

白纹伊蚊干燥卵保存登革2型病毒的实验研究^{*}

郭晓霞 赵彤言^{**} 董言德

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要 感染登革2型病毒的白纹伊蚊卵在(25±1)℃、光照14h/天, 75%±5%RH的相对干燥环境中保存42天, 分别采用C6/36细胞培养分离病毒和RT-PCR方法, 检测卵孵化的F₁代蚊虫感染率。第1个生殖营养周环F₁代蚊虫未检测和分离到病毒, PCR检测第2生殖营养周环蚊虫批阳性率为26.7%, 最低感染率为1:112.5; 第3生殖营养周环蚊虫批阳性率为27.8%, 最低感染率为1:108。统计学检验结果表明第2和第3生殖营养周环卵孵化的F₁代蚊虫感染率没有达到显著性水平(P>0.05)。结果表明感染白纹伊蚊卵在75%±5%RH的相对干燥环境中保存42天后, 能在孵化的子代蚊虫中检测和分离到病毒, 证实伊蚊卵在干燥环境中能够保存卵内病毒。

关键词 登革Ⅱ型病毒; 白纹伊蚊; 卵; 干燥

登革热(Dengue fever, DF)和登革出血热(Dengue hemorrhagic fever, DHF)是重要的虫媒病毒病之一, 主要由埃及伊蚊*Aedes aegypti*和白纹伊蚊*Ae. albopictus*传播。研究表明, 自然界存在登革病毒(Dengue-2 virus)经卵传递的现象(Rodhain and Rosen, 1997; Lourenço de Oliveira et al., 2002)。实验室研究发现白纹伊蚊和埃及伊蚊经口感染登革1~4型病毒或叮咬有病毒血症的小鸡后, 不仅能感染病毒, 且从感染雌蚊的子代蚊虫中可分离出病毒(张海林等, 1996)。在自然界中, 蚊卵在干旱和寒冷季节没有适于立即孵化的环境条件, 病毒能否度过不良环境以完成其传播周环, 是一个值得探讨的问题。本研究将感染登革2型病毒的白纹伊蚊卵在(25±1)℃、光照14h/天, (75±5)%RH的相对干燥环境中保存42天, 检测卵孵化的子代蚊虫感染率, 探讨实验室相对干燥保存条件下卵内病毒的存活情况。

1 材料与方法

1.1 蚊种、病毒、细胞及实验小鼠

白纹伊蚊: 广州株, 4~6日龄成蚊, 在(25±1)℃, 相对湿度(75±5)%, 每天光照14h的养殖室常规饲养。登革2型病毒(DENV-2):

新几内亚B株, 乳鼠脑传代, 液氮冻存储备用。C6/36细胞: 28℃, 5%CO₂培养条件下, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培养液(含10%小牛血清)传代培养。昆明小鼠: 1~3日龄, 由本院实验动物中心提供。羊抗鼠FITC荧光标记二抗: 北京中山生物技术公司提供。

1.2 DENV-2 乳鼠脑病毒悬液制备与保存

DENV-2乳鼠脑病毒悬液制备与保存方法同参考文献(郭晓霞等, 2004)。C6/36细胞培养测定病毒滴度TCID₅₀为10^{7.1}/mL。

1.3 人工经口感染蚊虫实验

人工配制病毒悬液(鼠血、10%葡萄糖和20%鼠脑病毒悬液的配比为1:1:1), 将浸泡有病毒悬液的海绵块(1.5cm×1.5cm×0.5cm)置平皿中, 放入蚊笼, 使饥饿18~24h的4~6日龄白纹伊蚊吸血1.5h, -20℃冻麻, 挑饱血雌蚊放入清洁小蚊笼内, 饲以5%糖水。保持温度(29±1)℃、相对湿度(80±5)%, 每天光照8h。同时设置吸食正常鼠脑悬液的蚊虫作为阴性对照。

1.4 卵的收集及保存

收集感染蚊第1、2、3生殖营养周环(Gonotrophic cycles)48h内产的卵, 继续保持48h湿润后置空气中干燥24h, 在(25±1)℃, 90%

收稿日期: 2006-11-30

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(39970665)

**通讯作者: E-mail: aedes@263.net

相对湿度、光照 14 h/天的环境中保存 6 天确保胚胎发育完全后进行处理 (Hanson and Craig, 1994)。感染蚊完成 3 个生殖营养周环产卵后, 存活的成蚊用头部压片间接免疫荧光法 (IFA) 检测病毒。

