

# 吸血库蠓胃血血源分子鉴定及吸血习性多样性研究

刘仰青<sup>1</sup>, 陶卉英<sup>1</sup>, 虞以新<sup>2</sup>, 夏文<sup>1</sup>, 马红梅<sup>1</sup>, 柳小青<sup>1</sup>, 陈海婴<sup>1</sup>

1 南昌市疾病预防控制中心, 传染病预防控制国家重点实验室研究基地, 江西 南昌 330038;

2 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

**摘要:** 目的 运用PCR技术检测吸血库蠓胃血来源, 研究其吸血习性的多样性。方法 2017年8月, 在南昌市郊区一村庄运用诱蚊灯法在与人类活动关系密切的生境调查吸血库蠓的组成, 捕捉饱血库蠓, 根据调查吸血库蠓可能的吸血对象的线粒体DNA细胞色素b序列的差异, 设计特异性引物, 建立PCR反应体系, 设立动物血源的阳性对照和阴性对照鉴定蠓胃血来源。结果 农户中以荒川库蠓和尖喙库蠓为主, 分别占37.01%和33.85%; 鸡圈主要以荒川库蠓为主, 占81.40%; 猪圈以尖喙库蠓为主, 占57.66%。PCR检测库蠓胃血血源结果显示, 该方法可以从已知动物血样和吸血库蠓提取的DNA中分别扩增到宿主动物的特异性条带。荒川库蠓、尖喙库蠓、刺螯库蠓和原野库蠓均吸食人血或动物血, 且4种库蠓同时具有兼吸2~4种动物血液的习性。4种不同吸血库蠓吸食人血指数荒川库蠓为0.13, 尖喙库蠓为0.63, 刺螯库蠓为0.33, 原野库蠓为1.00。结论 建立的PCR检测方法可鉴定吸血库蠓胃血来源, 结果灵敏、稳定可靠; 4种吸血库蠓均兼吸人、畜血液, 吸血对象广泛, 吸血习性多样。

**关键词:** 库蠓; 蠓胃血; 吸血多样性; 聚合酶链式反应; 血源鉴定; 不同生境

中图分类号: R384.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)04-0418-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.04.014

## Molecular identification of blood meal source in *Culicoides* and study on diversity of blood-sucking habit

LIU Yang-qing<sup>1</sup>, TAO Hui-ying<sup>1</sup>, YU Yi-xin<sup>2</sup>, XIA Wen<sup>1</sup>, MA Hong-mei<sup>1</sup>, LIU Xiao-qing<sup>1</sup>, CHEN Hai-ying<sup>1</sup>

1 The Collaboration Unit for Field Epidemiology of State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control,

Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, Jiangxi Province, China; 2 Institute of

Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences

Corresponding author: CHEN Hai-ying, Email: nccdcchy@126.com

Supported by the Scientific and Technological Project of Nanchang (No.2018235-01)

**Abstract: Objective** To identify the blood meal source in *Culicoides* using polymerase chain reaction (PCR), and to study the diversity of blood-sucking habit. **Methods** Blood-engorged *Culicoides* were collected by light-traps in habitats related to human activities at a village in suburban Nanchang, China, August 2017. Species-specific primers were designed based on differences between mitochondrial cytochrome b sequences of common *Culicoides* hosts to set up a PCR system. The blood meal source in *Culicoides* was identified with positive and negative controls of animal blood source. **Results** *Culicoides arakawae* and *C. oxystoma* were the predominant species in the peasant household habitat, accounting for 37.01% and 33.85%, respectively. *Culicoides arakawae* (81.40%) was the dominating specie in chicken coops and *C. oxystoma* (57.66%) was the predominant specie in pigsties. Results of PCR for blood meal source in *Culicoides* showed that specific PCR products were amplified from the DNA extracted from *Culicoides* and known animal blood samples. Moreover, *C. arakawae*, *C. oxystoma*, *C. punctatus*, and *C. homotomus* could suck both human and animal blood, and they had the habit of simultaneously sucking blood from 2-4 host animals. The blood sucking index for human blood of *C. arakawae*, *C. oxystoma*, *C. punctatus*, and *C. homotomus* was 0.13, 0.63, 0.33, and 1.00, respectively. **Conclusion** The PCR method has advantages in sensitivity and reliability in identifying the *Culicoides* blood meal source. The four *Culicoides* are all capable of feeding on human and animal blood, with wild blood-sucking objects and diverse habit.

