

革螨、恙螨传播肾综合征出血热病毒的实验研究

张云 朱进 邓小昭 吴光华 张家驹 周燕萍 R69 A

【摘要】 目的 研究革螨、恙螨在肾综合征出血热病毒(hemorrhagic fever with renal syndrome virus, HFRSV)传播中的媒介作用。方法 采集自然界鼠窝革螨及饲养繁殖的子代革螨和鼠体恙螨幼虫以及从小黑板采集游离恙螨幼虫及饲养孵化的若虫,进行螨细胞培养分别观察螨细胞传播 HFRSV 的作用。结果 发现螨细胞培养第 15 d 和第 20 d 可从螨细胞内检测到 HFRSV,其中 HFRSV 检出数和荧光强度在革螨子 4 代、子 3 代和恙螨若虫均多于和强于子 1 代、子 2 代及恙螨幼虫。结论 革螨、恙螨对 HFRSV 的传播有一定的媒介作用,在维持 HFRSV 的自然循环中起重要作用。

【关键词】 革螨;恙螨;肾综合征出血热病毒

Experimental study on the roles of gasmid mite and chigger mite in the transmission of hemorrhagic fever with renal syndrome virus ZHANG Yun, ZHU Jin, DENG Xiaozhao, et al. The Institute of Military Medicine, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective To study the roles of gasmid mite and chigger mite in the Transmission of hemorrhagic fever with renal syndrome virus (HFRSV). **Methods** Natural gasmid mite, the first generation gasmid mite, chigger mite larvae from rats, free chigger mite larva and nymph were collected and their cells were cultured to study the role of transmission HFRSV. **Results** HFRSV was detected from mite cells after cultured for 15 and 20 days. The number of HFRSV and fluorescence intensity detected from the third and fourth generation gasmid mite and chigger mite nymph was much more than those from the first, second generation and chigger mite larva. **Conclusion** Gasnid mite and chigger mite had an important role to play on HFRSV transmission in heeping the natural cycles.

【Key words】 Gasmid mite; Chigger mite; Hemorrhagic fever with renal syndrome virus

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)是在我国广泛流行的严重自然疫源性疾病,病毒通常分 4 型^[1]。60 年代以来我所通过大量研究证明 HFRS 病毒(HFRSV)以鼠类为传染源,并通过革螨、恙螨叮刺传播^[2]。70 年代和 80 年代我所研究证明:革螨、恙螨能自然感染、叮刺传播和经卵传递 HFRSV^[3,4]。为进一步了解革螨、恙螨在我国传播 HFRSV 的媒介作用和体内 HFRSV 的保存机理,我们在原有基础上作进一步研究。现将结果报告如下。

材料与方 法

一、材料

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970635);江苏省自然科学基金资助项目(BK99155)

作者单位:210002 南京,南京军区军事医学研究所流行病学研究室(张云、朱进、邓小昭、吴光华);陕西省卫生防疫站病毒科(张家驹、周燕萍)

1. 革螨、恙螨来源:(1)革螨来源:于 HFRS 流行季节(10~11 月份)挖鼠窝捕鼠、收集窝草置布袋中送实验室检出革螨;将鼠肺 HFRSV 抗原阳性和阴性的鼠窝革螨分别分类,置饲养缸内饲养,以成虫、卵和幼虫作为受检材料。(2)恙螨来源:于小盾纤恙螨密度高峰的 10 月份,在陕西历年来 HFRS 发病率及鼠带毒率高的户县化工厂,采用以下两法采集恙螨:①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。鼠肺用间接免疫荧光法(IFAT)检测 HFRSV 抗原,以 HFRSV 抗原阳性鼠所收集的饱食幼虫,以及饲养出的若虫、成虫、卵、子代幼虫作为受检材料。②小黑板采集:选择晴天,于 10:00 至 16:00,将小黑板放置于野外草丛中,10 min 后收回检查。将饱食恙螨幼虫置于饲养管中饲养。以未食幼虫、饱食幼虫、若虫、成虫、卵和子代幼虫作为受检

材料。

2. HFRSV 和 HFRSV 抗体: 试验用 HFRSV 为 76-118 株经乳鼠颅内传 4 代, 以 199 培养液研磨发病鼠脑制成 10% (W/V) 悬液, 500 r/min 离心 15 min, 取上清作为病毒液备用。HFRSV 单克隆荧光抗体(25-1)由中国预防医学科学院病毒学研究所研制。

