

## • 论著 •

缅甸克钦地区媒介微小按蚊分布和传疟作用<sup>\*</sup>周晓俊<sup>1</sup>, 施文琦<sup>1</sup>, 张仪<sup>1\*</sup>, 周晓农<sup>1</sup>, 胡铃<sup>1</sup>, 王学忠<sup>2</sup>, 王剑<sup>2</sup>

(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. 云南省寄生虫病防治所, 云南普洱 665000)

**【摘要】 目的** 研究中缅边境微小按蚊分布和传疟作用。 **方法** 2008年8月24日~9月12日选择中缅边境5个自然村, 用诱蚊灯在人房和牛房捕蚊。以复合PCR鉴别微小按蚊A或C, 以巢式PCR检测蚊体内的疟原虫感染率, 以复合PCR鉴别微小按蚊腹血。 **结果** 复合PCR鉴定微小按蚊A型居多, 占98.04%, 疟原虫感染率为1.72%, 人房人血指数为56.12%。 **结论** 此时间段缅甸克钦地区微小按蚊A型居多, 且以吸人血为主, 具有较高的疟疾传播潜能。

**【关键词】** 微小按蚊; 复合PCR; 巢式PCR; 嗜血习性; 媒介能量

**【中图分类号】** R384.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2010)08-0578-03

[Journal of Pathogen Biology. 2010 Aug; 5(8): 578—580, 584.]

**Distribution of *Anopheles minimus* and its role in malaria transmission in the Kachin Region of Myanmar**

ZHOU Xiao-jun<sup>1</sup>, SHI Wen-qi<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1</sup>, HU Ling<sup>1</sup>, WANG Xue-zhong<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup> (1. National Institute of Parasitic Disease, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis, and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2. Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Puer 665000, Yunnan, China)

**【Abstract】 Objective** To study the distribution of *Anopheles minimus* and its role in malaria transmission in the Kachin Region of Myanmar. **Methods** Mosquitoes were collected using lamp traps in five villages along the Sino-Burmese border in the Kachin Region of Myanmar from August 24th to September 12th, 2008. Complex *An. minimus* A or C was identified by multiplex PCR and mammalian bloodmeals in *An. minimus*, and rates of *Plasmodium* infection of mosquitoes were detected by nested PCR. **Results** Complex A was prevalent in residences, accounting for 98.04% of mosquitoes collected. The rate of *Plasmodium* infection was 1.72%. The human blood index for residences was 56.12%. **Conclusion** During the period studied, *An. minimus* A was the major malaria vector in the Kachin Region of Myanmar. These mosquitoes prefer human blood and have a higher potential for malaria transmission.

**【Key words】** *Anopheles minimus*; multiplex PCR; nested PCR; biting habits; vectorial capacity

微小按蚊(广义)是东南亚地区重要的传疟媒介, 也是我国云南、海南等山区的主要传疟媒介<sup>[1]</sup>。随着湄公河流域经济开发, 长达上千公里的中缅边境线缅甸一侧目前处于原始疟区的自然状态, 造成该地区疟疾常有暴发流行, 向中国内地输出的疟疾病例增多<sup>[2,3]</sup>。而目前当地的疟疾媒介状况不清, 因此, 通过传播媒介按蚊的分布调查, 判定当地疟疾传播的主要和次要媒介, 制定有效的防疟措施具有重要流行病学意义。我国近年来也报道过有关微小按蚊复合体分类基础上的传疟作用<sup>[4]</sup>。Trung 等<sup>[5]</sup>的调查表明, 微小按蚊A较微小按蚊C有较高的嗜人血习性和经产率, 认为微小按蚊A的传疟作用高于微小按蚊C。本实验采用复合PCR鉴别微小按蚊A型、C型及蚊腹血, 采用巢式PCR检测蚊体内孢子的感染率, 以研究微小按蚊的生态习性和行为特征, 为当地微小按蚊的传疟能力的评估和媒介防控措施提供参考, 为我国边境地区的疟疾防控提供基线资料。

