

广西微小按蚊种群密度地理分布 及种类分子鉴定研究

邹春燕¹, 区德锦¹, 韦海艳², 林康明², 郑彬³, 孙艳⁴, 阎桂云⁵, 黄亚铭^{1,2}

1 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西南宁 530028; 3 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所; 4 南京医科大学; 5 美国加利福尼亚大学Irvine分校医学院

摘要: **目的** 研究20世纪以来广西壮族自治区(广西)微小按蚊的种群密度和地理分布, 为疟疾防治提供参考。**方法** 收集广西20世纪50—90年代微小按蚊资料及疟疾发病率, 于2004—2010年在不同经纬度原以微小按蚊为主要传播媒介的疟疾流行区收集该蚊成蚊, 采用形态学和PCR方法鉴定采集的微小按蚊样品。**结果** 1957—1998年对全自治区不同经纬度媒介按蚊调查, 92个县中有56个县存在微小按蚊; 2004—2007年在该蚊活动频繁的36个县的乡村收集按蚊, 仅在20个县40个媒介点采集到微小按蚊244只; 采用种类分子鉴定, 除百色市旺甸村有微小按蚊种类A存在外, 其他地区均为微小按蚊种类C。2008年后全自治区各县疟疾疫情发病率已降至0.1/万。**结论** 目前在广西存在微小按蚊种类A和C两种, 以种类C为主; 全自治区不同经纬度的微小按蚊种群密度和分布范围已经明显减少, 该蚊有可能不再是该区域疟疾传播的主要媒介。

关键词: 微小按蚊; 复合体; 地理分布; 种群密度

中图分类号: R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)02-0101-04

Study on the geographical distribution of population density of *Anopheles minimus* and molecular identification of the species in Guangxi

ZOU Chun-yan¹, QU De-jin¹, WEI Hai-yan², LIN Kang-ming², ZHENG Bin³,
SUN Yan⁴, YAN Gui-yun⁵, HUANG Ya-ming^{1,2}

1 Guangxi Medical University Teaching and Research Section of Parasites, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2 Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 3 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 Nanjing Medical University; 5 Hewitt Hall, Room 3038, University of California, Irvine, CA, 92697

Corresponding author: HUANG Ya-ming, Email: hym9992004@yahoo.com.cn

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30628022)

Abstract: Objective To study the geographical distribution of population density of *Anopheles minimus* and molecular identification of the species since the 20th century in Guangxi Zhuang Autonomous Region for providing scientific data for its prevention and control. **Methods** Data on *An. minimus* and malaria incidence from 1950s to 1990s in Guangxi were collected, with the adult *An. minimus* collected in 2004 to 2010 in the Autonomous Region in the malaria endemic areas at different longitude and latitude where *An. minimus* was previously the major vector and the collected samples identified by morphology and PCR assay. **Results** It was found that of all of the 92 counties of the Region, there were 56 counties at different longitude and latitude locations in which *An. minimus* existed from 1957 to 1998. *An. minimus* were collected in the villages of 36 counties from 2004 and 2007 where the insects were prevalent. Only 244 *An. minimus* were collected at the 40 surveillance sites of 20 counties, and PCR molecular identification of the species revealed that *An. minimus* from Wangdian village, Baise district was of *An. minimus* A. The insects collected from other sites were all of *An. minimus* C. The incidence of malaria in all the counties of the Region was reduced to 0.1/10 000 after 2008. **Conclusion** Currently there exist two species of *An. minimus* in Guangxi, with *An. minimus* C being the predominant species and *An. minimus* A about to die away. There is a substantial decrease in the population density and geographical distribution range of *An. minimus* in Guangxi. It is likely that *An. minimus* will no longer be the major vector for malaria in the region.

