

DOI:10.13350/j. cjb. 180612

• 论著 •

白纹伊蚊 DENV 2 载量随饲养时长的变化趋势研究^{*}

徐铁龙^{1,2}, 庞兴亚^{1,2}, 郑彬^{1,2}, 张仪^{1,2}, 周晓农^{1,2**}

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织热带病研究中心, 上海 200025; 2. 卫生部寄生虫与病原生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫和丝虫病合作中心)

【摘要】 目的 探讨白纹伊蚊感染 DENV 2 后, 体内病毒载量随饲养时长变化趋势, 为相关研究提供参考依据。方法 305 只白纹伊蚊 100% 人工感染后, 分别于第 2、4、6、8、10 d 随机取蚊, 共 3 个重复, 每个重复至少 20 只蚊虫, 应用实时荧光定量 PCR 检测蚊体内 DENV 2 载量, 记录 CT 值。计算并比较各组蚊虫病毒载量、阳性率等。结果 白纹伊蚊感染 DENV 2 后第 2、4、6、8、10 d 病毒载量中位数为 $2.24 \times 10^3 - 1.99 \times 10^6$ copies/ml, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 51.08$, $P < 0.01$); 阳性率为 81.67%—100%, 差异具有统计学意义 (Fisher 确切概率 $P < 0.01$)。其中, 白纹伊蚊体内病毒载量变化特点为: 以第 2 d 时病毒载量为基线值, 第 4 d 显著降低, 第 6 d 回升至第 2 d 水平, 第 8、10 d 逐步升高; 白纹伊蚊 DENV 2 阳性率变化特点: 感染后第 2 d 阳性率 100%, 第 4 d 时降至 81.67%, 且随后保持稳定。结论 白纹伊蚊感染 DENV 2 载量随饲养时长变化先降低后升高, 阳性率先升高后降低, 因此中应根据 A 科研需要合理选择饲养时长。

【关键词】 白纹伊蚊; 登革病毒; 病毒载量; 变化趋势

【中图分类号】 R384.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2018)06-0605-04

[Journal of Pathogen Biology. 2018 Jun; 13(6): 605—608.]

Trends in the changes in DENV 2 loads with rearing time in *Aedes albopictus*

XU Tie-long^{1,2}, PANG Xing-ya^{1,2}, ZHENG Bin^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2}, ZHOU Xiao-nong^{1,2} (1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, and National Center for Tropical Diseases Research, Shanghai 200025, China; 2. Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Public Health, and WHO Collaborating Center for Tropical Diseases)

【Abstract】 **Objective** To study trends in changes in DENV 2 loads with rearing time in *Aedes albopictus* in order to guide further research. **Methods** Three hundred and five mosquitoes were infected with DENV 2 in the laboratory, and then samples were collected randomly on days 2, 4, 6, 8, and 10 after mosquitoes were fed infected blood. These steps were replicated 3 times with at least 20 mosquitoes in each group, and fluorescence quantitative PCR was used to detect the DENV 2 loads in each mosquito. The cycle threshold (C_T) was recorded for each mosquito, and viral loads and rates of detection were calculated. **Results** Mosquitoes reared for 2, 4, 6, 8, and 10 days after they were fed infected blood had different DENV 2 loads ($\chi^2 = 51.08$, $P < 0.01$) between 2.24×10^3 and 1.99×10^6 copies/ml. Mosquitoes tested positive for DENV 2 at different rates (Fisher's exact probability < 0.01) from 81.67 to 100%. Compared to the viral load in *A. albopictus* on day 2, the viral load decreased significantly on day 4 which, it increased on day 6, and it then increased steadily on days 8 and 10. On day 2, *A. albopictus* tested positive for DENV 2 at a rate of 100%. *A. albopictus* tested positive at a rate of 81.67% on day 4, and the rate of positivity remained consistent afterwards. **Conclusion** The DENV 2 load increased or decreased depending on the rearing time for *A. albopictus*. Therefore, a rearing time of a reasonable duration is required in relevant research.