卵的保存条件: 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 90% 相对湿度、光照 14 h/天的环境中保存 6 天确保胚胎发育完全后, 置光照培养箱中保持温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照 14 h/天, 75% \pm 5% 相对湿度 6 周, 采用过饱和盐溶液保持恒定湿度 (Winston and Bates, 1960)。

1.5 RT-PCR 检测 F₁ 代蚊虫感染率

根据文献资料 (方美玉等, 1994) 针对黄病毒 NS1 基因设计一对通用引物, P1 (上游引物): 5'-GACATGGGGTATTGGAT-3'; P2 (下游引物): 5'-TCCATCCCATACCAGCA-3'; 在 DENV-2 型病毒的 NS1 基因内设计一条引物, 与通用引物的下游引物配对为半套式引物, 其扩增基因序列长度为 189 bp。

采用 TRIzol 一步法提取病毒 RNA, 按试剂说明略加改进 (郭晓霞等, 2003)。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

病毒 cDNA 合成及 PCR 扩增: 按 RNA PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行。首先用通用引物进行第 1 次酶促扩增, 然后用内引物进行第 2 次扩增。两次 PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 40 s, 55°C 复性 45 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 8 min。1.2% 琼脂糖

凝胶电泳观察并拍照记录。

1.6 C6/36 细胞培养分离病毒检测 F₁ 代蚊虫感染率

3 个生殖营养周环卵孵化的 F₁ 代四龄幼虫和羽化 7 天的雌、雄成蚊, 每组 30 只, 用 DMEM 细胞培养液研磨, 离心后取上清液过滤除菌, 接种 C6/36 细胞, 37°C 吸附 1.5 h, 弃研磨液, 换含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液, CO₂ 培养箱培养 3~7 天, 观察细胞病变情况; 无病变的连续盲传 3 代。正常细胞同时培养传代。

2 结果

2.1 半套式 PCR 方法检测卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率

采用半套式 PCR 方法检测卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率, 共检测蚊虫 48 批 1 440 只, 结果如表 1 所示。第 1 生殖营养周环卵孵化的子代蚊虫中没有分离到病毒, 第 2 生殖营养周环卵孵化的蚊虫批阳性率为 26.7%, 最低感染率为 1:112.5; 第 3 生殖营养周环卵孵化的蚊虫批阳性率为 27.8%, 最低感染率为 1:108。χ² 检验的统计结果显示第 2 与第 3 生殖营养周环 F₁ 代蚊虫感染率之间没有显著性差异 (χ² = 0.103, P > 0.05)。RT-PCR 检测结果表明感染白纹伊蚊经卵传递 DENV-2 的批阳性率为 18.8%, 子代最低感染率为 1:160 (0.63%)。

表 1 半套式 PCR 检测感染白纹伊蚊卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率

Tab. 1 The infection rates of F₁ progeny from desiccated eggs of infected *Ae. albopictus* by RT-PCR

产卵周环 Ovipositions cycle	虫态 Growth stages of mosquito	试验批数 (只数) Number of tested pools (Number of mosquito)	阳性批数 Number of positive pools	批阳性率 (%) Positive rate of pools	最低感染率 Minimum infection rate
1 (3~7) *	幼虫 Larvae	5 (150)	0	—	—
	雌成虫 Female adult	5 (150)	0	—	—
	雄成虫 Male adult	5 (150)	0	—	—
	总计 Total	15 (450)	0	—	—
2 (9~14) *	幼虫 Larvae	5 (150)	2	40.0	1:75
	雌成虫 Female adult	5 (150)	1	20.0	1:150
	雄成虫 Male adult	5 (150)	1	20.0	1:150
	总计 Total	15 (450)	4	26.7	1:112.5
3 (16~23) *	幼虫 Larvae	6 (180)	2	33.3	1:90
	雌成虫 Female adult	6 (180)	2	33.3	1:90
	雄成虫 Male adult	6 (180)	1	16.7	1:180
	总计 Total	18 (540)	5	27.8	1:108

注: * 血餐之后的天数 Days after infectious blood meal

2.2 C6/36 细胞培养分离病毒检测卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率

C6/36 细胞培养分离病毒法检测卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率, 共检测 48 批 1 440 只蚊虫, 检测结果见表 2。第 1 生殖营养周环卵孵化的 F₁ 代蚊虫中没有分离到病毒, 与半套式 PCR 方法检测结果一致。第 2 生殖营养周环卵孵化 F₁ 代蚊虫批阳性率为 20.0%, 最低感染率为 1:150

