

我国昆明按蚊与凉山按蚊 rDNA-ITS2 序列和形态比较及分类地位的探讨*

马雅军¹ 翟逢伊¹ 雷心田² 董学书³

(1 第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433; 2 四川省寄生虫病防治研究所, 成都 610041; 3 云南省疟疾防治研究所, 思茅 665000)

摘要 [目的] 论证昆明按蚊 (*Anopheles kunmingensis*) 和凉山按蚊 (*An. liangshanensis*) 的分类地位。[方法] 比较两种按蚊 rDNA-ITS2 序列差异和主要形态特征的变化幅度。[结果] 两种按蚊 8 个样本 rDNA-ITS2 序列同源率为 97.1%~99.8%。昆明按蚊雌蚊翅 V5.2 缘缨白斑、后跗 IV 基白环 (斑) 及幼虫头毛 2-C 具叉枝等特征出现率分别为 43% (9/21)、89% (17/19) 及 40% (4/10), 而凉山按蚊则分别为 79% (34/43)、44% (17/39) 及 20% (4/20); 如以不同群体作统计分析, 各特征出现率波动幅度很大, 交叉重叠; 表明两蚊种间缺乏明确与稳定的鉴别特征, 缺乏实质性的形态差异。[结论] 两种按蚊形态特征和分子序列差异极小, 应属种内变异范围, 可以确认两者是同一蚊种, 昆明按蚊为凉山按蚊的同物异名。

关键词: 昆明按蚊, 凉山按蚊, 形态学, 分子序列, 分类地位

中图分类号: R384.111

文献标识码: A

昆明按蚊 (*Anopheles kunmingensis* Dong et Wang, 1985) 和凉山按蚊 (*An. liangshanensis* Kang Tan et Cao, 1984) 分别为根据云南和四川标本描述发表的新种, 仅知其分布于川滇毗邻的高海拔地区, 昆明按蚊并经调查证实为云南省北纬 24°~28°, 海拔 1 600 m 以上地区的传疟媒介^[1~3]。近年来, 发现此两种按蚊的形态特征比较近似, 杂交实验结果对其分类地位提出疑问, 应作进一步研究^[4~5]。本文通过对昆明按蚊和凉山按蚊核糖体 DNA 第二内转录间隔区 (rDNA-ITS2) 序列差异分析和形态鉴别特征比较观察, 结合文献记载资料, 分析论证其分类地位。

材料与方法

1 扩增 rDNA-ITS2 区及测序

1.1 蚊种及来源 昆明按蚊于 1997 年 8 月 21 日采自云南省腾冲县永古乡。凉山按蚊于 1996 年 6 月 15 日采自四川省昭觉县南坪乡。均在现场经乙醚或氯仿麻醉后, 用 70% 乙醇浸泡后 -20℃ 保存, 每种随机取 4 个雌性成蚊测序, 包括现场采集标本 (KM1-4、LS1-2) 和经卵养殖的 F1 成虫 (LS3-4)。

1.2 测序 按 Collins 等方法^[6] 提取单蚊基因组 DNA, 溶于 50 μl 双蒸灭菌水中, 置 0℃ 冰箱保存备用。扩增 rDNA-ITS2 区片段按 Ma 等方法^[7], PCR 产物经 1% 琼脂糖 (含 0.5 μg/ml 溴化乙锭) 电泳, 从凝胶中回收扩增片段 (QIAGEN 公司凝胶回收试

剂盒), 用四色荧光标记双脱氧链终止法测序 (PE-ABI377 全自动测序仪)。所测序列包括部分保守的 5.8 S 和 28 S 编码序列和 ITS2 区全长。ITS2 界限根据 5.8 S 与 28 S 编码区碱基配对形成的二级结构, 并参照其他蚊种的 ITS2 序列特征确定^[7]。用 PCGENE 软件 (Version 5.05) 分析其同源性及差异, 必要时手工排序。