**Key words:** *Culicoides*; *Culicoides* blood meal; Blood-sucking diversity; Polymerase chain reaction; Blood meal identification; Different habitats

基金项目: 南昌市科技支撑计划(洪科字[2018]235号-1)

作者简介: 刘仰青, 男, 硕士, 主管技师, 主要从事蚊蠓及其传染病的防制, Email: soh\_521@126.com

通信作者: 陈海婴, Email: nccdcchy@126.com

网络出版时间: 2019-06-20 19:57 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

蠓属双翅目(Diptera)蠓科(Ceratopogonidae)昆虫,种类繁多,分布广泛,是一类极其微小的昆虫。全世界已报道的蠓科昆虫有 5 000 余种,我国已报道 4 亚科 39 属 1 015 种,其中细蠓亚科的细蠓属,铗蠓亚科的蠓属和蠓亚科的库蠓属并称为我国的 3 大吸血蠓属。在 3 大吸血蠓属中,库蠓属是蠓科昆虫中拥有蠓种最多、分布最广、危害较大的主要类群,中国库蠓属已知 12 亚属 305 种,占已知吸血蠓的 73.67%<sup>[1]</sup>。吸血库蠓不仅刺叮骚扰人、畜,引起严重的结痂性皮炎,还可以通过刺叮吸血传播多种病原体,主要传播人体奥罗普切热(Oropuch fever)和牛羊蓝舌病(Bluetongue disease),是重要的人、畜传染病传播媒介。

媒介控制是蠓媒传染病防治的主要措施之一,准确鉴定传播媒介种类和掌握传播媒介吸血习性是防控蠓及蠓传疾病的前提和基础。但目前国内尚无吸血库蠓胃血血源的分子鉴别研究,我国吸血库蠓吸血习性尚不清楚。前期作者已对江西省 10 个地市居民区、医院、公园、农户、鸡圈、菜地、猪牛圈 7 个与人类活动关系密切场所的吸血库蠓的构成和分布进行了调查研究,同时建立了北京库蠓(*Culicoides morisitai*)等 10 种主要吸血库蠓的 DNA 条形码鉴定技术,建立了江西省主要吸血库蠓的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因库,为准确鉴定吸血库蠓种类打下了基础<sup>[2]</sup>。本研究在前期研究基础上运用 PCR 技术进一步探索分析吸血库蠓的吸血习性,为防控蠓及蠓传疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 调查生境 调查现场选择在南昌市安义县郊区一村庄及周边(28°50′41″N, 115°32′57″E),调查村庄为比较典型的人、畜混住类型,周边有小型山丘、河流和池塘等,水稻、蔬菜为当地农民主要的农作物。村庄有常住人口 141 人,住房主要由钢筋混泥土结构和老旧土瓦房组成;村内散养家畜(禽)主要有鸡、犬和牛,牛圈和鸡圈在人房隔壁或人房内。离村庄约 300 m 处有一养猪场,饲养猪约 1 345 头,鸡约 176 只,犬 5 只和鸽子 24 只,离养猪场 200 m 范围内有常住人口 34 人(包括养猪场饲养员 6 人)。

1.2 吸血库蠓的采集 2017 年 8 月,采用诱蚊灯法(购自武汉市吉星环保科技有限公司),分别在农户区、猪圈和鸡圈挂灯诱集库蠓。于当地日落前后开灯(19:00—19:30)至次日清晨收灯(07:00—07:30),连续诱捕 12 h,每种生境挂灯 3 盏,每灯相距 50 m 以上。将捕获蠓麻醉分属后保存于 95%乙醇溶液中,带回实验室分类鉴定,挑出饱血的库蠓,