(0.67%); 第 3 生殖营养周环 F₁ 代蚊虫的批阳性率为 22.2%, 最低感染率为 1:135 (0.74%), χ^2 检验的统计结果显示第 2 与第 3 生殖营养周环 F₁ 代蚊虫感染率之间没有显著性差异 ($\chi^2 = 0.074, P > 0.05$)。C6/36 细胞培养分离病毒结果表明感染白纹伊蚊经干燥保存卵传递 DENV-2 的总批阳性率为 14.6%, 子代最低感染率为 1:205.7 (0.49%)。

表 2 C6/36 细胞培养分离病毒检测感染白纹伊蚊干燥卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率

Tab.2 The DENV-2 infection rates of F₁ progeny from desiccated eggs of infected *Ae. albopictus* by virus isolation in C6/36 cells

产卵周环 Ovipositions cycle	虫态 Growth stages of mosquito	试验批数 (只数) Number of tested pools (Number of mosquito)	阳性批数 Number of positive pools	批阳性率 (%) Positive rate of pools	最低感染率 Minimum infection rate
1 (3~7) *	幼虫 Larvae	5 (150)	0	—	—
	雌成虫 Female adult	5 (150)	0	—	—
	雄成虫 Male adult	5 (150)	0	—	—
	总计 Total	15 (450)	0	—	—
2 (9~14) *	幼虫 Larvae	5 (150)	2	40.0	1:75
	雌成虫 Female adult	5 (150)	1	20.0	1:150
	雄成虫 Male adult	5 (150)	0	—	—
	总计 Total	15 (450)	3	20.0	1:150
3 (16~23) *	幼虫 Larvae	6 (180)	2	33.3	1:90
	雌成虫 Female adult	6 (180)	1	16.7	1:180
	雄成虫 Male adult	6 (180)	1	16.7	1:180
	总计 Total	18 (540)	4	22.2	1:135

注: * 血餐之后的天数 Days after infectious blood meal

3 讨论

本研究共收集 3 个生殖营养周环感染白纹伊蚊卵, 在 (75±5)% 相对湿度的干燥环境中保存 42 天后, 能在孵化的子代蚊虫中检测和分离到病毒。C6/36 细胞培养分离病毒与半套式 PCR 检测结果均证实第 1 生殖营养周环卵孵化的子代蚊虫没有感染病毒, Diallo 等 (2000) 在研究埃及伊蚊垂直传递黄热病毒的实验中得到类似结果, 即在第 1 生殖营养周环的子代蚊虫中未分离到病毒, 这可能与病毒在经口感染的蚊虫体内复制的时间有关。免疫组化试验研究表明, 感染 DENV-2 的白纹伊蚊第 9 天才能在卵母细胞、滤泡上皮细胞以及输卵管内检测到病毒, 也就是说第 9 天以后, 病毒才能感染卵巢, 使得子代有可能被感染 (谢超等, 2002)。而感染 DENV-2 的白纹伊蚊雌蚊在卵巢感染之前便完成第 1 生殖营养周环。统计学检验结果表明, C6/36 细胞培养分离病毒与半套式 PCR 方法检测的第 1、2 生殖营养

周环卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 这与前人的研究结果有所不同。Rosen (1987) 发现子代蚊虫最低感染率, 随着雌蚊感染到产卵时间的增加而上升。但也有学者报道随着感染蚊虫生殖营养周环数的增加, 子代感染率逐渐下降 (Beaty *et al.*, 1980; Turell *et al.*, 1982; 陈维钧等, 1990)。本研究结果与文献记载比较分析, 推测子代感染率在很大程度上并不都与生殖营养周环数有关, 而与亲代成蚊感染病毒的途径、生殖腔感染的时间以及蚊种和病毒株系有关 (Diallo *et al.*, 2000)。

实验室研究和野外调查均证实白纹伊蚊和埃及伊蚊能经卵传递登革 1~4 型病毒 (张海林等, 1996; Rodhain and Rosen, 1997), 白纹伊蚊卵的实验室保存条件为 (25±1) °C、光照 14 h/天, 90% RH, 保存时间为 3 个月。本研究结果表明感染白纹伊蚊卵在 (75±5)% RH 的相对干燥环境中保存 42 天后, 能在孵化的子代蚊虫中检测和分离到病毒, 证实伊蚊卵在干燥环境中能够保存卵内病毒。Mburya 等 (2001) 报道, 感染登革

病毒的埃及伊蚊卵在常温保存 1~2 月后, 孵化的子代蚊虫仍然能够水平传播登革病毒; San Angelo 病毒能在保存于 28℃ 的白纹伊蚊干燥卵中存活 3 个月 (Tesh and Shroyer, 1980)。美国三列伊蚊 *Ae. triseriatus* 在自然界中可长期保存和传播 La Grosse 病毒 (McGaw *et al.*, 1998), 这些研究表明, 伊蚊卵对于自然界虫媒病毒的保存具有重要意义。因此, 在预防登革热传播中, 加强媒介蚊虫的监测, 尤其是卵的监测, 对于控制疾病的传播具有重要意义。

