



陈方维, 郑亚鑫, 董子榕, 王冰洁, 王健瑜, 陈倩, 关兴艾, 缪娟娟, 黄彬, 王佳璐, 赵俊龙, 贺兰. 长角血蜱成蜱的毛细管和生物膜2种人工饲喂技术的建立与初步应用[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(11):131-140.

CHEN Fangwei, ZHENG Yaxin, DONG Zirong, WANG Bingjie, WANG Jianyu, CHEN Qian, GUAN Xingai, MIAO Juanjuan, HUANG Bin, WANG Jialu, ZHAO Junlong, HE Lan. Establishment and preliminary application of capillary-tube technique and membrane-based feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(11):131-140.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.11.14

长角血蜱成蜱的毛细管和生物膜2种人工饲喂技术的建立与初步应用

陈方维 郑亚鑫 董子榕 王冰洁 王健瑜 陈倩 关兴艾 缪娟娟 黄彬
王佳璐 赵俊龙 贺兰*

(华中农业大学 动物科学技术学院、动物医学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 为开发硬蜱人工感染技术以便于探索其与病原体之间的共生机制及传播机制, 本研究将长角血蜱成蜱分为3组, 分别为经毛细管饲喂后叮咬小鼠、小鼠体表叮咬后进行生物膜饲喂和小鼠体表叮咬至饱血3种方式, 其中小鼠体表叮咬至饱血为对照组。对饱血蜱体重、孕卵期和产卵量, 以及3种饱血方式下蜱的存活率、饱血率和产卵率进行分析, 最终建立了针对长角血蜱成蜱的毛细管饲喂和生物膜饲喂技术。同时, 通过该技术为长角血蜱饲喂吉氏巴贝斯虫, 完成了两种长角血蜱饲喂方式在吉氏巴贝斯虫蜱传性评价的初步应用。结果表明: 1) 毛细管饲喂后接小鼠体表叮咬的饱血方式在饱血成蜱体重、孕卵期和产卵重量3个指标上与对照组相比差异不显著($P>0.05$), 但在饱血率上低于小鼠生物膜饲喂和小鼠饲喂两种饱血方式。2) 生物膜饲喂在产卵率和产卵重量方面略逊于对照组($P<0.05$), 但是在成蜱饱血后体重和孕卵期上与对照组相比差异不显著($P>0.05$), 饲喂成活率也与对照组一致。3) 吉氏巴贝斯虫在长角血蜱成蜱吸血初期和后期均能够入侵卵巢并进入子代虫卵内。综上, 本研究建立了长角血蜱毛细管和小鼠生物膜2种饲喂方式, 并初步应用于吉氏巴贝斯虫的蜱传性研究。2种人工饲喂方式为探索蜱传病原体与媒介蜱的互作关系, 开发杀蜱疫苗和药物筛选提供了技术平台。

关键词 长角血蜱; 人工饲喂; 蜱传病; 吉氏巴贝斯虫

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2024)11-0131-10

文献标志码 A

Establishment and preliminary application of capillary-tube technique and membrane-based feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*

CHEN Fangwei, ZHENG Yaxin, DONG Zirong, WANG Bingjie, WANG Jianyu, CHEN Qian, GUAN Xingai, MIAO Juanjuan, HUANG Bin, WANG Jialu, ZHAO Junlong, HE Lan*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology /College of Animal Science and Technology, College of Animal Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract In order to develop the artificial infection technology of ticks to explore the symbiotic mechanism and transmission mechanism between ticks and pathogens, taking *Haemaphysalis longicornis* as an example, the adult ticks were divided into three groups: feeding mice through capillary tubes, feeding mice

收稿日期: 2024-03-31

基金项目: 十四五国家重点研发计划青年科学家项目(2022YFD1801700)

第一作者: 陈方维(ORCID:0009-0007-5244-7188), 博士研究生, E-mail: chenfw@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 贺兰(ORCID:0000-0002-5453-4425), 教授, 主要从事人兽共患寄生虫病研究, E-mail: helan@mail.hzau.edu.cn

with biofilms after body surface bites, and biting mice until sucking enough blood. The control group was mice bitten until sucking enough blood. The weight, gestation period and fecundity of engorged ticks were statistically analyzed. And the survival rate, blood-saturation rate and egg-laying rate of ticks under the three methods were compared. Finally, the capillary-tube feeding and the biological skin membrane-based feeding techniques for adult ticks were established. At the same time, the preliminary application of two feeding methods of ticks in the evaluation of tick-borne of *Babesia gibsoni* has been completed. The results showed that: 1) There was no significant difference in the body weight, gestation period and egg-laying weight of engorged ticks after capillary-tube feeding followed by mouse surface bites compared with the ticks in control group ($P>0.05$), but the full blood rate was lower than that of the biological skin membrane-based feeding and mouse feeding groups. 2) The biological skin membrane-based feeding group was slightly inferior to the control group in terms of egg-laying rate and egg-laying weight ($P<0.05$), but there was no significant difference in the body weight and gestation period compared with the control group ($P>0.05$), the feeding survival rate was also consistent with that of the control group. 3) *B. gibsoni* could invade the ovary and enter the offspring eggs in the early and late stages of blood-sucking of adult ticks. In summary, this study established two feeding methods for long horned tick capillaries and mouse biofilms, and preliminarily applied them to the study of tick-transmission of *B. gibsoni*. The two artificial feeding methods provide a technical platform for exploring the interaction between tick-borne pathogens and vector ticks. It also provides a technical platform for the development of tick-killing vaccine and drug screening.