【Key words】 *Aedes albopictus*; dengue fever virus; viral load; trends in changes

^{***}近半个世纪以来, 登革热在全球范围内发病率增加了近 30 倍, 疫区覆盖 100 多个国家或地区^[1]。目前, 登革热已从一个被忽视的热带病演变为全球性公共卫生问题之一。近年来, 登革热在我国的云南^[2]、广东^[3]、福建^[4]等地相继暴发流行, 其流行态势也呈现明显上升趋势, 如广东省已从登革热非地方性流行区变为低地方性流行区^[5]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 在《登革热全球防控策略 (2012—2020)》中确立了至 2020 年将登革热病死率和发病率

分别降低 50% 和 25% 以上的防控目标^[1]。目前, 尚无抗登革病毒的特效药物及全面有效的疫苗, 当前疫情形势下登革热蚊媒防控措施研究创新成为核心课题之

^{*} **【基金项目】** 国家重点研发计划“生物安全关键技术研发”专项 (No. 2016YFC1202000)。

^{**} **【通讯作者】** 周晓农, E-mail: zhouxn1@chinaacdc.cn

【作者简介】 徐铁龙 (1986—), 男, 湖南人, 博士研究生。研究方向: 热带病及其媒介防控。E-mail: jxcicq_xtl@126.com

—^[1]。本实验分别于白纹伊蚊感染 2 型登革病毒 (dengue virus type 2, DENV 2) 后第 2、4、6、8、10 d, 实时检测并比较蚊体 DENV 2 载量及其阳性率等变化趋势, 为相关研究提供参考依据。

材料与方法

1 材料

白纹伊蚊驯化蚊由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所提供。DENV 2 由深圳市疾病预防控制中心提供, 经 C6/36 细胞增殖培养后 1 ml/管分装, 于 -80 °C 冻存备用。

2 方法

2.1 白纹伊蚊饲养与人工感染

2.1.1 成蚊准备 白纹伊蚊饲养条件为: 温度 (28 ± 1) °C, 相对湿度 (70 ± 10) %, 自然光照, 幼虫以鼠食喂食, 成蚊孵化后, 以 10% 葡萄糖水维持饲养至 3—5 d 龄时用于人工感染实验。

2.1.2 病毒感染 1) 将白纹伊蚊断食断水 24 h—36 h; 2) 取 4 ml 新鲜肝素抗凝人全血于 15 ml 无菌离心管中, 置于 37 °C 恒温箱中备用; 3) 取出上述离心管, 加入 2 ml DENV 2 病毒, 轻轻混合均匀; 4) 将医用脱脂棉球制成扁平状, 吸取上述血餐滴于棉块上至其饱和而不滴液, 然后将棉块置于蚊笼上部, 饲养 2 h; 5) 重复上述感染步骤 1—2 次, 以提高阳性率; 6) 受试蚊虫继续饲养, 第 2 d 开始喂以 10% 葡萄糖水。人工感染操作均于生物安全柜内进行, 感染实验结束后第 1 d 停饲 10% 葡萄糖水, 以饿死雄蚊以及未吸血的雌蚊。

2.1.3 蚊虫分组 所有吸血蚊虫饲养在同一 5L 蚊笼中, 分别于感染后第 2、4、6、8、10 d 从中随机取蚊, 每次 3 个重复, 每次至少 20 只蚊虫, 于 -20 °C 冰冻处死, -80 °C 冻存。

2.2 荧光定量 PCR 检测蚊体 DENV 2 将蚊虫于 -80 °C 冰箱取出, 充分研磨, 逐只提取核酸, 采用荧光定量 PCR 检测 DENV 2 载量, 记录 CT 值, 阴性蚊虫取值为 40.01。同时将 DENV 2 核酸浓度为 10⁷ copies/ml 的标准品倍比稀释为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² copies/ml 等系列浓度, 每个浓度设 3 个重复, 与样品同步检测。

2.3 数据分析 采用文献[6]的方法分析 DENV 2 核酸浓度 (copies/ml) 的 log₁₀ 值 (log₁₀ DENV 2 核酸浓度) 与 CT 值的直线相关关系, 绘制回归直线, 建立回归方程。依据所得回归方程, 计算蚊体 log₁₀ DENV 2 核酸浓度, 作为反映蚊虫体内病毒载量高低的统计指标, 并采用最大值、75% 分位数 (75% percentile, P75)、中位数、25% 分位数 (25% percentile, P25) 统计描述各组数据, 绘制直方图。运行 SAS 9.2

软件, 采用 K-M 检验分析各组间 log₁₀ DENV 2 核酸浓度差别, 并采用 Turkey 学生化极差法进一步分析组间差异性, 绘制 Wilcoxon 得分 (秩次和) 随饲养时长变化趋势图。依据 DENV 2 试剂盒检测说明, CT 值 ≤ 40 判为阳性, > 40 为阴性, 并以第 2 d 蚊虫 CT 值基线数据中的最大值 (即病毒载量最小值) 为参照, 将其余各组数据中大于该最大值的判为 DENV 2 载量下降。计算各组蚊虫转阴率 (阴性率), 载量下降率等, 采用 Fisher 精确概率检验各组间 CT 值分布差异。