2 形态学鉴别特征的比较

2.1 蚊种及来源 检视昆明按蚊总数: 雄蚊 10 只, 雌蚊 24 只, 幼虫 10 条, 蛹 10 个。包括: 云南省腾冲县现场采集标本幼虫 3 条 (1986, VI), 雌蚊 5 只 (1997, K, 30); 云南省疟疾防治研究所实验室腾冲品系幼虫 7 条, 蛹 10 个 (1989, VII, 19), 雄蚊 3 只, 雌蚊 6 只 (1990, VIII, 23); 四川省寄生虫病防治研究所实验室龙陵品系雄蚊 2 只, 雌蚊 8 只 (1989, I, 16), 雄蚊 5 只, 雌蚊 5 只 (1992, II, 31)。检视凉山按蚊总数: 雄蚊 19 只, 雌蚊 46 只, 幼虫 20 条, 蛹 10 个。包括: 四川省昭觉县南坪乡牛棚雄蚊 5 只, 雌蚊 6 只 (1993, VIII), 雌蚊 14 只 (1997, VI, 15, 编号: SC-97-9); 同上同时同地经单雌产卵饲养的子 1 代雄蚊 10 只, 雌蚊 12 只, 幼虫 10 条, 蛹 5 个 (编号: SC-97-7); 同上子 1 代雄蚊 4 只, 雌蚊 14 只, 幼虫 10 条, 蛹 5 个 (编号: SC-97-8)。

2.2 观察方法 观察成蚊针插标本及幼虫、蛹、雄蚊尾器玻片标本, 以鉴别两种按蚊的主要形态特征。包括翅长与翅 V5.2 缘缨白斑有或无, 后跗 IV 基白环 (斑) 有或无, 雄蚊阳茎叶片数, 幼虫头毛 2-C 近

末端有二叉枝, 蛹腹毛 5-V 和 9-VII 等。

结 果

1 两种按蚊的 rDNA-ITS2 区序列特征比较

昆明按蚊和凉山按蚊部分 5.8 S 和 28 S 编码区序列与中华按蚊相同^[7], 8 个样本的 ITS2 区序列见图 1。昆明按蚊 4 个样本的 ITS2 区长度为 445 bp 或 446 bp, 鸟嘌呤 (guanine, G) 和胞嘧啶 (cyanine, C) 含量为 46.79%~46.92%, KM1 与 KM3 碱基无差异, KM2 与 KM4 相比差异仅 1 个腺嘌呤 (adenine A) 插入 (排序位置 446 位), 4 个样本间最大变异仅为 2.5%; 凉山按蚊 4 个样本的 ITS2 长度也为 445 bp 或 446 bp, GC 含量为 45.96% 或 46.07%, F1 的 2 个个体间 (LS3、LS4) 碱基无差异, F1 与现场样本个体间的碱基差异范围为 0.2%~0.7%。综合分析两种蚊 8 个样本之间的碱基差异范围是 0.2%~2.9% (表 1), 与种内个体间的差异相似, 除 2 处为双碱基改变外 (排序位置 27~28 位, 402~403 位), 其它均为单个碱基的改变 (共 10 处), 这些偶尔出现的由滑动复制造成的无规律碱基改变, 反映了按蚊自然种群遗传的多样性。

2 两种按蚊形态特征比较

昆明按蚊: 雌蚊翅长平均 4.47 mm (3.65~5.31 mm, n=24); 翅 V5.2 具缘缨白斑者占 43% (9/21), 但不同群体标本差异很大, 腾冲现场、实验室腾冲品系和 2 批龙陵品系翅 V5.2 具缘缨白斑者分别为 5/5、2/6、2/4 和 0/6; 后附 IV 具基白环 (斑) 者占 89% (17/19), 不同批标本差异不大; 后附 V 也可见基白斑 (5/18)。雄蚊翅长平均为 3.88 mm (3.82~4.65 mm, n=10); 翅 V5.2 未见缘

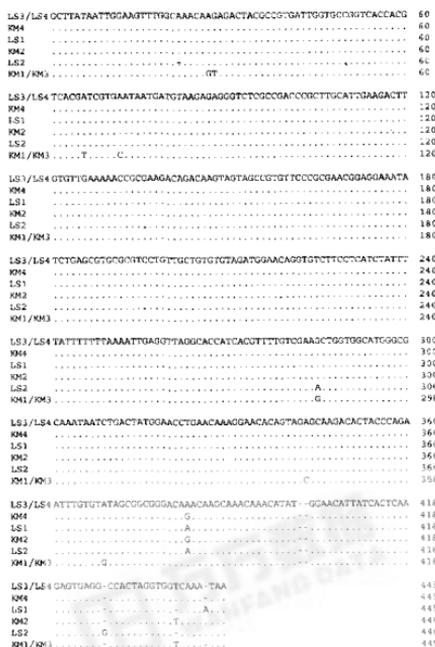


图 1 昆明按蚊(KM1-4)和凉山按蚊(LS1-4)的 rDNA-ITS2 序列特征 (基因库登记号: AF146750 凉山按蚊 LS3)

Fig. 1 The rDNA-ITS2 sequences of *Anopheles kunmingensis* (KM1-4) and *An. liangshanensis* (LS1-4) (GenBank Accession No. AF146750 *An. liangshanensis* LS3).