单只装入含 95%乙醇溶液的 EP 管中保存备用,用于蠓胃血源鉴定。

1.3 库蠓种的鉴别 分别挑出饱血库蠓,割下头胸部和翅制作玻片标本,依据《中国蠓科昆虫》中库蠓检索表进行形态学鉴定;余下的腹部单个装管用于胃血血源分子鉴定,并与头胸、翅编号匹配对应。

1.4 胃血源鉴定方法 根据人血、鸡血、猪血、鼠血、牛血、犬血、鸽子血和羊血的 mtDNA-cytb 序列差异,合成蠓胃血源宿主动物的种特异性引物(由上海生工生物工程有限公司合成),通过扩增出蠓胃血 mtDNA-cytb 片段长度来具体判断血液来源的动物种类(表 1)。同时设立以人血、鸡血、猪血、鼠血、牛血、犬血、鸽子血和羊血等全血 DNA 作为阳性对照,以 dd H<sub>2</sub>O 代替动物全血 DNA 模板作为阴性对照,以避免假阳性和假阴性的出现。

表 1 8 种用于血源鉴定合成的特异性引物

Table 1 Eight specific primers for blood meal identification

血源动物	引物(5'~3')	长度(bp)
人	F:CTTCCTACAATCGGGCGAG	689
	R:GTGATTGGCTTAGTGGGCGA	
猪	F:CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
	R:GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	
牛	F:GCCATATACTCTCCTTGGTGACA	271
	R:GTAGGCTTGGGAATAGTACGA	
羊	F:TTAAAGACTGAGAGCATGATA	225
	R:ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG	
鼠	F:ACCACTCATTCATTGACCTACCTGC	485
	R:GGTCAAGGTGGCTTTGTCTACTGAG	
鸡	F:GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA	268
	R:GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG	
犬	F:CTTCTCTCTGCCATCCCTTATATCG	590
	R:TGCTCAACTGGTTGTCTCTCCAATTC	
鸽子	F:TTACTACTCGCCGCACATTACA	401
	R:TGAAGGGTGAAGAATCGTGTTA	

供试血样来自志愿者的静脉采血(人血),犬血、羊血、牛血为本实验室其他项目研究现场采集的血液,猪血、鸡血和鸽子血购自商场或农贸市场,鼠血来源于南昌市疾病预防控制中心媒介科鼠疫监测时采取。

1.5 蠓胃血和动物全血 DNA 提取 取出置于 95%乙醇溶液保存的库蠓腹部组织,dd H<sub>2</sub>O 漂洗 2~3 次,洁净吸水纸吸干,将腹部挑至 1.5 ml 的 EP 管中,用磨砂细玻璃棒进行组织研磨。然后根据 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,提取的 DNA 于 -20 ℃ 保存备用。

各取供试动物血样 200 μl 于 1.5 ml 的离心管中,按照 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。

1.6 PCR 扩增 20 μl PCR 反应体系包括 10 μl 2×Es Taq MasterMix(含染料)(购自上海研谨生物科技

有限公司,由Es Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂组成的预混体系,浓度为 $2\times$ )、血源动物正、反向特异性引物各 $1\mu l$ 、dd  $H_2O$   $6\mu l$ 和DNA模板 $2\mu l$ 。PCR反应条件:95℃变性15 min;94℃(人、鸡58℃,猪54℃,牛、鼠56℃,羊53℃,犬61.1℃,鸽子56.5℃)30 s、72℃30 s,共35次循环;72℃延长10 min,不同动物血源按不同退火温度分别扩增。

