230—236 6845(7)

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

白纹伊蚊和埃及伊蚊经卵传递登革病毒的研究

张海林 米竹青 张云智
(云南省流行病防治研究所,大理 671000)

R373.33、R384.1

提要 白纹伊蚊和埃及伊蚊通过吸食病毒液或叮吸有病毒血症的小鸡血后,能感染登革1～4型病毒,并能在蚊体内增殖。对感染雌蚊子1和子2代幼虫、雌性或雄性成虫4559只,分101批进行了病毒检测。白纹伊蚊子1代的批阳性率:登革1型为10%(1/10),2型为22.22%(2/9),3型为33.33%(4/12),4型为28.95%(11/38);登革1～4型的最低子代感染率依次为0.20%、0.71%、0.70%和0.63%。子2代对登革4型的批阳性率和最低子代的感染率分别为35.29%(6/17)和0.93%。登革4型感染埃及伊蚊子1和子2代的最低子代感染率分别为0.63%和0.60%。实验表明,白纹伊蚊和埃及伊蚊能经卵传递登革病毒。在本病地方性疫区中,这两种蚊虫在维持登革病毒的自然循环中起重要作用。

关键词 登革病毒,蚊虫,白纹伊蚊,埃及伊蚊,经卵传递

登革热是由登革(DEN)1～4型病毒引起经伊蚊传播的一种急性传染病,广泛分布于全球热带和亚热带地区。与云南相邻的东南亚地区均属本病地方性疫区。1978年以来,我国广东、海南和广西多次发生本病爆发,并形成地方性流行,亦出现登革出血热爆发[1],成为该地区严重的公共卫生问题。国内外流行病学调查和实验研究证明,埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)是本病主要传播媒介。国外一些研究还发现,这两种蚊虫可经卵传递4个型登革病毒[2～6]。然而,我国梁凤屏等[7]用DEN3病毒感染白纹伊蚊,仅从其子1代卵中分离出病毒,而幼虫和成蚊的病毒分离为阴性,未证实该蚊的经卵传递。为阐明我国白纹伊蚊和埃及伊蚊能否经卵传递登革病毒,我们用1～4型登革病毒感染雌蚊,并对它们的子1和子2代作病毒检查,现将结果报告如下。

材料与方法

1 蚊虫

白纹伊蚊云南株为本室建立的种群。1992年8月从云南瑞丽采集幼虫,带回实验室驯化繁殖。北京株白纹伊蚊和埃及伊蚊虫株引自中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所建立的实验室种群。本室在自控温湿度的实验室内饲养繁殖,温度28℃±1℃,相对湿度70%～75%,每日光照10～12 h。幼虫饲料为1:1猪肝馒头粉。成虫供血动物为小白鼠并给予白糖水。

2 毒株

实验用的登革病毒为1型Hawaii株,2型New Guinea株,3型H87株,4型H241株(以上引自中国药品生物制品检定所)和分离自云南白纹伊蚊的Ban18株[8]。毒株经乳鼠脑内传代两次,收获发病鼠脑,用含20%灭活小牛血清乳蛋白Hanks液制成病毒悬液供试。

本文于1995年10月4日收到,12月12日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

3　抗体

登革1～4型病毒单克隆抗体为中国药品生物制品检定所俞永新教授和美国耶鲁大学 Robert E. Shope 教授惠赠。免抗鼠荧光抗体为北京生物制品研究所和兰州生物制品研究所制品。登革1～4型病毒家兔免疫血清为本室自制。

4　蚊虫经口感染登革病毒的方法

将浸泡有 10^{-2} 病毒液(含等量新鲜脱纤维兔血和10%葡萄糖)的海绵块或棉球置于平皿中,然后放入蚊笼,让饥饿24～48 h的2～4天龄雌蚊吸食1～2 h。或者让蚊虫叮吸有病毒血症的小鸡血(2日龄鸡肌肉接种病毒,0.5 mL/只,感染后2～4 d产生病毒血症)。感染蚊饲养于另外的实验室,保持上述的温湿度及光照,仅供给10%葡萄糖水。

5　蚊虫经卵传递登革病毒的方法

经口感染的雌蚊经饲养繁殖后,对它们的子代幼虫(3～4龄)和羽化后8～10 d的成蚊进行病毒检查,观察经卵传递情况。

6　病毒检测方法

6.1　标本接种　经口感染的雌蚊及其子代幼虫或成虫,分批研磨,常规制成 10^{-1} 悬液,取上清液接种BHK21或Vero细胞进行病毒分离。选取部分细胞法分离的阳性标本接种乳鼠以分离病毒。