表 1 昆明按蚊和凉山按蚊 rDNA-ITS2 序列间的同源性和多样性
Table 1 The identity and diversity of rDNA-ITS2 sequence between *Anopheles kunmingensis* and *An. liangshanensis*

组别 Group	KM1/KM3	KM2	KM4	LS1	LS2	LS3/LS4
KM1/KM3		2.5*	2.5*	2.7*	2.9*	2.2*
KM2	97.5		0*	0.2*	0.7*	0.2*
KM4	97.5	100.0		0.7*	0.9*	0.2*
LS1	97.3	99.8	99.3		0.2*	0.4*
LS2	97.1	99.3	99.1	99.8		0.7*
LS3/LS4	97.8	99.8	99.8	99.6	99.3	

* 为差异性(%) * Diversity(%)

白斑 (0/10); 后附 IV 具基白环 (斑) 者占 86% (6/7); 后附 V 偶见基白斑 (1/6); 阳茎叶片均为 5 对 (5/5)。幼虫头毛 2-C 腾冲现场标本近端部均有明显

叉枝 (3/3), 而同地实验室品系仅个别标本可见纤细叉枝 (1/7), 综合统计幼虫头毛 2-C 具叉枝者占 40% (4/10)。蛹腹毛 5-V 分 5~7 枝, 9-VII 羽状分

枝 ($n=10$)。

凉山按蚊: 雌蚊翅长平均 4.49 mm (3.98~5.46 mm, $n=46$); 翅 V5.2 具缘缨白斑者约占 79% (34/43); 后附 IV 具基白环 (斑) 者约占 44% (17/39); 后附 V 偶见基白斑 (1/46)。雄蚊翅长平均 4.09 mm (3.65~4.48 mm, $n=19$); 翅 V5.2 无缘缨白斑 (0/17); 后附 IV 具基白环 (斑) 者占 44% (7/16); 后附 V 偶见基白斑 (1/16); 阳茎叶片 5 对 (3/4) 或 6 对 (1/4)。幼虫头毛 2-C, 两份同地采集的 F1 标本显有差异, SC-97-7 标本全部为单枝 ($n=10$), 而 SC-97-8 标本中单枝 (6/10) 和具 1~2 细叉枝 (4/10) 混杂, 综合统计幼虫头毛 2-C 具叉枝者占 20% (4/20)。蛹腹毛 5-V 分 5~7 枝, 9-Ⅱ羽状分枝 ($n=10$)。

讨 论

rDNA-ITS2 区序列在种内非常保守, 种间序列差异对按蚊复合体近缘种鉴别具有应用价值。根据我国赫坎按蚊复合体 (*An. hyrcanus* complex) 成员种的 ITS2 序列差异初步研究结果^[7], 凉山按蚊与昆明按蚊的 ITS2 区序列差异仅 2.9% 以下, 应属种内变异范围。

通过昆明按蚊与凉山按蚊形态学鉴别特征的比较观察, 各特征的出现率虽有较大差异, 但不够明确、稳定, 在具体分类鉴定操作中是一个模糊的概念, 表明两种按蚊间缺乏实质性的形态差异。如以不同群体作统计分析, 自然群体的特征表现相对比较稳定, 而实验室品系经人工选育后某些特征有退变趋势。如昆明按蚊雌蚊翅 V5.2 缘缨白斑出现率可在全现 (5/5) 和全无 (0/6) 间波动, 而凉山按蚊相应特征的出现率处于上述波动幅度之内, 呈现交叉重叠现象, 表明两种蚊不同群体间既有形态共

性, 又有特征出现率的差异变化。特征是分类的依据, 昆明按蚊和凉山按蚊之间形态差异极小, 缺乏明确和恒定的鉴别特征, 不具备物种鉴别的基本要求^[8]。两种按蚊形态学比较观察结果, 同时反映此类蚊虫种内共性和不同群体间的差异信息, 是自然界蚊类群体中物种“又变又不变”辩证概念的现实表现^[8]。

媒介蚊虫的分类地位和正确鉴定具有重要的科学意义, 根据昆明按蚊和凉山按蚊形态学比较观察和 rDNA-ITS2 序列差异分析结果; 以及文献报道此两种蚊杂交可育, 幼虫染色体联会, 无生殖隔离, 地理分布同域和生境的相似性等多方面资料^[4,5], 可以确认两者应属同一蚊种, 昆明按蚊为凉山按蚊的同物异名。

