
五、RT-PCR 扩增步骤及扩增产物的鉴定	(251)
六、注意事项	(253)
第二十六章 cDNA 限制性片段长度多态性分析	(255)
一、仪器与试剂	(256)
二、目的片段的 RT-PCR 扩增	(257)
三、限制性片段长度多态性分析	(257)
四、注意事项	(259)
第二十七章 基因组 RNA 测序技术	(260)
一、原理	(260)
二、器材与试剂	(261)
三、方法与步骤	(263)
四、注意事项	(267)
第二十八章 病毒基因的表达	(269)
一、登革 1 型病毒 NS5 基因在大肠杆菌中的表达	(269)
二、杆状病毒载体表达登革病毒基因	(272)

第二十九章 杂交瘤技术	(275)
一、原理	(276)
二、试剂与仪器	(277)
三、方法与步骤	(277)
四、注意事项	(284)
第三十章 电镜技术	(287)
一、原理	(287)
二、材料与方法	(287)
三、电镜技术在登革病毒鉴定中的应用	(289)

上 篇

基础理论

第一章 历史背景与流行简史

登革热 (Dengue fever, DF) 和登革出血热 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 均由黄病毒科黄病毒属的登革病毒所引起。登革病毒有 4 个抗原性相关而又不同的血清型称为登革 1~4 型 (DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4)。这 4 个血清型的病毒不仅可以引起 DF 和 DHF, 严重的还可以导致登革休克综合征 (Dengue shock syndrome, DSS)。登革病毒的自然宿主是人和低等灵长类动物, 主要传播媒介是埃及伊蚊和白纹伊蚊。本章主要简述登革病毒及其媒介的发现以及 DF 和 DHF 流行历史, 目的使人们对其有一个全面的了解并能引起足够的重视。

一、历史背景

(一) 病原的发现

自 1779 年印度尼西亚的雅加达和 1780 年美国的费城先后报道发生 DF 以来至今已有 200 多年的历史。但在相当长的时间里人们并不了解其病因及流行来源, 仅知其为一种热性疾病, 症状为发热、肌肉痛、关节痛、出疹等。当时根据其症状将其称为“骨痛热”、“折骨热”或“痛骨热”等。直到 1907 年 Ashhar 和 Gruig 才提出 DF 的病原体可能是一种滤过性病毒。1926 年 Siler 等人证实了他们的推测。但真正分离到病毒已经到了本世纪 40 年代。当时正是第二次世界大战期间, 战争环境加剧了 DF 的流行。在太平洋和亚洲战场, DF 成为日本及其盟军士兵发病率上升的重要原因。为此日本和美国的军事当局对其非常重视, 专门成立了研究机构对其病原进行了研究。1943 年日本的 Hotta 和 Kimura 用急性期病

人血清通过乳鼠脑接种分离到了登革病毒。但此项工作发表在一个普通杂志上,并未引起人们的重视。1944年美国的 Sabin 及其同事分别从美国驻印度、新几内亚和夏威夷的士兵中分离出 3 株病毒并建立了血凝抑制试验方法,比较了 3 株病毒之间的差异。发现从印度和新几内亚分离到的 2 株病毒抗原性极为类似;而从夏威夷分离到的病毒株与上述 2 株病毒在抗原性上有一定差异。因此把从夏威夷分离到的毒株定为登革 1 型(DEN-1,夏威夷株);从印度和新几内亚分离到的毒株定为登革 2 型(DEN-2,新几内亚株)。1956 年菲律宾发生 DF/DHF 流行,从菲律宾首都马尼拉又分离出登革 3 型(DEN-3 H87)和登革 4 型(DEN-4 H241)病毒,从此揭开了 DF 病原体之迷。这 4 个血清型已被列为登革病毒的国际参考株。后来从世界各地又陆续分离出不少的毒株,但这些毒株均属于这 4 个血清型范畴,直到目前尚未发现新的型别。

关于登革病毒的来源一直是一个争论的话题。早期有些学者推测可能来源于非洲,因为 17、18 世纪非洲奴隶贩卖活动猖獗,也可能由于这项活动而把病毒带到世界各地。已从生活在尼日利亚的人群和海边森林的猴中查出登革病毒的抗体,提示非洲可能是它的疫源地。此外 1980 和 1981 年从西非的野生蚊类包括非洲伊蚊(*Ae Stegomyia africanus*)、黄头伊蚊(*Ae Stegleuteocephalus*)等蚊种中分离到大批登革病毒,从而进一步证实登革病毒可能起源于非洲。

