

西藏墨脱县疟疾流行区多斑按蚊复合体种型鉴定

武松^{1,3}, 潘嘉云¹, 王学忠², 周水森¹, 张国庆¹, 汤林华^{1*}

【摘要】 目的 鉴定西藏林芝地区墨脱县疟疾流行区多斑按蚊复合体的种型。方法 墨脱县捕获的 5 190 只按蚊经形态学鉴定为多斑按蚊复合体后, 随机取 575 只, 酚-氯仿法提取单蚊 DNA 作为模板, 根据伪威氏按蚊、多斑按蚊、威氏按蚊、达罗毗按蚊和塞沃按蚊分别设计 5 对特异性引物, PCR 扩增 rDNA 第二转录间隔区 (ITS2) 片段, 进行种型鉴别。对目标片段进行测序、同源性比对, 并运用 MEGA (3.1) 软件构建多斑按蚊复合体的系统进化树。结果 575 份 DNA 样本中有 11 份扩增出约 231 bp 的条带, 即威氏按蚊 (1.9%); 564 份扩增出约 119 bp 的条带, 为伪威氏按蚊 (98.1%)。PCR 种型鉴定结果与同源性比对及系统进化树的结果一致。结论 西藏林芝地区墨脱县疟疾流行区多斑按蚊复合体由伪威氏按蚊和威氏按蚊构成, 伪威氏按蚊为优势蚊种。

【关键词】 西藏; 墨脱; 多斑按蚊复合体; 种型鉴定

中图分类号: R531.3, R384.111 文献标识码: A

Species Identification of *Anopheles maculatus* Complex in Malaria Endemic Area Motuo County, Tibet

WU Song^{1,3}, PAN Jia-yun¹, WANG Xue-zhong², ZHOU Shui-sen¹,
ZHANG Guo-qing, TANG Lin-hua^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Puer 665000, China; 3 School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Hefei 230038, China)

【Abstract】 **Objective** To identify the species of *Anopheles maculatus* complex in malaria endemic area Motuo County, Linzhi Prefecture, Tibet Autonomous Region. **Methods** 5 190 adult mosquitoes were morphologically identified as *An. maculatus* complex, and 575 were randomly selected to extract DNA by phenol-chloroform method. According to the rDNA ITS2 variations of *An. maculatus* s. s., *An. willmori*, *An. pseudowillmori*, *An. sawadwongporni* and *An. dravidicus*, 5 pairs of specific primers were designed for PCR identification on the species of *An. maculatus* complex. The PCR products were sequenced in double directions, and homology searches were done over the Web using the program Blast. 22 ITS2 sequence of *An. maculatus* complex from GenBank was adopted to construct phylogenetic tree with UPGMA method by MEGA (3.1) software. **Results** 575 DNA samples were extracted. Among which, 11 were amplified 231 bp *An. willmori* fragment (1.9%) and 564 were amplified 119 bp *An. pseudowillmori* fragment (98.1%). PCR identification, Web homology blast and phylogenetic tree showed same results. **Conclusion** The predominant anopheline mosquitoes in Motuo County is *An. pseudowillmori*.

【Key words】 Tibet; Motuo; *Anopheles maculatus* complex; Species identification

* Corresponding author, E-mail: ipdtlh@sh163.net

多斑按蚊复合体包括 9 种按蚊^[1,2], 我国目前发现 5 种^[3], 即多斑按蚊(*An. maculatus* s. s.)、威氏按蚊(*An. willmori*)、伪威氏按蚊(*An. pseudowillmori*)、塞沃按蚊(*An. sawadwongporni*)和达罗毗按蚊(*An.*

dravidicus)。多斑按蚊复合体的部分成员种在疟疾传播中有一定作用^[4-6]。我国西藏林芝地区的墨脱县早有疟疾病例报告, 并呈增长趋势, 但其传播媒介至今未知。该地区既往有多斑按蚊复合体的记载^[3], 但具体包含的种型尚不清楚。作者等于 2007 年 7~8 月在西藏林芝地区墨脱县进行媒介调查, 基本调查方法及媒介形态鉴别等业已另文报道^[7]。对捕获的多斑按蚊复合体采用 PCR 进行种型鉴定, 结果报告如下。

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 云南省寄生虫病研究所, 普洱 665000; 3 安徽中医学院中西医结合临床学院, 合肥 230038