6.2　免疫荧光试验　采用间接法。感染细胞培养至第5～7 d时,用DEN1－4型单克隆抗体进行检测。常规制片和染色,用OLYMPUS荧光显微镜观察结果,如出现特异荧光,以≥"+"为阳性。

6.3　血凝(HA)及血凝抑制(HI)试验　采用微量法。取发病鼠脑,用蔗糖丙酮法制备血凝素,用0.5%鸽血球测定滴度。用分离株抗原与DEN 1～4免疫血清作HI试验,抗原使用8单位,以50%的血球凝集被抑制为终点。

6.4　中和试验　采用固定病毒稀释血清法。用BHK21细胞测定。

结　　果

1　白纹伊蚊和埃及伊蚊经口感染登革病毒

雌蚊感染登革1～4型病毒后第10 d,对每株病毒感染的蚊虫各选1批进行病毒分离,结果无论用细胞或乳鼠均分离出同型病毒(表1)。表明通过吸食病毒液或叮吸有病毒血症的小鸡,白纹伊蚊和埃及伊蚊可感染登革病毒。

表1　雌蚊感染登革病毒后第10 d的病毒检查结果

Table 1　Detection of dengue viruses of females mosquitoes on the 10th day after infection with dengue viruses

毒株 Virus strains		试验蚊数(批数) No. of tested mosq. (No. of mosq. pools)	BHK21细胞法 BHK21 cell method					乳鼠法 Suckling mouse method					
			细胞病变 CPE	免疫荧光 IF				发病数/试验数 No. of illness /No. of tested mice	血凝 HA	血凝抑制 HI			
				DEN1	2	3	4			DEN1	2	3	4
DEN1	Hawaii	51(1)*	+	++	−	−	−	8/8	256	64	8	8	16
DEN2	New Guinea	27(1)*	++	−	++	−	−	7/7	256	8	32	4	8
DEN3	H87	33(1)*	+	−	−	++	−	5/8	128	8	8	64	16
DEN4	H241	59(1)*	++	−	−	−	++	6/8	4	4	4	8	64
DEN4	Ban18	64(1)*	++	−	−	−	++	7/7	64	8	16	8	128
DEN4	Ban18	48(1)**	+	−	−	−	++	8/8	128	8	4	8	64

*:白纹伊蚊, *Aedes albopictus*; **:埃及伊蚊, *Aedes aegypti*.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 白纹伊蚊经卵传递登革1～4型病毒

用DEN1～4病毒感染雌性白纹伊蚊云南株，共检查子1代幼虫28批1528只，成虫41批1564只。其中DEN1 10批491只，DEN2 9批281只，DEN3 12批569只，DEN4 38批1751只。结果从白纹伊蚊幼虫和雌性或雄性成虫体内分离出登革病毒，子1代的批阳性率：DEN1为10%(1/10)，DEN2为22.22%(2/9)，DEN3为33.33%(4/12)，DEN4为28.95%(11/38)；DEN1～4的最低子代感染率依次为0.20%(1:491)、0.71%(1:140.5)、0.70%(1:142.25)和0.63%(1:159.18)。仅从DEN1感染的白纹伊蚊的子1代幼虫中分离出病毒，而成蚊的病毒分离为阴性。其余3个型病毒感染蚊虫子1代幼虫和成虫中均分离出同型病毒(表2)。实验证实云南株白纹伊蚊能将DEN1～4病毒经卵传递给子1代幼虫和成虫体内，除DEN1的子1代批阳性率和子代感染率较低外，其它3个型间差异不大。

表2 感染白纹伊蚊云南株子1代经卵传递登革1～4型病毒检测结果

Table 2 Results of transovarial transmission of dengue type 1－4 viruses in first generation progeny of infected Yunnan strain of *Aedes albopictus* mosquitoes