Key words: *Anopheles minimus*; Complex; Distribution; Population density

微小按蚊(*Anopheles minimus*)分布在亚洲东部的

基金项目: 国家自然科学基金(30628022)

作者简介: 邹春燕(1983-), 女, 土家族, 硕士研究生, 从事媒介分子生物学研究。Email: chunyanzou0424@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄亚铭, Email: hym9992004@yahoo.com.cn

丘陵地区, 包括我国北纬32°30'以南, 西至印度的北方邦, 南至马来西亚半岛, 东至中国台湾和日本的琉球群岛的广大地区, 是该地区重要的传疟媒介之一^[1]。随着分子生物学技术在媒介生物学中的应用, 近几年

国内外的研究发现,微小按蚊种群的地理分布、种类密度、与传疟作用的关系及对杀虫剂敏感性方面均存在差异。广西壮族自治区(广西)原是全国三大高疟区之一,自从1935年冯兰洲教授在广西的龙胜等地发现并证实微小按蚊为当地的主要传疟媒介以来,20世纪50—60年代科技工作者对广西各县调查发现有56个县存在微小按蚊,种群密度比为6.53%~82.70%,微小按蚊的平均自然感染率为0.11%(0.01%~2.10%)。存在微小按蚊的区域县疟疾年平均发病率为4.38%(2.03%~22.43%),因此将微小按蚊确定为全自治区的主要传疟媒介^[2]。90年代对原高密度微小按蚊地区调查发现,该蚊的种群密度比下降至0.26%~6.06%,该区域的疟疾年平均发病率控制在1/万以下。但20世纪以来广西境内微小按蚊种群密度、地理分布及种类组成情况如何尚不清楚,为此进行了调查研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 资料来源 收集广西50—90年代以来历年各县微小按蚊调查研究的资料。

1.2 微小按蚊样品来源 2004—2007年在全自治区不同经纬度原微小按蚊活动频繁的乡村采取半通宵全捕人牛房按蚊及诱蚊灯通宵诱蚊收集蚊虫的方法,所捕按蚊经形态鉴定后将微小按蚊单只单管保存在99%乙醇中用于种类分子鉴定。

1.3 微小按蚊DNA制备 根据文献方法提取DNA^[3]。取单只雌性微小按蚊在离心管内充分研磨,120 μ l DEB液和1.5 μ l RNA酶,3 μ l蛋白酶K,水浴50 $^{\circ}$ C 1 h,而后加等量酚和氯仿(1:1),混匀10 min,300 \times g离心10 min;取上清液加300 μ l的100%冰冻乙醇,-20 $^{\circ}$ C冻存60 min,而后混匀,离心10 min,移去上清液,70%冰冻乙醇洗涤2次,室温空气干燥,加100 μ l双蒸水-20 $^{\circ}$ C贮存备用。

1.4 扩增rDNA ITS2和测序 用PCR扩增蚊rDNA ITS2片段,使用与5.8S编码区保守序列互补的上游引物:ATC ACT CGG CTC ATG GAT CG;与28S编码区保守序列互补的下游引物:ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC^[4]。反应体积50 μ l;DNA模板5.0 μ l,5 μ l 10 \times 缓冲液(1 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,5 mmol/L KCl,20 mmol/L MgCl₂,0.01% Triton-X100),1.0 μ l dNTPs,引物各1.5 μ l。94 $^{\circ}$ C预变性2 min后,94 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 2 min。在PE-480 PCR仪进行32次循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取10 μ l PCR产物,经1.2%琼脂糖(含5 μ g/ml EB)电泳后,在紫外灯下观察,柯达成像仪中摄影分析。

2 结果

2.1 20世纪50—90年代广西微小按蚊及疟疾发病率 1957—1998年对全自治区不同经纬度媒介按蚊调查发现,全自治区92个县,其中56个县有微小按蚊存在。90年代后期全自治区疟疾发病率控制在1/万以下(图1)。