1.7 PCR产物鉴定 吸取 $5\mu l$ 扩增产物于1%琼脂糖凝胶(含 $0.5\mu g/ml$ 溴化乙锭)电泳分离,电泳缓冲液为 $50\times$ Tris-乙酸(TAE),150 V 75 mA电泳40 min,取出胶在紫外凝胶成像系统下观察、拍照。

1.8 蚊胃血来源判断 上述扩增产物分别扩增,不同来源其目的片段大小不同,人源、猪源、牛源、羊源、鼠源、鸡源、犬源和鸽子源分别为689、453、271、225、485、268、590和401 bp。扩增结果分别统计,如果同一只蚊的胃血DNA同时扩增出上述1种、2种或2种以上的片段,则认为该蚊吸食1种、2种或2种以上动物血。人血指数(HBI)=吸人血蚊数/检测的饱血蚊总数。

## 2 结果

2.1 不同生境吸血库蚊种群组成及吸血率 本次调查共捕获库蚊1932只,经形态学鉴定,主要为荒川库蚊(*Culicoides arakawae*, 37.68%)、尖喙库蚊(*C. oxystoma*, 35.66%)、原野库蚊(*C. homotomus*, 12.89%)、刺螯库蚊(*C. punctatus*, 9.16%)、日本库蚊(*C. nipponensis*, 2.54%)、异域库蚊(*C. peregrinus*, 1.40%)和其他库蚊(*Other Culicoides species*, 0.67%),见表2。其中收集的饱血库蚊122只,平均吸血率为6.31%。其中饱血荒川库蚊46只,吸血率为6.32%;饱血尖喙库蚊19只,吸血率为2.76%;饱血刺螯库蚊42只,吸血率为23.73%;饱血原野库蚊15只,吸血率为6.02%。

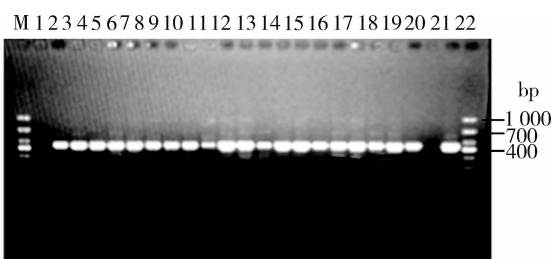
农户中以荒川库蚊和尖喙库蚊为主,分别占37.01%和33.85%;鸡圈生境主要以荒川库蚊为主,占81.40%,尖喙库蚊次之,占10.91%;猪圈生境以尖喙库蚊和原野库蚊为主,分别占57.66%和21.29%,其次为刺螯库蚊(17.34%)和日本库蚊(2.51%),见表2。

表2 南昌市安义县郊区不同生境吸血库蚊组成

Table 2 *Culicoides* composition in three different habitats in the suburb of Anyi county, Nanchang, China

生境	蚊总数 (只)	荒川库蚊		尖喙库蚊		原野库蚊		刺螯库蚊		日本库蚊		异域库蚊		其他蚊种	
		数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)	数量 (只)	构成比 (%)
农户	381	141	37.01	129	33.85	46	12.07	11	2.89	23	6.04	24	6.30	7	1.84
鸡圈	715	582	81.40	78	10.91	25	3.49	21	2.94	5	0.70	2	0.28	2	0.28
猪圈	836	5	0.60	482	57.66	178	21.29	145	17.34	21	2.51	1	0.12	4	0.48
合计	1932	728	37.68	689	35.66	249	12.89	177	9.16	49	2.54	27	1.40	13	0.67

2.2 吸血库蚊胃血血源、吸血习性与人血指数 对122份饱血蚊胃血经PCR检测结果显示,103份蚊胃血分别扩增出目标动物血源相对应的条带,19份蚊胃血未扩增出任何条带,可能为其他未知血源。M号为DL1000 DNA Marker, 22号为阳性对照,21号为阴性对照,其余1~20为蚊胃血扩增出的猪血特异性条带,片段大小为453 bp(图1)。



