

DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.155

· 实验研究 ·

重庆綦江赶水地区库蠓及其胃血血源分子鉴定

卢 雪, 汪 琳, 徐媛媛, 刘江欣, 代青浪, 侯晓晖

摘要: 目的 利用物种线粒体 CO I 基因对吸血库蠓胃血来源进行检测, 研究库蠓的吸血习性。方法 采用诱蚊灯法于重庆綦江赶水地区不同生境采集吸血库蠓, 并调查该地区吸血库蠓种类组成; 同时根据周边环境中库蠓可能的吸血对象的线粒体 CO I 基因序列差异, 设计物种特异性引物, 采用 PCR 技术对吸血库蠓胃内血粉进行线粒体 CO I 基因扩增, 通过将扩增产物与不同物种所对应的目的条带大小进行匹配, 检测吸血库蠓胃内血粉种属来源。**结果** 鸡舍、羊舍和鸡鸭混合圈舍主要以荒川库蠓为主, 分别占 93.36%、75.26% 和 94.29%, 猪舍以洋岛库蠓为主, 占 69.44%。通过随机抽样, 对 6 种主要吸血库蠓的 190 份饱血库蠓胃血进行 PCR 检测, 结果显示上述种类都存在兼性吸血的现象, 可同时吸食 4~6 种动物的血液, 其中琉球库蠓和荒川库蠓兼具吸食人血, 两者吸食人血比例分别为 56.52% 和 1.39%。**结论** 本研究初步证实物种线粒体 CO I 基因序列可应用于吸血库蠓胃血来源的检测, 同时发现 6 种吸血库蠓都为兼性吸血, 具有吸血习性多样、对象广泛的特点。

关键词: 吸血蠓; 胃血血源; CO I 基因; 吸血偏好; 不同畜舍

中图分类号: R384.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2021)12-1064-07

Molecular identification of gastric blood source of *Culicoides* in Ganshui Town, Qijiang, Chongqing, China

LU Xue, WANG Lin, XU Yuan-yuan, LIU Jiang-xin, DAI Qing-lang, HOU Xiao-hui

(School of Basic Medical Science, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China)

Abstract: This study aimed to use the mitochondrial CO I gene of the species to detect the source of gastric blood from the blood-sucking *Culicoides*, and to study the blood-sucking habits of the midges. The mosquito trap method was used to collect blood-sucking *Culicoides* in different habitats in the Ganshui Town, Qijiang District, Chongqing, China, and to investigate the species composition of blood-sucking *Culicoides* in the area; at the same time, according to the differences in the mitochondrial CO I gene sequence of the possible blood-sucking objects of the blood-sucking objects in the surrounding environment, the species-specific design was designed. Using PCR technology to amplify the mitochondrial CO I gene of blood meal of blood-sucking midge stomach, by matching the amplified product with the target band size corresponding to different species, detect the source of blood meal of blood-sucking *Culicoides* stomach. The results showed that the habitats of chicken houses, sheep houses and chicken-duck mixed houses were mainly *C. arakawai*, accounting for 93.35%, 75.26% and 94.29%, respectively, and the pig houses were mainly *C. kinabaluensis*, accounting for 69.44%. Through random sampling, PCR detection was performed on 190 full blood-sucking *Culicoides* gastric blood from 6 types of *Culicoides*. All 6 types of *Culicoides* had facultative blood-sucking phenomenon and sucked the blood of 4~6 kinds of animals at the same time. Among them, *C. actoni* and *C. arakawai* had the ability to suck the habit of human blood, accounted for 56.52% and 1.39% respectively. Therefore, this study preliminarily confirmed that the mitochondrial CO I gene sequence of the species can be used to detect the source of gastric blood from the blood-sucking *Culicoides*. At the same time, it was found that all six *Culicoides* were facultative blood-sucking, with various blood-sucking habits and a wide range of blood-sucking objects.