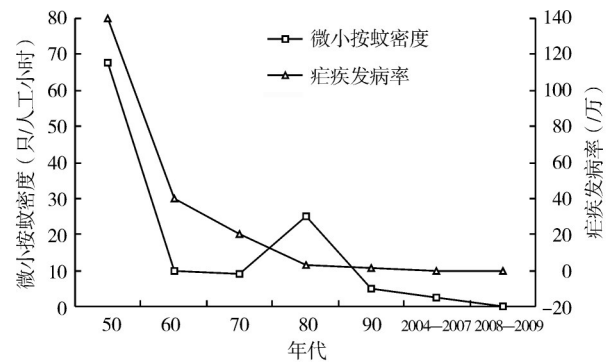


图1 广西20个县不同年代微小按蚊密度和全自治区疟疾发病率

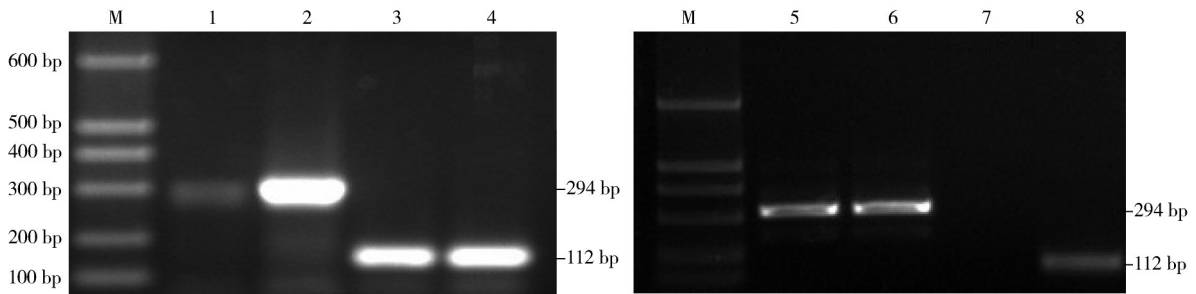
Fig. 1 The relationship between the density of *An. minimus* and malaria incidence at different times in 20 counties of Guangxi Zhuang Autonomous Region

2.2 21世纪全自治区微小按蚊捕捉及疟疾发病率 2004—2007年在全自治区不同经纬度原疟疾流行高发区有微小按蚊活动频繁的36个县不同的乡村捕捉按蚊,结果在20个县的40个捕蚊点共收集微小按蚊244只(表1);2008—2010年对以上原调查有微小按蚊的捕蚊点再次反复收集,除捕获中华按蚊(*An. sinensis*)及少量其它按蚊外,未捕到微小按蚊。2008年后全自治区疟疾发病率控制在0.1/万以下(图1)。

2.3 微小按蚊种类分子鉴定情况 对2004—2008年收集的244只(其中有217只微小按蚊成功提取DNA并进行扩增,仅有1只为种类A,其余均为种类C)微小按蚊采用复合PCR鉴定,结果显示为2种条带种类(图2)。经比对,具有特异条带294 bp者为微小按蚊种类A,112 bp条带者为微小按蚊种类C。经PCR-ASA鉴定的微小按蚊种类A来自百色旺甸,其他地区均为微小按蚊种类C。用采自云南省思茅市的微小按蚊与广西采集到的微小按蚊种类A比较,发现扩增出大约112 bp的条带,说明两地微小按蚊为同一种类。中华按蚊样品DNA扩增无条带显示(图2)。

3 讨论

对微小按蚊种类的研究主要是为了解不同种类微小按蚊的生态习性与疟疾传播之间的关系,国外的研究发现微小按蚊种类C更能适应一些砍伐森林后开垦的农业生态系统,微小按蚊种类A则适应在破坏很少的森林和传统的稻田生态系统^[5];Rwegoshora等^[6]对泰



注: M. 100 bp 标志物; 1、2. 微小按蚊种类 A; 3、4. 微小按蚊种类 C; 5. 广西微小按蚊种类 A; 6. 云南省微小按蚊种类 A; 7. 中华按蚊; 8. 海南省微小按蚊种类 C。

图2 PCR-ASA 鉴别微小按蚊种类 A 和 C 以及鉴别广西、云南省的微小按蚊和中华按蚊

Fig. 2 PCR-ASA identification of *An. minimus* A and C, and of *An. minimus* and *An. sinensis* in Guangxi and Yunnan province

表 1 2004—2007 年广西微小按蚊种类分子鉴定结果
Table 1 Molecular identification of *An. minimus* from 2004 to 2007 in Guangxi

地区	地理位置 (经、纬度)	试验蚊虫 只数	试验结果 只数	基因型 只数
凭祥	22°12' N 106°75' E	4	2	2
宁明	22°12' N 107°08' E	21	19	19
上思	22°17' N 107°98' E	8	7	7
龙州	22°37' N 106°85' E	14	12	12
崇左	22°42' N 107°37' E	5	4	4
大新	22°85' N 107°21' E	27	23	23
百色汪甸	23°9' N 106°6' E	6	3	2(1)
武鸣	23°17' N 108°27' E	2	2	2
金秀	24°1' N 110°1' E	6	6	6
隆林	24°7' N 105°3' E	6	5	5
环江	24°8' N 108°2' E	9	7	7
融安	24°25' N 109°37' E	11	11	11
凌云	24°35' N 106°55' E	12	11	11
南丹	24°98' N 107°55' E	7	5	5
融水	25°N 109°2' E	14	14	14
永福	25°N 109°98' E	2	2	2
天峨	25°02' N 107°17' E	72	67	67
三江	25°7' N 109°5' E	13	12	12
龙胜	25°7' N 110°E	2	2	2
资源	26°03' N 110°67' E	3	3	3
合计		244	217	216(1)

