

文章编号:1000-7423(2011)-02-0134-04

【现场研究】

中缅边境(西段)传疟媒介的初步调查

施文琦¹, 周晓俊¹, 张仪^{1*}, 周晓农¹, 胡铃¹, 王学忠², 王剑², 李艳君³

【摘要】 目的 了解中缅边境(西段)传疟媒介的分布与构成。方法 2008 年 8~9 月,在中缅边境的中国云南省盈江县及其相邻的缅甸昔懂县 6 个自然村,用诱蚊灯在人房和牛棚共进行 20 次通宵诱捕。将捕获的蚊虫以传统方法进行形态学鉴定,然后用复合 PCR 法鉴别微小按蚊、乌头按蚊和杰普按蚊。同时,抽提部分蚊虫标本总基因组 DNA,以巢式 PCR 方法检测蚊体内的疟原虫感染情况。结果 共捕获各类蚊虫 4 571 只,隶属 9 属 50 种,其中按蚊属是优势蚊种,占总量的 54.32%(2 483/4 571)。人房和牛棚的按蚊蚊种构成差异有统计学意义,其中人房以腹簇按蚊、微小按蚊和中华按蚊为主,而牛棚以腹簇按蚊(223 只)、环纹按蚊(184 只)、迷走按蚊(131 只)和杰普按蚊(129 只)为主。对比有牛村和无牛村中人房的蚊种构成发现,有牛村的人房以微小按蚊(260 只)和腹簇按蚊(49 只)为主,而无牛村人房则以腹簇按蚊(481 只)和中华按蚊(124 只)为主。巢式 PCR 检测 1 075 只按蚊,其中 9 只检出疟原虫阳性,分别为微小按蚊(7/408)、乌头按蚊(1/125)和伪威氏按蚊(1/101)。经测序鉴定均为恶性疟原虫感染,目的条带长 204 bp。结论 中缅边境(西段)蚊虫密度高、种类多,在传疟作用中以微小按蚊最为重要,乌头按蚊和伪威氏按蚊亦为当地的传播媒介。

【关键词】 传疟媒介;复合 PCR;巢式 PCR;子孢子;中缅边境

中图分类号:R384.111

文献标识码:A

Investigation on Malaria Vectors in Western Part of China-Myanmar Border

SHI Wen-qi¹, ZHOU Xiao-jun¹, ZHANG Yi^{1*}, ZHOU Xiao-nong¹, HU Ling¹,
WANG Xue-zhong², WANG Jian², LI Yan-jun³

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Puer 665000, China; 3 Institute of Pathogens and Vectors, Dali University, Dali 671000, China)

【Abstract】 Objective To reveal the distribution and composition of malaria-transmitting vectors on the western part of China-Myanmar border. **Methods** An entomological survey of malaria vectors was carried out in six villages of Yingjiang County and Xidong County on China-Myanmar border between August and September, 2008. Mosquitoes in human dwellings and cattle sheds were collected by overnight trapping with ovitrap light. The mosquitoes were firstly identified morphologically, and then *Anopheles minimus* A and C, *An. aconitus*, and *An. jeyporiensis* were identified by using multiplex PCR. Some mosquitoes were selected to extract the total genomic DNA, and detect sporozoites by nested PCR. **Results** A total of 4 571 mosquitoes were captured with 54.32% (2 483/4 571) of anopheline mosquitoes. There was significant difference in *Anopheles* species composition in human dwellings and cattle sheds. The main species in human dwellings were *An. kochi*, *An. minimus*, and *An. sinensis*, while the principal species in cattle sheds consist of *An. kochi* (223), *An. annularis* (184), *An. vagus* (131), and *An. jeyporiensis* (129). Furthermore, the composition in human dwellings of villages with and without cattle was significantly different. *An. minimus* (260) and *An. kochi* (49) were the most important species in villages with cattle, whereas *An. kochi* (481) and *An. sinensis* (124) were the key species in villages without cattle. A total of 1 075 mosquitoes were examined for sporozoites and 9 mosquitoes were found to be infected. Only three species, i.e. *An. minimus* (7/408), *An. aconitus* (1/125) and *An. pseudowillmori* (1/101) were infected with malaria parasite. All sporozoites were identified as *Plasmodium falciparum* by sequencing, the target fragment was 204 bp. **Conclusion** The species composition of mosquitoes is complex in the study sites on the western part of China-Myanmar border, and *An. minimus* is the major malaria vector. Additionally, *An. aconitus* and *An. pseudowillmori* are also confirmed as potential malaria vector in this area.

