

肾综合征出血热病毒在恙螨体内增殖的动态观察*

张云 李先富 吴光华

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

张家驹[✓] 姜克俭

(陕西省卫生防疫站, 西安 710054)

R373.32
R384.4

A **提 要** 取饲养的小盾纤恙螨幼虫和若虫, 每 20 d 为一批制成无菌滤液接种 Vero-E6 细胞测定 HFRSV 滴度, 动态观察 HFRSV 在螨体内的增殖情况, 并用 PCR 技术检测恙螨幼虫和若虫体内 HFRSV-RNA。结果如下: 小盾纤恙螨幼虫期除 60 d 一批外, 其余各批均在不同时间内测出 HFRSV 滴度, 3 批若虫中亦有 2 批测出 HFRSV 滴度并检测到 HFRSV-RNA。结果为小盾纤恙螨作为 HFRS 的传播媒介提供了进一步的证据。

关键词 小盾纤恙螨, 肾综合征出血热病毒, 增殖

1989 年以来, 我们先后设计了 4 种方法从小盾纤恙螨幼虫中分离到 20 株^[1]肾综合征出血热病毒(HFRSV), 结果说明小盾纤恙螨可自然感染、叮刺传播和经卵传递 HFRSV。为进一步观察恙螨体内 HFRSV 的增殖情况, 动态观察了恙螨体内 HFRSV 的 TCID₅₀ 滴度, 并用 PCR 技术检测恙螨体内 HFRSV-RNA。现将结果报告如下:

材料和方法

1 实验材料

1.1 恙螨来源 于小盾纤恙螨密度高峰的 10 月份, 在陕西省历年来 HFRS 发病率及鼠带毒率高的户县 HFRS 疫区, 采用两法采集: (1) 从鼠体采集: 晚间在野外布放鼠夹, 次晨收回, 将从鼠体自行爬下的饱食恙螨幼虫置于饲养管中饲养, 以饲养的幼虫、若虫供实验用。(2) 用黑板采集: 选择晴天, 于 10 h 至 16 h 将黑板放于野外草丛中, 10 min 后收回检查。用采集的未食恙螨幼虫叮刺小白鼠乳鼠, 待其饱食自行爬下后, 置饲养管饲养备用。

1.2 Vero-E6 细胞 由中国预防医学科学院病毒学研究所提供, 用于测定 HFRSV TCID₅₀/mL 测定。

1.3 引物的设计和合成 根据实验要求和引物设计原则, 设计了 HFRSV76 118 株 cDNA 中 M 基因片段相互补的两个寡核苷酸引物:

正向引物: HFRSV cDNA440~459 bp

反向引物: HFRSV cDNA635~654 bp

第一个引物的碱基组成 5'-AAT AGC ACA TAC TGC AAG CC-3'

收稿日期: 1996-05-27, 修回日期: 1996-12-06

* 国家自然科学基金资助项目 No: 39470631

第二个引物的碱基组成为 5'-CTT GCT ATA GCA AAG ATC CC-3'

两引物之间距离为 215 bp。将该引物输入 PCR 引物设计, PCR DESNA 程序验证符合引物设计要求。用 Applied Biosystems 公司的 381A DNA Synthesizer 仪合成该对引物, 并经过柱纯化、真空冷冻干燥后备用。

1.4 PCR 试剂盒 AMV-逆转录酶、10×PCR 缓冲液、dNTPs 和 Taq 酶均为上海复旦大学产品。

1.5 DNA 标准分子量(Marker) 上海华美公司产品, 为 pGEM-7zf(+)/HaeIII DNA Markers

2 实验方法

2.1 恙螨体内 HFRSV 增殖

2.1.1 鼠体恙螨 HFRSV 增殖观察 (1)幼虫 HFRSV 增殖观察: 分别取鼠肺 HFRSV 抗原阳性或阴性的鼠体采集并饲养的恙螨幼虫, 每隔 20 d 以 100 只为一批研磨、冻融、离心, 制成无菌滤液作 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释, 接种 Vero-E6 细胞, 每批 2 份测定 TCID₅₀/mL, 方法见文献^[2]。(2)若虫 HFRSV 增殖观察: 分别取以上鼠体恙螨幼虫饲养孵化出的若虫, 于 100 d 时, 以 5~10 只为一批研磨、冻融、离心, 制成无菌滤液作 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释接种 Vero-E6 细胞, 每批 2 份测定 TCID₅₀/mL 滴度, 方法同上。