注: 括号内数据为微小按蚊种类 A, 其它均为微小按蚊种类 C。

国等地微小按蚊的研究认为微小按蚊种类 A、C 均嗜好吸食牛血。Trung 等^[7]的调查表明, 微小按蚊种类 A 较之微小按蚊种类 C 有较高的嗜人血习性和叮人率, 从而认为微小按蚊种类 A 的传疟作用高于种类 C。微小按蚊种类 A 对 DDT 等杀虫剂较敏感^[8]。

微小按蚊种群的分类从最初的成蚊形态学分类^[9], 到遗传学采用生殖隔离现象来证实, 不同地理位置的微小按蚊存在生殖隔离现象^[10-11]。曾经有科学家企图用按蚊的染色体分析来区分^[12], 再到采用同工酶方法来区别微小按蚊种类^[13-15], 自从采用分子生物学方法从成蚊的 DNA 区分不同种类的微小按蚊, 并将微小按蚊分为 A、C 和 E 3 个种类^[16-17], 给现场微小按蚊种类的鉴定带来更为便捷准确的方法, 并广泛用于微小按蚊种类生态习性与疟疾传播方面的研究^[5], 由此国内外

将微小按蚊不同种类的叮咬率和季节性进行了研究^[6]。中国在有微小按蚊活动的地区发现有 A、C 两个种类^[18-20]。Chen 等^[21]于 2000—2002 年对东南亚及中国南方地区的微小按蚊种类进行了初步调查, 其中在广西的凌云、隆林和龙胜县只发现有微小按蚊种类 C, 在上思县发现微小按蚊种类 C 和 A。2004 年后在同地点收集的微小按蚊试验均为种类 C, 而在百色右江区旺甸捕获的 3 只微小按蚊中仅 1 只为种类 A。微小按蚊种类 E 仅在日本的琉球群岛发现, 并得到国际公认, 只是因为该地为非疟区, 关注比较少^[17]。

本世纪对广西不同经纬度微小按蚊曾经活动频繁、种群数量多且疟疾发病率高的村屯进行调查发现, 该蚊在全区的分布范围正大面积减少, 而且在其种群数量上也呈现急剧减少现象, 主要表现在原有微小按蚊存在的地区已不易捕捉到, 微小按蚊种群密度曾经很高的地区捕到该蚊的数量也极少, 一些地区反复多次调查也未捕到。导致这一现象的原因主要是由于边远山区的经济发展, 人们的生活环境得到根本改善, 农业及公共卫生杀虫剂在广大农村广泛使用, 曾经微小按蚊种群密度高的地区由水田改种旱地甘蔗, 农业机械化的推广, 耕牛的减少, 农村沼气池的普及等所致。综上所述, 尽管目前在广西发现有微小按蚊种类 A 和 C, 以种类 C 为主; 但其中微小按蚊种类 A 种群即将消失; 全自治区不同经纬度的微小按蚊种群密度和分布范围已经明显减少; 微小按蚊将有可能不再是该区域疟疾传播的主要媒介。随着全球气候变暖, 微小按蚊这一物种是否在该地区逐渐消失有待进一步观察。