Keywords *Haemaphysalis longicornis*; artificial feeding technique; tick-borne disease; *Babesia gibsoni*

硬蜱是蛛形纲(Arachnoidea)蜱目(Ixodida)下一类寄生于脊椎动物、专性吸血的外寄生虫,广泛分布于世界各地^[1]。硬蜱通过哈氏器感受气味变化^[2],发现并爬行至宿主体表,进行持续几天的吸血过程。硬蜱的吸血过程可以分为吸血准备、缓慢吸血、快速饱血和饱血后4个阶段^[3]。除了吸食血液造成损伤和引发炎症外,蜱也可作为细菌、病毒、立克次体和原虫等病原体传播媒介^[4],对人类和动物的健康构成严重威胁。由于实验动物饲喂蜱成本较高、流程繁琐,通过浸入病原体培养物、显微注射或体外饲喂病原体的方式使蜱感染特定病原体具有更广泛的应用前景^[5]。其中体外饲喂主要有毛细管饲喂、动物源性膜饲喂和人工膜饲喂,是研究蜱与该病原相互作用机制和评价媒介蜱传播能力的重要途径。早在1950年就有针对盾陷璃眼蜱(*Hyalomma excavatum*)、嗜驼璃眼蜱(*H. dromedarii*)、网纹革蜱(*Dermacentor reticulatus*)和血红扇头蜱(*Rhipicephalus sanguineus*)的毛细管饲喂报道^[6];随后在硬蜱属(*Ixodes*)、花蜱属(*Amblyomma*)、革蜱属(*Dermacentor*)和扇头蜱属(*Rhipicephalus*)也有相关报道^[7-8],但由于蜱的口器小且易遭毛细管破坏,一直未得到广泛的运用。各类膜饲喂包括使用动物源性膜和人工膜。人工膜以各类硅膜为主,目前已报道的有在希伯来花蜱

(*A. hebraeum*)^[9]、安氏革蜱(*D. andersoni*)^[10]、篦子硬蜱(*I. ricinus*)^[11]、肩突硬蜱(*I. scapularis*)^[12-13]、嗜驼璃眼蜱和小亚璃眼蜱(*Ha. anatolicum*)^[14]上成功应用,其中希伯来花蜱、篦子硬蜱和肩突硬蜱可在硅酮浸渍膜饲喂系统上完成完整生命周期。动物源性膜主要使用动物皮肤如小鼠皮肤,适用于各类蜱尤其是因口下板较短、须肢运动有限、主动叮咬能力不强,而不适用于硅膜饲喂的硬蜱^[15]。

长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)是一种常见的血蜱属(*Haemaphysalis*)三宿主蜱,在国内大部分地区均有分布,可寄生于牛、马、绵羊、山羊、犬、猪等多种动物,也可侵袭人^[1],是吉氏巴贝斯虫(*Babesia gibsoni*)的重要传播媒介^[16]。长角血蜱包括两性生殖和孤雌生殖2种生殖种群^[17],其孤雌生殖方式为建立遗传稳定的种群提供便利。由于长角血蜱假头宽短,自主叮咬能力弱^[1],目前人工饲喂技术基本局限于使用脱纤维血经生物膜饲喂快速吸血期成蜱至饱血。这对人工饲喂时替换血液组分和研究长角血蜱不同吸血阶段与病原体互作关系带来了不便。本研究以孤雌生殖的长角血蜱种群为研究对象,建立人工配制血液的小鼠生物膜饲喂和毛细管饲喂的体外人工饲喂技术,通过将饱血后蜱的体重、孕卵期和产卵量,以及人工饲喂存活率、饱血率和产卵率等评价指标与经动物饲喂的对

照组进行比较,成功建立了长角血蜱成蜱小鼠生物膜饲喂和毛细管饲喂 2 种人工饲喂技术,并初步应用于巴贝斯虫蜱传性评价。该技术将为研究长角血蜱与蜱传病原体之间的共生关系与相互作用机制奠定基础,同时也为后续开发杀蜱药物和疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 长角血蜱

本研究所用长角血蜱为四川苍溪株,属孤雌生殖种群,可在实验室日本大耳白家兔体表和气候箱($(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}\geq 90\%$)内稳定发育和繁殖。该种群的饥饿成蜱可在小鼠体表实现叮咬饱血并完成脱落产卵。在建立饲喂方式时,将 150 只长角血蜱成蜱平均分为 3 组,分别为经毛细管饲喂后叮咬小鼠、小鼠体表叮咬后进行生物膜饲喂和小鼠体表叮咬至饱血 3 种方式,其中小鼠体表叮咬至饱血为对照组。本次试验所用的 8 周龄以上 BALB/c 小鼠购自华中农业大学实验动物中心。

1.1.2 吉氏巴贝斯虫

本研究所用吉氏巴贝斯虫为本课题组从临床分离得到的吉氏巴贝斯虫武汉株。该虫株在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下实现体外稳定培养,目前传代超过 400 代。

1.1.3 犬红细胞和兔血清

本研究所用犬红细胞采自比格犬。使用 EDTA-K2 抗凝管采集新鲜血液后,1 500 r/min 离心 5 min,弃血浆。2 倍体积生理盐水混匀后再次离心弃上清,重复清洗 3 次, 4°C 保存。所获得的抗凝犬红细胞可在 1 周内使用。兔血清采自健康的日本大耳白家兔。

1.1.4 试剂

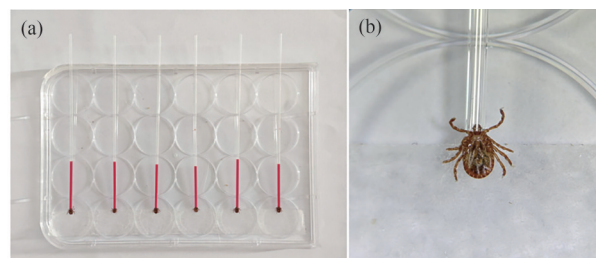
天根生化科技(北京)有限公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒和北京擎科生物科技股份有限公司的 TSE101 金牌 MIX。小鼠布袋粘合和固定材料为合众 504 环氧树脂胶,购自浙江黄岩光华胶黏剂厂。

1.2 试验设计

1.2.1 长角血蜱毛细管饲喂试验

参考 Rau 等^[6]的饲喂方法,结合长角血蜱假头宽短的特点进行改进,提高固定强度并降低饲喂角

度,具体操作如下:直径为 1.0 mm 的毛细管虹吸约 3 cm 30°C 预热后的新鲜配制血液。饲喂的血液由 50% 犬红细胞与 50% 兔血清组成。如图 1(a)所示,饥饿长角血蜱雌蜱用双面胶仰卧位固定,将毛细管呈 20° 插向蜱假头前端并固定,确保假头前端进入毛细管内(如图 1(b))。同时设立没有蜱的阴性对照组。用马克笔标记饲喂前液面位置。将套管蜱置于 30°C 培养箱内,湿度 $\geq 80\%$ 。



(a) 饲喂示意图; (b) 套管示意图。

(a) Feeding diagram; (b) Casing diagram.

