

基于沃尔巴克氏体的蚊媒和蚊媒病控制的生物安全性

郑小英¹, 刘起勇^{2,3}, 奚志勇^{1,4}

1 中山大学-密歇根州立大学热带病虫媒控制联合研究中心, 中山大学热带病研究教育部重点实验室, 广东 广州 510080;

2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室; 3 世界卫生组织媒介生物监测

与管理合作中心; 4 美国密歇根州立大学微生物学和分子遗传学系

摘要: 沃尔巴克氏体是非脊椎动物胞内专性寄生、可经卵传递的胞内革兰阴性共生菌。用沃尔巴克氏体控制蚊媒及蚊媒病的原理是基于其所诱导的胞质不相容性和对病原体的抗性。沃尔巴克氏体对蚊媒病原体具有广泛抗性, 其直径大于蚊虫唾液腺管直径, 不能通过蚊虫叮咬感染人体或哺乳动物; 反复受到沃尔巴克氏体感染蚊虫叮咬的人血中未检测到抗沃尔巴克氏体抗体。沃尔巴克氏体仅在宿主细胞内生存, 不能在培养基内和环境中独立生长; 它不产生孢子, 不含质粒, 不随宿主死亡而分解扩散至环境; 它不会横向传播至生活在同一生境中的其他节肢动物。捕食沃尔巴克氏体感染的蚊幼虫和成虫的节肢动物不能通过捕食而获得感染; 基于沃尔巴克氏体的蚊媒和蚊媒病控制所产生的生物安全风险几乎可以忽略。

关键词: 沃尔巴克氏体; 种群压制; 种群替换; 生物安全

中图分类号: R386; R384.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2014)02-0093-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.02.001

The biosafety concerns of *Wolbachia*-mediated biological control of mosquitoes and mosquito-borne diseases

ZHENG Xiao-ying¹, LIU Qi-yong^{2,3}, XI Zhi-yong^{1,4}

1 SunYat-sen University-Michigan State University Joint Center of Vector Control for Tropical Diseases, Key Laboratory for Tropical

Disease Control, Ministry of Education, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; 2 State Key Laboratory for Infectious

Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center

for Disease Control and Prevention; 3 WHO Collaborating Center for Vector Surveillance and Management;

4 Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University

Abstract: *Wolbachia*, a maternally transmitted obligate endosymbiotic gram - negative bacteria, is widely distributed in invertebrates. The *Wolbachia*-mediated biological control of mosquito and mosquito-borne diseases is based on the nature that *Wolbachia* induces cytoplasmic incompatibility, and reduces the vector competence of its host species. *Wolbachia* induced pathogen inhibition in mosquito is broad-spectrum, its size is larger than mosquito's salivary gland duct so it is impossible to be transmitted to humans or mammals through mosquito bitin. Antibodies against *Wolbachia* have never been detected in blood of humans who are repeatedly bitten by mosquitoes which are infected with *Wolbachia*. *Wolbachia* cannot produce spores and does not contain plasmid, it will not disseminate to the environment when its host dies. *Wolbachia* cannot be horizontally transmitted from one invertebrate host to another that lives in the same environment. Invertebrate predators that feed on *Wolbachia*-infected mosquito larvae or adults do not get infected. The biological risks of *Wolbachia*-mediated biological control of mosquito and mosquito-borne diseases are negligible.

Key words: *Wolbachia*; Population suppression; Population replacement; Biosafety

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)是无脊椎动物胞内专性寄生的、可经卵传递的革兰阴性共生菌^[1]。它在自然界节肢动物体内广泛存在, 据研究估计约 65% 的昆虫种类和 28% 的蚊虫种类天然携带沃尔巴克氏体^[2-3]。应用沃尔巴克氏体控制蚊媒是近年出现的蚊虫控制新

作者简介: 郑小英, 女, 副教授, 从事沃尔巴克氏体控制蚊媒和蚊媒病研究工作。Email: zhengxy@mail.sysu.edu.cn

策略。与杀虫剂控制蚊媒的方法相比, 沃尔巴克氏体为基础的蚊媒控制方法环保、成本低。沃尔巴克氏体诱导胞质不亲和(Cytoplasmic incompatibility, CI), 作为工具用于库蚊的控制最早是在 1967 年^[4]。近年来, 随着沃尔巴克氏体蚊种间转移技术的成功, 以沃尔巴克氏体为基础的蚊媒及蚊媒病控制策略成为应用研究的热点。