Keywords: 血吸虫; 胃血血源; CO I 基因; 血吸虫偏好; 不同畜舍

国家自然科学基金项目(No.81802040、No.31960102); 校级大学生创新创业训练计划项目(No.ZYDC2018003)

通讯作者: 侯晓晖, Email: hxh19801122@163.com;

ORCID: 0000-0002-7713-2808

作者单位: 遵义医科大学基础医学院, 遵义 563099

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81802040, No.31960102), and Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Zunyi Medical University (No.ZYDC2018003).

Corresponding author: Hou Xiao-hui, Email: hxh19801122@163.com

库蠓(*Culicoides Latreille*, 1809)隶属于双翅目(Diptera)蠓科(Ceratopogonidae)库蠓属(*Culicoides*),是已知吸血蠓类中,数量最庞大的一个属,广泛分布于世界各地。截至 2020 年,全球已发现 1 347 种,我国已知 480 种^[1-2]。库蠓体型微小,具有吸血特性,可直接侵袭人和动物,并在吸血过程中造成人或动物真皮层机械损伤,类似于马蝇(虻科 Tabanidae)、黑蝇(蚋科 Simuliidae)和蜱虫(蜱总科 Ixodoidea)等吸血昆虫^[3]。为了便于嗜血,库蠓唾液中含有抗凝血因子、蛋白酶抑制剂和免疫调节蛋白^[4-5],当其吸食受到病毒感染的宿主后,其唾液便可携带有病毒性或非病毒性病原体,如乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、蓝舌病毒(Bluetongue virus, BTV)、Schmallenberg 病毒(Schmallenberg virus, SBV)、卡氏住白虫(*Leucocytozoon caulleryi*)等^[6-7]。因此,作为虫媒病毒的重要载体,库蠓可对人和动物造成一定的危害,在疾病传播研究领域中具有不可忽视的地位。

昆虫媒介载体与其取食动物之间的接触频率同病原体扩散及传播的风险密切相关,故吸血蠓种类鉴定、吸血习性及其胃血来源鉴定是蠓媒传染病流行病学调查的重要内容及防治的基础。吸血蠓的吸血习性及取食偏好研究主要是通过其在不同生境中吸血率的生态学调查来反映^[8-9]。随着分子生物学技术的发展,基于分子标志的检测技术也被应用于吸血蠓胃血来源的鉴定^[10],国内仅见刘仰青等人利用 PCR 技术对库蠓的取食偏好进行研究^[11]。CO I 基因存在于线粒体基因组中,相比线粒体其他基因,其具有较为保守的结构及大小,同时包含大量遗传信息,且在同一物种不同个体之间仅有 1%~2% 的差异,而不同物种之间差异则较大^[12-13],是目前应用较多的分子标记。重庆地处我国西南地区,由于其地理条件复杂,动植物多样,植被繁茂且农村覆盖面积相对较广,有利于吸血库蠓的繁殖和生存。因此,本研究基于不同物种 CO I 基因,对重庆綦江赶水地区库蠓的胃血来源进行种属鉴定,此项工作有助于了解库蠓可能的取食偏好及病原体传播的类群,为该地区疾病防治工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 生活环境调查

调查现场选择在重庆市綦江区赶水镇周边村落(28°75'40"N, 106°72'75"E),该地区为典型的人、畜混住类型,水稻和蔬菜为当地农民

主要的农作物。村落内住房主要由钢筋水泥混凝土结构和旧式瓦房组成,各村落内有鸡、鸭、猪、牛和羊等家畜家禽,且禽畜厩舍多紧邻人居住房。

1.2 库蠓的采集

2019 年 7 月 16 日至 7 月 28 日,研究人员先后在 4 种不同圈舍(猪舍、羊舍、鸡舍及鸡鸭混合舍)灯诱蠓虫,每个采集点分别设置 1~2 盏光触媒诱虫灯(购自武汉恒冠生物科技有限公司),该灯挂于距地面约 1.5 m 处,于当日日落后傍晚时分挂灯(18:00—19:00)至次日清晨收灯(6:00—7:00),持续灯诱 12 h,每种生境采集两晚。将采集到的库蠓用乙酸乙酯(购自天津市富宇精细化工有限公司)麻醉后保存于 75% 乙醇中,后续进行分类和鉴定。