**材料与方法****1 调查地基本情况**

调查点位于缅甸联邦克钦邦昔懂县, 北纬24°42', 东经97°33', 海拔最低点210 m, 克钦邦政府所在地拉咱市的街道与云南盈江那邦镇一桥相连、隔河相望, 东与铜壁关接壤, 北与昔马乡山水相连。该地区系热带亚热带雨林季风气候, 年平均气温22.7℃, 终年无霜, 以种植油木和水稻为主, 是恶性疟和间日疟混合流行区。

**2 蚊虫采集**

采集时间从2008年8月24日~9月12日, 选择

**【基金项目】** “十一五”国家重大专项(No. 2008ZX10004-010); 科技部国家自然资源资源基础平台项目(No. 2005DKA21104); “十五”国家科技攻关计划项目(No. 2003BA71ZA09-01)。

**【通讯作者】** 张仪, E-mail: zhang1972003@yahoo.com.cn

**【作者简介】** 周晓俊(1981-), 女, 山东人, 病原生物学硕士。主要从事媒介体内病原体的分子检测的研究。

E-mail: zhouxiaojun\_2004@163.com

与云南西南部盈江县那班镇接壤的孟先央、石鱼央、扎图共和勒买央4个自然村及那班镇景颇寨和王家寨。采用美国CDC诱蚊灯,于日落后19时至翌晨6时,在人房、牛房通宵诱捕共20次,并不定期在各类孳生地采集蚊幼虫。捕获的蚊虫立即用乙醚麻醉处死,并置干燥剂硅胶,常温下保存,带回实验室后-20℃保存;或待蚊虫自然死亡后(也可人工处死),隔天置管内保存。

### 3 蚊虫基因组DNA提取

按Collins等<sup>[6]</sup>的方法提取蚊基因组DNA。蚊虫去头,将胸部与腹部分开(单只无腹血者取去头整蚊),按下述步骤抽取DNA:匀浆液65℃预热,将单蚊腹部置于1.5 ml离心管中,加入120 μl预热的匀浆液1.5 μl RNaseA,用塑料研磨棒研磨至匀浆状(现场干燥蚊标本加入匀浆液之前,需用20 μl双蒸水浸泡约20 min),37℃孵育1 h,加入3 μl蛋白酶K(20 μg/μl),50℃水浴60 min;加入苯酚和氯仿各60 μl,震荡混匀,4℃14 000 g冷冻离心10 min,留取上清液;加入2~2.5倍体积100%冰乙醇(-20℃)过夜,沉淀核酸,同上离心15 min,弃上清液,沉淀置37℃恒温箱干燥;加50~100 μl 1×TE溶解沉淀,置0℃冰箱保存待用。

### 4 蚊腹血基因组DNA提取

以饱血蚊腹部为材料进行基因组DNA提取,步骤如下:匀浆液65℃预热,将单只蚊腹部置于1.5 ml离心管中,加入100 μl预热的匀浆液,用塑料研磨棒研磨至匀浆状(现场干燥标本加入匀浆液之前,需用20 μl双蒸水浸泡约20 min),65℃孵育1 h;加8 mol/L(15 μl)乙酸钾,混匀,置碎冰中45 min,4℃,14 000 g冷冻离心10 min,留取上清液,加入2~2.5倍体积100%冰乙醇(-20℃)沉淀核酸,室温下放置5 min,同上离心15 min,弃上清液;加75%乙醇200~300 μl(-4℃)洗涤盐分,同上离心10 min,弃上清液,沉淀置37℃恒温箱干燥;加50~100 μl双蒸灭菌水(ddH<sub>2</sub>O)溶解沉淀,置0℃冰箱保存待用。