结果

1 标准曲线

CT 值与 log₁₀ DENV 2 核酸浓度标准曲线见图 1。标准曲线公式为 Y (log₁₀ DENV 2 核酸浓度) = -0.28X (CT 值) + 12.70, 决定系数 R² = 0.99。经标准曲线公式计算各组各蚊虫 log₁₀ DENV 2 核酸浓度。

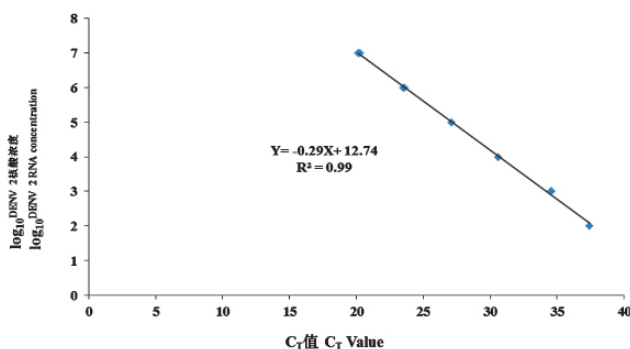


图 1 标准回归直线及回归方程
Fig. 1 The standard regression line and equation

2 组间 DENV 2 载量比较

各组 log₁₀ DENV 2 核酸浓度数据参数比较见图 2。DENV 2 感染后第 2、4、6、8、10 d 蚊虫 log₁₀ DENV 2 核酸浓度数据最大值、P75、中位数、P25 等指标随着饲养时间的变化趋势相同: 即第 4 d 降低, 第 6、8、10 d 逐渐升高。

经非参数 K-M 检验, 各组间 DENV 2 载量差异具有统计学意义, 其中, 第 2 d 时 DENV 2 载量显著高于第 4 d, 等于第 6 d, 而低于第 8 d 和第 10 d ($\chi^2 = 51.08, P < 0.01$)。 (图 3)。

3 组间 DENV 2 载量转归分布比较

感染 DENV 2 后, 白纹伊蚊病毒载量出现上升或不变、降低及转阴等 3 种情况 (表 1), 第 2、4、6、8、10 d 病毒载量降低率分别为 0%、11.67%、8.33%、8.33% 和 12.31%, 转阴率分别为 0%、18.33%、16.67%、16.67% 和 15.38%。汇总得, 第 2、4、6、8、10 d 阳性率分别为 100%、81.67%、83.33%、83.33% 和 84.62%。

经检验, 各组间 DENV 2 阳性率差异具有统计学意义, 具体为: 第 2 d DENV 2 阳性率显著高于第 4、6、

8、10 d,而后四者间相同(Fisher 精确概率<0.01)。

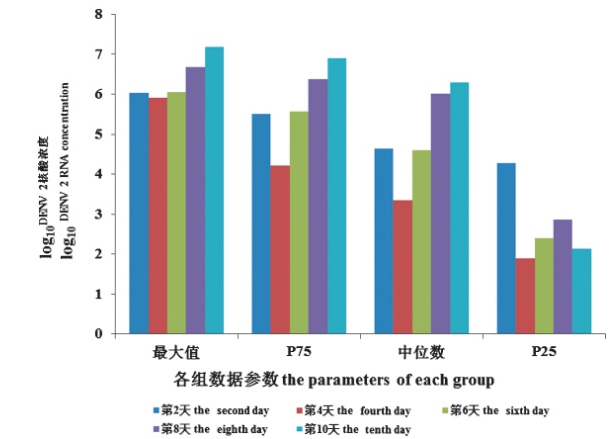


图2 各组蚊虫数据参数随饲养时长变化趋势
Fig.2 The trend of each parameter changes with rearing time

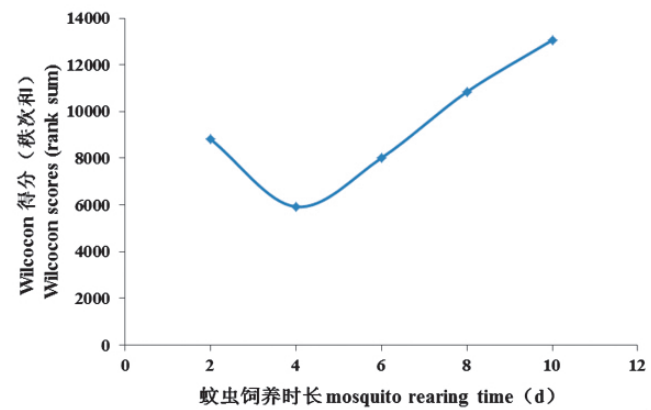


图3 蚊虫体内 DENV2 病毒载量随饲养时间变化趋势
Fig.3 The trend of DENV 2 loads changes with rearing time in mosquito