【Key words】 Malaria vector; Multiplex PCR; Nested-PCR; Sporozoite; China-Myanmar border

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目(No. 2008ZX10004-010);科技部自然资源平台项目(No. 2005DKA21104)

作者单位:1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,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,普洱 665000;3 大理医学院病原与媒介生物研究所,大理 671000

* 通讯作者, E-mail: yizhang15@hotmail.com

Supported by the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the 11th Five-Year Plan Period (No. 2008ZX10004-010) and the Natural Resources Platform Project from the Ministry of Science and Technology (No. 2005DKA21104)

* Corresponding author, E-mail: yizhang15@hotmail.com

云南省曾是中国疟疾严重流行地区之一, 因其特殊的地理环境和复杂的气候条件, 疟区分布较为复杂, 传疟媒介蚊种也较多。疟疾流行病学调查发现自然感染、并确认为传疟媒介的按蚊有微小按蚊 (*Anopheles minimus*)^[14]、嗜人按蚊 (*An. anthropophagus*)、昆明按蚊 (*An. kunmingensis*)^[5]、中华按蚊 (*An. sinensis*)、大劣按蚊 (*An. dirus*)^[6]和杰普按蚊 (*An. jeyporiensis*)^[7], 此外, 伪威氏按蚊 (*An. pseudowillmori*)^[3]亦可能是传疟媒介。随着媒介防制工作的开展, 以及自然环境和人为因素的影响, 媒介按蚊的生态习性也有所改变。为了解中缅边境 (西段) 的传疟媒介, 本研究选择防蚊灭蚊措施较贫乏、较少受人为因素影响的云南边境与缅甸联邦克钦邦昔懂县进行媒介按蚊调查, 以期为进一步制定该地区的疟疾消除措施提供参考。

材料与方法

1 调查点概况

缅甸克钦邦昔懂县位于 N 24°42', E 97°33', 海拔最低点为 210 m, 与中国云南省盈江县那邦镇隔河相望, 东与云南省铜壁关乡接壤, 北与云南省昔马乡相连。当地系热带亚热带雨林季风气候, 年平均温度 22.7 °C, 年降雨量 2 655 mm, 终年无霜, 四季不分明, 以种植水稻为主, 兼种旱稻, 属于以恶性疟为主的稳定疟区。

2 调查方法

2.1 蚊种分布调查 2008 年 8 月 24 日~9 月 12 日, 选择与中国云南省西部盈江县那邦镇接壤的缅甸昔懂县孟先央、石鱼央、扎图共和勒买央等 4 个自然村, 以及云南那邦镇景颇寨和王家寨 2 个自然村, 在人房、牛房 (棚) 悬挂诱蚊灯 (美国 CDC 诱蚊灯, 6 W 50 mm) 进行不定期诱捕, 每次从 19: 00 至翌晨 6: 00, 共进行 20 次通宵诱捕, 将捕获的蚊虫标本带回实验室鉴定。

2.2 有牛和无牛村按蚊构成比较 在缅甸 2 个有牛村 (石鱼央和勒买央) 和 2 个无牛村 (孟先央和扎图共) 用诱蚊灯诱捕按蚊, 比较按蚊分布。人房、牛房 (棚) 间的距离约为 20~30 m。4 个观察村均位于次生林环绕的山脚地带。以人和牛为诱饵, 将诱蚊灯捕获的按蚊作为蚊种组成, 并比较其对不同宿主的吸血趋性。

2.3 复合 PCR 鉴别按蚊蚊种 捕获按蚊经形态学鉴定后, 用酚-氯仿法抽提按蚊 DNA 作为模板。按文献 [8] 合成鉴别几种按蚊所用的复合 PCR 特异引物序列: 5.8S rRNA 通用引物 (Au)、微小按蚊 A 型引物 (Ama)、微小按蚊 C 型引物 (Amc)、乌头按蚊引物 (Aa) 和杰普按蚊引物 (Aj), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成 (表 1)。以乌头按蚊和杰普按蚊作为阳性对照。PCR 反应体系为: DNA 模板 1.0 μl, 2×PCR 反应混合液 12.5 μl, 上述引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μl, 加 ddH₂O 补足 25.0 μl。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 51 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