二、方法

1. 感染试验: 将感染 HFRSV 发病症状典型的乳鼠, 分别放入未饱食的革螨、恙螨饲养管内任其叮食 4 h 后, 挑出革螨和恙螨置于另一饲养管内饲养。

2. 革螨、恙螨细胞内 HFRSV 观察: 分别取鼠肺 HFRSV 抗原阳性的鼠窝革螨、鼠体恙螨和鼠肺 HFRSV 抗原阴性的鼠窝革螨、鼠体恙螨经叮刺感染 HFRSV 后发病的乳鼠, 各 200 余只挑入经消毒灭菌的饲养管内再饲养 15 d。然后将螨挑入平皿内, 平皿口涂驱避剂以防螨外爬; 将平皿置于距紫外线灯管(30 W)37 cm 处暴露垂直照射 30 min; 尔后用 199 液洗 3 遍; 再将螨悬浮于含 1 000 U/ml 青霉素、链霉素、20 U/ml 两性霉素 B 2 ml 的 199 液中, 置 4℃ 冰箱继续灭菌 6 h 后取出, 弃去液体; 用无菌眼科小剪反复剪碎螨体; 每种螨加 2 ml pH 7.2~7.4 0.75% 胰蛋白酶(Difco 1:250), 在 37℃ 水浴中进行消化; 30 min 后取出, 以 2 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀物悬于 2 ml 10% 牛血清 199 液内, 反复吹打, 直至螨组织块成絮状为止; 再用 10% 牛血清 199 液离心洗涤 3 次, 以排除螨体机械携带 HFRSV 的可能。每种螨可得细胞悬液约 3~5 ml, 分别置于 25 ml 小方瓶中, 37℃ 培养, 细胞贴壁后, 换营养液, 以后每 4 d 换一次维持液。第 7~8 d 传代一次。观察 HFRSV 在螨细胞内感染情况。

3. 革螨、恙螨细胞内 HFRSV 垂直传播观察: 分别取子 1 代、子 2 代、子 3 代、子 4 代革螨和恙螨若虫、子代幼虫同上述方法 2 作革螨、恙螨单层细胞培养观察。

4. 观察内容: ①每天镜下观察螨细胞贴壁生长形态; ②待螨细胞贴壁和生长良好后, 每天刮取部分螨细胞按常规方法进行特异性荧光检测; ③在传第 2 代时取螨贴壁细胞悬液, 反复冻融 3 次、离心, 取上清接种 Vero-E₆ 细胞, 分离 HFRSV。

5. 判定螨体内 HFRSV 的指标: ①螨贴壁细胞胞浆内检测到 HFRSV 的特异性荧光颗粒; ②经 HFRS 病人恢复期血清和病毒免疫血清作用后可阻

断其特异性荧光反应; ③培养物重复接种 Vero-E₆ 细胞能分离出并可稳定传代的 HFRSV。

6. 螨细胞内 HFRSV 多聚酶链反应(PCR)检测分析: ①引物设计和合成; ②HFRSV 制备及 RNA 提取; ③逆转录 PCR 扩增反应; ④PCR 结果检测等, 参见文献^[5]。

结 果

1. 螨细胞生长贴壁情况: 螨细胞培养 24 h 镜检细胞贴壁良好, 细胞大小不等, 15 d 生长旺盛未见病变, 20 d 有少量细胞脱落并有病变出现, 25 d 后螨贴壁细胞全部脱落。

2. 螨细胞内 HFRSV 观察: 经培养第 15、20 d 各用白金环刮取部分螨贴壁细胞按常规方法进行 HFRSV 特异性荧光检测。结果: 螨贴壁培养细胞均数量不等见有特异荧光颗粒。荧光图像呈沙粒分布于细胞浆内, 少数呈块状。检测结果见表 1。

表1 鼠肺 HFRSV 抗原阳性、阴性的不同种螨细胞内 HFRSV 检测结果

螨 种	培养天数	鼠肺 HFRSV 抗原阳性		鼠肺 HFRSV 抗原阴性	
		标本数	检出数	标本数	检出数
格氏血厉螨	15	5	2	5	1
	20	6	3	6	1
厥真厉螨	15	5	2	5	2
	20	5	1	5	0
鼠鬃毛厉螨	15	4	1	4	1
	20	3	1	3	1
巴氏厉螨	15	4	2	4	1
	20	4	2	4	1
鼠体恙螨幼虫	15	4	2	4	0
	20	4	1	4	1
游离恙螨幼虫	15	4	1	4	0
	20	4	2	4	1

3. 螨细胞垂直传播 HFRSV 观察: 经培养第 15 d 和 20 d 的子 1 代、子 2 代、子 3 代、子 4 代革螨和恙螨若虫、幼虫的单层贴壁细胞, 按常规方法进行 HFRSV 特异性荧光检测, 其细胞胞浆内荧光图像和上述螨细胞类似均呈沙粒状分布于细胞浆内, 少数呈块状。检测结果见表 2。

4. Vero-E₆ 细胞重复感染检测: 将螨单层细胞第 19 d 上清液接种 Vero-E₆ 细胞。接种后第 4 d 刮取部分细胞进行特异性荧光染色, 50% 以上细胞胞浆内有块状或点状荧光颗粒。Vero-E₆ 细胞传至第 2 代后, 90% 以上细胞浆内呈特异性荧光反应, 经 HFRS 病人血清作用可阻断其特异性荧光反应。用 5 例 HFRS 病人双份血清测定, 荧光抗体滴度均有 4