应用昆虫共生菌沃尔巴克氏体进行虫媒及虫媒病控制主要是基于其所诱导的 CI 和对病原体的抗性。胞质不相容性是沃尔巴克氏体影响昆虫生殖的一种表型,即当携带沃尔巴克氏体的雄虫与不携带的或者携带不同沃尔巴克氏体型别的雌虫交配,雌虫产的卵将不会孵化^[5-6]。该特性使得可以通过连续释放携菌雄蚊以引起胞质不相容性的交配而获得在释放现场的种群压制甚至种群根除的效果^[6-7],或者释放携菌雌蚊再通过胞质不相容性所赋予其的生殖优势而将沃尔巴克氏体扩散到整个群体以达到种群替换^[8-9]。由于沃尔巴克氏体可以引起蚊媒对其通常所传播的人类病原体(如登革热病毒、流行性乙型脑炎病毒和疟原虫)的抗性,将携带沃尔巴克氏体且对病原体有抗性的蚊虫释放到自然界的蚊虫种群中,从而替换自然界中可传播病原体的蚊虫,以达到阻断蚊媒在人群中传播蚊媒病的作用。无论是种群替换或种群压制技术用于蚊媒病的防治,都是通过释放携带沃尔巴克氏体的雄蚊或雌蚊实现的。本文就释放携带沃尔巴克氏体蚊虫来控制蚊虫和蚊媒病可能所产生的生物安全性问题进行了分析。

1 *Wolbachia* 为基础的蚊媒和蚊媒病控制的生物技术安全性

基于沃尔巴克氏体的蚊媒病防治策略主要通过种群压制和种群替换 2 种方式来实现。种群压制是通过释放感染沃尔巴克氏体雄蚊,诱导宿主产生胞质不相容性的特点实现的。种群压制在缅甸已有成功案例,Laven^[4]通过持续释放从异地引入感染的与本地种群不同沃尔巴克氏体型别的致倦库蚊(*Culex pipiens quinquefasciatus*)雄蚊,诱导本地致倦库蚊种群中产生 CI,使得本地致倦库蚊种群在 12 周内于该地彻底根除。

Wolbachia 感染雌蚊无论与感染或非感染的雄蚊交配都能产出下一代。释放雌蚊可以发生种群替换。研究证实沃尔巴克氏体可以使蚊媒对多种人类病原体(如登革热病毒、基孔肯雅病毒、黄病毒和疟原虫等)产生抗性^[10-16]。因此,释放携带抗病原体特性的沃尔巴克氏体雌蚊至目标种群,可以将原有传病的蚊虫种群替换,以达到阻止蚊媒病传播的效果。如雌蚊携带抗登革热病毒的沃尔巴克氏体,可以将对登革热病毒的抗性扩散到整个蚊群中,使得蚊虫失去传播登革热病毒的能力,从而达到阻断登革热流行的目的。利用蚊虫种群替换防治登革热病毒的研究已在澳大利亚 2 个现场试点取得突破性进展。2011 年在澳大利亚 Yorkeys Knob 和 Gordonvale 释放携带沃尔巴克氏体的抗登革热病毒埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的田间试验,在

Yorkeys Knob, 释放 3 个月后沃尔巴克氏体 100% 扩散到所有的埃及伊蚊种群;在 Gordonvale, 释放 4 个月后沃尔巴克氏体也扩散到 90% 的当地埃及伊蚊种群中。

无论是采用种群压制还是种群替代,都需要建立感染沃尔巴克氏体或者导入新品系沃尔巴克氏体的蚊株。而目前建立沃尔巴克氏体感染蚊株的方法是采用显微注射^[8]。供体为原本广泛存在于自然界的沃尔巴克氏体,并非转基因产物。因而不会使环境中的生物类群发生改变。

