

## 小盾纤恙螨自然感染流行性出血热病毒的研究\*

张云<sup>1</sup> 胡云龙<sup>1</sup> 赵学忠<sup>1</sup> 吴光华<sup>1</sup> 姜克俭<sup>2</sup> ✓ R373.32<sup>1</sup>(南京军区军事医学研究所,南京 210002)<sup>2</sup>(陕西省预防医学研究所,西安 710054) R384.4

关键词 小盾纤恙螨, 自然感染, 叮刺传播, 流行性出血热病毒

小盾纤恙螨 [*Leptotrombidium* (L.) *scutellare*] 被认为是流行性出血热 (EHF) 的传播媒介<sup>[1]</sup>。为查明其媒介意义, 1989 年和 1990 年, 我们曾先后用“鼠体恙螨分离法 (I 法)”和“自然界游离螨叮刺黑线姬鼠法 (II 法)”<sup>[3-4]</sup> 进行本课题的研究, 取得了初步的结果。1991 年, 又用两种新方法 (III 法和 IV 法) 进行研究, 取得了进一步的结果, 作出了明确的结论。现将结果报告如下:

## 材料和方法

## 1 材料

1.1 恙螨幼虫 来源有二: 一为草丛中的游离螨, 另一为从卵孵出的子代幼虫, 二者均未吸食过。详见“方法”部分 III 法和 IV 法。

1.2 血清、荧光抗体、单克隆抗体、特异性抗原、细胞、小白鼠乳鼠 见文献<sup>[2]</sup>。

## 2 方法

2.1 小黑板诱集的游离螨分离和叮刺乳鼠法 (III 法) 1991 年 10 月中旬小盾纤恙螨密度高峰季节, 于上午 10 时至下午 4 时, 将小黑板 (15cm 见方、厚 0.5cm 的完整木板, 表面光滑无缝隙, 正、反和侧面均涂上黑漆) 置于陕西户县惠安化工厂历年来鼠和螨较多地区的草丛中。10 分钟后, 取回仔细观察板的正、反面和侧面。如有肉眼可见、爬行缓慢、可疑为小盾纤恙螨的游离螨, 即用湿毛笔挑入恙螨饲养管中, 带回鉴定备用。这些游离螨均很微小, 未曾吸食过。15 天后, 将此游离螨以 100 只为 1 份制作成悬液再制成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞分离 EHF 病毒 (EHFV), 方法见文献<sup>[2]</sup>; 以 10、20 和 30 只为一批叮刺 1 只小白鼠乳鼠, 待鼠发病后, 将 EHFV 抗原阳性鼠的肺和脑, 分别制作成悬液再制成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞分离 EHFV, 方法见文献<sup>[2-4]</sup>。

2.2 疫区土中成虫所产卵孵出的子代幼虫分离和叮刺乳鼠法 (IV 法) 1991 年 10 月中旬在惠安化工厂, 于小黑板采集小盾纤恙螨游离螨多的阳性点, 取土表面下 6~10cm 的土块, 将土中的成虫连同已产下的卵一并带回实验室。将孵出的子代幼虫以 100 只为 1 份作成悬液再制成滤液, 接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞分离 EHFV; 以 10~20 只为 1 批叮刺 1 只小白鼠乳鼠, 将 EHFV 抗原阳性鼠的肺和脑, 分别制作成悬液再制成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞分离 EHFV, 方法同以上 III 法。

2.3 EHFV 鉴定 (1) 滤过试验; (2) 血清学检查; (3) 免疫荧光阻断试验; (4) 中和试验; (5) 病毒感染滴度试验。见文献<sup>[2,5]</sup>。

## 结果与讨论

1 小黑板诱集的游离螨分离和叮刺乳鼠法 将小黑板置放于草地上, 共 177 块次, 诱集到小

本文于 1994 年 1 月 3 日收到, 3 月 8 日修回

\* 国家自然科学基金资助课题

盾纤恙螨幼虫 1326 只,平均每块板 7.5 只(0~43 只)。将此游离螨幼虫,以 100 只为 1 份制作成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞,共接种 4 份,分离到 2 株 EHFV;以 10、20、30 只为 1 批叮刺小白鼠乳鼠,每组试乳鼠 8 只共 24 只,分离到 5 株 EHFV(10 只组 1 株,20 和 30 只组各 2 株),详见表。

2 疫区土中成虫所产卵孵出的子代幼虫分离和叮刺乳鼠法 将孵出的子代幼虫,以 100 只为 1 份作成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞,共接种 4 份,分离到 EHFV 1 株;以 10~20 只为 1 批叮刺小白鼠,共试乳鼠 62 只,EHFV 抗原阳性 7 只,将抗原阳性 4 只鼠肺和脑制成滤液接种 Vero E<sub>6</sub> 细胞,分离到 3 株 EHFV,详见表。

3 EHFV 鉴定 将从游离螨或子代幼虫分离出的 11 株毒株进行 EHFV 鉴定 结果:(1)滤过试验。分离出的毒株均可通过 300nm 孔径的滤膜。(2)血清学试验。分离出的毒株制成抗原片,用 EHF 病人恢复期血清 10 份、兔抗陈株血清和 EHF McAb(25-1)检测均为阳性,而兔抗呼肠孤病毒 I、II、III 型血清和正常人血清 20 份均为阴性;用 8 份 EHF 病人双份血清作 IFAT 检查,结果恢复期血清抗体滴度均较急性期血清有 4 倍以上增长。(3)免疫荧光阻断试验。分离出的毒株制成抗原片,与 EHF 病人恢复期血清作用后可阻断特异性荧光试验,而非 EHF 病人血清和兔抗呼肠孤病毒 I、II、III 型血清无此作用。(4)中和试验。试验证明分离出的毒株能被 EHF 病人血清所中和。(5)病毒感染滴度试验。第 5 代细胞培养冻融液的 TCID<sub>50</sub>/ml 为  $10^{4.2} \pm 5$ (按 Karber 法计算<sup>[5]</sup>)。以上结果表明从游离螨和子代幼虫分离出的毒株为 EHFV。我们先后所用 4 种方法从小盾纤恙螨分离 EHFV 的结果见表。