* 通讯作者, E-mail: ipdtlh@sh163.net

材料与方法

1 蚊虫标本来源

2007 年 7~8 月在西藏自治区林芝地区墨脱县捕获的 5 190 只成蚊经形态学鉴定为多斑按蚊复合体后^[7]麻醉处死, 每 10 只装入打孔的 1.5 ml 离心管, 放入有干燥剂的自封袋中带回实验室, -20 °C 冻存备用。

每个调查点按捕获多斑按蚊复合体成蚊总数的 10% 随机抽取, 共 575 只。以伪威氏按蚊、多斑按蚊、威氏按蚊、达罗毗按蚊和塞沃按蚊作对照 (由第二军医大学马雅军教授惠赠)。

2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪 (PTC-200 型) 购自美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统 (Alpha Imager HP/EP) 购自美国 Alpha Innotech 公司, CDC 诱蚊灯 (New Standard Miniature Light Traps, 512 6 V 150 mm) 购自美国 John W. Hock 公司, 电泳仪 (DYY-2C 型) 购自北京六一仪器厂。DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸 (dNTPs) 购自上海赛百盛基因技术有限公司, RNA 酶和蛋白酶 K 购自上海鼎国生物技术有限公司。

3 种型鉴定

3.1 DNA 模板制备 单只成蚊加入 120 μ l 65 °C 裂解液 [含 0.025 mol/L 乙二胺四乙酸钠 (EDTA)、0.2 mol/L 氯化钠 (NaCl)、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1% 十二烷基磺酸钠 (SDS)] 和 1.5 μ l RNase 酶 (10 μ g/ μ l), 充分研磨, 37 °C 水浴 1 h。加入 3 μ l 蛋白酶 K (20 μ g/ μ l), 50 °C 水浴 1 h。加入苯酚和氯仿各 60 μ l, 充分振荡混匀, 13 000 \times g 离心 10 min, 收集上清液。加入 95% 冰乙醇 300 μ l, -20 °C 沉淀过夜, 13 000 \times g 离心 10 min, 弃上清。37 °C 干燥, 加入 100 μ l 1 \times TE (Tris/EDTA) 缓冲液, -20 °C 保存。

3.2 PCR 扩增 分子鉴定参照文献^[8]的鉴别方法, 根据 rDNA-ITS2 序列设计了一条共用的正向引物, 5 个种特异引物 (表 1), 可扩增 5 种大小不同的片段, 分别为伪威氏按蚊 (119 bp)、多斑按蚊 (186 bp)、威氏按蚊 (231 bp)、达罗毗按蚊 (327 bp) 和塞沃按蚊 (406 bp)。PCR 反应体系: 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液、25 mmol/L MgCl₂ 2 μ l, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ l、正向引物与 5 个反向引物各 0.6 μ l (20 mmol/L)、red Taq 聚合酶 1 μ l (1 U/ μ l)、DNA 模板 1 μ l, 加水补至 25 μ l。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。

表 1 多斑按蚊复合体 PCR 鉴别引物
Table 1 Specific primers in diagnostic PCR assay for *An. maculatus* complex

引物名称 Primer name	引物 Primer	产物 Product (bp)
共用正向引物 5.8S	5'-GAACTGCAGGACACATGAACACCG-3'	
伪威氏按蚊 <i>An. pseudowillmori</i>	5'-GTCAGTCTGGTATCGGCATAT-3'	119
多斑按蚊 <i>An. maculatus</i>	5'-AGCGCCAGGGCCCACTAGC-3'	186
威氏按蚊 <i>An. willmori</i>	5'-CCATAGTGTACCACCATTTCG-3'	231
达罗毗按蚊 <i>An. dravidicus</i>	5'-TAGCGCCCGGTGTTAATACA-3'	327
塞沃按蚊 <i>An. sawadwongporni</i>	5'-AAGGCGGAATCGATGATT-3'	406

4 电泳鉴定

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭) 电泳后 (电压为 9 V/cm, 电泳时间为 25 min), 凝胶成像系统观察结果并拍照记录。

5 测序与同源性比对

采用测序试剂盒和全自动测序仪进行双向测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。测序结果采用 Bioedit 软件进行拼接, 并登陆 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对。

6 构建系统进化树

利用 ClustalX 1.83 软件对测得序列及美国国立信息中心 (NCBI) 数据库 (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的多斑按蚊复合体 8 成员种 (表 2) ITS2 序列进

表 2 来自 GenBank 的多斑按蚊 8 成员种 ITS2 序列信息
Table 2 ITS2 sequence of 8 members in *Anopheles maculatus* complex from GenBank