注: M. DL1000 DNA Marker; 1~20. 蚊胃血猪血源; 21. 阴性对照; 22. 阳性对照

图1 PCR扩增蚊胃血(猪血源)结果

Figure 1 PCR amplification results of *Culicoides* blood meal (containing DNA of pigs)

荒川库蚊检测胃血46份,检出人源血6份(其中包括人/鸡混合血2份,人/鸡/猪混合血3份,人/猪/鸽子1份),占13.04%;鸡源血27份,占58.70%,猪源血4份,占8.70%;鸽子源血2份,占4.35%。未检出鼠、牛、犬和羊血源。荒川库蚊吸血动物对象主要为鸡、人、猪和鸽子4种。

尖喙库蚊共检测胃血19份,检测人源血12份(单独人血2份,人/猪混合血10份),占63.16%;猪源血14份(单独猪血4份,人/猪混合血10份),占73.68%。未检出鸡、鼠、牛、犬、鸽子和羊血源。尖喙库蚊吸血动物对象主要为人、猪2种。

刺螯库蚊共检测胃血42份,检出人源血14份(单独人血5份,人/猪混合血8份,人/犬混合血1份),占33.33%;检出猪源血36份(单独猪血27份,人/猪混合血8份,猪/牛1份),占85.71%;检出牛和犬血各1份。分别以人/犬和猪/牛混合血存在。未检出鸡、鼠、鸽子和羊血源。刺螯库蚊吸血对象主要为人、猪、犬、牛4种。



原野库蠓共检测胃血 15 份,检出人血源 15 份(单独人血 4 份,人/猪混合血 11 份),占 100%;检出猪血源 11 份,均为人/猪混合血,占 73.33%。未检出鸡、鼠、牛、犬、鸽子和羊血源。原野库蠓吸血对象主要为人、猪 2 种。

4 种不同的吸血库蠓吸食人血指数荒川库蠓为 0.13,尖喙库蠓为 0.63,刺螯库蠓为 0.33,原野库蠓为 1.00,见表 3。

表 3 南昌市安义县郊区 4 种不同吸血库蠓血源鉴定结果  
Table 3 Blood meal identification for four different species of *Culicoides* in the suburb of Anyi county, Nanchang, China

蠓种	饱血库蠓 数量(只)	血源(份)								人血指数 (HBI)
		人	鸡	猪	鼠	牛	犬	鸽子	羊	
荒川库蠓	46	6	27	4	0	0	0	2	0	0.13
尖喙库蠓	19	12	0	14	0	0	0	0	0	0.63
刺螯库蠓	42	14	0	36	0	1	1	0	0	0.33
原野库蠓	15	15	0	11	0	0	0	0	0	1.00
合计	122	47	27	65	0	1	1	2	0	0.39

3 讨 论

本次调查选择了与人类活动关系密切的农户、鸡圈和猪圈等生境采集样本。农村生境是典型的人、畜混住,村落中有人、鸡、猪、牛、犬、鸽子和鼠等动物,农村的鸡圈和猪圈生境大都设置在人居环境内或附近,在此生境中能较全面的反映吸血库蠓的吸血习性。通过诱蚊灯在不同生境的诱集调查,结果显示农户以荒川库蠓和尖喙库蠓为主,鸡圈主要以荒川库蠓为主,猪圈以尖喙库蠓和原野库蠓为主,与 Liu 等<sup>[2]</sup>研究结果相似。