2.1.2 小黑板采集的游离恙螨 HFRSV 增殖观察 (1)幼虫 HFRSV 增殖观察: 取小黑板采集的未食恙螨幼虫叮刺小白乳鼠, 待其饱食后置饲养管饲养, 每隔 20 d 以 100 只为一批, 同上述鼠体恙螨幼虫 HFRSV 增殖方法进行观察。(2)若虫 HFRSV 增殖观察: 同上述鼠体恙螨若虫 HFRSV 增殖方法进行观察。

2.2 PCR 检测恙螨体内 HFRSV-RNA

2.2.1 恙螨悬液制备 每隔 20 d 取小黑板采集的游离恙螨幼虫和饲养出的若虫, 以 10 只为一批, 用 Eagle's 液洗涤 3 次, 置于 0.5 mL Eppendorf 离心管内, 用制成盲端的塑质移液吸头将恙螨幼虫捣碎, 加 Eagle's 液 100 μL 冻融 3 次^[3]。

2.2.2 恙螨体内 HFRSV-RNA 提取 参照文献^[4]略加改进。取上述螨悬液 100 μL 于 1.5 mL Eppendorf 管内, 加入等体积 40% PEG 6000 溶液, 4℃ 沉淀过夜, 4℃ 12000 r/min 离心 20 min, 沉淀溶于 500 μL DS 液 (4 mol/L 硫氰酸胍, 0.5% Sarcosyl, 25 mmol/L 柠檬酸钠, pH7.4) 中。充分溶解后加入 5 μL 2-巯基乙醇再混匀。依次加入 2 mol/L NaAc(pH4.0) 50 μL, 饱和酚 500 μL, 氯仿: 异戊醇 200 μL, 每次加入后均混匀。4℃ 放置 15 min, 4℃ 12000 r/min 离心 10 min。取上清加氯仿: 异戊醇 500 μL, 4℃ 12000 r/min 离心 5 min, 上清加 2 倍体积无水乙醇 -20℃ 过夜。4℃ 12000 r/min 离心 15 min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 吹干后溶于 50 μL 用 DEPC 处理过的去离子水中, 加 4 u/μL RNasin 0.5 μL -20℃ 保存备用。

2.2.3 逆转录 PCR 扩增反应 步骤为: 在 0.5 mL Eppendorf 离心管内依次加入下列物质: 10×PCR buffer 各 5 μL, 4 mmol/L dNTP 2 μL, 2 μmol/L Primer 各 1 μL, 40 u/μL RNasin 0.4 μL, 8 u/μL AMVRTase 0.2 μL, 5 u/μL Tge 0.4 μL, DEPC 处理过的去离子水 21 μL, RNA 模板 20 μL, 混匀后再加入石蜡油 50 μL。

逆转录反应为: 42℃ 15 min, 94℃ 3 min 灭活逆转录酶, 自然冷却至 30℃。PCR 反应程度为: 94℃ 40 sec, 55℃ 45 sec, 72℃ 45 sec, 进行 35 次循环。最后一次循环延长时间为 5 min。反应结束后取 20 μL 电泳、EB 染色鉴定。

结 果

1 恙螨体内 HFRSV 增殖

1.1 幼虫 HFRSV 增殖 取鼠肺 HFRSV 抗原阳性或阴性鼠体恙螨幼虫和小黑板诱集的游离恙螨幼虫各 5 批, 分别制成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的无菌滤液接种 Vero-E6 细胞测定 TCID₅₀/mL 滴度。结果除 60 d 一批未测出滴度外, 其余各组均测出, 其滴度在 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ TCID₅₀/mL 之间。鼠肺 HFRSV 抗原阳性鼠体恙螨幼虫滴度均较 HFRSV 抗原阴性鼠体恙螨幼虫和小黑板采集的游离恙螨幼虫高 10^{-1} 以上。详见表 1。

表1 不同时期小盾纤恙螨 HFRSV TCID₅₀测定
Table 1 TCID₅₀/mL of HFRSV in various stages of *Leptotrombidium scutellare*