参考文献

- 方美玉, 陈火胜, 陈翠华. 1994. 逆转录-多聚酶链反应扩增黄病毒核酸的研究. 中华传染病杂志, **12** (3): 145~147.
- 张海林, 米竹青, 张云智. 1996. 白纹伊蚊和埃及伊蚊经卵传递登革病毒的研究. 中国病毒学, **11** (3): 230~236.
- 陈维钧, 蔡世盟, 陈淑莉, 等. 1990. 登革第一型病毒在埃及伊蚊体内经卵传播现象之探讨. 中华微免杂志, **23**: 259~270.
- 郭晓霞, 赵彤言, 董言德, 等. 2003. 白纹伊蚊经滞育卵传递登革 II 型病毒的实验研究. 中国媒介生物学及控制杂志, **14** (1): 9~11.
- 郭晓霞, 赵彤言, 董言德, 等. 2004. 登革 II 型病毒经白纹伊蚊滞育卵的传递. 昆虫学报, **47** (4): 424~428.
- 谢超, 赵彤言, 杨发青, 等. 2002. 登革 II 型病毒在白纹伊蚊体内分布的研究. 昆虫学报, **45** (1): 18~23.
- Beaty, B. J., R. B. Tesh and T. H. G. Aitken 1980 Transovarial transmission of yellow fever virus in *Segomyia* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29** (1): 125~132.
- Hallo, M., J. Thonnon and D. Fontenille 2000 Vertical transmission of the yellow fever virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Dynamics of infection in F₁ adult progeny of orally infected females. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62** (1): 151~156.
- Hanson, S. M. and G. B. Graig 1994 Cold acclimation, diapause and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, **31** (2): 192~201.
- Lourenço de Oliveira, R., N. A. Henriques, M. G. Castro *et al.* 2002 Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the Municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mém. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **97** (6): 799~800.
- McGaw, M. M., L. J. Chandler, P. L. Wasiloski *et al.* 1998 Effect of La Grosse virus infection on overwintering of *Aedes triseriatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58** (2): 168~175.
- Muraya, D. T., M. D. Gokhale, A. Basu *et al.* 2001 Horizontal and vertical transmission of dengue-2 virus in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol.*, **45** (2): 67~71.
- Rodhain, F. and L. Rosen 1997 Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: Gubler, D. J., G. Kuno (Eds): *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Colorado: Center for Agriculture Bioscience International. 45~60.
- Rosen, L. 1987 On the mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C. R. Acad. Sci.*, [III] **304** (13): 347~350.
- Tesh, R. B. and D. A. Shroyer 1980 The mechanism of arbovirus transovarial transmission in mosquitoes: San Angelo virus in *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29** (6): 1394~1404.
- Turell, M. J., W. C. Reeves and J. L. Hardy 1982 Evaluation of the efficiency of transovarial transmission of California Encephalitis viral strains in *Aedes dorsalis* and *Aedes melanon*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31** (2): 382~388.
- Winston, P. W. and D. H. Bates 1960 Saturated solutions for control of humidity in biological research. *Ecology*, **41** (1): 232~237.

STUDY ON PRESERVATION OF DENGUE 2 VIRUS IN DESICCATED EGGS OF *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE)

GUO Xiao-Xia ZHAO Tong-Yan DONG Yan-De

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Beijing 100071)

Abstract Whether dengue-2 virus (DENV-2) can survive in infected desiccated eggs of *Aedes albopictus* (Skuse) was determined in the study. Eggs of *Ae. albopictus* infected with DENV-2 were placed into a desiccation environment at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, and a daily photoperiod of 14h light with $(75 \pm 5)\%$ RH for 42d. C6/36 cells and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect virus in F₁ progeny derived from desiccated eggs. Three gonotrophic cycles (GC) eggs were collected. Vertical transmission was not observed in the first gonotrophic cycle. The total positive rate of GC₂ progeny was 26.7%, the minimum infection rate was 1:112.5. As for the GC₃ progeny, there were 27.8% and 1:108, respectively. There was no significant difference observed between the infection rates of GC₂ and GC₃ progeny ($P > 0.05$). The results indicated that DENV-2 can survive in desiccated eggs of infected *Ae. albopictus* and also be detected in F₁ progeny.

Key words Dengue-2 virus; *Aedes albopictus*; Eggs; Desiccation