2.4 巢式 PCR 检测蚊体内疟原虫子孢子感染情况 检测微小按蚊 408 只、乌头按蚊 125 只、伪威氏按蚊 101 只、多斑按蚊 77 只和中华按蚊 214 只。根据文献 [9] 设计鉴别疟原虫属、恶性疟和间日疟的种特异引物 rplu5、rplu6, PfF、PfR、PvF 和 PvR, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成 (表 1)。巢式 PCR 第 1 轮反应体系为: DNA 模板 1 μl, 2×PCR 反应混合液 12.5 μl, 引物 rplu5、rplu6 (10 μmol/L) 各 0.5 μl, ddH₂O 补足 25.0 μl。第 2 轮 PCR 反应体系: 第 1 轮 PCR 产物 1 μl, 2×PCR 反应混合液 12.5 μl, 引物 PfF、PfR、PvF 和 PvR (10 μmol/L) 各 0.5 μl, 加 ddH₂O 补足 25.0 μl。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1.5 min, 72 °C 1.5 min 共 35 个循环; 72 °C 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

表 1 引物序列
Table 1 Specific primers in diagnostic PCR assay

引物名称 Primer name	引物 (5'→3') Primers
Au 通用引物 5.8s rRNA	ATCACTCGGCTCATGGATCG
Ama <i>An. minimus</i> A	GGGCGCATGTAGTTAGAGTTG
Amc <i>An. minimus</i> C	GGTTGCCCCACTCAATACGGGTG
Aa <i>An. aconitus</i>	AGGTTACACCCGCTCGG
Aj <i>An. jeyporiensis</i>	CTCCCATAGCGCGTAAGC
rplu5	TTAAATTTGTTGCAGTTAAACG
rplu6	CCTGTGTTGTCCTTAAACTT
PfF	TTAAACTGGTTTGGAAAACCAATATATT
PfR	ACACAATGAACATCAATCATGACTACCCGTC
PvF	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC
PvR	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA

3 统计学分析

用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。

结 果

1 蚊种构成

共捕获蚊虫 4 571 只, 经形态学鉴定, 隶属 9 属 50 种。其中, 按蚊共 2 483 只, 属 18 种, 占总数的 54.32% (2 483/4 571) (表 2); 在人房共捕获 1 452 只 (58.48%, 1 452/2 483), 主要为腹簇按蚊 (531 只)、微小按蚊 (391 只) 和中华按蚊 (193 只); 牛房共捕获 1 031 只 (41.52%, 1 031/2 483), 主要为腹簇按蚊 (223 只)、环纹按蚊 (84 只)、迷走按蚊 (131 只) 和杰普按蚊 (129 只)。

有牛村人房分布的按蚊主要为微小按蚊 (260 只, 59.36%) 和腹簇按蚊 (49 只, 11.19%), 无牛村人房分布的主要为腹簇按蚊 (481 只, 63.96%) 和中华按蚊 (124 只, 16.49%) (表 3)。

表 2 中缅边境(西段)按蚊在人房和牛房(棚)构成状况
Table 2 *Anopheles* species composition in human dwellings and cattle sheds on China-Myanmar border (western part)

蚊种 species	人房 Human dwelling		牛房 Cattle shed	
	捕获蚊数 No. collected	构成比(%) Composition(%)	捕获蚊数 No. collected	构成比(%) Composition(%)
腹簇按蚊 <i>An. kochi</i>	531	36.57	223	21.63
微小按蚊 <i>An. minimus</i>	391	26.93	17	1.65
中华按蚊 <i>An. sinensis</i>	193	13.29	21	2.04
多斑按蚊 <i>An. maculatus</i>	77	5.30	2	0.19
伪威氏按蚊 <i>An. pseudowillmori</i>	64	4.41	37	3.59
环纹按蚊 <i>An. annularis</i>	62	4.27	184	17.85
迷走按蚊 <i>An. vagus</i>	36	2.48	131	12.71
乌头按蚊 <i>An. aconitus</i>	30	2.07	95	9.21
杰普按蚊 <i>An. jeyporiensis</i>	21	1.45	129	12.51
美彩按蚊 <i>An. splendidus</i>	15	1.02	56	5.44
带足按蚊 <i>An. peditaeniatus</i>	11	0.76	69	6.69
菲律宾按蚊 <i>An. philippinensis</i>	7	0.48	45	4.36
须喙按蚊 <i>An. barbirostris</i>	5	0.34	11	1.07
溪流按蚊 <i>An. fluviatilis</i>	4	0.28	2	0.19
大劣按蚊 <i>An. dirus</i>	2	0.14	0	0
棋斑按蚊 <i>An. tessellatus</i>	2	0.14	8	0.78
库态按蚊 <i>An. culicifacies</i>	1	0.07	0	0
银足按蚊 <i>An. argyropus</i>	0	0	1	0.09
合计 Total	1 452	100	1 031	100

表 3 有牛村和无牛村按蚊构成比较
Table 3 *Anopheles* species composition in villages with and without cattle