毒株 Virus strains	虫态 Growth stages of mosq.	试验批数(只数) No. of tested pools (No. of mosq.)	阳性批数(只数) No. of positive pools (No. of mosq.)	批阳性率% Positive rate of pools (%)
DEN1 Hawaii	幼虫 Larvae	4(274)	1(53)	25.00
	雌性成虫 Adult females	4(178)	0	00.00
	雄性成虫 Adult males	2(39)	0	00.00
DEN2 New Guinea	幼虫 Larvae	3(104)	1(33)	33.33
	雌性成虫 Adult females	4(124)	1(45)	25.00
	雄性成虫 Adult males	2(53)	0	00.00
DEN3 H87	幼虫 Larvae	5(302)	2(112)	40.00
	雌性成虫 Adult females	4(213)	1(57)	25.00
	雄性成虫 Adult males	3(54)	1(18)	33.33
DEN4 H241	幼虫 Larvae	5(265)	2(123)	40.00
	雌性成虫 Adult females	7(313)	2(104)	28.57
	雄性成虫 Adult males	2(39)	0	00.00
DEN4 Bam18	幼虫 Larvae	11(583)	3(164)	27.27
	雌性成虫 Adult females	9(420)	3(134)	33.33
	雄性成虫 Adult males	4(131)	1(40)	25.00

注：蚊虫用BHK21细胞进行病毒分离。

Note: Isolation of virus from these mosquitoes was performed by inoculation of specimens into BHK21 cells.

维普资讯 http://www.cqvip.com

用DEN4感染两株白纹伊蚊的子2代共检查17批647只,总的批阳性率为35.29%(6/17),其中云南株和北京株分别为36.36%(2/6)和33.33%(4/11)。它们的最低子代感染率为0.93%(1:107.83),其中云南株为0.88%(1:113.75),北京株为1.04%(1:96),详见表3。结果证明该蚊能垂直传播DEN4病毒,不同来源的两株白纹伊蚊的经卵传递能力没有明显差异。

表3　感染白纹伊蚊子2代经卵传递登革4型病毒检查结果

Table 1　Results of transovarial transmission of Ban18 strain of dengue type 4 virus in second generation progeny of infected *Aedes albopictus* mosquitoes

蚊虫株 Mosq. strains	虫态 Growth stages of mosq.	试验批数(只数) No. of tested pools (No. of mosq.)	阳性批数(只数) No. of positive pools (No. of mosq.)	批阳性率% Positive rate of pools (%)
北京株 Beijing	幼虫 Larvae	2(85)	1(41)	50.00
	雌性成虫 Adult females	3(93)	1(47)	33.33
	雄性成虫 Adult males	1(14)	0	00.00
云南株 Yunnan	幼虫 Larvae	4(212)	2(103)	50.00
	雌性成虫 Adult females	5(179)	1(76)	20.00
	雄性成虫 Adult males	2(64)	1(31)	50.00

注与表2相同。Note is the same as table 2.

表4　感染埃及伊蚊子1和子2代经卵传递登革4型病毒(Ban18株)检测结果

Table 4　Results of transovarial transmission of Ban18 strain of dengue type 4 virus in first and second generations progeny of infected *Aedes aegypti* mosquitoes

蚊虫代次 Generations of mosq.	虫态 Growth stages of mosq.	试验批数(只数) No. of tested pools (No. of mosq.)	阳性批数(只数) No. of positive pools (No. of mosq.)	批阳性率% Positive rate of pools (%)
子1代 F1	幼虫 Larvae	2(194)	1(102)	50.00
	雌性成虫 Adult females	2(103)	1(51)	50.00
	雄性成虫 Adult males	1(25)	0	00.00
子2代 F2	幼虫 Larvae	3(244)	1(76)	33.33
	雌性成虫 Adult females	4(187)	1(47)	25.00
	雄性成虫 Adult males	2(67)	1(31)	50.00

注:蚊虫用Vero细胞进行病毒分离。

Note: Isolation of virus from these mosquitoes was performed by inoculation of specimens into Vero cells.

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 埃及伊蚊经卵传递登革4型病毒

用DEN4 Ban18株感染雌性埃及伊蚊，共检查子1代幼虫和成虫5批322只，批阳性率为40%(2/5)，最低子代感染率为0.63%(1:161)；子2代幼虫和成虫9批498只，批阳性率为33.33%(3/9)，最低子代感染率为0.60%(1:166)，详见表4。结果表明，埃及伊蚊能将DEN4病毒垂直传播给子代幼虫和成虫体内，子1和子2代的感染率基本相似。

4 感染白纹伊蚊和埃及伊蚊子代病毒的分离和鉴定

对上述DEN1～4病毒感染雌蚊的子代接种细胞出现免疫荧光阳性者，各选1批原始蚊悬液接种乳鼠，结果均能引起乳鼠连续两代发病和死亡。发病鼠脑制备的抗原具有血凝特性。分离到的病毒与DEN1～4免疫血清作中和试验，均证明与原登革病毒株同属一个型别(表5)。