吸血库蠓吸血习性目前主要是通过生态学调查其在不同生境的吸血率来反映<sup>[3]</sup>,或是捕捉正在吸食动物血液的库蠓,以此来明确该吸血库蠓的吸血对象。如生态学调查研究表明荒川库蠓是刺吸禽血蠓种,不显库蠓(*Culicoides obsoletus*)、刺螯库蠓和雪翅库蠓(*Culicoides chiopterus*)刺吸牛血;尖喙库蠓和异域库蠓嗜吸家畜血<sup>[1]</sup>。近年来基于分子标志的各种鉴定技术已被应用于蚊胃血源的鉴定<sup>[4-5]</sup>,但国内尚无应用 PCR 技术检测吸血库蠓胃血血源的研究。本研究应用 PCR 技术对采集的饱血库蠓进行了胃血血源的鉴定,为避免因 PCR 扩增失败,或蠓胃血血源动物并非上述 8 种动物血源而导致的结果误判,本研究在实验过程中加入了阳性和阴性对照。共检测了 122 份饱血蠓胃血,根据本实验体系(人、猪、牛、鸡、鸽子、鼠、羊和犬)能够判定血源的库蠓为 103 只,占检测库蠓总数的 84.43%,另有 19 只库蠓未扩增出目的条带。目的条带未能扩增可能有

模板质量问题或蠓胃血源为体系外的动物两方面原因。由于本研究采用的是采集 24 h 内的标本,剔除了时间较长或保存不当的标本,在 DNA 提取过程进行质量控制等,大大减少了因蠓胃血 DNA 模板的质量问题而导致的检测失败,故未扩增出目的条带的蠓胃血可能来源于本实验设定体系外的其他动物。

已扩增出条带研究结果显示荒川库蠓嗜吸鸡血(58.70%),兼吸人、猪或鸽子血,吸血动物对象达 4 种;尖喙库蠓嗜吸猪血(73.68%)和人血(63.16%),吸血动物对象 2 种;刺螯库蠓嗜吸猪血(85.71%),兼吸人血、犬血或牛血,吸血动物对象 4 种;原野库蠓嗜吸人血(100%)和猪血(84.62%),吸血动物对象 2 种。这也揭示了荒川库蠓、尖喙库蠓、原野库蠓和刺螯库蠓均为兼性吸血,且 4 种吸血库蠓的胃血中均鉴定到人血,吸血动物数量达 2~4 种,具有吸血多样性的特点。这一特点也反映了吸血库蠓吸血行为的随机性、机会性,一旦吸血时被干扰,在一个多动物共同存在的环境范围内,吸血库蠓可选择的吸血对象较多,可能会再次或多次寻找不同的宿主动物进行吸血,直到吸饱为止。本研究未检测到鼠和羊的阳性血源,与本调查吸血库蠓主要采集于农户、鸡圈和猪圈生境有关。同时与我们对村落周边动物分布调查结果相符,村落周边没有羊群的存在;而鼠属于隐蔽性活动动物,大多时间藏于鼠洞内,不利于吸血库蠓的吸血,或是本研究检测的 4 种库蠓均不吸食鼠血,这有待于进一步的研究。

本研究揭示了荒川库蠓、尖喙库蠓、刺螯库蠓和原野库蠓在人、畜等多种动物共同存在环境下其吸血习性多样,4 种库蠓除吸食牲畜、禽类等动物血液外,均有吸食人血的习性,这也为进一步研究吸血库蠓的公共卫生意义提供了理论依据。同时本研究建立的 PCR 方法能有效的检测出吸血库蠓胃血的来源,结果特异性强,操作简便易行,具有良好的现场应用前景。

参考文献

[1] 虞以新. 中国蠓科昆虫[M]. 北京:军事医学科学出版社,2006: 2-3,1655.  
[2] Liu YQ, Tao HY, Yu YX, et al. Molecular differentiation and species composition of genus *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in different habitats in southern China[J]. Vet Parasitol, 2018, 254:49-57. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.02.035.  
[3] 刘国平,曹玉玺,龙浩宇,等. 湖南省新晃县和城步县吸血蠓的调查研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2016, 22(6):586-588.  
[4] 朱长强,韩坤,艾乐乐,等. 应用 PCR 技术检测中华按蚊蚊胃血源[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(4):906-910.  
[5] 余海涛,张录顺,谭开科,等. 聚合酶链式反应(PCR)扩增基因鉴定蚊胃血血源[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2014, 12(1):4-6.

收稿日期:2019-04-17 (编辑:陈秀丽)