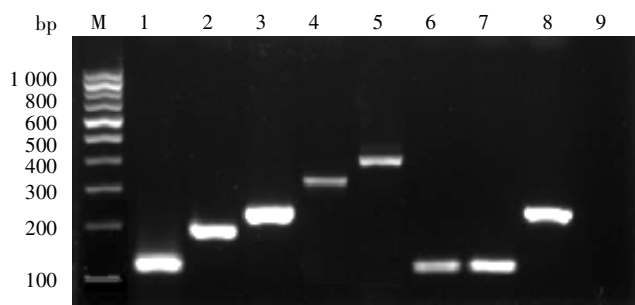
蚊种 Species	序列来源 Sequence origin
多斑按蚊 <i>An. maculatus</i>	DQ518618I (Cambodia), DQ518616I (China), DQ518615I (Thailand), DQ518619I (Malaysia), DQ518617.1 (Viet Nam)
伪威氏按蚊 <i>An. pseudowillmori</i>	AF261952.2 (China), AF512550.1 (China), DQ518629I (Viet Nam), DQ518628I (Thailand)
威氏按蚊 <i>An. willmori</i>	AF512552.1 (China)
塞沃按蚊 <i>An. sawadwongporni</i>	DQ518623I (Cambodia), AF512551I (China), DQ518620I (Thailand), DQ518621I (China), DQ518622.1 (Viet Nam)
多斑按蚊 K 型 K type of <i>An. maculatus</i>	DQ518627.1 (Cambodia), DQ518625.1 (Thailand), DQ518626.1 (Viet Nam)
达罗毗按蚊 <i>An. dravidicus</i>	DQ518624.1 (Thailand), AF261951.1 (China)
异形按蚊 <i>An. dispar</i>	AF234778 (Malaysia)
格林按蚊 <i>An. greeni</i>	AF234779 (Malaysia)

行多序列比对。应用MEGA3.1 软件运用UPGMA 法构建多斑按蚊复合体的系统进化树。

结 果

1 PCR 扩增结果

575 份 DNA 样本均扩增出目标片段, 共有 119 bp (伪威氏按蚊) 和 231 bp (威氏按蚊) 两种带型 (图 1), 其中威氏按蚊 11 只 (1.9%), 伪威氏按蚊 564 只 (98.1%), 伪威氏按蚊为优势成员种。



M: DNA 标志物, 1: 伪威氏按蚊, 2: 多斑按蚊, 3: 威氏按蚊, 4: 达罗毗按蚊, 5: 塞沃按蚊, 6-8: 西藏林芝地区墨脱县现场蚊虫样本, 9: 空白对照。

M: DNA marker, 1: *An. pseudowillmori*, 2: *An. maculates s. s.*, 3: *An. willmori*, 4: *An. dravidicus*, 5: *An. sawadwongporni*, 6-8: *Anopheles* collected in Tibet, 9: Blank control.

图 1 多斑按蚊复合体成员种 PCR 扩增结果

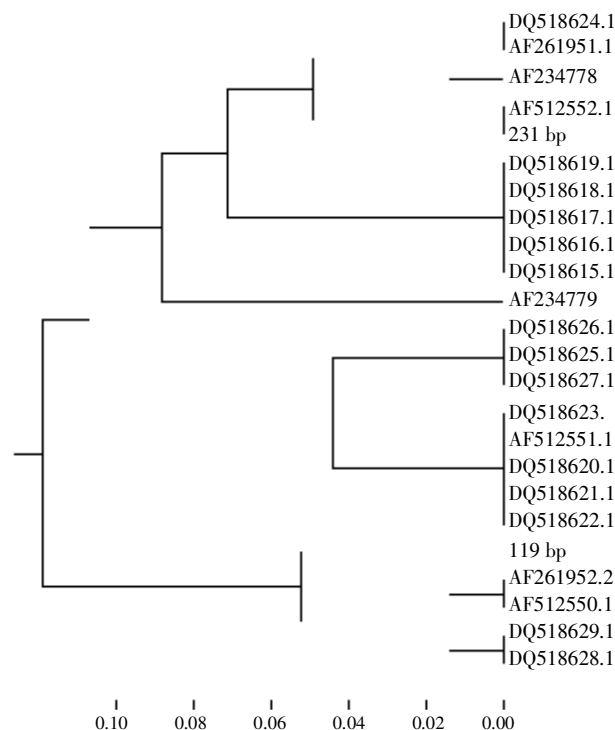
Fig.1 PCR result on DNA from *Anopheles maculatus* complex