### 5 复合PCR鉴别蚊种和蚊腹血

**5.1 复合PCR扩增鉴别蚊种** 根据文献[7]合成复合PCR鉴别微小按蚊复合体A型和C型所用的特异引物:5.8S通用引物(Au):ATCACTCGGCTCATG-GATCG;微小按蚊A(Ama):GGGCGCATGTAGTTAGAGTTG;微小按蚊C(Amc):GGTGGCCCACT-CAATACGGGTG。乌头按蚊(Aa):AGGTTACAC-CCCGCTCGG;杰普尔按蚊(Aj):CTCCCCAT-AGCGCG TAAGC,乌头按蚊和杰普尔按蚊为对照。蚊种鉴定复合PCR反应体系为在0.2 ml的PCR管中依次加入以下试剂:DNA模板1.0 μl,2×Mix

Buffer 12.5 μl,引物Au(10 μmol/L)、Ama(10 μmol/L)、Amc(10 μmol/L)各0.5 μl,最后加ddH<sub>2</sub>O补足25.0 μl反应体系。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,51℃退火45 s,72℃延伸45 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物4℃保存,进行1.5%琼脂糖凝胶(含5 μg/ml EB)电泳。

**5.2 复合PCR扩增鉴别蚊腹血** 依据文献[8]合成通用引物和5种动物血的种特异性引物,引物序列如下:人HumanF:GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT;猪PigF:CCTCGCAGCCGTACATCTC;羊GoatF:CCTAATCTTAGTACTTGTACCTTCCTC;牛CowF:CATCGGCACAAATTTAGTCG;狗DogF:GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT;反向通用引物UnrevUNR:GGTTGTCCTCCAAT-TCATGTTA;正向通用引物UnforUNF:TGAGGA-CAAATATCATTCTGAGG。蚊腹血鉴定复合PCR反应体系为在0.2 ml的PCR管中依次加入以下试剂:DNA模板1 μl,2×Mix Buffer 12.5 μl,引物UNR(10 μmol/L)、UNF(10 μmol/L)、HumanF(10 μmol/L)、CowF(10 μmol/L)、DogF(10 μmol/L)、GoatF(10 μmol/L)和PigF(10 μmol/L)各0.5 μl,最后加ddH<sub>2</sub>O补足25.0 μl反应体系。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物4℃保存,进行1.5%琼脂糖凝胶(含5 μg/ml EB)电泳。

### 6 巢式PCR鉴别疟原虫感染

依据文献[9]合成巢式PCR鉴别疟原虫属及恶性疟、间日疟的种特异引物序列如下:rplu<sup>5</sup>:TTA-AAATTGTTGCAGTTAAAACG;rplu<sup>6</sup>:CCTGTT-GTTGCCTTA AACTT;PfF:TTAAACTGGTTT-GGGAAAACCAAATATATT;PfR:ACAC AAT-GAACTCAATCA TGACTACCCGTC;PvF:CGCT-TCTAGCTTAATCCACATA ACTGATAC;PvR:ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA。第一轮PCR反应体系为在0.2 ml的PCR管中依次加入以下试剂:DNA模板1 μl,2×Mix Buffer 12.5 μl,引物rplu<sup>5</sup>(10 μmol/L)、引物rplu<sup>6</sup>(10 μmol/L)各0.5 μl,ddH<sub>2</sub>O补足25.0 μl反应体系;第二轮PCR反应体系为在0.2 ml的PCR管中依次加入以下试剂:模板为第一轮DNA产物1 μl,2×Mix Buffer 12.5 μl,引物PfF(10 μmol/L)、PfR(10 μmol/L)、PvF(10 μmol/L)和PvR(10 μmol/L)各0.5 μl,ddH<sub>2</sub>O补足25.0 μl反应体系。两轮PCR反应条件均为95℃预变性5 min;95℃变性1 min,55℃退火1 min 30 s,72℃延伸1 min 30 s,共35个循环;最后72℃再延伸10 min。PCR产物4℃保存,进行1.5%琼脂糖凝胶