研究证实沃尔巴克氏体可以使蚊媒对多种人类病原体(如登革热病毒、黄病毒和疟原虫等)产生抗性。沃尔巴克氏体对蚊虫体内的多种病原体有抑制作用,不会因为控制了一种疾病而导致增加对另一种病原体的易感性。

2 *Wolbachia* 对人和脊椎动物安全性的影响

释放感染了沃尔巴克氏体的蚊虫至目标区域以达到控制蚊媒种群数量和阻断蚊媒病传播的目的,释放蚊虫是否会对人类、动物或环境及生态系统造成不利的因素,这是必须要考虑的问题。

释放携带沃尔巴克氏体雌蚊到人或动物居住环境中替代传病蚊虫,势必会引起新的叮咬。沃尔巴克氏体是否可以通过叮咬而感染人或动物,从而产生不良影响。沃尔巴克氏体是一种严格的细胞内共生菌,自然界节肢动物广泛感染,包括一些蚊虫,如淡色库蚊(*Cx. pipiens pallens*)、骚扰库蚊(*Cx. pipiens molestus*)和白纹伊蚊(*Ae. albopictus*)等自然携带沃尔巴克氏体,人类和脊椎动物早已接触携带沃尔巴克氏体蚊虫的叮咬,但未见沃尔巴克氏体引起损伤的报告。将感染沃尔巴克氏体的黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)卵巢研磨后注射到鸡胚和幼鼠的胸腔及大脑,均未发现由沃尔巴克氏体引起的症状和死亡^[17]。沃尔巴克氏体本身的生物学特征也决定了沃尔巴克氏体不能通过蚊虫叮咬进入人或动物体内。电镜观察结果表面,沃尔巴克氏体 ϕ 1~2 μm , 而蚊虫的唾液腺导管 ϕ < 1 μm ;用 PCR 方法检测蚊虫唾液和唾液腺沃尔巴克氏体 DNA,发现其存在于蚊虫唾液腺中,但唾液中未检测到沃尔巴克氏体的 DNA^[11]。这些研究说明沃尔巴克氏体不能进入到蚊虫的唾液,即使雌蚊的唾液腺中含有沃尔巴克氏体,也不能通过蚊吸血的方式进入人体。

为了解沃尔巴克氏体是否会进入人体血液,用实验室饲养的携带沃尔巴克氏体的蚊虫叮咬志愿者,志愿者在 4 年时间反复接受沃尔巴克氏体感染蚊虫的叮咬。然后用免疫印迹法对志愿者血清进行抗蚊虫唾液和抗沃尔巴克氏体抗体的检测。结果显示,志愿者长

期被携带沃尔巴克氏体的蚊虫叮咬后,对蚊虫唾液有效成分产生抗体,但血清中未检测到抗沃尔巴克氏体的抗体。这些研究说明沃尔巴克氏体不能进入到蚊虫的唾液,通过蚊虫吸血的方式进入人体^[11]。目前没有任何证据表明携带沃尔巴克氏体的昆虫对人或脊椎动物有害,也未发现人类被携带沃尔巴克氏体的昆虫叮咬后出现任何不良反应。研究表明,释放携带沃尔巴克氏体的雌蚊或雄蚊控制蚊媒和蚊媒病,对人类和脊椎动物的直接危害是可以忽略的。

3 *Wolbachia* 对无脊椎动物安全性的影响

3.1 蚊虫横向传播沃尔巴克氏体至环境非捕食性昆虫的可能性 携带沃尔巴克氏体的蚊虫释放至目标环境后,是否会通过水平传播影响环境或者生物链。首先,同一种蚊虫种群传播沃尔巴克氏体,是必须通过母系垂直传播。沃尔巴克氏体在一个蚊虫种群中扩散,是通过诱导 CI 的产生和母系垂直传播实现的,雌蚊和雄蚊不能通过交配传递沃尔巴克氏体,同一种群之间无横向传播。

为确定沃尔巴克氏体能否从感染蚊虫横向传递至与它们共同环境中的非天敌动物,在全封闭的户外温室式蚊虫实验室培养感染沃尔巴克氏体的蚊虫数月,采集环境中蚯蚓、马陆等节肢动物样本,PCR 检测沃尔巴克氏体 DNA。结果表明样本中未检测到沃尔巴克氏体的 DNA。说明沃尔巴克氏体从感染的蚊虫散布到环境中的可能性极低。沃尔巴克氏体可以在实验室通过显微注射进行中间转染^[8],但这并不意味着 *Wolbachia* 菌能够水平传播感染其他物种,或者说水平传播在自然界中是一种非常低的概率事件。