表5 感染白纹伊蚊和埃及伊蚊子1和子2代的登革病毒分离和鉴定结果

Table 5 Isolation and identification of dengue viruses in the first and second generations progeny of infected *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes

蚊虫种类 Species of mosq.	毒株 Virus strains	蚊虫代次和虫态 Generations and growth stages of mosq.	发病数试验鼠数 No. of illness/No. of tested mice	血凝 HA	免疫荧光 IF DEN1	2	3	4	中和试验 Neu. test DEN1	2	3	4
白纹伊蚊云南株 Yunnan Strain of *Aedes albopictus*	DEN2 NEW Guinea	子1代雌性成虫 F1 adult females	8/8	256	−	++	−	−	16	64	8	4
	DEN3 H87	子1代雌性成虫 F1 adult females	6/8	128	−	−	++	−	8	8	128	4
	DEN4 H241	子1代幼虫 F1 larvae	7/7	64	−	−	−	+	4	8	16	128
		子1代雌性成虫 F1 adult females	6/9	64	−	−	−	++	4	8	8	128
	DEN4 Ban18	子1代雌性成虫 F1 adult females	7/7	32	−	−	−	++	8	4	8	128
		子2代幼虫 F2 larvae	8/8	64	−	−	−	++	8	8	16	256
		子2代雌性成虫 F2 adult females	7/8	128	−	−	−	++	8	16	16	128
		子2代雄性成虫 F2 adult males	6/6	64	−	−	−	+	8	8	16	128
白纹伊蚊北京株 Beijing strain of *Aedes albopictus*	DEN4 Ban18	子2代幼虫 F2 larvae	7/7	128	−	−	−	++	8	16	8	128
		子2代雌性成虫 F2 adult females	7/7	64	−	−	−	+	8	8	4	128
		子2代雄性成虫 F2 adult males	6/8	64	−	−	−	++	4	8	4	128
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	DEN4 Ban18	子1代幼虫 F1 larvae	8/8	64	−	−	−	++	8	16	8	256
		子1代雌性成虫 F1 adult females	6/6	64	−	−	−	++	8	8	4	64
		子1代雄性成虫 F1 adult males	6/8	32	−	−	−	+	8	4	8	128
		子2代雌性成虫 F2 adult females	6/6	64	−	−	−	++	4	8	4	128

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

Rosen 等[2]、Mitchell 等[3]和 Shroyer[4]相继在不同的实验室证明白纹伊蚊能经卵传递登革病毒,并能垂直传播给子2和子3代。Rosen[9]还证明感染 DEN1～4 病毒的雄蚊与雌蚊交配后,可将病毒传给雌性及其子代。最近,Serufo 等[10]从巴西野外采集的白纹伊蚊幼虫中分离出两株 DEN1 病毒,并进一步用 PCR 技术从分离阳性的原始幼虫标本中扩增出 DEN1 基因。本研究证明,我国白纹伊蚊经吸食病毒液或叮吸有病毒血症的小鸡血后,不仅能感染登革病毒,并可在蚊体内增殖,还能从感染雌蚊的子代蚊中分离出病毒,该蚊的子代最低感染率与国外报道相似。实验和现场证据充分说明,白纹伊蚊确实能将 DEN1～4 病毒垂直传播给后代。

Khin 等[5]和 Hull 等[6]曾分别从捕自缅甸和特里尼达自然界埃及伊蚊幼虫体内分离出 DEN2 和 DEN4 病毒。陈文洲等[1]还从海南岛野外雄性埃及伊蚊中分离出 DEN2 病毒。此外,Rosen 等[2]和台湾学者 Chen 等[11]的实验亦表明该蚊能经卵传递登革病毒。我们的研究亦显示,我国埃及伊蚊也能将 DEN4 病毒传播给子1和子2代。表明无论白纹伊蚊或埃及伊蚊均具有经卵传递登革病毒的能力。

弄清登革病毒在自然界长期保存机制,对预防和控制本病较为重要。国外报道和本研究表明,伊蚊垂直传播可能是重要因素之一。东南亚以及广东和海南本病地方性疫区中,该病毒的保存和传播是否与此有关,值得深入研究。李雪东等[12]和我所[8]曾先后从云南自然界白纹伊蚊中分离出 DEN4 病毒。虽然本省人群中亦存在该病毒自然感染,但一直未发现登革热流行。云南登革病毒究竟如何在自然界保存和传播,这是值得探讨的问题。云南虽无埃及伊蚊分布,但白蚊伊蚊分布较广,属野栖蚊种,分析认为除某些野生动物参与外,白纹伊蚊经卵传递保存登革病毒可能起一定作用。