1.3 库蠓标本制作及鉴定

将采集的库蠓初步分类并计数,挑出饱血库蠓,在体视镜下利用解剖针将饱血腹部分离,再将其余部分制成永久玻片,根据虞以新等^[14]的方法进行形态分类鉴定。

1.4 库蠓腹部血粉及寄主 DNA 提取

将分离出来的饱血腹部血粉单独装入 EP 管中,先与其胸部和头部标本匹配标记,再用蒸馏水漂洗 2 次,最后利用 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒提取其 DNA,置于 -20 °C 保存备用。此外,寄主动物的血液或组织 DNA 也利用上述试剂盒进行提取及保存。

1.5 寄主来源 PCR 鉴定

根据不同物种(猪、人、羊、鼠、鸭、鸡、牛和犬)的 CO I 基因序列差异,设计其特异性引物(表 1),由上海生工生物工程有限公司合成。以腹部血粉 DNA 为模板,分别加入 8 种常见寄主动物 CO I 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,其反应体系为:2 × Taq PCR MasterMix 4.5 μL;引物 p1(100 pmol/L) 0.2 μL;引物 p2(100 pmol/L) 0.2 μL;模板 DNA 1 μL;ddH₂O 6.6 μL,总体积 12.5 μL;反应条件为:95 °C 预变性 5 min,1 个循环;94 °C 变性 30 s,不同引物的退火温度不同,即猪为 53 °C、人为 54.9 °C、羊为 55.6 °C、鼠为 56.5 °C、鸭为 57.4 °C、鸡为 58.5 °C、牛为 59.4 °C、犬为 61 °C,退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,1 个循环;最后,4 °C 保存。PCR 扩增设置阴性对照和阳性对照,阴性对照以 ddH₂O 来代替 DNA 模板,阳性对照以不同动物的 DNA 为模板,以避免出现假阳性或假阴性结果。阳性对照中人血样本来自志愿者静脉采集,鼠血样本来自实验小鼠,猪、羊、鸡、鸭、牛和犬的样本购自超市或农贸市场。

表 1 8 种用于血源鉴定的特异性引物
Tab.1 Eight specific primers for blood source identification

种属	基因	引物序列(5'—3')	片段长度/bp
人 (Human)	CO I	F:CAATACCAAACGCCCTTTC R:AGGTTTATGGAGGGTTCTCTAC	944
猪 (pig)	CO I	F:TCACCCGCAATACTATGAGCTCTG R:TGATAGGGAGGAGGACATCCG	506
牛 (Cattle)	CO I	F:TGAATTAGGCCAACCGGAA R:GTCGACGTCTATTCCGACAGT	784
羊 (Goat)	CO I	F:CAACCCGGAACCCCTACTTGG R:ATGCCTGCTAGGTGTAGGGA	338
鼠 (Mouse)	CO I	F:TACCCACCTCTAGCCGGAAA R:GTGATATGGTGGAGGGCAGC	1 125
鸡 (Chicken)	CO I	F:CTTCGGTCACCCGAAGTTT R:CCAGTTGGATGGCGATGAT	240
鸭 (Duck)	CO I	F:CCCCACATAGCATTCCCACG R:CGTGTAGGGTGGCGAGTCAG	718
犬 (Dog)	CO I	F:ACTAGGTCAAGCCGGTACTT R:CAGTGGCAAATCCTCCCAT	1 068