表1 白纹伊蚊 DENV 2 载量转归分布
Table 1 Pair-wise differences of DENV-2 loads qualitative distribution among the groups

| 感染后时间(d) The day post infecting | 观察蚊虫数 No. of sample | 阳性蚊病毒载量上升或不变只数 No. of mosquitoes with increasing or fixed virus loads | 百分率 Percentages (%) | 阳性蚊病毒载量降低只数 No. of mosquitoes with decreasing virus loads | 百分率 Percentages (%) | 阴性蚊只数 No. of negative mosquitoes | 百分率 Percentages (%) |
|---------------------------------------|---------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|--|---------------------------|
| 2 | 60 | 60 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| 4 | 60 | 42 | 70.00 | 7 | 11.67 | 7 | 18.33 |
| 6 | 60 | 45 | 75.00 | 5 | 8.33 | 5 | 16.67 |
| 8 | 60 | 45 | 75.00 | 5 | 8.33 | 5 | 16.67 |
| 10 | 65 | 47 | 72.31 | 8 | 12.31 | 8 | 15.38 |

讨 论

本研究采用 DENV 2 感染白蚊伊蚊,感染后第 2 d 感染率达 100%,并在随后第 4、6、8、10 d 监测了蚊体 DENV 2 载量变化趋势:一方面,从群体水平上定量分析了 DENV 2 载量随饲养时长的变化趋势,结果发现白纹伊蚊感染 DENV 2 后病毒载量在第 4 d 降低,第 6 d 回升至第 2 d 水平,并于第 8、10 d 逐渐升高;另一方面,依据蚊体 DENV 2 载量的转归结果,定性分析了各组白纹伊蚊转阴、载量降低、升高或不变等 3 种转归分布情况,结果表明白纹伊蚊感染后第 2 d 阳性率为 100%,至第 4—10 d 下降并稳定在 81.67%—84.62%之间,其中载量下降率为 8.33%—12.31%。两方面变化趋势结果相互印证。感染后第 4 d DENV 2 载量下降归因于蚊虫病毒载量转阴或下降,而此时 DENV 2 与蚊虫仍未相互适应,病毒在蚊虫体内尚不能大量繁殖,待其相互适应后,在阳性率稳定不变(81.67%—84.62%)的情况下 DENV 2 随着饲养时长大量增殖,故至第 6 d 后蚊体病毒载量逐渐增加。

以往有研究^[7]表明白纹伊蚊感染 DENV 2 后其阳性率随饲养时长逐步增加,其中在感染后第 3、5、7、9、14 d 中肠阳性率分别为 40%、56.67%、75.00%、78.33%和 81.67%。本研究发现阳性率降低的相反现象,可能与白纹伊蚊感染方法、感染血餐滴度、检测方法灵敏度等因素有关。但两项研究的第 10 d 左右

时阳性率均为 80%左右。本研究中白纹伊蚊感染 DENV 2 后 15.38%—18.33%的转阴率以及 8.33%—12.31%的载量降低率,反映了病毒与蚊媒的相互作用结果。病毒感染蚊虫需要通过几个解剖学屏障。一旦蚊虫摄入含有病毒的血液,病毒必须首先感染中肠细胞。而中肠细胞感染成功与否同时取决于蚊和病毒两个因素^[8-9]。蚊虫摄取的病毒颗粒必须达到一定数量才能使病毒突破中肠屏障^[10-11]。病毒随吸食的血先进入中肠后段,这时蚊虫会释放蛋白水解酶并改变 pH 值和温度,造成不利于病毒生存的环境。蚊虫的前肠和后肠因为有角质层,所以被认为不会被病毒感染^[12]。在感染中肠后,病毒通过基底膜或蚊的血淋巴管道系统播散到整血腔^[13]。然后,病毒感染唾液腺,并被分泌到唾液向新宿主传播。蚊虫可通过基因突变筛选^[14-15]、识别病毒核酸并进一步抑制其复制^[16-17],以及感染细胞自我凋亡^[18]等多种机制对入侵的病毒产生抗性,即使病毒成功感染中肠细胞,通过中肠在血淋巴中增殖也并不能保证感染唾液腺^[10]。蚊虫与病毒相互作用,使蚊虫体内及其传播的病毒数量呈现显著变化,从几个病毒颗粒到 10⁵ 个/ μ l^[10,19-20]。