国外研究认为,随着白纹伊蚊分布区的扩大,登革热亦可随之蔓延扩散。张升等[13]研究发现,我国不同地理株白纹伊蚊均对登革病毒敏感。本研究证实,我国白纹伊蚊不仅对登革病毒易感,而且能经卵传递该病毒。当前,世界登革热疫区不断扩大,而白纹伊蚊在我国分布广泛[14],因此,提高警惕,加强白纹伊蚊的监测,对预防本病显得尤为重要。

参 考 文 献

1 陈文洲,陈玉本,邝维深等.1980至1991年海南省登革热流行的病原学和血清学监测.中国媒介生物学及控制杂志,1992,3(特刊7期):321－324

2 Rosen L, Shroyer D A, Tesh R B *et al*. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg, 1983, 32(6):1108－1109

3 Mitchell C J, Miller B R. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. J Am Mosq Control Assoc, 1990, 6(2):251－253

4 Shroyer D A. Vertical maintenance of dengue－1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc, 1990, 6(2):312～314

5 Khin M M, Than K A. Transovarial transmission of dengue virus by *Aedes aegypti* in nature. Am J Trop Med Hyg, 1983; 32(3):590～594

6 Hull B, Tikasingh E, Souza M *et al*. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. Am J

维普资讯 http://www.cqvip.com

Trop Med Hyg, 1984, 33(6):1248～1250

7 梁凤屏,罗庆洪,郭永文等.登革病毒经卵传递的研究.中国媒介生物学及控制杂志,1992,3(特刊7期):378～380

8 张海林,自登云,施华芳等.云南省登革热病原学和血清学监测报告.中国媒介生物学及控制杂志,1992,3(特刊7期):353～357

9 Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. Am J Trop Med Hyg, 1987, 37(2):398～402

10 Serufo J C, Consoli R A N, Nogueira R M R *et al*. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Ae. albopictus* in the state of Minas Gerais, Brazil. Arthropod－Borne Virus Information Exchange, 1993, December: 11

11 Chen W J, Wei H L, Hsu E L *et al*. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: Development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. J Med Entomol, 1993, 30(3):524～530

12 李雪东,罗嘉善,刘丽华等.从捕自云南省河口县的白纹伊蚊分离得4型登革病毒.病毒学杂志,1987,2(1):76～77

13 张升,何桂铭.我国不同地理株白纹伊蚊对登革病毒的易感性.中华流行病学杂志,1989,10(6):348～351

14 陆宝麟主编.中国登革热媒介及其防治.第1版.贵阳:贵州人民出版社,1990,47～51

Transovarial Transmisson of Dengue Viruses in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* Mosquitoes

Zhang Hailin Mi Zhuqing Zhang Yunzhi

(*Yunnan Provincial Institute of Epidemic Diseases Control and Research, Dali, Yunnan Province* 671000)

Aedes albopictus and *Ae. aegypti* mosquitoes from mainland China were tested for their ability to transovarial transmission of dengue (DEN) viruses. DEN1～4 viruses for experiment were prototype dengue strains (Hawaii, New Guinea, H87 and H241) and Ban18 strain of DEN4 isolated from Yunnan, China. Parental females of *Ae. albopictus* and *Ae aegypti* were orally infected with DEN1～4 viruses, and 4559 larvae and adult of F1 and F2 generations from infected mothers were divided into 101 pools for the detection of the viruses. The positive rates of pools from *Ae. albopictus* of F1 were 10% (1/10) for DEN1, 22.22% (2/9) for DEN2, 33.33% (4/12) for DEN3 and 28.95% (11/38) for DEN4. The minimum filial infection rates (MFIR) of *Ae. albopictus* of F1 were successively 0.20%, 0.71%, 0.70% and 0.63% for DEN1～4. The positive rates of pools and MFIR from *Ae. albopictus* of F2 were 35.29% (6/17) and 0.93% for DEN4. The positive rates of pools from *Ae. aegypti* of F1 and F2 were 60% (3/5) and 33.33% (3/9), and their MFIR were 0.63% and 0.60% for DEN4, respectively. The experimental studies showed that infected *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* females are capable of transovarially transmitting DEN1～4 viruses to their offspring, and these two species of mosquitoes from mainland China have the potential role in the natural cycle of the maintenance of dengue viruses in endemic areas of the disease.

Key words Dengue viruses, Mosquitoes, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, Transovarial transmission