3.2 蚊虫横向传播 *Wolbachia* 至环境捕食性昆虫的可能性 在自然界中,蚊幼虫或成虫可以作为很多种节肢动物的食物,通过捕食携带 *Wolbachia* 的蚊虫是否有横向传播? 为确定沃尔巴克氏体能否从感染蚊虫横向传递至吞吃蚊幼虫的捕食动物,澳大利亚医学研究院(QIMR)和越南国立卫生疫学研究所(NIHE)分别在 4 d 内给 200 只剑水蚤(*Mesocyclops*)喂食感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊幼虫。每只剑水蚤喂食超过 10 只刚孵出的埃及伊蚊幼虫,将其转移到干净容器 4 d,使其肠道内容物全部排出后进行 DNA 提取和 PCR 检测。检测结果均呈阴性^[18]。同样在 2 d 时间内给 37 条孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)喂食感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊幼虫。每条孔雀鱼喂食 50 只幼虫后将其转移到干净容器 36 h,让其排清肠道内容物后进行 DNA 提取和 PCR 检测。此外在 5 d 内给 40 条蓝眼燕子(灯鱼)(*Pseudomugil signifer*)喂食感染沃尔巴克氏体的埃及

伊蚊幼虫。当每条孔雀鱼喂食 100 只幼虫,将其转移到干净容器 3 d,让其排清肠内容物后进行 DNA 提取和 PCR 筛查。结果发现 37 条孔雀鱼(35 条存活)和 40 条蓝燕子(38 条存活)均为阴性^[18-19]。说明捕食蚊幼虫的昆虫不会通过吞食感染 *Wolbachia* 的蚊幼虫而获得感染。

为确定沃尔巴克氏体能否从感染蚊虫横向传递至吞吃成蚊的捕食动物,在 4 周时间内给 80 只双带扁蝇虎蜘蛛(跳蜘蛛)(*Menemerus bivittatus*)喂食感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊成蚊(每周每只蜘蛛吃 10 只蚊虫)。在随后的 2 周内喂食未感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊,以确保其肠内未消化的感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊全部排出。最后将蜘蛛冷冻死亡进行 DNA 提取及 PCR 检测;结果在存活的 76 只扁蝇虎蜘蛛中均未检测到沃尔巴克氏体。将 20 只长腿蜘蛛(*Pholcus phalangioides*)放在 5 个笼内(30 cm×30 cm×30 cm)。每笼放置雄蜘蛛及至少 1 只雌蜘蛛,以使它们在观察期间也能进行繁殖。由于笼中的蜘蛛种群数量急剧增长,在 16 周内每周给每个笼喂食 1600 只感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊成蚊。在随后的 3 周内给予它们喂食未感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊成蚊,以确保其肠内未消化的感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊全部排出。实验观察获得 412 只蜘蛛以及雌蜘蛛内的 28 个卵囊,蜘蛛冷冻死亡后进行 DNA 提取及 PCR 检测,在 2 只蜘蛛中检测到 *Wolbachia* 阳性,其体内仍还有未被消化的受感染的蚊虫^[20]。试验结果表明蚊虫天敌因捕食蚊虫而获得沃尔巴克氏体感染的可能性极低。

4 *Wolbachia* 在环境中的扩散

以释放携带沃尔巴克氏体蚊虫为实施手段的蚊媒和蚊媒病控制技术,蚊虫携带的沃尔巴克氏体是否会扩散到周围环境中,也是该方法实施之前应考虑到的问题。首先,沃尔巴克氏体是昆虫、蜘蛛、螨、陆地甲壳类动物以及线虫的专性共生菌;只能在宿主细胞内生存,不能在培养基内独立生长,离开昆虫宿主,不能在环境中存活;不能产生孢子,也不含有质粒,离开宿主后自然死亡、分解,不会在周围环境中残留。研究发现,当宿主死亡时,沃尔巴克氏体和宿主尸体一起降解;对宿主尸体周围的植物叶子、根茎和土壤进行检测,均未发现沃尔巴克氏体的体外寄生存在^[17]。自然界中每天均有大量感染沃尔巴克氏体的昆虫死去,但周围环境中并无发现沃尔巴克氏体独立存在。说明沃尔巴克氏体从感染的蚊虫散布到环境的可能性极低。