标本分类 Specimens	编号 Code No.	采集至测定 间隔天数 Days between collecting and screening	测定用 螨数(只) Mites used	TCID ₅₀ /mL (直接测定) Direct assay
HFRSV 抗原阳 性鼠体恙螨	LS ₁	20	100	10 ⁻¹
Mites from HFRSV antigen positive mice	幼虫 Larva	40	100	10 ⁻²
		60	100	-
	LS ₃	80	100	10 ⁻⁴
	LS ₄	100	100	10 ⁻⁵
	若虫 Nymph	100	6	10 ⁻⁶
HFRSV 抗原阴 性鼠体恙螨	LS ₆	20	100	10 ⁻¹
Mites from HFRSV antigen negative mice	幼虫 Larva	40	100	10 ⁻²
		60	100	-
	LS ₈	80	100	10 ⁻⁴
	LS ₉	100	100	10 ⁻⁵
	若虫 Nymph	100	7	-
小黑板诱集 的游离恙螨	LS ₁₀	20	100	10 ⁻¹
Free mites collected with small blackboard	幼虫 Larva	40	100	10 ⁻²
		60	100	-
	LS ₁₂	80	100	10 ⁻⁴
	LS ₁₃	100	100	10 ⁻⁴
	若虫 Nymph	100	6	10 ⁻⁵

1.2 若虫 HFRSV 增殖 取鼠肺 HFRSV 抗原阳性或阴性鼠体恙螨幼虫和小黑板诱集的游离恙螨幼虫,经饲养 100 d 孵化出的若虫共 3 批,制成无菌滤液接种 Vero-E6 细胞,测定 HFRSV 滴度。结果除鼠肺 HFRSV 抗原阴性鼠体恙螨若虫未测出外,鼠肺 HFRSV 抗原阳性鼠体恙螨幼虫、小黑板采集的游离恙螨幼虫孵出的若虫滴度分别为 10⁻⁶、10⁻⁵ TCID₅₀。详见表 1。

2 PCR 检测恙螨体内 HFRSV-RNA

取鼠肺 HFRSV 抗原阳性或阴性鼠体恙螨幼虫和饲养出的若虫,小黑板采集的游离恙螨幼虫和饲养出的若虫,共 18 份悬液提取 RNA,分别经逆转录、扩增、检测。结果从 12 份鼠肺 HFRSV 抗原阳性或阴性的鼠体恙螨幼虫和饲养出的若虫中,有 6 份扩增后见有 215 bp 的 DNA 扩增带(分别为:鼠肺抗原阳性螨 40 d 组、80 d 组、100 d 组和若虫组,鼠肺抗原阴性螨 80 d 组和 100 d 组)。6 份小黑板采集的游离恙螨幼虫和饲养出的若虫有 4 份扩增后见有 215 bp 的 DNA 扩增带(分别为:40 d 组、80 d 组、100 d 组和若虫组)。表明这 10 份恙螨幼虫、若虫体内有 HFRSV-RNA,证明用 PCR 技术可直接从螨体内检测到 HFRSV-RNA,见图 1。