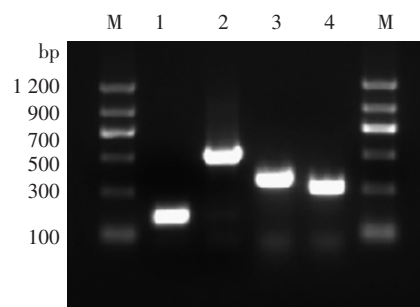
蚊种 Species	有牛村 Village with cattle		无牛村 Village without cattle
	人房蚊数(%) No. collected from human dwelling (%)	牛房蚊数(%) No. collected from cattle shed (%)	人房蚊数(%) No. collected from human dwelling (%)
微小按蚊 <i>An. minimus</i>	260 (59.36)	17 (2.35)	65 (8.65)
腹簇按蚊 <i>An. kochi</i>	49 (11.19)	143 (19.75)	481 (63.96)
迷走按蚊 <i>An. vagus</i>	27 (6.16)	112 (15.47)	14 (1.86)
乌头按蚊 <i>An. aconitus</i>	19 (4.34)	50 (6.91)	4 (0.53)
杰普按蚊 <i>An. jeyporiensis</i>	19 (4.34)	52 (7.18)	6 (0.80)
伪威氏按蚊 <i>An. pseudowillmori</i>	16 (3.65)	18 (2.49)	37 (4.92)
环纹按蚊 <i>An. annularis</i>	7 (1.60)	225 (31.08)	3 (0.40)
大劣按蚊 <i>An. dirus</i>	2 (0.46)	—	—
中华按蚊 <i>An. sinensis</i>	1 (0.23)	29 (4.01)	124 (16.49)
其他 * Other species*	38 (8.67)	78 (10.76)	18 (2.39)
合计 Total	438 (100)	724	752

注: * 包括美彩按蚊 (*An. splendidus*)、菲律宾按蚊 (*An. philippinensis*)、带足按蚊 (*An. peditaeniatus*)、溪流按蚊 (*An. fluviatilis*)、棋斑按蚊 (*An. tessellatus*)、须喙按蚊 (*An. barbirostris*)、多斑按蚊 (*An. maculatus*) 和库态按蚊 (*An. culicifacies*) 等 8 种。

Note: * Other species include *An. splendidus*, *An. philippinensis*, *An. peditaeniatus*, *An. fluviatilis*, *An. tessellatus*, *An. barbirostris*, *An. maculatus*, and *An. culicifacies*.

2 复合 PCR 鉴别蚊种

复合 PCR 结果表明, 微小按蚊 A 型、微小按蚊 C 型、乌头按蚊和杰普按蚊的目的基因分别为 184、509、306 和 346 bp (图 1)。



M: DNA 标志物; 1: 微小按蚊 A 型; 2: 微小按蚊 C 型; 3: 杰普按蚊; 4: 乌头按蚊。

M: DNA marker; 1: *An. minimus* A; 2: *An. minimus* C; 3: *An. jeyporiensis*; 4: *An. aconitus*.

图 1 复合 PCR 方法鉴别微小按蚊 A、微小按蚊 C、杰普按蚊和乌头按蚊

Fig.1 Multiplex-PCR identification of *An. minimus* A, *An. minimus* C, *An. jeyporiensis*, and *An. aconitus*

3 按蚊疟原虫子孢子的感染情况

经巢式 PCR 检测按蚊标本 1 075 只, 其中微小按蚊 408 只, 阳性标本 7 只, 子孢子阳性率为 1.7%; 乌头按蚊 125 只, 阳性 1 只, 阳性率为 0.8%; 伪威氏按蚊 101 只, 阳性 1 只, 阳性率为 1.0%。统计学分析表明, 3 种按蚊疟原虫子孢子感染率的差异均无统计学意义 ($\chi^2=3.06$, $P>0.05$)。检测杰普按蚊 150 只、中华按蚊 214 只、多斑按蚊 77 只, 均为阴性。PCR 阳性结果经测序分析, 均为恶性疟原虫。

讨 论

与中国接壤的缅甸北部地区经济发展较落后, 几乎未开展过媒介防制工作, 加上两国边民走亲访友和外出务工等多种因素的影响, 增加了中国输入性疟疾发生的机会^[10]。本次调查在有牛村的人房共捕获 16 种按蚊, 主要吸血蚊种为微小按蚊、腹簇按蚊和迷走按蚊等; 在无牛村的人房共捕获按蚊 14 种, 主要为腹簇按蚊、中华按蚊和微小按蚊等。这些结果说明当地按蚊种类多, 吸血情况相对复杂, 常兼吸人血和牛血。