近年来有人提出登革病毒可能来源于亚洲马来半岛的森林循环。这种森林循环包括低等灵长类动物和树冠中的蚊虫,构成了猴-蚊-猴循环。登革病毒在适应于低等灵长类动物之前,也有可能是作为蚊虫的病毒来进化。病毒先适应了它们的蚊虫宿主,在蚊虫内垂直传播而维持这种森林循环。

马来西亚对丛林的长期研究结果支持了登革病毒可能来源于热带森林这一结论。主要依据是:一是森林中的猴有高比例的黄病毒抗体,主要是 DEN 和 Zika(68%)病毒抗体;二是从森林中的啮

猴分离到 DEN-1、DEN-2 和 DEN-4 型病毒,表明有自然感染;三是从树冠捕捉的白雪伊蚊(*Ae. Finlayana*)中分离到 1 株 DEN-4 型病毒。说明在热带森林里存在着猴-蚊-猴的循环,参加循环的蚊种有 3 个亚属:覆蚊亚属(*Stegomyia*)、纷蚊亚属(*Finlaya*)和双角伊蚊亚属(*Diceromyia*)。1960 年又从蚊虫中分离到不同血清型的病毒;不同血清型在分类学上的进化与不同地域可能有关;在同一地理区域的病毒随蚊种的进化而进化。因此有人认为登革病毒可能是从蚊虫中的病毒衍化而来。已有文献报道在亚洲的森林循环中存在登革病毒的 4 个血清型,而在非洲据报道仅有 1 个血清型,因此近年来认为登革病毒可能来源于亚洲。

至于“Dengue”(音译为“登革”)这个名词的来源一直有争议,多年来叫过许多名字,这个名字的首次使用被认为是 1828 年古巴流行期间,其实早在 1801 年 6 月 12 日在西班牙皇宫的档案文件中已有这样的记载,西班牙皇后 Marid Luisa 生病之后,她说过:“我得了名为‘登革’的病,昨日有出血”。说明“登革”这个词在那时就已经在使用。在 1823 年和 1870 年桑给巴尔和东非海岸发生 DF 流行,Christe 根据其症状把它叫做 Ki-dinga 或 denga,他推测 denga 这个名词可能来源于奴隶贩卖活动,通过这一活动把病毒带到新的境地,那里把它叫 dandy 热或 Dandy。1828 年古巴流行时把它叫做 dunga,后来改为 dengue,一直沿用至今。

(二)媒介的发现

关于 DF 的媒介早期就有许多学者推测是由蚊虫传播的,直到 1903 年才由 Graham 首次证实。1906 年 Bancroft 进一步证实了 DF 是由埃及伊蚊传播。他采用饱吸了 DF 急性期病人血的埃及伊蚊去叮咬健康志愿者,经过大约 10d 的潜伏期后被叮咬者则发生了 DF,其症状为发热、头痛、关节痛、骨痛、出疹等,表明埃及伊蚊可以把病毒传播给健康人,从而证实了埃及伊蚊为 DF 的重要媒介。此后于 1918 年 Cleland 又进一步证实了这一事实。1916 年我国的台湾省,1926 年菲律宾、印度等地证实了白纹伊蚊也是

DF 的媒介。

至于媒介的来源目前许多学者认为可能来源于非洲,因为在美洲未发现有关的覆蚊(*Stegomyia*)蚊种,而在埃塞俄比亚和远东地区均有属于同一亚属的蚊种。作为野生的蚊种在非洲森林有水的环境中广泛蔓延孳生,因而逐渐适应了森林环境。到了 17、18 世纪这种蚊虫已成为机帆船的主要乘客,通过机帆船把蚊虫带到世界许多热带或亚热带的大城市,特别是亚洲。在第二次世界大战期间和战后,埃及伊蚊已成为亚洲许多非海岸城市的主要覆蚊蚊种。事实上二次大战之前 Carter 和 Kumm(1931 年)已经分别记载了埃及伊蚊的分布。从多年的记载来看,埃及伊蚊的分布是严格局限在地球的一定纬度,也就是在北纬 45°和南纬 35°之间,在夏季潮湿有水的环境中孳生繁殖。