图 1 毛细管饲喂示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the capillary-tube feeding technique

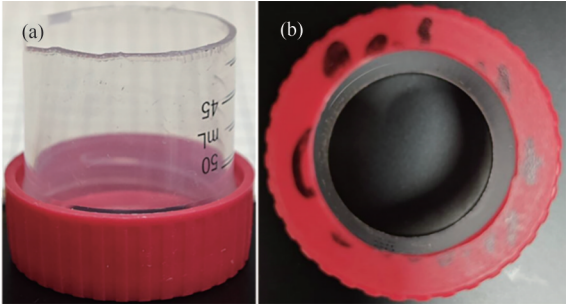
每间隔 24 h 观察蜱吸食与排泄情况,测量毛细管液面下降的相对高度,并更换新毛细管。新毛细管提前虹吸 30°C 预热后的新鲜配制血液。(毛细管液面相对下降相对高度 = 蜱吸食后液面下降高度 - 阴性对照组液面下降高度)

连续饲喂 7 d 后,将蜱从双面胶上取下,观察其状态及刺激反应。当蜱表现出附肢卷曲或伸展且镊子接触后无反应,视为死亡。统计并收集存活雌蜱,接于剃毛并固定口袋的小鼠体表。将饱血脱落后的雌蜱用 75% 酒精浸泡 5 min,清水冲洗干净后放在擦手纸上吸干体表液体。将清洁完成后的饱血脱落雌蜱置于 12 孔细胞板中,于气候箱($(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}\geq 90\%$)内继续培养,等待雌蜱产卵。

1.2.2 长角血蜱的小鼠生物膜饲喂试验

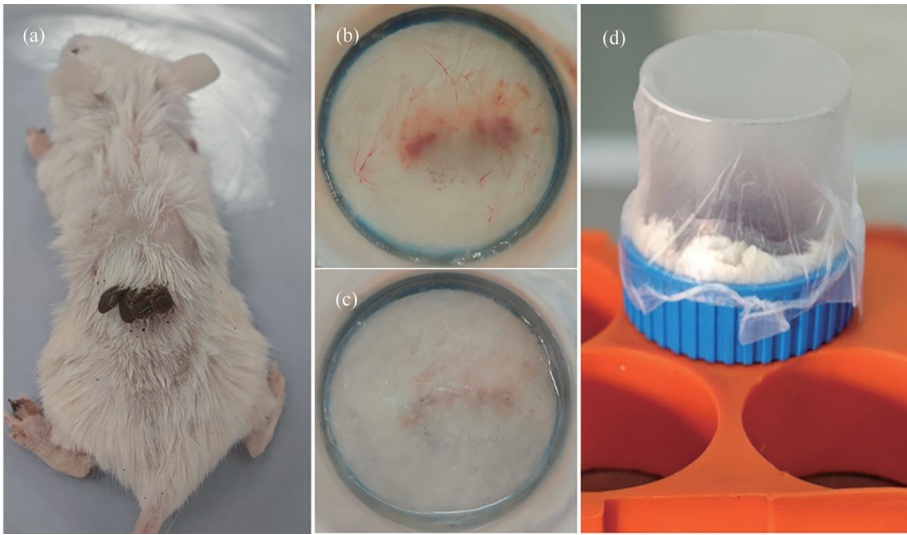
参考 Hatta 等^[15]的饲喂方法,结合试验需求替换饲喂血液和装置材料,具体如下:如图 2(a)所示,饲喂装置由 50 mL 离心管切割而成。在距离管顶约 3 cm 处切除管体,在盖子上挖出直径约 2.3 cm 圆孔(图 2(b)),确保剩余盖子部分能将皮肤牢牢固定于管口。

8 周龄以上 BALB/c 小鼠麻醉后剃去其背部毛发,将用尼龙滤网制成的口袋用胶水固定于背部。



(a)装置正面;(b)装置底面。
(a) The front of the device; (b) The bottom of the device.
图2 生物膜饲喂装置示意图
Fig. 2 Schematic diagram of the biological skin membrane feeding technique

在每只小鼠口袋内接种5只饥饿长角血蜱雌蜱,每日观察蜱叮咬情况。待雌蜱叮咬小鼠3 d后即将进入快速吸血期时(如图3(a)),取下口袋,处死小鼠。沿腹中线剪开,尽可能完整地分离皮肤,将附着蜱的小鼠皮肤绷紧于饲喂装置管口,用盖子拧紧固定,保证附着蜱能完全处于装置外侧。如图3(b)~(c)所示,用无菌弯头镊小心去除蜱叮咬周围的皮下组织,至镊子顶端可触及口器突起。无菌生理盐水冲洗后,加入2 mL 30℃预热后的新鲜配制血液,用封口膜密封装置顶部(如图3(d))。将装置静置于30℃培养箱内,湿度≥80%。



(a)在小鼠体表叮咬的成蜱;(b)处理前的皮肤;(c)处理后的皮肤;(d)完整装置示意。
(a) Ticks biting a mouse; (b) Pre-treatment skin; (c) Post-treatment skin; (d) A schematic diagram of the complete device.

