

文章编号:1002-2694(2012)02-0108-03

温度对 DEN-2 型病毒在白纹伊蚊体内外潜伏期的影响^{*}肖方震¹, 张 仪², 谢汉国¹, 施文琦², 何 似¹, 邓艳琴¹, 周晓农², 严延生¹

摘 要:目的 研究温度对登革 2 型病毒在蚊体内的外潜伏期的影响。方法 登革 2 型病毒人工经口感染白纹伊蚊, 冻麻挑出吸饱血的雌蚊放入新的蚊笼, 分别置于 18℃、21℃、26℃、31℃ 和 36℃ 中饲养, 第 3 d、4 d、5 d、7 d、10 d、14 d、20 d、25 d 分别收集并解剖白纹伊蚊, 以间接免疫荧光法分别检测蚊虫头部、唾液腺和胸腹部的登革 2 型病毒抗原。结果 置于 18℃、21℃、26℃、31℃ 和 36℃ 饲养的白纹伊蚊分别在第 25 d、7 d、5 d、4 d、3 d 时胸腹部中开始检出阳性。21℃、26℃、31℃ 和 36℃ 饲养的蚊虫唾液腺阳性检出的时间分别为 10 d、7 d、4 d、4 d, 18℃ 在感染后的 25 d 内, 唾液腺均未检出阳性。结论 随着温度的升高, 登革 2 型病毒在白纹伊蚊体内外潜伏期逐渐缩短。

关键词:白纹伊蚊; 外潜伏期; 温度; 登革病毒

中图分类号: R384 文献标识码: A

Effect of temperatures on extrinsic incubation period
of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*XIAO Fang-zhen, ZHANG Yi, XIE Han-guo, SHI Wen-qi, HE si,
DENG Yan-qin, ZHOU Xiao-nong, YAN Yan-sheng

(Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: To investigate the effect of incubation temperature on extrinsic incubation period, *Aedes albopictus* were orally infected with dengue virus type 2 suspension, then fully blood-engorged mosquitoes were separated and transferred to new cartons and retained at 18℃, 21℃, 26℃, 31℃ and 36℃ with 10% sucrose. Mosquitoes were sacrificed on 3 d, 4 d, 5 d, 7 d, 10 d, 14, 20 d and 25 d post-infection. Immunofluorescence assays were used to detect antigen of dengue virus type 2 in the head, salivary gland and thorax-abdomen. Virus in thorax-abdomen was detected on 25 d, 7 d, 5 d, 4 d and 3 d post-infection. The extrinsic incubation period was 10 d, 7 d, 4 d and 4 d separately, when mosquitoes were maintained at 21℃, 26℃, 31℃ and 36℃. But virus in salivary was not detected during a 25-day incubation period when mosquitoes were retained at 18℃. It was suggested that the extrinsic incubation period of *A. albopictus* shortened gradually with the increase of extrinsic incubation temperature.

KEY WORDS: *Aedes albopictus*; extrinsic incubation period; temperature; dengue virus

登革热(DF)和登革出血热(DHF)主要流行于热带和亚热带地区, 近年来随着全球气候变暖, 该病的发病率不断上升, 流行区域不断扩大, 目前已经波及全球 100 多个国家和地区。成为全球重要的公共卫生问题之一^[1]。白纹伊蚊和埃及伊蚊是登革热的主要传播媒介, 近 30 年白纹伊蚊在全球分布范围显著扩大, 在一些地区甚至替代了埃及伊蚊, 成为登革

热最主要的传播媒介^[2]。白纹伊蚊是通过叮咬传播病毒, 病毒在传播给人之前需要在蚊体内经过一段时间的繁殖, 才具有传染性, 这段时间即外潜伏期, 外潜伏期的长短与温度密切相关。了解外潜伏期和温度的关系对于登革热的防制具有重要的流行病学意义。目前仅见少数关于温度对埃及伊蚊、致倦库蚊外潜伏期影响的研究^[4,7], 而对关于白纹伊蚊外潜伏期与温度的关系未见报告。特对不同温度条件下登革 2 型病毒在白纹伊蚊体内复制和繁殖进行检测, 现将结果报告如下。

^{*} 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2007BAC03A02), 国家科技重大专项项目(2008ZX10004-011)和福建省社会发展重点项目(2010Y0010)联合资助

通讯作者: 周晓农, Email: Xiaonongzhou1962@gmail.com;

严延生, Email: yysh@fjcdc.com.cn

作者单位: 1. 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001;