参考文献

[1] 蒙日朗, 黄亚铭. 东南亚国家疟疾流行及防治概况[J]. 中国热带医学, 2010, 10(2): 244-246.
[2] 周祖杰. 中国疟疾的防治与研究[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 118-123.
[3] 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, 2007, 17 (4) : 423-428.
- [4] van Bortel W, Trung HD, Bntlin RK. Molecular variation and phylogeny of members of the minimus group of *Anopheles* Subgenus Cellia9 (Diptera: Culicidae) [J]. System Entomol, 2010, 25 (2) : 263-272.
- [5] Garros C, Harbach RE, Manguin S. Systematics and biogeographical implications of the phylogenetic relationships between members of the Funestus and Minimus groups of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) [J]. J Med Entomol, 2008, 42:7(R)C18.
- [6] Rwegoshora RT, Sharp RG, Baisley KJ, et al. Biting behavior and seasonal variation in the abundance of *Anopheles minimus* species A and C in Thailand [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2002, 33(4):694-701.
- [7] 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 Health, 2004, 9(2):230-237.
- [8] van Bortel W, Trung HD. Malaria transmission and vector behaviour in a forested malaria focus in central Vietnam and the implications for vector control [J]. Malar J, 2010, 12(23):73-93.
- [9] Tisgratog R, Tananchai C. Chemically induced behavioral responses in *Anopheles minimus* and *Anopheles harrisoni* in Thailand [J]. J Vectpr Ecol, 2011, 36(2):321-331.
- [10] 叶奕英, 许政拱, 黄若密. 广西和云南两地微小按蚊的杂交试验 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 10(4):287-289.
- [11] 石焕焕, 袁志刚, 何登贤, 等. 桂南与桂西两地微小按蚊杂交试验 [J]. 广西医科大学学报, 1994, 11(3):365-367.
- [12] van Bortel W, Trung HD, Manh ND, et al. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences [J]. Trop Med Int Health, 1999, 4 (4):257-265.
- [13] 石焕焕, 何登贤. 广西三地微小按蚊乳酸脱氢酶和酯酶同工酶比较研究 [J]. 广西医科大学学报, 1994, 11(3):258-261.
- [14] 石焕焕, 田春林, 黄若密, 等. 海南与广西两地微小按蚊杂交试验 [J]. 广西医科大学学报, 1999, 16(4):399-401.
- [15] 田春林, 石焕焕, 何登贤, 等. 广西、海南和云南三地微小按蚊 DNA 限制性酶切片长度多态性分析 [J]. 广西医科大学学报, 1999, 16(4):427-431.
- [16] Green CA, Gass RF, Munstermann LE, et al. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand [J]. Med Vet Entomol, 1990, 4(4):25-34.
- [17] Somboon P, Walton C, Sharpe RG, et al. Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan [J]. J Am Mosq Control Assoc, 2001, 17(2):98-113.
- [18] 俞渊, 李明馨. 海南岛微小按蚊 *Anopheles* (*Cellia*) *minimus* Theobald, 1901 类型的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1984, 2(1):95.
- [19] 郑彬, 汤林华, 王学忠, 等. 我国微小按蚊 A、C 的形态和染色体核型研究 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2007, 34(1):13-15.
- [20] 郑彬, 汤林华, 马雅军, 等. 微小按蚊 A、C 的 PCR 和同工酶鉴别比较研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(2):78-81.
- [21] Chen B, Harbach RE, Butlin RK. Molecular and morphological studies on the *Anopheles minimus* group of mosquitoes in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status [J]. Med Vet Entomol, 2002, 16(3):253-265.

收稿日期:2011-12-26

(上接第 100 页)

该地中华按蚊的溴氰菊酯抗性可能仅由代谢酶活性增高引起,其具体的抗药性机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Grand rounds: the opportunity for and challenges to malaria eradication [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(15):476-480.
- [2] 裴速建, 李凯杰, 胡乐群, 等. 湖北部分地区中华按蚊对溴氰菊酯抗药性的现场调查 [J]. 中国热带医学, 2010, 10(7):792-793.
- [3] Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(6):563-577.
- [4] Syafruddin D, Hidayati AP, Asih PB, et al. Detection of 1014F *kdr* mutation in four major *Anopheline* malaria vectors in Indonesia [J]. Malar J, 2010, 9:315.
- [5] Yewhalaw D, Bortel WV, Denis L, et al. First evidence of high knockdown resistance frequency in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia [J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(1):122-125.
- [6] WHO. Report of the WHO informal consultation. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces [R]. Geneva: WHO, 1998:12-14.
- [7] Kim H, Baek JH, Lee WJ, et al. Frequency detection of pyrethroid resistance allele in *Anopheles sinensis* populations by real-time PCR amplification of specific allele (rtPASA) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2007, 87:54-61.
- [8] Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. [J]. Insect Mol Biol, 1998, 7(2):179-184.
- [9] Ranson H, Jensen B, Vulule JM, et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids [J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(5):491-497.
- [10] Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, et al. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252(1-2):61-68.
- [11] Matambo TS, Abdalla H, Brooke BD, et al. Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation [J]. Med Vet Entomol, 2007, 21(1):97-102.

收稿日期:2011-10-22