图3 小鼠皮肤处理及生物膜饲喂系统示意图

Fig. 3 Schematic diagram of skin treatment of mice

每间隔8 h打开封口膜,弃去血液。用无菌生理盐水冲洗至无血凝块,加入2 mL 30℃预热后的新鲜配制血液。将饱血脱落后的雌蜱用75%酒精浸泡5 min,清水冲洗干净后放在擦手纸上吸干体表液体。完成清洁后的饱血雌蜱置于12孔细胞板中,于气候箱((26±1)℃,RH≥90%)内继续培养等待产卵。

1.2.3 人工饲喂在巴贝斯虫蜱传性评价的初步应用

用染虫率为5%~8%的吉氏巴贝斯虫染虫红细胞代替犬红细胞,通过2种人工饲喂方式分别饲喂30只饥饿长角血蜱雌蜱。待蜱产卵18 d后,收集

细胞板内虫卵。每只产卵雌蜱各随机取100颗虫卵于洁净的EP管内,充分研磨。根据基因组试剂盒说明提取基因组。使用表1内引物进行巢式PCR扩增,同时设立阴性对照组和阳性对照组。反应体系为25 μL体系,包括22 μL金牌Mix、上下游引物各1 μL和基因组DNA(或一轮扩增产物)1 μL。反应程序为98℃预变性2 min;98℃变性10 s,一轮51.2℃/二轮60.0℃退火15 s,72℃延伸一轮30 s/二轮15 s,35个循环;72℃终延伸5 min。

1.3 检测指标及方法

统计3种饱血方式下雌蜱经人工饲喂后的存活率。将饱血脱落的长角血蜱雌蜱经清洗后置于

表 1 用于 ITS 巢式 PCR 的引物信息
Table 1 Primer information for ITS nested PCR

引物 ^[18] Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	长度/bp Length
ITS1F ^a	GGTGGTGCATGGCCG	15
ITS1R ^a	TGCGCTTCAATCCC	14
ITS2F ^b	GAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG	23
ITS2R ^b	GCTTCACTCGCCGTTACTAGG	21

注：a 为一轮扩增引物，b 为二轮扩增引物。
Note: a is the primer for the first round of nested PCR, and b is the primer for the second round.

12 孔细胞板，记录脱落时间并计算饱血率。用电子天平测量饱血雌蜱体重。随后静置于气候箱((26±1)℃,RH≥90%)内继续培养。每日观察雌蜱情况，待第 1 天开始产卵时记录为首日产卵时间，并计算饱血雌蜱产卵率。从饱血雌蜱脱落当日至产卵首日之间为该蜱孕卵期。待雌蜱连续产卵 18 d 后，小心收集所有虫卵，用电子天平测量所产卵重量，即为该蜱产卵量。

存活率=饲喂后存活蜱数量/总饲喂蜱数量；
饱血率=饱血蜱数量/存活蜱数量；产卵率=产卵蜱数量/饱血蜱数量

1.4 数据处理

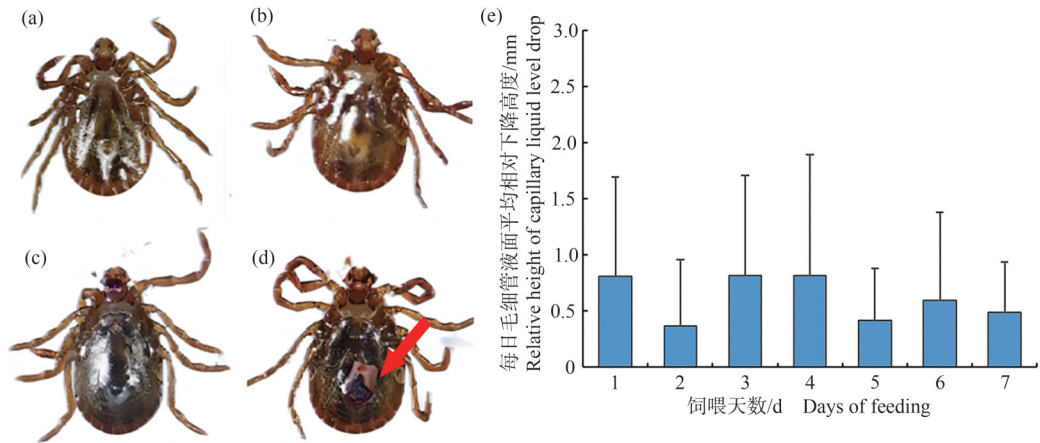
使用 Graphpad 8.0.2 的统计分析功能对饱血

成蜱体重、孕卵期和产卵量的数据进行 One-Way ANOVA 单因素方差分析和多重比较，经 Excel 2019 统计并绘制图表。 $P<0.05$ 表示差异显著， $P<0.01$ 表示差异极显著， $P>0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 长角血蜱离体小鼠生物膜饲喂与毛细管饲喂技术建立

取 50 只饥饿长角血蜱雌蜱仰卧位固定后，连续 7 d 进行毛细管饲喂。与饲喂前相比，多数雌蜱腹部出现明显隆起(如图 4(a)~(c))，部分蜱肛门处可见白色至深褐色排泄物(如图 4(d))。



(a)~(c)分别为毛细管饲喂第 0、3、6 天后蜱体型变化；(d)经饲喂后进行排泄中的蜱，红色箭头为蜱排泄物；(e)毛细管饲喂中每日管内液面平均相对下降高度。

(a)-(c) The changes in tick body size after 0, 3, and 6 days of the capillary-tube feeding; (d) The tick excreting after feeding, the red arrow refers to tick droppings; (e) The average relative drop in the liquid level during daily capillary-tube feeding.