(含 5  $\mu$ g/ml EB)电泳。以上 PCR 产物均由英骏生物技术有限公司测序,由 BLAST 比对确认。

结 果

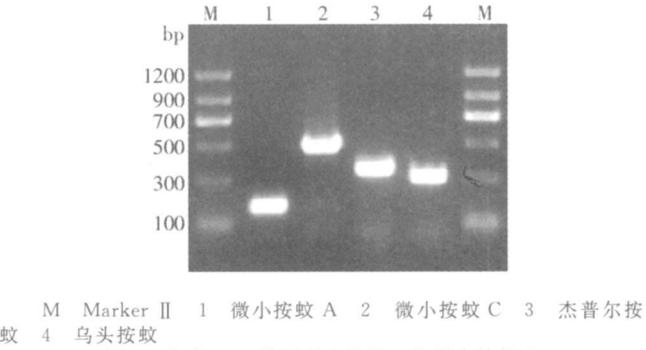
1 复合 PCR 鉴别微小按蚊 A 和 C

不同蚊种经复合 PCR 检测,获得其产物的大小不尽相同:乌头按蚊为 306 bp,杰普尔按蚊为 346 bp,微小按蚊 A 为 184 bp,微小按蚊 C 为 509 bp。对照蚊种均为特异扩增(图 1)。对采集的 408 只微小按蚊进行复合 PCR 检测,鉴定 A 型 400 只,占 98.04%;C 型 8 只,占 1.96%。微小按蚊 A 型捕自人房 383 只,捕自牛房 17 只;8 只微小按蚊 C 型均捕自人房。

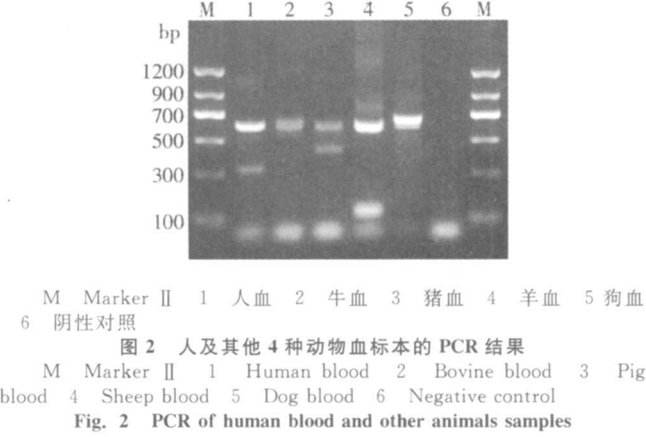
2 多重 PCR 检测蚊腹血来源

本实验应用的多重 PCR 从理论上讲,每个标本可扩增出 2 条带,1 条是正、反向通用引物扩增产生的阳性对照带,为 623 bp,另 1 条是蚊腹血来源动物种特异引物与通用引物扩增产生的种特异条带,长度如下:334 bp(人)、453 bp(猪)、132 bp(羊)、561 bp(牛)和 680 bp(犬)。若蚊腹血来源动物不是上述 5 种或蚊腹无血,则无动物种特异条带。本实验采集人及牛、猪、羊、犬血标本进行扩增验证,获得的扩增条带与理论值一致(图 2),其中犬血无通用的阳性对照条带。本研究共检测人房来源腹血 98 例,其中腹部抽提 DNA 为模板 46 例,研磨后发现有的标本腹部有血而无法肉眼识别,此类用整蚊基因组 DNA 为模板代替共 52 例,