1.6 PCR 产物检测 取 5 μ L PCR 扩增产物,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,与 DNA Marker 电泳条带进行比对判断出扩增条带的大小,根据表 1 确定模板结果,即同一库蠓腹部血粉 DNA 扩增出 1 种、2 种或多种条带,提示该库蠓可吸食 1 种、2 种或多种寄主动物血液。

2 结 果

2.1 种类组成 本次调查共采集吸血库蠓 1 796 头,经形态学鉴定有 4 亚属 9 种;各蠓种名录如下:

- (1) 带纹亚属 (Subgenus *Beltranomyia* Vargas, 1953)
 - ① 荒川库蠓 (*C. arakawai* Arakawa, 1910)
 - ② 二囊亚属 (Subgenus *Avaritia* Fox)
 - ③ 洋岛库蠓 (*C. kinabaluensis* Wirth et Hubert, 1989)
 - ④ 连斑库蠓 (*C. jacobsoni* Macfie, 1934)
 - ⑤ 条带库蠓 (*C. tainanus* Kieffer, 1916)
 - ⑥ 库蠓亚属 (Subgenus *Culicoides* Latreille, 1809)
 - ⑦ 新替库蠓 (*C. newsteadi* Austen, 1921)
 - ⑧ 刺螯库蠓 (*C. punctatus* Meigen, 1804)
 - ⑨ 屋室亚属 (Subgenus *Oecacta* Poey, 1853)
 - ⑩ 尖喙库蠓 (*C. oxystoma* Kieffer, 1910)

⑨ 陵水库蠓 (*C. lingshuiensis* Lee, 1975)

2.2 种群组成 重庆綦江赶水地区的优势蠓种为荒川库蠓 (*C. arakawai*, 72.44%), 其次是洋岛库蠓 (*C. kinabaluensis*, 18.10%), 而其他 7 种库蠓的数量较少,共占 9.47% (表 2)。

表 2 重庆綦江赶水地区主要库蠓种群组成

Tab.2 Community composition of the main hematophagous midges in the Ganshui Town, Qijiang, Chongqing

种类	数量/只	构成比/%
荒川库蠓 (<i>C. arakawai</i>)	1 301	72.44
洋岛库蠓 (<i>C. kinabaluensis</i>)	325	18.10
刺螯库蠓 (<i>C. punctatus</i>)	54	3.01
琉球库蠓 (<i>C. actoni</i>)	42	2.34
尖喙库蠓 (<i>C. oxystoma</i>)	49	2.73
陵水库蠓 (<i>C. lingshuiensis</i>)	13	0.72
其他库蠓 (Other <i>Culicoides</i>)	12	0.67
合计	1 796	100

2.3 不同畜舍主要蠓种的诱捕率 不同畜舍主要库蠓种群组成有所不同,羊舍、鸡舍和鸡鸭混合舍的优势种均为荒川库蠓,分别占捕获总数的 75.26%、93.36% 和 94.29%;而猪舍的优势种则为洋岛库蠓,占捕获总数 69.44% (表 3)。

表 3 重庆綦江赶水地区不同生境库蠓组成

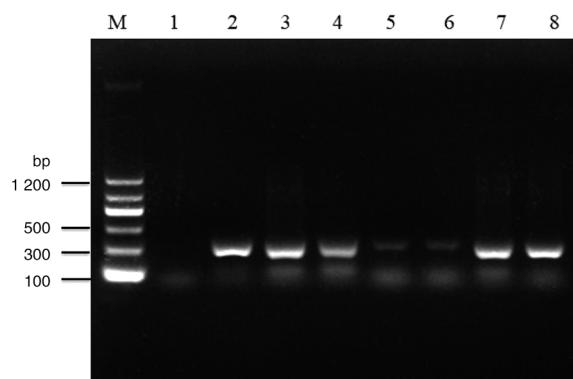
Tab.3 Composition of blood-sucking *Culicoides* in different habitats in the Ganshui Town, Qijiang, Chongqing