当地居民居住条件较差, 基本无防蚊措施, 增加了蚊虫叮咬和被疟原虫感染的机会。文献已有云南媒介蚊种的记载^[11,12], 本调查研究在传统形态学调查的基础上, 增加了分子生物学技术的检测方法, 保证了媒介判定的准确性, 亦弥补了形态学鉴定时可能出现的误差。经巢式 PCR 检测, 微小按蚊、乌头按蚊和伪威氏按蚊的子孢子自然感染阳性率分别为 1.7%、0.8%和 1.0%, 均为恶性疟原虫; 而检测的杰普按蚊、中华按蚊和多斑按蚊均为阴性。乌头按蚊则首次判定为该地区的媒介蚊种。

缅甸克钦邦政府允许中国民间组织在拉咱市成立经济开发区, 开展边境贸易等, 因此大量的中国内地无免疫力人群涌入, 如果未采用任何防护措施, 易造成疟疾的暴发, 且向内地输入疟疾病例。因此, 通过此次媒介按蚊的分布和生态习性调查, 可为制定该地区的疟疾防治措施提供依据。

参 考 文 献

- [1] Ho C, Fang LC. Studies on malaria in new China[J]. Chin Med J, 1958, 77(6): 533-551.
- [2] Dong XS. Anophelinae//The Mosquito Fauna of Yunnan, China

(Vol.1)[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1993: 175. (in Chinese)
(董学书. 按蚊亚科//云南蚊类志(上卷)[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1993: 175.)

- [3] Dong XS. The malaria vectors and their ecology in Yunnan Province[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2000, 13(2): 144-147. (in Chinese)
(董学书. 云南省的传疟媒介及其有关的生态习性[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(2): 144-147.)
- [4] Chow CY, Balfour MC. The natural infection and seasonal prevalence of *Anopheles* mosquitoes in Chefang and vicinity, Yunnan-Burma border[J]. Chin Med J, 1949, 67(8): 405-413.
- [5] Dong XS, Wang XZ, Lu YR, et al. Studies on geographical distribution, ecology and habits, role in malaria transmission and method of control of *Anopheles kunmingensis* [J]. Zool Res, 1990, 11(4): 317-323. (in Chinese)
(董学书, 王学忠, 卢勇荣, 等. 昆明按蚊的地理分布、生态习性、传疟作用及其防治研究[J]. 动物学研究, 1990, 11(4): 317-323.)
- [6] Bureau of Disease Control, Ministry of Health. A Handbook of Malaria Control[M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 78. (in Chinese)
(卫生部疾病预防控制局. 疟疾防治手册[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 78.)
- [7] Deng D. Ecological habit and role of *Anopheles jeyporiensis candidiensis* in transmission of malaria//Feng LZ, Mao SB. Review on Research Advances in Parasitic Diseases[C]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Information Institute, 1964, 2: 123-130. (in Chinese)
(邓达. 日月潭按蚊的生态习性和传疟作用//冯兰洲, 毛守白. 近年来主要寄生虫病的科学研究专题综述[C]. 上海, 上海科学技术情报研究所: 1964, 2: 123-130.)
- [8] 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(4): 423-428.
- [9] Rebekanh J, Douglas E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(2): 336-342.
- [10] Zhao LL, Wang XZ, Shi WQ, et al. Preliminary observations on mosquito species composition in Kachin Region of Northern Burma [J]. Chin J Vector Biol Control, 2010, 21(4): 105-108. (in Chinese)
(赵玲玲, 王学忠, 施文琦, 等. 缅甸北部克钦地区蚊类种群组成初报[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(4): 105-108.)
- [11] Qu FY. The mosquito vectors of malaria transmission in China: past and present[J]. Int J Med Parasit Dis, 2009, 36(5): 315-322. (in Chinese)
(瞿逢伊. 我国传疟蚊媒研究: 过去与现在[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2009, 36(5): 315-322.)
- [12] Lu BL, Xu JJ, Yu Y, et al. Fauna Sinica, Insecta Vol.9, Diptera: Culicidae [M]. Beijing: Science Press, 1997: 184. (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: 184.)

(收稿日期: 2010-12-01 编辑: 高石)

文章编号: 1000-7423(2011)-02-137-01

【消息】

勘误 本刊 2011 年第 1 期刊载的“徐莉莉, 薛剑, 张永年, 强慧琴, 肖树华. 7 种抗蠕虫药物的体外抗华支睾吸虫作用”一文, 全文所涉及的剂量, “g/ml”应改为“ $\mu\text{g/ml}$ ”。