2 序列比对结果

上述 PCR 产物的测序结果显示, 231 bp 条带序列为: 5'-CTGCAGGGCACATGAACACCGTTGAACGCA-TATTGCGCATCGGACGCTTCAACCCGACCGATGCACACATCCTTGAGTGCCTACCAAGTTATCTATTTTCTCCTACCAAAGTACCGTCCCATCCCCGTGATGGGCTGTCGCAGCATGGCGTGCTCGGACCCGCATCTGTCGGGACCGTGGCGTGTGATAGTGAGAGTGCTATTATAACGAATGGGGTTACACTATGGGGC-3'; 119 bp 条带序列为: 5'-GAACTGCAGGACACATGAACACCGTTGAACGCATATGCGCATCGGACGATTCAACCCGACCGATGCACACATCCTTGAGTGCCTACTCAGTTATCTTATATGCCCATACAGACTAGAC-3'。BLASTN 分析以上 2 条序列的结果显示, 119 bp 和 231 bp 条带分别与伪威氏按蚊 (登录号 AF512550.1) 和威氏按蚊 (登录号 AF512552.1) 同源, 序列一致性 (identity) 分别为 97% 和 98%。

3 进化关系分析

基于 ITS2 序列片段构建的多斑按蚊复合体的系统进化树 (图 2) 显示, 119 bp 片段与伪威氏按蚊聚为一支, 231 bp 片段则与威氏按蚊聚在一起。



注: 标尺为遗传距离 (%), 119 bp 和 231 bp 片段分别为本试验所得序列, 其余 ITS2 序列均来自 GenBank 数据库。

Note: The scale representing the genetic distance unit (percent divergence or percentage), 119 bp and 231 bp fragments fom present study, and the other ITS2 sequences from GenBank database.

图 2 基于 ITS2 片段构建的多斑按蚊复合体的系统进化树

Fig.2 UPGMA tree based on ITS2 sequences of *Anopheles maculatus* complex

讨 论

西藏地区自 20 世纪 50 年代起, 在林芝地区的雅鲁藏布江下游和察隅河河谷地带的墨脱、察隅等县偶有疟疾病例报道^[9]。2005 年林芝地区八一镇疟疾暴发。该地区的传疟媒介至今尚未确定, 影响疟疾综合防治措施的制定与实施。

西藏地区曾有多斑按蚊^[3]和威氏按蚊^[10]的报道。本次在林芝地区墨脱县现场调查共捕获按蚊 5 345 只, 其中多斑按蚊复合体 5 190 只 (97.1%), 带足按蚊 155 只 (2.9%), 多斑按蚊复合体为当地的优势种群。

本研究应用马雅军^[8]建立的我国多斑按蚊 5 成员种种型鉴别方法鉴定墨脱县多斑按蚊复合体, 共扩增出两种带型, 分别为伪威氏按蚊 (119 bp) 和威氏按蚊 (231 bp), 其中伪威氏按蚊占 98.1%, 为该地区的首次报道。同源性比对结果显示 119 bp 和 231 bp 片段分别与伪威氏按蚊 (登录号 AF512550.1) 和威氏按蚊 (登录号 AF512552.1) 同源。系统进化树亦显示 119 bp 片段与伪威氏按蚊聚为一支, 231 bp 片段则与威氏按蚊聚在一起, 进一步证明本次种型鉴定是可靠的。

陆宝麟^[3]曾报道威氏按蚊偏吸畜血,对疟原虫不敏感,在疟疾流行病学上意义不大;而伪威氏按蚊嗜吸人血,人血指数可达 42.85%,对疟原虫非常敏感,与我国云南省西双版纳地区的疟疾流行关系密切。董学书^[11]发现伪威氏按蚊和多斑按蚊的消长曲线与疟疾发病一致。本次现场调查结果显示,墨脱县按蚊种群相对单一,伪威氏按蚊为当地的主要优势蚊种,在种群数量上具备在当地传播疟疾的可能性,但是否为传疟媒介尚需根据生态习性和子孢子感染等资料综合分析方可判定。

由于西藏林芝地区地形复杂,地区性小气候存在明显,本次调查选择的调查点相对较少,同时蚊虫捕获围绕人房和牛舍,未进行野外蚊虫采集,故调查仅发现威氏按蚊和伪威氏按蚊,不能排除当地其他成员种存在的可能。

致谢 本研究得到西藏林芝地区卫生局、林芝地区疾病预防控制中心和墨脱县疾病预防控制中心的大力支持和帮助,上海第二军医大学马雅军教授惠赠多斑按蚊 5 成员种 DNA 样本,谨致感谢!