我国埃及伊蚊主要分布在北纬 22°以南的地区包括海南省,还有福建省,广东雷州半岛、广西钦州地区以及台湾省南部,在沈阳以南,西安以东广大地区也有发现。白纹伊蚊分布在我国北纬 41°到 32°之间,包括了约 1/3 的国土面积,即北起辽宁沈阳,西北到陕西,南到海南省。该蚊种密度较高,是长江以南大部分地区最常见的蚊种,也是 DF 的重要传播媒介之一。

二、流行简史

自 1779 年和 1780 年世界上首次报道 DF 流行以来,世界各地陆续有此病流行的报道。流行地区主要是热带和亚热带,包括东南亚、南亚、西太平洋、非洲和美洲等地区,涉及到 90 多个国家其中以东南亚地区流行最为严重。据统计全世界每年 DF 病例多达 1 亿以上,DHF 病例达几千万,受威胁人口达 25 亿,已受到 WHO 和各国医学工作者的重视。

(一)DF 和 DHF 的世界流行史

1. 二次世界大战前 追溯 DF 的流行历史,DF 和 DF 样疾病

最初流行是在亚洲、非洲和北美。DF 样疾病的临床与流行病学描述最早见诸于中国的“疾病症状和救治”医学全书,内有 DF 样疾病的记载。该书首次发表在秦朝(公元 265~420 年),正式发表在唐朝(公元 610 年),北宋 992 年再版又有关于 DF 样疾病的详细描述,具体年代虽不确切,但是最迟不晚于公元 992 年,比国外首次报道的 1779 年要早约 800 年。由于该病与水 and 飞行的昆虫有关,因此当时人们将其称为“水毒”(poison)。其症状主要是发热、头疼、眼痛、关节痛、肌肉痛、出疹及出血,包括咽、龈、肠及阴道出血,出疹 3 天即消失。如果此病是登革的话,那么 DF 的最早出现可能是在中国。

在公元 992 年之后相当长的时间里未有 DF 的记载。直到 1635 年法属西印度群岛及 1699 年巴拿马的达连省暴发 DF,其症状与上述描述类似,病程持续 4~5d 即可痊愈。1800 年开罗暴发 DF,全市 4/5 的人口发病。1901 年新加坡报道有 DF,1903~1904 年在马来西亚巴生港发生 DF 并查明了该病由埃及伊蚊传播。1922 年美国南部暴发 DF,发病人数达 100 万~200 万。1923 年巴西发生 DF 流行,1925~1926 年澳大利亚北部发生 DF 流行,患者多达 56 万。1928 年希腊发生 DF 流行,病例人数超过 100 万。二次大战期间战争环境使埃及伊蚊密度上升,分布范围扩大,尤其是太平洋和亚洲战场 DF 流行严重。1942~1945 年太平洋群岛发生 DF 大流行,日本本土在二次大战期间 DF 患者每年达 200 万,主要由 DEN-1 型引起。表 1-1 列举了 1945 年前 DF 流行的主要地区。其中不一定完全是 DF,也可能有齐孔贡雅病毒引起的齐孔贡雅热。DF 和齐孔贡雅热在临床上很难区分,因此当时的 DF 样疾病中不排除齐孔贡雅病毒感染。