Murphy 等^[21]在澳洲对释放感染沃尔巴克氏体的

埃及伊蚊控制登革热田间试验进行了全面的风险分析。从对人类、环境、经济方面包括 30 大类评估释放计划可能造成的不良后果。风险分析表明,在环境中释放携带沃尔巴克氏体蚊虫带来的风险危害是微乎其微的。

5 结 语

一些沃尔巴克氏体感染宿主可以缩短媒介蚊虫的寿命,通过在宿主体内诱导细胞质不相容性而快速侵入宿主种群,特别是它对蚊虫体内感染的多种病原体有抑制作用,因而目前以沃尔巴克氏体为基础的新型、环保、高效的蚊媒和蚊媒病控制策略已成为全球研究的热点。在一些地区田间开展释放沃尔巴克氏体感染的蚊虫试验,将为进一步在虫媒病疫区应用提供技术和理论基础。开展田间试验的同时,关注释放沃尔巴克氏体感染蚊虫的遗传特性和对环境的风险。沃尔巴克氏体为基础的蚊媒和蚊媒病控制策略,除了控制如登革热、基孔肯雅热等病毒性疾病外,更重要的将应用于疟疾的控制,目前已将 wAlbB 品系的沃尔巴克氏体成功导入疟疾的重要媒介斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*)^[16],并建立稳定的携带沃尔巴克氏体的斯氏按蚊种群,为建立以沃尔巴克氏体为基础的疟疾控制建立了基础。

参考文献

- [1] Pfarr K, Foster J, Slatko B, et al. On the taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*: should this species name include the intracellular bacteria of filarial nematodes? [J]. *Internat J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(Pt 8): 1677–1678.
- [2] Kittayapong PK, Baisley J, Baimai V, et al. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae) [J]. *J Med Entomol*, 2000, 37(3): 340–345.
- [3] Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*? — A statistical analysis of current data [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 281(2): 215–220.
- [4] Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility [J]. *Nature*, 1967, 216(28): 383–384.
- [5] Dobson SL. Reversing *Wolbachia*-based population replacement [J]. *Trends Parasitol*, 2003, 19(3): 128–133.
- [6] Sinkins SP. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(7): 723–729.
- [7] O'Connor L, Plichart C, Sang AC, et al. Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(11): e1797.
- [8] Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population [J]. *Science*, 2005, 310(5746): 326–328.
- [9] Hoffmann A, Montgomery A, Popovici J, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission [J]. *Nature*, 2011, 476(7361): 454–457.
- [10] Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, et al. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes [J]. *Science*, 2009, 326(5949): 134–136.
- [11] Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium* [J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1268–1278.
- [12] Bian GY, Xu P, Lu YX, et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti* [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4): e1000833.
- [13] Walker TP, Johnson H, Moreira LA, et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations [J]. *Nature*, 2011, 476(7361): 450–453.
- [14] Lu P, Bian G, Pan X, et al. *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(7): e1754.
- [15] Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, et al. The Native *Wolbachia* symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(12): e1989.
- [16] Bian G, Joshi D, Dong Y, et al. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium infection* [J]. *Science*, 2013, 340(6133): 748–751.
- [17] Popovici J, Moreira LA, Poinsignon AI, et al. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia* - based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, 105(8): 957–964.
- [18] Huigens ME, de Almeida RP, Boons PA, et al. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps [J]. *Proc Royal Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 271(1538): 509–515.
- [19] Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, et al. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(6): 313–316.
- [20] Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA. *Wolbachia pipientis* in *Australian spiders* [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 49(3): 208–214.
- [21] Murphy B, Jansen C, Murray J, et al. Risk analysis on the Australian release of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) containing *Wolbachia* [R]. Australian: CSIRO Report, 2010: 1–94.

收稿日期: 2014-03-11