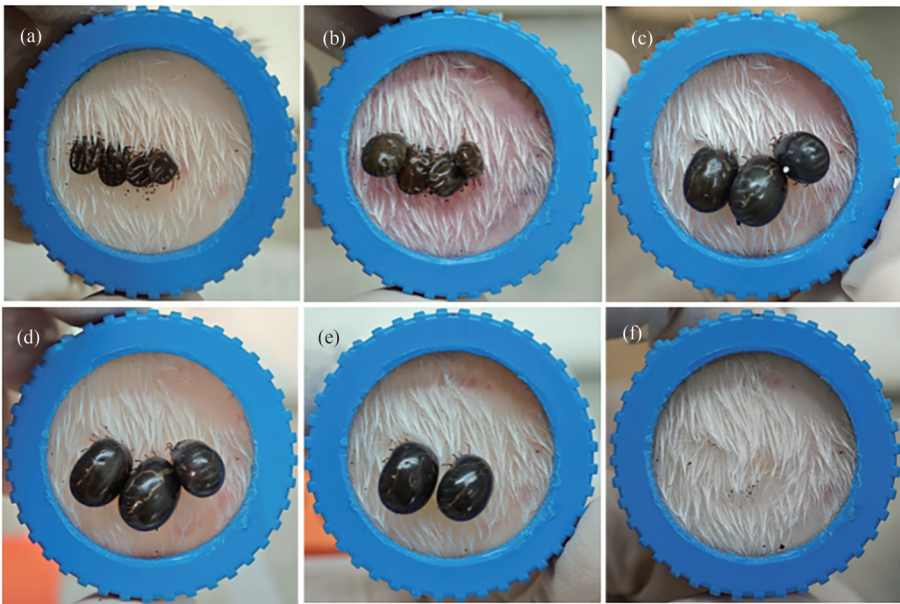
图 4 毛细管饲喂后第 0、3 和 6 天蜱体型变化及每日平均饲喂量

Fig. 4 Changes of tick body type amount on the 0th, 3rd and 6th day and average daily feeding quantity after the capillary-tube feeding

每日平均饲喂量如图4(e)所示,一周后收获存活饲喂蜱47只,分别接至10只8周龄以上的BALB/c小鼠。最终自小鼠体表脱落饱血雌蜱26只,共有24只雌蜱在14 d内产卵,产卵率为92.31%。

取50只饥饿长角血蜱雌蜱分别接至10只8

周龄以上的BALB/c小鼠。待雌蜱即将进入快速吸血期,剥离附着蜱的小鼠皮肤,完成小鼠生物膜饲喂装置制备。此时,进入快速吸血期的蜱可在48 h内饱血并脱落,如图5。最终收获饱血脱落雌蜱47只,共有39只雌蜱在14 d内产卵,产卵率为82.98%。



(a)~(f)分别为饲喂后第0、8、16、24、32、40 h小鼠皮肤上的蜱状态,其中第16 h、32 h和40 h分别有1只、1只和2只蜱饱血脱落。

(a) to (f) shows the body shapes of ticks on the mouse skin at 0, 8, 16, 24, 32, and 40 hours after feeding, respectively. One, one, and two ticks were engorged and fell off at 16, 32, and 40 hours, respectively.