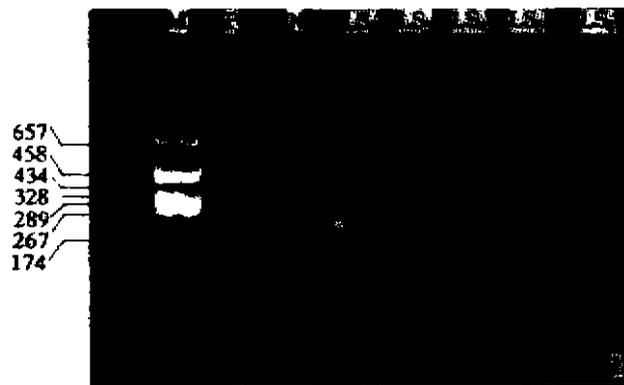


图 1 PCR 检测恙螨幼虫、若虫体内 HFRSV-RNA 结果

Fig. 1 Detection of HFRSV-RNA in larva and nymph by RT-PCR

The numbers from left to right: LS₂, LS₃, LS₄, LS₅, LS₆

讨 论

1954 年 Traub 等根据流行病学资料提出恙螨是朝鲜出血热可疑的传播媒介^[5], 70 年代陕西省卫生防疫站根据流行病学证据又提出小盾纤恙螨为流行性出血热可疑的传播媒介, 但一直未得到病原学证实。1989 年以来我们先后设计了 4 种方法对小盾纤恙螨进行自然感染、叮刺传播和经卵传递 HFRSV 的研究并分离到 HFRSV 20 株。1995 年我所分批用幼虫和若虫进行 HFRSV 分离并测定 TCID₅₀/mL 滴度。结果发现小盾纤恙螨幼虫在蜕变为若虫前有一阶段分离不出 HFRSV, 若虫期所分离出的 HFRSV 滴度较幼虫期增高约 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ TCID₅₀/mL, 该滴度是经细胞培养第 4 代后所测得的结果, 说明 HFRSV 在螨体内有增殖现象。本次研究取饲养的小盾纤恙螨幼虫和若虫, 每 20 d 为一批制成无菌滤液, 用 Vero-E6 细胞测定滴度, 动态观察 HFRSV 在恙螨体内的增殖情况。结果如下: 小盾纤恙螨幼虫期除 60 d 一批未测出 HFRSV 外, 其余每批均在不同时间内测出 HFRSV 滴度, 其滴度均在 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ TCID₅₀ 之间, 并用 PCR 扩增技术检测到 HFRSV-RNA。动态观察发现 80 d 和 100 d 两批 HFRSV 滴度较 20 d 和 40 d 两批高 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ TCID₅₀/mL。饲养 100 d 时的 3 批若虫, 除鼠肺 HFRSV 抗原阴性的鼠体若虫未测出 HFRSV 滴度和未检测到 HFRSV-RNA 外, 另外 2 批均测出 HFRSV 滴度并检测到 HFRSV-RNA, 其滴度在 10^{-6} 、 10^{-5} TCID₅₀/mL, 表明 HFRSV 在恙螨体内有增殖现象。表中第 1、2 组恙螨幼虫系来自鼠体, 不能排除分离出的 HFRSV 系来自鼠体的可能性, 但在饲养过程中有增殖现象; 第 3 组恙螨幼虫系用小黑板采自自然界的未吸食过的幼虫, 所分离的 HFRSV 只能是经卵传递而来, 在饲养过程中亦有增殖现象。1、3 组从若虫中分离到 HFRSV, 表明 HFRSV 可经期传播并有增殖现象。

用 PCR 扩增技术从饲养不同天数的恙螨幼虫、若虫体内直接检测到 HFRSV-RNA, 这一结果为流行病学调查提供快速、敏感的方法。

参 考 文 献

- 1 吴光华, 张云, 赵学忠等. 小盾纤恙螨在流行性出血热传播中的作用. 中华医学杂志, 1992, 72(8): 481~483
- 2 黄慎祥主编. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990. 145
- 3 张云, 李先富, 唐家琪等. 用 PCR 技术检测恙螨体内 HFRSV 的初步研究. 中国公共卫生学报, 1996, 15(5): 315~316
- 4 张云, 李越希, 陶开华等. 大白鼠吸入 EHFV 气溶胶后病毒在各脏器的分布. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9(1): 34~36
- 5 Traub R, Wissemann CL. Jr. The ecology of chigger-borne rickettsiosis. J Med Entmol, 1974, 11: 237~303
- 6 张云, 李先富, 陶开华等. 小盾纤恙螨自然感染流行性出血热病毒经期传播及其体内增殖的初步观察. 中国公共卫生学报, 1995, 14(3): 176~178

Dynamic Observation on Proliferation of HFRSV in Chigger Mite

Zhang Yun Li Xianfu Wu Guanghua

(Nanjing Institute of Military Medicine, Nanjing 210002)

Zhang Jiaju Jiang Kejian

(Institute of Preventive Medicine of Shanxi Province, Xi'an 710054)

In order to observe further dynamic changes on proliferation of HFRSV in *Leptotrombidium Scutellare*, the raised *Leptotrombidium scutellare* were ground and sterilized with an interval of 20~40 days, the filtrate of each batch was inoculated separately into Vero-E6 cells, titres of HFRSV and HFRSV-RNA were detected. The results confirmed that HFRSV were positive in most batches of larva. The above results indicated that the *Leptotrombidium sutellare* is a transmitting vector of HFRSV.

Key words *Leptotrombidium Sutellare*, Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus. Proliferation