2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病防治研究所, 上海 200025

1 材料与方法

1.1 蚊种 蚊卵来自中国疾病预防控制中心寄生

虫病防治研究所。在温度(27±0.5)℃,相对湿度:70±5%,光照时间 L:D=12:12。幼虫饲以猪肝粉和酵母粉(1:3)、成蚊以 10%葡萄糖水饲养之。

1.2 病毒悬液制备 DEN-2 型病毒(New Guinea C 株)由本中心病毒科提供。33℃,5%CO₂培养箱培养,细胞病变至卅~+++++时收获病毒,反复冻融,离心吸取上清。取 2~4 d 龄小白鼠的乳鼠,颅内接种病毒上清 0.02 mL/只,腹腔接种 0.03 mL/只。放置于 ABSL-2 饲养。每 d 观察乳鼠的症状,4 d 后如果乳鼠出现典型的神经症状,将其解剖取出鼠脑。间接免疫荧光方法确定感染的鼠脑加入 3% 1640 营养液研磨制备成 10%的鼠脑病毒悬液。反复冻融,离心,吸取上清。病毒滴度 TCID₅₀ 为 10^{7.9}。

1.3 DEN-2 型病毒人工感染白纹伊蚊 新鲜豚鼠血、10%葡萄糖注射液、10%鼠脑病毒悬液等比例混和,用高压灭菌海绵浸透,置于平皿中,放入蚊笼。供饥饿 24 h 4~6 d 龄的白纹伊蚊吸食 30 min。冻麻将吸饱血的雌蚊随机挑出分别放入干净的蚊笼。蚊笼放入智能编程人工气候箱。温度分别为(18±0.5)℃、(21±0.5)℃、(26±0.5)℃、(31±0.5)℃、

(36±0.5)℃,相对湿度为(75±5)%,光照时间 L:D=12:12。同时设置阴性对照(吸食新鲜豚鼠血、10%葡萄糖注射液、10%正常鼠脑悬液等比例混合液),放(置于 26±0.5)℃。

1.4 间接免疫荧光法检测白纹伊蚊病毒感染情况 白纹伊蚊冻死后,取蚊虫的头部、唾液腺以及胸腹部,盖玻片轻压涂匀。自然风干,4℃丙酮固定 12 min。风干后加 1:100 的小鼠抗 DEN-2 型病毒单抗(Chemicon),置于湿盒,放入 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗,双蒸水震荡,吹干。加 1:100 的 FITC-羊抗鼠 IgG(Gaithersburg)置于湿盒,放入 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗,双蒸水震荡,吹干。滴 9:1 甘油,荧光显微镜(OLYMPUS)下观察。

2 结 果

含豚鼠血的病毒悬液在蚊体内完全消化需要 2 d 左右的时间,因此未收集感染后 2 d 内蚊虫。而在感染后第 3、4、5、7、10、14、20、25 d 对一定量的白纹伊蚊的头部、唾液腺和胸腹部分别做间接免疫荧光,结果见表 1。

表 1 不同温度登革 2 型病毒在白纹伊蚊头部、唾液腺和胸腹部检测结果

Tab. 1 Dengue virus type 2 in head, salivary gland and thorax-abdomen of *Aedes albopictus* at different temperatures

感染后 d 数	部位	18℃	21℃	26℃	31℃	36℃	合计
3	头部	0/5	0/5	0/10	0/5	0/5	0/30
	唾液腺	0/5	0/5	0/10	0/5	0/5	0/30
	胸腹部	0/5	0/5	0/10	0/5	1/5	1/30
4	头部	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	2/25
	唾液腺	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	2/25
	胸腹部	0/5	0/5	0/5	3/5	3/5	6/25
5	头部	0/10	0/10	0/5	1/5	0/5	1/35
	唾液腺	0/10	0/10	0/5	1/5	1/5	2/35
	胸腹部	0/10	0/10	5/5	4/5	2/5	11/35
7	头部	0/10	0/10	2/5	3/5	2/5	7/35
	唾液腺	0/10	0/10	2/5	3/5	3/5	8/35
	胸腹部	0/10	2/10	3/5	3/5	3/5	11/35
10	头部	0/10	1/10	3/5	3/5	2/5	9/35
	唾液腺	0/10	1/10	3/5	3/5	2/5	9/35
	胸腹部	0/10	3/10	3/5	5/5	2/5	13/35
14	头部	0/10	2/10	3/5	3/5	3/7	11/37
	唾液腺	0/10	3/10	3/5	3/5	3/7	12/37
	胸腹部	0/10	4/10	3/5	4/5	3/7	14/37
20	头部	0/10	3/10				
	唾液腺	0/10	4/10				
	胸腹部	0/10	6/10				
25	头部	0/10	1/5				
	唾液腺	0/10	1/5				
	胸腹部	1/10	3/5				

2.1 不同时间胸腹部感染率 置于18℃饲养的蚊虫,感染后25d胸腹部才检及阳性,阳性率仅10%。随着温度的升高,胸腹部开始出现阳性的时间逐渐缩短,置于21℃、26℃、31℃、36℃的蚊虫分别在第7、5、4、3d胸腹部开始出现阳性。以合计来看,随着感染后d数的增加,蚊虫胸腹部的阳性率逐渐升高。由3d的3.33%增加到14d的37.84%,见图1。