图5 生物膜饲喂不同时间后蜱体形变化

Fig. 5 Changes of tick shape after the biological skin membrane feeding

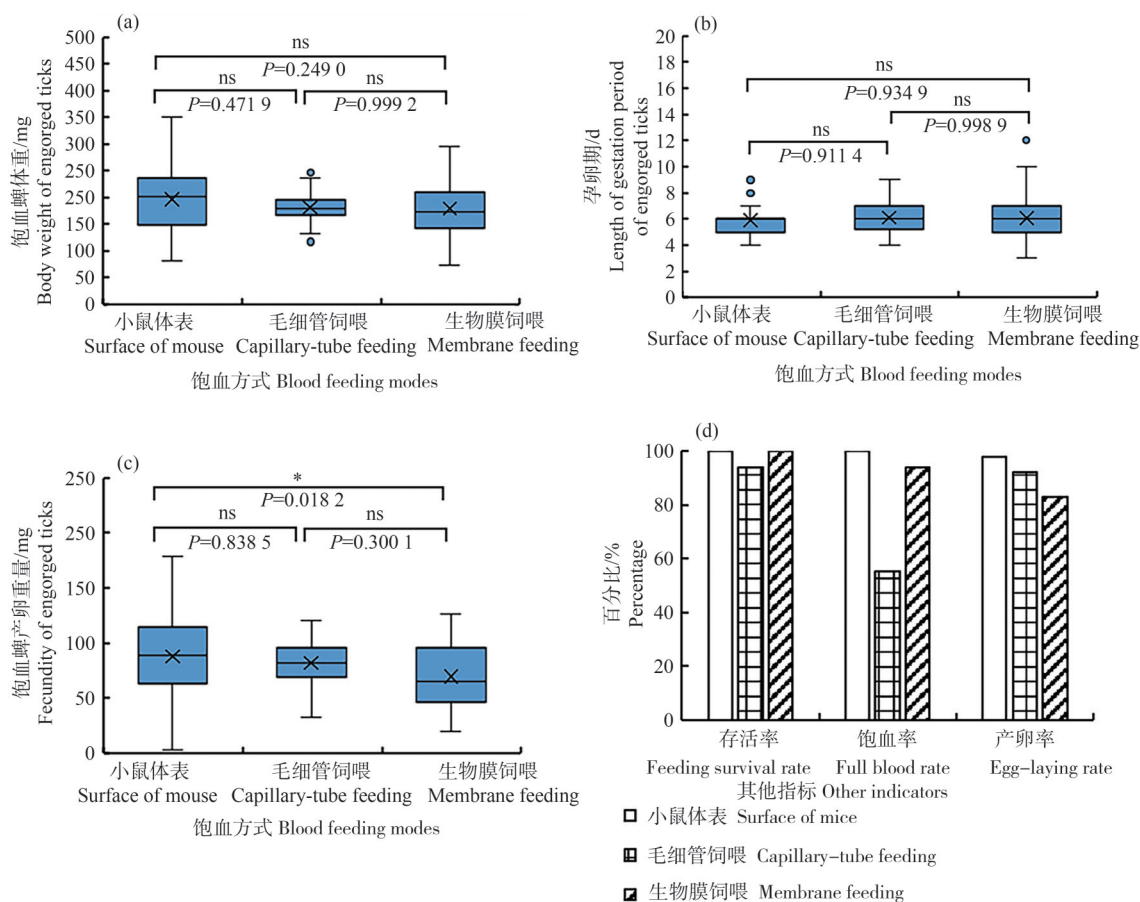
2.2 长角血蜱人工饲喂技术对成蜱饱血与孕卵的影响

取同批次50只饥饿长角血蜱雌蜱分别接至10只8周龄以上的BALB/c小鼠,作为对照组。最终收获饱血脱落雌蜱50只,共有49只雌蜱在14 d内产卵,产卵率为98%。统计每只雌蜱的体重、孕卵期和产卵量,与2种人工饲喂方式进行对比。根据统计结果,如图6(a)~(b)所示3种吸血方式的差异对饱血雌蜱体重和孕卵期几乎无影响。但小鼠生物膜饲喂和小鼠体表叮咬脱落饱血雌蜱在产卵量上有显著差异,毛细管饲喂与其他2种吸血方式相比在产卵量上无明显差异(如图6(c))。如图6(d)所示,对3种饲喂方式的存活率、饱血率及产卵率进行比较可见,3种饲喂方式下的雌蜱在存活率上均超过90%。蜱经毛细管饲喂后在饱血率上不及其他2种饱血方式,经生物膜饲喂获得的饱血蜱

在产卵率上略低于其他2种饱血方式。

2.3 次代卵ITS巢式PCR检测

通过毛细管感染吉氏巴贝斯虫的30只饥饿长角血蜱雌蜱中,共有12只雌蜱完成经小鼠饱血脱落,且均顺利产卵。如图7所示,有2份虫卵样品ITS巢式PCR检测为阳性,阳性率为16.67%。使用小鼠生物膜饲喂吉氏巴贝斯虫染虫红细胞的30只饥饿长角血蜱雌蜱中,共有28只雌蜱饱血,其中21只雌蜱顺利产卵。有4份虫卵样品ITS巢式PCR检测为阳性,阳性率为19.04%。将PCR阳性产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果为吉氏巴贝斯虫。由此可见,2种人工饲喂方式均可实现吉氏巴贝斯虫感染长角血蜱成蜱,并完成经卵传播。



×表示组内平均值, ns表示差异不显著($P>0.05$), *表示差异显著($P<0.05$).

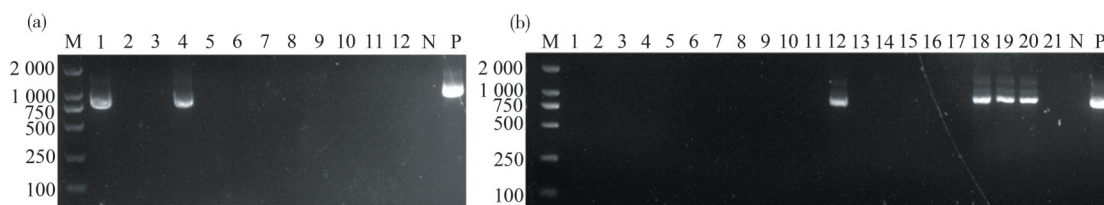
(a) 饱血蜱体重; (b) 孕卵期; (c) 饱血蜱产卵重量; (d) 存活率、饱血率、产卵率。

× indicates intra-group average, ns indicates no significant difference ($P>0.05$), * indicates difference ($P<0.05$).

(a) Body weight of engorged ticks; (b) Length of gestation period of engorged ticks; (c) Fecundity of engorged ticks; (d) Feeding survival rate, full blood rate and egg-laying rate.

图 6 3 种吸血方式对饱血蜱发育及繁殖的影响

Fig. 6 Differences in development and reproduction of engorged ticks under three blood feeding modes



1~12 和 1~21 为虫卵样品, N 表示阴性对照, P 表示阳性对照。

(a) 毛细管饲喂; (b) 生物膜饲喂。

1-12 and 1-21 represent egg samples, N represents negative control, and P represents positive control.

(a) The capillary-tube feeding; (b) The biological skin membrane feeding.

图 7 经 2 种饲喂方式感染吉氏巴贝斯虫的雌蜱所产虫卵 ITS 巢式 PCR 检测

Fig. 7 ITS nest PCR amplification of eggs produced by female ticks infected with *B. gibsoni* by two feeding methods

3 讨论

本研究针对长角血蜱成蜱建立了毛细管和生

物膜 2 种人工饲喂技术。目前,毛细管饲喂在口器较长的硬蜱中已经有了诸多应用,如通过饲喂使蜱感染特定病原微生物。目前已有在美洲花蜱(*A.*

americanum)^[19]和变异革蜱(*D. variabilis*)^[20]体内定植土拉杆菌(*Francisella tularensis*),在中华硬蜱(*I. sinensis*)^[21]和肩突硬蜱(*I. scapularis*)^[22]体内定植立克次体,以及在篦子硬蜱(*I. ricinus*)、六角硬蜱(*I. hexagonus*)、网状革蜱(*D. reticulatus*)和囊形扇头蜱(*R. bursa*)体内定植蓝舌病毒等报道^[23]。长角血蜱假头宽短^[1],采用毛细管饲喂时仅能假头前端插入管内,存在一定的饲喂难度。因此饲喂时需要将蜱和毛细管进行良好的固定,并选取合适的角度,防止饲喂途中毛细管脱落。同时,长时间固定会导致蜱活力下降甚至死亡,严重影响饲喂结束后在小鼠体表的叮咬率。在前期尝试中发现连续固定超过8 d时部分蜱会出现足卷曲和对镊子触碰反应下降,超过10 d时13.3%蜱出现死亡。由于每只蜱的吸血时间和时长不同(每日毛细管饲喂量标准差较大),为尽可能增加饲喂量,本研究选取7 d为饲喂周期。同时,研究还尝试了使用0.3和0.5 mm直径的毛细管对幼蜱和若蜱进行饲喂。但最终只能完成部分蜱的前期饲喂,实现腹部隆起或排泄,饲喂后蜱在宿主兔体表无法完成主动叮咬。目前,长角血蜱仍无法实现全阶段的经毛细管人工饲喂。蜱经毛细管实现人工感染后,结合qPCR等分子生物学手段,可对病原体经摄食后在蜱体内定植水平、各组织器官间扩散动态,以及媒介蜱对该病原的传播方式和传播效率进行初步研究^[24],也可借助荧光蛋白标记建立可视化的蜱感染模型^[22],或结合蛋白组学分析研究与病原体传播相关的差异调控蛋白在媒介蜱中的表达差异^[25],这些研究对蜱传性自然疫源病的控制具有重要意义。类似的,将针对蜱肠道蛋白质的单克隆抗体通过毛细管饲喂进入蜱体内以测试免疫球蛋白对蜱生长发育的影响^[26],或通过毛细管饲喂筛选定向靶点的各类杀蜱化合物^[27],可见人工饲喂技术能为开发新的抗蜱药物提供帮助。