致谢 四川省寄生虫病防治研究所康万民同志, 腾冲县卫生防疫站戴应辉、杨元和同志、本教研室许滢滢同志协助采集标本, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 康万民, 谈俊, 曹仲华, 等. 按蚊属一新种. 四川动物, 1984, 3: 11~14.
- [2] 董学书, 王学忠. 按蚊亚属一新种. 动物学研究, 1985, 6: 117~121.
- [3] 董学书, 王学忠, 张国才, 等. 昆明按蚊 (*Anopheles kunmingensis*) 的地理分布、生态学、传疟作用及其防治研究. 动物学研究 1990, 11: 317~323.
- [4] 康万民, 曹仲华, 杨玉华, 等. 昆明按蚊与凉山按蚊的种间关系. 四川动物 1992, 11: 30~31.
- [5] 陆宝麟主编. 中国动物志·昆虫纲. 第 9 卷. 双翅目蚊科 (下卷). 北京: 科学出版社, 1997, 21~26.
- [6] Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, et al. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. Am J Trop Med Hyg, 1987, 37: 37~41.
- [7] Ma YJ, Qu FY, Xu JN, et al. Sequence differences of rDNA-ITS2 and species-diagnostic PCR assay of *Anopheles sinensis* and *Anopheles anthropophagus* from China. J Med Coll PLA, 1998, 13: 123~128.
- [8] 陈世骧. 进化论与分类学. 北京: 科学出版社, 1978, 1~51.

收稿日期: 1999-09-13

(编辑: 富秀兰)

COMPARISON OF rDNA-ITS2 SEQUENCES AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF ANOPHELES KUNMINGENSIS AND ANOPHELES LANGSHANENSIS IN CHINA, WITH DISCUSSION ON TAXONOMIC STATUS*

MA Ya-jun¹, QU Feng-yi¹, LEI Xin-tian², DONG Xue-shu³

(1 Department of Etiologic Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 2 Sichuan Institute of Antiparasitic Diseases, Chengdu 610041; 3 Yunnan Institute of Malaria Control, Simao 665000)

Abstract [Objective] To determine the taxonomic status of *Anopheles kunmingensis* (AK) and *An. langshanensis* (AL) from China. [Methods] Sequence differences of rDNA-ITS2 and main morphological characters variability between different sources of AK and AL were compared. [Results] The level of rDNA-ITS2 sequence differences among eight samples was under 2.9%. The total occurrence rates of main morphological characters examined in the female mosquitoes with pale fringe spot on V5.2, white basal band (or spot) on hind tarsomere IV, and larvae with bifurcated head hair 2-C were 43% (9/21), 89% (17/19), 40% (4/10) in

AK, and 79% (34/43), 44% (17/39), 20% (4/20) in AL, respectively. These rates calculated from separate colonies fluctuated within a wide range and overlapped, suggesting that there was no definite, stable morphological difference between AK and AL. [Conclusion] The morphological and molecular variations between AK and AL were small and belong to intraspecific level. The AK and AL may be considered as the same species, and that the *An. kunmingensis* may be recognized as the synonym of *An. liangshanensis*.

Key Words: *Anopheles kunmingensis*, *Anopheles liangshanensis*, morphology, molecular sequence, taxonomic status.

* Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39670663)

文章编号: 1000-7423(2000)-02-0068-01

卫氏并殖吸虫病 10 例临床分析

(上海市肺科医院, 上海 200433)

张祖荣

中图分类号: R532.220.4

文献标识码: D

卫氏并殖吸虫主要寄生于肺部,引起急性或慢性并殖吸虫病^[1,2]。该病属食源性寄生虫病,近年来上海市有上升趋势^[3]。该病临床表现较为复杂,如咳嗽、咳痰、胸痛及发热等症状无特征性,故易致误诊。为探讨其临床诊断方法,作者对本院 1998 年 8 月至 1999 年 3 月所收住的 10 例并殖吸虫病病资料作了临床分析,以加深对本病的认识,减少漏诊及误诊。

临床资料

一般资料 10 例患者中男性 6 例,女性 4 例,年龄 30~44 岁(平均 39.3 岁),发病前 2 年均在上海居住并常在外就餐。

诊断依据 10 例卫氏并殖吸虫病病例均经中国预防医学科学院寄生虫研究所确诊。具有生食醉制、腌制淡水蟹及油炸未熟透螺蛳;嗜酸性粒细胞比例及计数明显升高;血清并殖吸虫循环抗体 ELISA 检测阳性;其中 6 例痰液中找到并殖吸虫卵,3 例送检胸水,并殖吸虫循环抗体 ELISA 检测阳性。以上 10 例经吡喹酮治疗后症状改善或消失,嗜酸性粒细胞比例及计数下降,6 例痰检虫卵阳性者阴转。