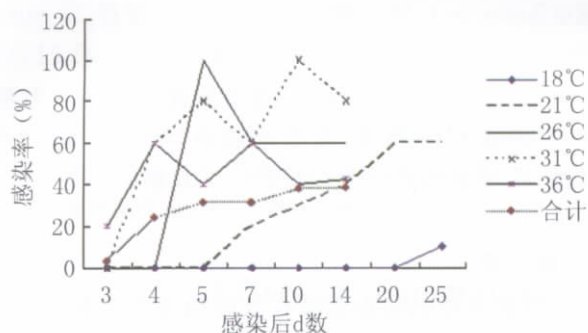


图1 白纹伊蚊不同时间胸腹部感染率

Fig. 1 The infection rate on thorax-abdomen of *A. albopictus* at different times

2.2 不同时间唾液腺感染率 18℃饲养的蚊虫,感染后25d内唾液腺均未检及阳性,但21℃饲养的蚊虫第10d唾液腺即开始出现阳性,14d、20d感染率分别为30%、40%,第25d出现下降,感染率为20%。而在26℃、31℃、36℃饲养的蚊虫唾液腺阳性检出的时间分别为7d、4d和4d。26℃饲养的蚊虫唾液腺感染率在第14d阳性率为60%。31℃、36℃饲养的蚊虫随着时间的延长唾液腺感染率逐渐升高,14d最高。合计显示,除第5d略呈下降外,3~14d随着时间的延长,唾液腺的阳性率逐渐升高,见图2。

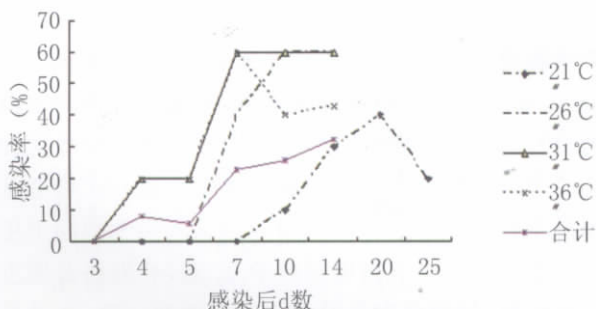


图2 白纹伊蚊不同时间唾液腺感染率

Fig. 2 The infection rates of thorax-abdomen of *A. albopictus* at different times

3 讨论

温度不仅影响蚊虫生殖营养周期的长度、叮咬率、死亡率等,而且影响病毒在蚊体内的复制传播。

温度升高时,病毒在蚊体内的复制加快,蚊体检出阳性时间逐渐缩短。18℃时25d胸腹部才检出阳性,而21℃、26℃、31℃、36℃则分别在7、5、4d出现阳性,36℃时3d即检及阳性。

蚊虫吸入病毒后,病毒需经过中肠再到血淋巴,然后才进入唾液腺。研究表明蚊虫唾液腺感染上登革病毒即使范围<25%蚊虫亦能传播病毒^[3]。温度是影响蚊虫外潜伏期的重要因素之一。Watts, DW等以埃及伊蚊为媒介,在饲养温度为32~35℃时,埃及伊蚊的外潜伏期为7d,饲养温度低于30℃时,外潜伏期为12d^[4]。Salazar等认为埃及伊蚊的外潜伏期短于先前的预期,3d唾液腺即开始出现阳性^[5]。目前国内外尚无白纹伊蚊的外潜伏期研究的报告。本试验采用相同的蚊种、饲养条件、感染方式以及同一病毒滴度,尽可能平衡实验因素和其他潜在因素干扰。结果显示18℃环境,感染后25d蚊虫的唾液腺中仍未检及阳性,而21℃、26℃、31℃、36℃检出唾液腺阳性d数分别为10d、7d、4d、4d。表明随着温度的升高,白纹伊蚊的外潜伏期逐渐缩短。这与其他媒传病毒的现象一致^[4,7]。外潜伏期的长短在登革热的防治中具有重要的流行病学意义。白纹伊蚊在一个生殖营养周期内可以吸取2~3次的血^[6],在相同的生殖营养周期内,更短的外潜伏期使得白纹伊蚊可能叮咬更多的宿主,从而加快传播周期,使病毒传播更快。这在目前全球气候变暖的大环境下,需要制定更加有效和完备的方案来防控登革热的疫情。

参考文献:

- [1] Castleberry, Mahon CR. Dengue fever in the Western Hemisphere[J]. Clin Lab Sci, 2003, 16: 34-38.
- [2] WHO[OL]. 2008http: www. who. int/mediacentre/factsheets/fs117/en/.
- [3] Gubler DJ, Rosen LA. Simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts[J]. Am J Trop Med Hyg, 1976, 25(1): 146-50.
- [4] Watts D M, Burke D S, Harrison B A, et al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus[J]. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36(1): 143-152.
- [5] Salazar MI, Richardson JH, Sanchez-Vargas I, et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. BMC Microbiol, 2007, 30(7): 9.
- [6] Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, et al. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean[J]. J Med Entomol, 2009, 46(1): 33-41.
- [7] Dohm DJ, O'Guinn ML, Turell MJ. Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus[J]. J Med Entomol, 2002, 39(1): 221-225.

收稿日期: 2011-10-11; 修回日期: 2011-11-23