参 考 文 献

- [1] Walton C, Somboon P, O'Loughlin SM, *et al.* Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA[J]. *Infect Genet Evolution*, 2007, 7(1): 93-102.
- [2] Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships[J]. *Bull Entomol Res*, 2004, 94(6): 537-553.
- [3] Lu BL, Xu JJ, Yu Y, *et al.* Fauna Sinica, Insecta Vol. 9, Diptera: Culicidae II [M]. Beijing: Science Press, 1997. 88-106. (in Chinese)
(陆宝麟, 许锦江, 俞渊, 等. 中国动物志, 昆虫纲, 双翅目, 蚊科(下卷)[M]. 第 9 卷. 北京: 科学出版社, 1997. 88-106.)
- [4] Kengluetcha A, Singhasivanon P, Tiensuwan M, *et al.* Water quality and breeding habitats of anopheline mosquito in northwestern Thailand[J]. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*, 2005, 36(1): 46-53.
- [5] Vythilingam I, Phetsouvanh R, Keokenchanh K, *et al.* The prevalence of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in Sekong Province, Lao PDR, in relation to malaria transmission[J]. *Trop Med Int Hlth*, 2003, 8(6): 525-35.
- [6] Zhou HN, Zhang ZX, Curtis C, *et al.* Evaluation of the enzyme linked immunosorbant assay in detecting circumsporozoite protein of anopheline vectors in Yunnan[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2004, 22(4): 227-230. (in Chinese)
(周红宁, 张再兴, Curtis C, 等. ELISA 检测云南按蚊环孢子蛋白的评价[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(4): 227-30.)
- [7] Pan JY, Wu S, Wang XZ, *et al.* Investigation on malaria transmission vectors in Motuo County, Tibet Autonomous Region[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2008, 26(4): 281-285. (in Chinese)
(潘嘉云, 武松, 王学忠, 等. 西藏林芝地区墨脱县传疟媒介调查研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 281-285.)
- [8] Ma YJ, Qu FY, Dong XS, *et al.* Molecular identification of *Anopheles maculatus* complex from China[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2002, 20(6): 321-324. (in Chinese)
(马雅军, 瞿逢伊, 董学书, 等. 我国多斑按蚊复合体成员种的分子鉴别研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(6): 321-324.)
- [9] Zhou ZJ. *Malaria Control and Research in China* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991. 9. (in Chinese)
(周祖杰. 中国疟疾防治与研究[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 9.)
- [10] Ji SH, Lu BL. A note on the *Anopheles maculatus* group of China[J]. *Acta Zootaxon Sin*, 1991, 16(2): 224-227. (in Chinese)
(姬淑红, 陆宝麟. 中国多斑按蚊类群小记(双翅目: 蚊科)[J]. 动物分类学报, 1991, 16(2): 224-227.)
- [11] Dong XS, Zhou HN, Bi Y, *et al.* Geographical distribution, ecological habits and role in malaria transmission of *Anopheles maculatus* group in Yunnan[J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 1996, 3(2): 100-105. (in Chinese)
(董学书, 周红宁, 毕艳, 等. 云南多斑按蚊种群的地理分布、生态习性与疟疾的关系[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1996, 3(2): 100-105.)

(收稿日期: 2008-03-24 编辑: 高石)

(上接第 285 页)

道较少见。本文 2 例血小板显著减少, 并出现紫癜。血小板减少可能与下列因素有关: ①机体产生血小板抗体, 血小板破坏增加, 疟原虫作为抗原刺激机体免疫系统产生血小板相关抗体 (PAIgG), 血小板与 PAIgG 结合后流经脾脏红髓时, 与巨噬细胞充分接触, 大量血小板通过 Fc 受体被巨噬细胞吞噬, 故外周血液中血小板显著减少^[2]; ②脾脏增大, 大量血小板分布在脾血池, 使外周血小板减少, 脾脏对血小板清除和破坏过多; ③疟色素影响骨髓功能, 导致血小板生成减少。诊断中应注意与引起血小板减少的其他常见疾病的鉴别, 对血小板减少的疟疾患者最重要的是早期诊断和治疗。

参 考 文 献

- [1] Chen HZ. *Practice of Internal Medicine* [M]. 12rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 653-658. (in Chinese)
(陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 653-658.)
- [2] Ji AP, Gan SB, Hong ML, *et al.* Clinical observation of two malaria cases complicated with thrombocytopenia [J]. *Chin J Zoonoses*, 2000, 16(3): 118. (in Chinese)
(纪爱萍, 甘绍伯, 冯曼玲, 等. 疟疾伴发血小板减少的临床观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 118.)

(收稿日期: 2007-08-13 编辑: 盛慧锋)