研磨蚊虫全蚊蚊腹血及蚊 DNA 多重 PCR 结果见表 1。



M Marker II 1 微小按蚊 A 2 微小按蚊 C 3 杰普尔按蚊 4 乌头按蚊  
图 1 复合 PCR 鉴别微小按蚊 A 和微小按蚊 C  
M Marker II 1 *Anopheles minimus* A 2 *Anopheles minimus* C 3 *Anopheles jeyporiensis* 4 *Anopheles aconitum*  
Fig. 1 Multiplex-PCR identification of *A. minimus* A, *A. minimus* C, *A. jeyporiensis* and *A. aconitum*



M Marker II 1 人血 2 牛血 3 猪血 4 羊血 5 狗血 6 阴性对照  
图 2 人及其他 4 种动物血标本的 PCR 结果  
M Marker II 1 Human blood 2 Bovine blood 3 Pig blood 4 Sheep blood 5 Dog blood 6 Negative control  
Fig. 2 PCR of human blood and other animals samples

表 1 人房微小按蚊腹血 DNA 和全蚊 DNA 多种 PCR 结果  
Table 1 PCR results from mammalian bloodmeals in *A. minimus* which collected in human house

标本 Sample	检测份数 No. examined	人血 Human blood		牛血 Bovine blood		猪血 Pig blood		其他动物血 Other animal's blood	
		阳性份数 No. of positive	阳性率 Positive rate(%)	阳性份数 No. of positive	阳性率 Positive rate(%)	阳性份数 No. of positive	阳性率 Positive rate(%)	阳性份数 No. of positive	阳性率 Positive rate(%)
蚊腹血 DNA The DNA of mammalian bloodmeals in mosquitoes	46	41	89.14	0	0	3	6.52	1	2.17
全蚊 DNA The DNA of mosquitoes	52	14	26.92	4	7.69	17	32.69	10	19.24
合计 Total	98	55	56.12	4	4.08	20	20.41	11	11.23

3 巢式 PCR 检测蚊体内疟原虫

取第 1 轮 PCR 产物 1  $\mu$ l 作为第 2 轮 PCR 模板进行扩增,恶性疟阳性条带为 204 bp。共检测蚊标本 408 份,7 份阳性,阳性率为 1.72%。阳性蚊均为微小按蚊 A 型。

讨 论

微小按蚊是由多个亲缘种组成的复合体,迄今已记录有微小按蚊 A、B、C、D 和 E,其中 A、C 的分布较

广,且对疟疾传播作用有所差异<sup>[4]</sup>。因此,在复合体鉴别的基础上,研究其在疟疾传播中的作用,对于我国疟疾控制策略的制定具有重要的指导意义,本研究显示中缅边境地区微小按蚊 A 的比例明显高于微小按蚊 C,其原因有可能是采集的时间处于微小按蚊 A 活动高峰,此媒介人房人血指数为 56.12%,说明其嗜人血指数比较高,另外还需要补充种群数量消长及其与疟疾发病情况相关性等研究,才能进一步判断其是否为主要的传疟媒介。

近几年有学者不断通过构建广州管圆线虫幼虫 cDNA 质粒文库来寻找有效的诊断抗原,现已得到的有广州管圆线虫幼虫半乳凝素和半胱氨酸蛋白酶抑制剂等,其大小均为 40 ku。广州管圆线虫幼虫半乳凝素能被广州管圆线虫感染血清识别<sup>[9]</sup>,广州管圆线虫幼虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂能诱导小鼠产生一定水平的保护性免疫力<sup>[10]</sup>。本研究选取的广州管圆线虫 V 期幼虫 55 ku 抗原,经 Western blot 鉴定,能被感染广州管圆线虫 V 期幼虫大鼠血清识别。用该抗原免疫 BALB/c 小鼠,建立杂交瘤细胞株,制备的单克隆抗体用于检测感染广州管圆线虫大鼠血清循环抗原,阳性率 73.3%(22/30)。实验用大鼠血清采集于感染广州管圆线虫 III 期幼虫后 21 d,此时广州管圆线虫 III 期幼虫已经发育成 V 期幼虫并移行至脑。解剖大鼠脑组织,发现有广州管圆线虫 V 期幼虫。