受研究设计限制,本研究只能以感染后第 2 d 的蚊虫检测 CT 值数据中的最大值作为判断病毒载量下降的临界点,故所述下降率属于保守估计值。另有研

究表明,病原体感染可增加蚊虫死亡率^[21]。而本研究未能定量检测频死蚊虫 DENV 2 载量,也许因病毒致死蚊虫体内的病毒载量更高。白纹伊蚊感染 DENV 2 后载量向降低、转阴、上升或不变等 3 个方向转归,且各项转归率,如阴性率(阳性率)于第 4 d 趋于稳定,而群体水平病毒载量于第 6 d 回升,并逐渐升高,可供相关研究参考。

【参考文献】

- [1] WHO. Global strategy for dengue prevention and control[R]. Geneva, 2012.
- [2] 范建华,胡挺松,张海林,等. 西双版纳州 2016 年登革 1 型和 2 型病毒疫情的流行病学调查[J]. 中国热带医学, 2017, 17(10): 982—7.
- [3] 王敏,杨丽莉,杨心怡,等. 广州市荔湾区 2012—2015 年登革热疫情流行病学分析[J]. 华南预防医学, 2017(5): 446—9.
- [4] 羊晶晶,陈敏红,王瀚,等. 福州市 2016 年登革热暴发疫情的流行特征分析[J]. 中国热带医学, 2017(8): 795—9.
- [5] 熊益权,陈清. 1978—2014 年我国登革热的流行病学分析[J]. 南方医科大学学报, 2014, 35(12): 1822—5.
- [6] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology (NY), 1993(11): 1026—30.
- [7] 苏建新,赵彤言. 登革病毒易感性相关的白纹伊蚊中肠特异性 microRNA 的鉴定、筛选与功能研究[D]. 军事医学科学院, 2014.
- [8] Kenney JL, Adams AP, Gorchakov R, et al. Genetic and anatomic determinants of enzootic Venezuelan equine encephalitis virus infection of *Culex (Melanoconion) taeniopus*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012(6): e1606.
- [9] Smith DR, Adams AP, Kenney JL, et al. Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck[J]. Virology, 2018(372): 176—86.
- [10] Hardy JL. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: Arboviruses: Epidemiology and Ecology, TP Monath[M]. CRC Press, 1988. 87—126.
- [11] Weaver SC. Vector biology in viral pathogenesis[J]. In: Viral Pathogenesis, N Nathanson, ed (New York: Lippincott-Raven), 1997. 329—52.
- [12] Weaver SC, Denison M, Roossinck M, et al. Virus evolution: current research and future direction [M]. Caister Academic Press, 2016. 73—74.
- [13] Romoser WS, Wasieleski LP, Pushko P, et al. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut[J]. J Med Entomol, 2004, 41: 467—75.
- [14] Kozak CA. The mouse " xenotropic " gammaretroviruses and their XPR1 receptor[J]. Retrovirology, 2010(7): 101.
- [15] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. Nat Rev Microbiol, 2010(8): 317—27.
- [16] Hornung V. SnapShot: Nucleic acid immune sensors, part 2 [J]. Immunity, 2014(41): 1066.
- [17] Hornung V. SnapShot: nucleic acid immune sensors, part 1[J]. Immunity, 2014(41): 868.
- [18] Clem RJ. Viral IAPs, then and now[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015(39): 72—9.
- [19] Smith DR, Carrara AS, Aguilar PV, et al. Evaluation of methods to assess transmission potential of Venezuelan equine encephalitis virus by mosquitoes and estimation of mosquito saliva titers [J]. Am J Trop Med Hyg, 2005(73): 33—9.
- [20] Vanlandingham DL, McGee CE, Klingler KA, et al. Short report: comparison of oral infectious dose of West Nile virus isolates representing three distinct genotypes in *Culex quinquefasciatus*[J]. Am J Trop Med Hyg, 2008(79): 951—4.
- [21] Kobylinski KC, Foy BD, Richardson JH. Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*[J]. Malar J, 2012(11): 381.

【收稿日期】 2018-04-15 【修回日期】 2018-06-16