表 4 种方法从小盾纤恙螨分离 EHFV 结果

Table The results of EHFV isolated from *Leptotrombidium* (*L.*) *scutellare* by four methods

方法 Methods	直接分离法			叮刺实验鼠法			合计	
	Direction			Biting			Total	
	每份标本 螨数(只) Samples	分离份数 No. of Isolation	阳性 株数 Positive	每批标本 螨数(只) Samples	分离批数 Batch of Isolation	阳性 株数 Positive	分离份 (批)数 No. of Isolation	阳性 株数 Positive
I	400~500	14	6				14	6
II				23~92	28	3	28	3
III	100	4	2	10~30	24	5	28	7
IV	100	4	1	10~20	4	3	8	4
合计 Total		22	9		56	11	78	20

注:Note: I 法:鼠体恙螨分离法

Method I: Collecting chigger mites from the body of rats

II 法:自然界游离螨叮刺黑线姬鼠法

Method II: Using *A. agrarius* as baiting animal to lure the free mites on the grassland

III 法:小黑板诱集的游离螨分离和叮刺乳鼠法

Method III: Collecting free mites with small blackboard

IV 法:疫区土中成虫所产卵孵出的子代幼虫分离和叮刺乳鼠法

Method IV: Collecting filial mites hatched from the eggs laid by the adults in the soil

1989~1991 年,我们先后设计了 4 种方法进行小盾纤恙螨自然感染、叮刺传播和经卵传

递 EHFV 的研究,共分离到 20 株 EHFV。其中改进的 I 法分离到 6 株<sup>[2]</sup>,首用的 II 法和 III 法分别分离到 3 株和 7 株,创用的 IV 法分离到 4 株。在 4 种方法中, I 法尚不能排除螨所带 EHFV 是由于吸食鼠的体液带来的可能性; II 法也不能完全排除实验鼠所感染的 EHFV,是由于螨二次叮刺带来的可能性(螨叮刺阳性鼠感染 EHFV,鼠死时有些螨尚未饱食,这些螨进行二次叮刺时将 EHFV 带给实验鼠),虽然这种可能性很小,但 III 和 IV 法,由于所用螨为未曾叮刺过的幼虫,特别是 IV 法为土中成虫所产卵孵出的子代幼虫,完全排除了由鼠带来 EHFV 的可能性。因此,可认为 III 法尤其 IV 法所得结果是可靠的。

根据恙螨一生仅幼虫叮刺而且只饱食 1 次,螨带有的病原体只能通过经卵传递由后代传播的特点,以上 III 和 IV 法所用幼虫未曾叮刺过,但从这些幼虫能直接分离到 EHFV,用这些幼虫叮刺小白鼠乳鼠能使鼠感染 EHFV,表明这些幼虫有 EHFV 的自然感染,并能经叮刺传播,而幼虫自然感染的 EHFV 又只能是经卵传递而来。这些结果证明:小盾纤恙螨能自然感染、叮刺传播和经卵传递 EHFV,具有作为 EHFV 传播媒介条件。

以上关于这种螨作为 EHF 传播媒介的研究结果表明:小盾纤恙螨有 EHFV 的自然感染,可通过叮刺在鼠间传播;其生活史长,1 年仅 1 代,且能经卵传递 EHFV,故带毒时间长,因此在某些疫区,小盾纤恙螨对在鼠间传播 EHF 和保持疫源地起了重要作用。鼠和螨有 EHFV 的自然感染,草地中游离螨多,能叮人,因而对在鼠-人间传播 EHF 可能也有一定的作用。这对 EHF 的流行病学调查和预防有指导意义。

### 参 考 文 献

- 1 陕西省卫生防疫站. 流行性出血热资料汇编(第 1 辑). 1975
- 2 张云, 宴蕊, 赵学忠, 等. 小盾纤恙螨自然感染流行性出血热病毒的调查研究. 中华预防医学杂志, 1990; 22(5): 261-264
- 3 张云, 史江, 胡云龙, 等. 小盾纤恙螨通过叮刺在鼠间传播流行性出血热病毒的实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1990; 4(4): 451-452
- 4 张云, 史江, 宴蕊, 等. 小盾纤恙螨自然感染、叮刺传播和经卵传递流行性出血热病毒的研究. 中华流行病学杂志, 1992; 13(1): 16-18
- 5 倪大石, 沈宏开, 余荣汉, 等. 从病人血清中分离的一株流行性出血热病毒的鉴定. 中华医学杂志, 1983; 63(2): 65-68

### Study on Natural Infection of EHFV in *Leptotrombidium* (L.) *Scutellare*

Zhang Yun    Hu Yunlong    Zhao Xuezhong *et al*

(*Institute of Military Medicine, PLA, Nanjing 210002*)

This paper reports that EHFV were isolated from the larvae of the mites which have no biting and the sucking mice bitten by these larvae could be infected with EHFV. It showed that these larvae possess natural infection of EHFV, and can spread EHFV by biting, furthermore, the EHFV of the larvae natural infection may only be spread over by eggs. The results showed that *Leptotrombidium* (L.) *scutellare* has an important role in spreading EHFV by rats and in the maintenance of the epidemic focus area.

**Key words** *Leptotrombidium* (L.) *scutellare*, Natural infection, Biting transmission, Epidemic Haemorrhagic Fever Virus