2. 二次世界大战以后 二次大战后 DF 主要流行地区在南太平洋群岛、澳大利亚、美洲和非洲。

表 1-1 1945 年以前登革热样疾病流行情况

年份	流 行 国 家 及 地 区
992	中国
1635	法属西印度群岛
1699	巴拿马的达连省
1779	埃及的开罗和亚历山大;印度尼西亚的雅加达
1780	美国宾西法尼亚的费城;印度的马得拉斯;阿拉伯及伊朗
1784~1788	西班牙的加的斯和塞维利亚
1818	秘鲁的利马
1823	桑给巴尔
1824	苏伊士
1824~1825	英属印度的广大地区从仰光至马得拉斯和本地治里;埃及的苏伊士
1826~1828	加勒比群岛;美国南部;哥伦比亚;百慕大;墨西哥的韦拉克鲁斯
1835	阿拉伯海岸
1836	印度的加尔各答
1837	百慕大
1844~1849	非洲戈雷岛和圣路易;印度的加尔各答;埃及的开罗;巴西的里约热内卢;夏威夷
1850~1851	从美国的得克萨斯至佛罗里达,佐治亚和南卡罗纳的广大地区;古巴的哈瓦那;非洲留尼汪岛和毛里求斯;秘鲁的利马
1852~1856	南太平洋塔西提岛;包括加尔各答在内的印度广大地区;仰光;非洲的黎波里等;
1860~1868	百慕大.加那利群岛;西班牙加的斯;塞得港;坦噶尼喀湖;肯尼亚;坦桑尼亚
1870~1873	东非海岸的桑给巴尔,达累斯萨拉姆;阿拉伯(亚丁,麦加,麦地那),沙特阿拉伯;也门;塞得港;印度的广大地区(庞贝,加尔各答,卡利卡特,马得拉斯,浦那,科钦,韦洛尔,达卡);缅甸的仰光;印度尼西亚的爪哇;新加坡;印度支那;中国的上海、台湾;留尼汪岛的毛里求斯;美国的新奥尔良和哈得逊港,路易丝安那;阿拉巴马的莫比尔;密西西比的维克斯堡和伍德韦尔;得克萨斯的加尔维斯顿

续 表

年 份	流 行 国 家 及 地 区
1876~1877	秘鲁的利马;香港
1879~1881	路易丝安那州的新奥尔良,佐治亚州的萨凡纳和奥古斯塔,南卡来罗纳州的查尔斯顿;澳大利亚汤斯维尔;克里特;贝鲁特;埃及的开罗、亚历山大、塞得港;红海港
1883~1886	新喀里多尼亚;缅甸;澳大利亚的查特斯堡;美国得克萨斯的加尔维斯顿;希腊阿森斯;斐济;塔西提岛;巴西的库里蒂巴
1889~1890	中国的台湾;土耳其的土麦拉;以色列;桑给巴尔;坦桑尼亚;斐济
1897~1899	澳大利亚的查特斯堡,汤斯维尔及布里斯班;香港;印度支那;印度庞贝;美国得克萨斯,佛罗里达;古巴哈瓦那;波多黎哥圣胡安;厄立特里亚;索马里
1901~1907	香港;缅甸仰光;印度马得拉斯;马来西亚的槟榔屿;夏威夷;东南亚的广大地区包括印度尼西亚的爪哇;泰国;菲律宾;中国台湾;澳大利亚布里斯班;印度加尔各答;美国得克萨斯的布朗斯维尔、加尔维斯顿及休斯顿;古巴哈瓦那;南非那塔尔;埃及
1907~1913	越南的河内,西贡和东京湾;斐济;塔西提岛;新喀里多尼亚;萨摩亚;黎巴嫩的贝鲁特;以色列的耶路撒冷;印度加尔各答、浦那、密拉特;夏威夷的火奴鲁鲁
1914~1918	澳大利亚昆士兰;波多黎哥圣胡安;美国休斯顿、加尔维斯顿,得克萨斯;巴西南里奥格兰德;阿根廷布宜诺斯艾利斯;中国台湾;苏丹
1920~1926	澳大利亚新南威尔士;印度的庞贝、勒克瑙、加尔各答;菲律宾马尼拉;中国台湾;加纳阿克拉;在南部湾各州广泛分布,美国从得克萨斯到佛罗里达和佐治亚;巴西尼泰罗伊;委内瑞拉的马拉开波;也门亚丁;塞内加尔的圣路易斯
1927~1928	南非德班;塞内加尔的达喀尔;希腊阿森斯;埃及;越南西贡;印度哥印拜陀
1930~1933	太平洋诸岛;中国台湾;日本冲绳;印度尼西亚的爪哇,苏门答腊;马来西亚的槟榔屿;缅甸仰光;印度马得拉斯
1934~1936	美国迈阿密和杰克逊维尔、佛罗里达、佐治亚和亚拉巴马;日本博宁群岛;印度马得拉斯;加纳;埃及开罗
1940~1945	澳大利亚昆士兰;夏威夷;加勒比海及太平洋的中部及南部;日本;中国;菲律宾;印度和东南亚