蜱在宿主体表附着并叮咬时需要一系列的化学和物理刺激,如气味、二氧化碳和热量^[28],因此使用有机硅膜饲喂时需要给予合适的刺激剂来诱导蜱叮咬并进食。人工膜的塑性和厚度也一定程度上限制了部分硬蜱的自主叮咬。蜱的快速饱血期往往发生在进食的最后24~36 h内,此时蜱的吸血量是其最终体重增加量的2~8倍^[29],因此可选用事先附着蜱的生物膜代替人工膜以适应短假头蜱的

人工饲喂。当病原体宿主为大型动物时,膜饲喂系统能为蜱传试验提供极大的便利。在本研究中,没有直接使用膜饲喂中常用的去纤维血作为抗凝血,而采用人工配制血液,初步尝试替换血液组分。这将便于后续应用于吉氏巴贝斯虫蜱传性评价,可直接将健康犬红细胞替换为长期体外培养的染虫红细胞。同时,考虑到使用犬血清的成本,以及实验室长角血蜱种群长期经日本大耳白家兔体表繁殖,因此选用日本大耳白家兔血清作为替换血清。除了与毛细管饲喂类似的在蜱传病和杀蜱药物上的研究应用,膜饲喂系统可通过在饲喂过程中选用特定抗生素定向杀死蜱体内共生体,用于研究其与蜱的互作关系^[30]。本次研究中小鼠生物膜饲喂方式在产卵率和产卵量上略低于其他2种吸血方式,可能与饲喂血液变质有关,可添加庆大霉素等适宜抗生素以缓解血液变质,同时补充维生素B等减少抗生素对蜱体内微生物的干扰^[31]。

本研究使用吉氏巴贝斯虫染虫血对长角血蜱进行毛细管和生物膜饲喂,并在饲喂蜱所产卵内通过巢式PCR检测到虫体存在,可证实毛细管饲喂和生物膜饲喂均能有效保持巴贝斯虫的经卵传播。由于部分病原体如边缘无形体(*Anaplasma marginale*)和双芽巴贝斯虫(*B. bigemina*)侵袭会受到宿主针对蜱的免疫保护影响^[32],因此与自然感染或经试验动物饲喂相比,毛细管或生物膜饲喂可消除宿主免疫对蜱和病原体的干扰,保证病原体感染的稳定性和可靠性。同时,通过调整饲喂时间和饲喂血液内病原体的密度,可实现初步控制病原体感染时间和感染量。其中毛细管饲喂方式可诱导蜱在吸血初期感染特定病原体,而膜饲喂方式则诱导蜱在快速吸血期至吸血末期感染特定病原体。将2种饲喂方式结合,可用于研究病原体在不同吸血时期在蜱体内的定植和扩散情况,具有较大的研究前景。

4 结 论

本研究建立了针对长角血蜱成蜱的毛细管饲喂和生物膜饲喂技术。在使用人工配方血液进行饲喂的条件下,多数蜱仍能正常饱血并顺利产卵。同时,本研究完成了该2种人工饲喂技术在吉氏巴贝斯虫蜱传性评价的初步应用,证明了在吉氏巴贝斯虫在长角血蜱的吸血初期和后期均可经血液进入蜱体内并传递给子代虫卵。2种人工饲喂方式将