本实验制备的单克隆抗体具有较高的特异性,为进一步应用单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 法检测广州管圆线虫病患者血清和脑脊液中的循环抗原提供了一定的参考价值。

【参考文献】

[1] Ko RC, Chan SW, Chan KW, et al. Four documented cases of eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Hong Kong[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987, 81(5): 807

—10.  
[2] Yü CY. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg, 1976, 25(2): 233—49.  
[3] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256: 495—7.  
[4] 邱玉华, 张学光, 谢炜. 一种显著提高小鼠生产单抗腹水产量的新方法[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11, 366—7.  
[5] Chye SM, Yen CM, Chen ER. Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of angiostrongyliasis [J]. Am J Trop Med Hyg, 1997, 56(4): 408—12.  
[6] Shih HH, Chen SN. Immunodiagnosis of angiostrongyliasis with monoclonal antibodies recognizing a circulating antigen of mol. WT91,000 from *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Int J Parasitol, 1991, 21: 171—7.  
[7] 谭峰, 潘长旺, 梁韶晖. 抗广州管圆线虫成虫单克隆抗体的研制及初步应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 209—12.  
[8] 梁韶晖, 黄慧聪, 潘长旺, 等. 单克隆抗体检测广州管圆线虫循环抗原的研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(43): 3057—61.  
[9] 郝丽, 吴焜, 陈晓光. 广州管圆线虫半乳凝素基因的克隆表达、蛋白纯化及免疫反应性研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(5): 584—7.  
[10] 潘智华, 何藹, 程梅. 广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆表达及免疫保护作用研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 534—8.

【收稿日期】 2010-05-29 【修回日期】 2010-07-27

(上接 580 页)

随着我国疟疾流行程度下降,病例高度分散,监测难度大,加上人群流动频繁,时有发生输入的疟疾病例。中缅边境贸易往来频繁,传播条件并未根本改变,需加强监测。我国已经确定疟疾消除目标,众所周知,一个国家的疟疾消除不仅仅是局域性的规划,此目标的实现和边境疟疾控制息息相关,本研究所应用的巢式 PCR 用于中缅边境疟疾监测中检测媒介自然感染率具有较高的敏感性、特异性,并可一次同时检测恶性疟和间日疟感染。本调查研究获得当地蚊虫疟原虫感染率高达 1.72%,值得我国边境疟疾防治关注。

【参考文献】

[1] 董学书. 云南疟疾媒介及其生态学研究[A]. 云南疟疾控制所 1997~1998 年度疟疾控制和研究年报[C]. 1999. 14: 167.  
[2] 李华宪, 杨沅川, 姜华. 云南省 2003 年疟疾流行态势及暴发情况分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2005, 3(4): 152—6.  
[3] 周水森, 汤林华, 盛慧锋. 2003 年全国疟疾形势[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(6): 385—7.  
[4] 郑彬, 汤林华, 马雅军, 等. 云南微小按蚊 A 和 C 栖性的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(3): 146—9.

[5] Trung HD, Van Bortel W, Sochantha T, et al. Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia [J]. Trop Med Int Hlth, 2004, 19: 230—7.  
[6] Collins F H, Mendez M A, Rasmussen M O, et al. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex [J]. Am J Trop Med Hyg, 1987, 37(1): 37—41.  
[7] Phuc HK, Ball AJ, Son L, et al. Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the *Myzomyia* Series from Southeast Asia [J]. Med Vet Entomol, 2003, 17: 423—8.  
[8] Rebekah J, Douglas E. Identification of mammalian bloodmeals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(2): 336—42.  
[9] Ebrahimzadeh A, Fouladi B, Fazaeli A, et al. High rate of detection of mixed infections of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in South-East of Iran, using nested PCR[J]. Para Int, 2007, 56: 61—4.

【收稿日期】 2010-04-09 【修回日期】 2010-07-16