倍以上增长,证实分离出的病原因子为 HFRSV。

表2 不同代螨体内 HFRSV 检测结果

螨种代数	培养天数	格氏血厉螨		威真厉螨		鼠颚毛厉螨		恙螨	
		标本数	检出数	标本数	检出数	标本数	检出数	标本数	检出数
革螨	1	15	5	1	6	1	4	1	
		20	6	2	5	2	5	1	
	2	15	4	0	4	1	5	2	
		20	5	2	3	1	4	2	
	3	15	6	3	5	2	4	2	
		20	4	3	3	3	3	3	
	4	15	4	3	4	3	6	3	
		20	4	4	5	3	6	4	
恙螨	幼虫	15						3	1
		20						4	2
	若虫	15						3	1
		20						4	2

5. 螨细胞内 HFRSV PCR 分析:各取格氏血厉螨、威真厉螨、鼠颚毛厉螨、巴氏厉螨和游离恙螨 20 d 的细胞培养悬液提取 HFRSV-核糖核酸(RNA),制备 RNA 模板分别进行逆转录、扩增检测。结果除巴氏厉螨外其余 4 份标本均见有明显的 RNA 扩增带。表明螨细胞内有 HFRSV 存在。

讨 论

螨媒在虫媒病毒中所起的媒介作用,不仅取决于该种类的数量、生物学特性、与人的关系等,还取决于对该病毒的易感性、传播性及经卵传递能力。虫媒病毒如何在自然界长期保存,也是一个重要而复杂的问题,一直受到流行病学工作者的关注。我们通过大量的现场调查和实验研究观察,认识到 HFRSV 在革螨、恙螨间传递对保存病毒有一定的作用。

本研究用单层螨细胞培养法,取贴壁螨细胞按常规方法进行特异性荧光检测细胞内 HFRSV,结

果在螨细胞培养第 15 d 和第 20 d 可从细胞内检测到 HFRSV。在螨细胞垂直传播的观察中发现,在革螨的子 1 代、子 2 代、子 3 代和子 4 代及恙螨幼虫和若虫细胞内均可检测到 HFRSV。在革螨子 3 代和子 4 代及恙螨若虫细胞内检出数和荧光颗粒强度均高于和强于革螨子 1 代和子 2 代及恙螨幼虫。表明 HFRSV 在螨体细胞内垂直传播,并有增殖现象,这一现象对该种病毒的自然循环和维持 HFRSV 疫源地具有重要的流行病学意义。

此外,我们以前作革螨、恙螨自然感染、叮刺传播和经卵传递试验中,将螨悬液接种 Vero-E₆ 细胞,均需要传 3 代后才观察到荧光颗粒;50% 以上细胞呈特异性荧光反应一般为 4~5 代后才出现。用 HFRSV 阳性螨单层细胞接种 Vero-E₆ 细胞培养,第 1 代即观察到荧光阳性,第 2 代有 90% 以上细胞浆内有特异性荧光反应。提示用 HFRSV 阳性螨单层细胞培养物接种 Vero-E₆ 细胞分离 HFRSV,可较直接接种 Vero-E₆ 细胞早 10 d 分离出 HFRSV 并可提高检出率。

参 考 文 献

- 1 吴光华. 流行性出血热传播途径研究进展. 中华流行病学杂志, 1995, 16:171-174.
- 2 张云, 陶开华, 赵学忠, 等. 流行性出血热传播途径的研究. 中华预防医学杂志, 1994, 28:132-135.
- 3 李法卿, 吴光华, 孟鹤雁, 等. 革螨自然感染、叮刺传播和经卵传递流行性出血热病毒的实验研究. 中华流行病学杂志, 1986, 7:200-202.
- 4 张云, 史江, 袁蕊, 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, 13:16-18.
- 5 张云, 陶开华, 李先富, 等. 用 PCR 技术检测革螨、恙螨体内 HFRSV 的研究. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(2):23-24.

(收稿日期:2001-01-21)

(本文编辑:杨莲芬)

· 出版信息 ·

欢迎订阅《中华流行病学杂志》

《中华流行病学杂志》为中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业性学术期刊,读者对象为从事预防医学、临床医学、流行病学科研与教学的工作者。作为核心期刊已被国内主要检索机构收录,1990 年本刊已进入美国国立图书馆 MEDLARS-MEDLINE 数据库。

《中华流行病学杂志》为双月刊,大 16 开 80 页。欲订读者请及时向当地邮局订阅(邮发代号:2.73),漏订读者请直接汇款至我刊编辑部。本编辑部常年办理邮购(每期定价 9.00 元,全年 54.00 元,免费邮寄)。地址:北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部,邮政编码:102206,电话:(010)61739449。

本刊编辑部