临床表现 病史中均有起病 2 月前摄入可能含并殖吸虫囊蚴的中间宿主史,病程为半月至 6 个月,主要症状为:咳嗽 8 例,咳痰 7 例,发热 5 例,胸闷 5 例,胸痛 4 例,腹痛 3 例,痰血 2 例。主要 X 线征象: 10 例均有胸腔积液,其中 7 例为双侧胸腔积液(2 例并有右侧气胸),1 例左侧胸腔积液。5 例胸部 CT 扫描均显示两肺以中下肺野为主的多发斑片状浸润及小的软组织结节影,其中 3 例病程超过 2 月者在胸腔积液的基础上有胸膜增厚。外周血象检查:白细胞总数升高 4 例,全部病例均有嗜酸性粒细胞比例及绝对计数升高(18%~59%, $1.35 \times 10^9/L \sim 15.4 \times 10^9/L$)。胸水检查:8 例行胸腔穿刺抽液,胸水混浊,常规、生化检查提示为渗出液,其中 3 例进行细胞分类嗜酸性粒细胞比例为 3%~85%。确诊前诊治情况:10 例均为外院拟诊结核性胸膜炎而转来我院,6 例曾给予 2 wk 到 6 个月不等的抗结核加用强的松治疗。入院后,结核病相关检查报告:痰浓缩查抗酸杆菌均阴性,PPD 皮试 5 例阳性,血结核抗体 ELISA 检测阳性 5 例,胸水结核抗体 ELISA 检测阳性 2 例。

讨论

由于并殖吸虫病临床表现复杂且无特征性,所以正确诊

断并殖吸虫病,临床肺科医生首先要提高对该病的认识,尤其是要注意与常见结核性胸膜炎的鉴别诊断^[4]。两病临床症状有多处相似,目前多家医院广泛应用自动血球计数仪检测血常规,在白细胞分类时常不能识别嗜酸性粒细胞而把其归入单核或中性粒细胞,在血象及胸水检查中掩盖了强烈提示寄生虫病的嗜酸性粒细胞比例及绝对计数升高的信号。因此建议,对双侧胸腔积液、肺内病灶以中下肺野为主、PPD 及血和胸水结核抗体 ELISA 不支持结核性胸膜炎者,对已拟诊结核性胸膜炎病例经抗结核和强的松治疗效果不佳者,具有生食或半生食淡水蟹及螺蛳史者,要同时行外周血及胸水检测,准确的计数嗜酸性粒细胞及其分类^[5,6]。对疑似病例可请中国预防医学科学院寄生虫研究所作痰检虫卵、血清及胸水循环抗体等项检测以便早期诊断,减少误诊。通常感染并殖吸虫囊蚴 1 个月,用 ELISA 法即可检出血清中并殖吸虫循环抗体阳性^[7],该法已用作本病的辅助诊断方法,而痰检虫卵则要在感染后约 2 个月、大量虫体进入肺部后才能获得阳性结果,虫卵阳性者即可作为该病确诊的重要依据。未获得病原确诊者,则可根据上述病史、血清学检测抗体阳性、外周血检测白细胞及嗜酸性粒细胞增高、有胸水并可排除其他胸膜疾病者,可按并殖吸虫病诊治。

参 考 文 献

- [1] 罗慈惠主编. 现代呼吸病学. 北京:人民军医出版社,1996:600~603.
- [2] 翁心华等主编. 现代感染病学. 上海:上海医科大学出版社,1997:916~920.
- [3] 周敏,何礼贤,祖善福等. 表现为胸膜病变的肺吸虫病. 临床杂志 1995;2(3):151~152.
- [4] Kagawa FT. Pulmonary Paragonimiasis. *Semin Respir Infect.* 1997;12(2):149~158.
- [5] Xu ZB. Studies on clinical manifestations, diagnosis and control of paragonimiasis in China. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health.* 1991;22(suppl):345~348.
- [6] Pariyanonda S. Serodiagnosis of human paragonimiasis caused by *Paragonimus heterotremis*. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health.* 1990;21:103~107.
- [7] Ikeda T. Cystatin capture enzyme-linked immunodiagnostics of human paragonimiasis and fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(2):286~290.

收稿日期: 1999-12-16

(编辑: 高秀兰)