为研究蜱传病原体与蜱的互作关系提供便利, 并为今后开发灭蜱药物提供技术支持。

参考文献 References

- [1] 陈泽, 杨晓军. 蜱的系统分类学[M]. 北京: 科学出版社, 2021
Chen Z, Yang X J. *Systematic Taxonomy of Ticks*[M]. Beijing: Science Press, 2021 (in Chinese)
- [2] 常崇艳, 姜在阶, 张之同. 硬蜱哈氏器嗅觉功能的研究[J]. 昆虫学报, 1989, 32(4): 445-450
Chang C Y, Jiang Z J, Zhang Z T. Studies on the olfactory function of haller's organs of Ixodes[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1989, 32(4): 445-450 (in Chinese)
- [3] 楼怡寒, 张学潮, 徐海君, 杨章女. 硬蜱吸血策略及其生理生化变化过程[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2023, 46(6): 607-610
Lou Y H, Zhang X C, Xu H J, Yang Z N. Blood meal strategy of hard ticks and physiological and biochemical changes in the process [J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2023, 46(6): 607-610 (in Chinese)
- [4] Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks [J]. *Parasitology*, 2004, 129(Suppl): S3-S14
- [5] Embers M E, Grasperge B J, Jacobs M B, Philipp M T. Feeding of ticks on animals for transmission and xenodiagnosis in Lyme disease research [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013 (78): e50617
- [6] Rau U, Hannoun C. The use of a capillary-tube technique for artificially feeding *Argas reflexus reflexus* ticks [J]. *Bull World Health Organ*, 1968, 39(2): 332-333
- [7] Korshus J B, Munderloh U G, Bey R F, Kurtti T J. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding [J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2004, 193(1): 27-34
- [8] Rechav Y, Zyzak M, Fielden L J, Childs J E. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis* [J]. *Journal of Medical Entomology*, 1999, 36(4): 414-419
- [9] Kuhnert F, Diehl P A, Guerin P M. The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro [J]. *International Journal for Parasitology*, 1995, 25(8): 887-896
- [10] Vimonish R, Johnson W C, Mousel M R, Brayton K A, Scoles G A, Noh S M, Ueti M W. Quantitative analysis of *Anaplasma marginale* acquisition and transmission by *Dermacentor andersoni* fed in vitro [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 470
- [11] Militzer N, Bartel A, Clausen PH, Hoffmann-Köhler P, Nijhof AM. Artificial feeding of all consecutive life stages of *Ixodes ricinus* [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(4): 385
- [12] Khoo B, Cull B, Oliver JD. Tick artificial membrane feeding for *Ixodes scapularis* [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2022, (189): e64553
- [13] Garcia Guizzo M, Meneses C, Amado Cecilio P, Hessab Alvarenga P, Sonenshine D, Ribeiro JM. Optimizing tick artificial membrane feeding for *Ixodes scapularis* [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 16170
- [14] Tajeri S, Razmi G R. *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood in vitro by utilizing an artificial feeding system [J]. *Veterinary Parasitology*, 2011, 180(3-4): 332-335
- [15] Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam M K, Alim M A, Anisuzzaman, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis* [J]. *Parasites & Vectors*, 2012, 5: 263
- [16] Liu M M, Igarashi I, Xuan X N. Babesia gibsoni [J]. *Trends in Parasitology*, 2022, 38(9): 815-816
- [17] 陈凯丽, 杨晨, 张雨凡, 李思思, 刘敬泽, 张艳凯. 实验室条件下长角血蜱胚胎发育过程[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2023, 34(6): 723-727
Chen K L, Yang C, Zhang Y F, Li S S, Liu J Z, Zhang Y K. The embryonic development process of *Haemaphysalis longicornis* under laboratory conditions [J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2023, 34(6): 723-727 (in Chinese)
- [18] 贺兰. 东方巴贝斯虫新型诊断方法的建立和基因组序列测定与分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011
He L. Novel diagnostic methods development and genome sequencing of *Babesia orientalis* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [19] Mani R J, Metcalf J A, Clinkenbeard K D. *Amblyomma americanum* as a bridging vector for human infection with *Francisella tularensis* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130513
- [20] Mani R J, Reichard M V, Morton R J, Kocan K M, Clinkenbeard K D. Biology of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* live vaccine strain in the tick vector *Dermacentor variabilis* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35441
- [21] Ye X D, Sun Y, Ju W D, Wang X, Cao W C, Wu M Y. Vector competence of the tick *Ixodes sinensis* (Acari: Ixodidae) for *Rickettsia monacensis* [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7: 512
- [22] Baldrige G D, Kurtti T J, Burkhardt N, Baldrige A S, Nelson C M, Oliva A S, Munderloh U G. Infection of *Ixodes scapularis* ticks with *Rickettsia monacensis* expressing green fluorescent protein: A model system [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 94(3): 163-174
- [23] Bouwknegt C, van Rijn P A, Schipper J J M, Hölzel D, Boonstra J, Nijhof A M, van Rooij E M A, Jongejan F. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2010, 52(2): 183-192
- [24] Lee J K, Moraru G M, Stokes J V, Benton A N, Wills R W, Nabors H P, Smith C L, Lawrence A M, Willeford B V, Varela-Stokes A S. *Amblyomma maculatum*-associated rickettsiae in vector tissues and vertebrate hosts during tick feeding [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2019, 77(2): 187-205
- [25] Flores-Ramirez G, Sallay B, Danchenko M, Lakhneko O, Špitalská E, Skultety L. Comparative proteomics of the vector *Dermacentor reticulatus* revealed differentially regulated proteins associated with pathogen transmission in response to laboratory infection with *Rickettsia slovaca* [J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 318
- [26] Gonsioroski A V, Bezerra I A, Utiumi K U, Driemeier D, Farias S E, da Silva Vaz Jr I, Masuda A. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females [J]. *Experimental Parasitology*, 2012, 130(4): 359-363
- [27] Saramago L, Gomes H, Aguilera E, Cerecetto H, González M, Cabrera M, Alzugaray M F, da Silva Vaz Junior I, Nunes da Fonseca R, Aguirre-López B, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Merlino A, Moraes J, Álvarez

- G. Novel and selective *Rhipicephalus microplus* triosephosphate isomerase inhibitors with acaricidal activity [J]. *Veterinary Sciences*, 2018, 5(3): 74
- [28] Carr A L, Salgado V L. Ticks home in on body heat: A new understanding of Haller's organ and repellent action [J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0221659
- [29] Kröber T, Guerin P M. *In vitro* feeding assays for hard ticks [J]. *Trends in Parasitology*, 2007, 23(9): 445-449
- [30] Zhong Z W, Zhong T, Peng Y Q, Zhou X F, Wang Z Q, Tang H R, Wang J W. Symbiont-regulated serotonin biosynthesis modulates tick feeding activity [J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(10): 1545-1557. e4
- [31] Militzer N, Pinecki Socias S, Nijhof AM. Changes in the *Ixodes ricinus* microbiome associated with artificial tick feeding [J]. *Front Microbiol*, 2023, 13: 1050063
- [32] Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid J A, Galindo R C, de la Fuente J. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* [J]. *Vaccine*, 2011, 29(47): 8575-8579

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 陈方维, 华中农业大学在读兽医专业博士研究生。研究方向为吉氏巴贝斯虫基因编辑弱毒疫苗。



通讯作者简介: 贺兰, 华中农业大学教授、博导。专注于巴贝斯虫相关研究, 从事巴贝斯虫基因组学、入侵机制、疫苗的开发、早期诊断抗原和药物靶标的筛选等工作, 尤其是巴贝斯虫诊断方面, 致力于早期分泌抗原的筛选, 研发了多种可用于实验室、临床、宠物医院等不同条件不同需求的诊断制剂。先后主持国家青年拔尖人才支持计划、十四五国家重点研发计划青年科学家项目, 十三五国家重点研发计划课题主持、973技术骨干、国家自然科学基金青年基金、面上基金、中国博士后基金等13个项目。以第一或通讯作者发表SCI收录论文40余篇, 包括 *The FASEB Journal*, *Parasites & Vectors*, *Veterinary Parasitology* 等领域权威期刊; 获国家发明专利13项, 参编著作1部。