生境	库蠓 总数/ 只	荒川库蠓		洋岛库蠓		刺螯库蠓		琉球库蠓		尖喙库蠓		陵水库蠓		其他库蠓	
		<i>C. arakawai</i>		<i>C. kinabaluensis</i>		<i>C. punctatus</i>		<i>C. actoni</i>		<i>C. oxystoma</i>		<i>C. lingshuiensis</i>		Other Culicoides	
		只	%	只	%	只	%	只	%	只	%	只	%	只	%
鸡舍	813	759	93.36	26	3.20	3	0.37	11	1.35	1	0.12	13	1.60	0	0
猪舍	373	3	0.80	259	69.44	38	10.19	21	5.63	43	11.53	0	0	9	2.41
羊舍	190	143	75.26	31	16.32	5	2.63	10	5.26	1	0.53	0	0	0	0
鸡鸭舍	420	396	94.29	9	2.14	8	1.90	0	0.00	4	0.95	0	0	3	0.71
合计	1 796	1 301	72.44	325	18.10	54	3.01	42	2.34	49	2.73	13	0.72	12	0.67

2.4 不同畜舍主要蠓种的吸血率 本次调查重庆綦江赶水地区 9 种吸血库蠓总吸血率为 72.10%,除去陵水库蠓(*C. lingshuiensis*)等其他库蠓因总捕获数过少而不具代表性(仅为 25 只)外,其中荒川库蠓(*C. arakawai*)的吸血率最高(79.55%),刺螯库蠓(*C. punctatus*)的吸血率最低(51.85%);此外,鸡鸭混合舍中总吸血率为 81.18% 远高于其他圈舍,其他圈舍中羊舍最低仅为 65.83%(表 4)。

2.5 不同库蠓血源鉴定结果 将所有样本按照种属、生境进行分类,从中随机抽检 190 份饱血库蠓胃血样本进行 PCR 扩增,检测其所对应的寄主动物。抽样率分别为:荒川库蠓(*C. arakawai*) 12.68%;鸡舍 16.53%,猪舍 0%,羊舍 7.14%,鸡鸭舍 10.37%;洋岛库蠓(*C. kinabaluensis*) 19.42%;鸡舍 100%,猪舍 13.89%,羊舍 31.25%,鸡鸭舍 100%;刺螯库

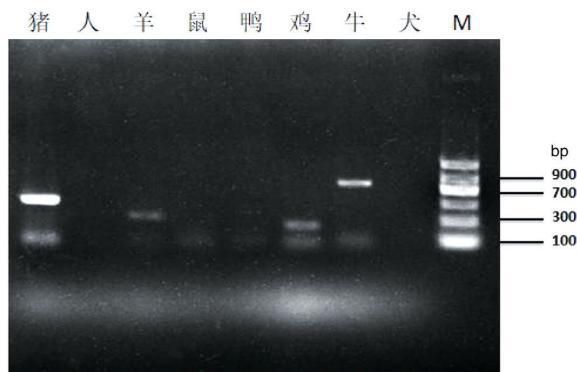
蠓(*C. punctatus*) 60.71%;鸡舍 0%,猪舍 59.26%,羊舍 0%,鸡鸭舍 100%;琉球库蠓(*C. actoni*) 100%;鸡舍 0%,猪舍 100%,羊舍 100%,鸡鸭舍 0%;尖喙库蠓(*C. oxystoma*) 78.79%;鸡舍 0%,猪舍 78.13%,羊舍 100%,鸡鸭舍 0%;陵水库蠓(*C. lingshuiensis*) 92.31%;鸡舍 92.31%,猪舍 0%,羊舍 0%,鸡鸭舍 0%。由图 1 可知,6 头荒川库蠓饱血腹部血粉的 PCR 鉴定结果,其中 1 号泳道为阴性对照,2 号泳道为鸡源阳性对照,3~8 号泳道为不同编号的荒川库蠓胃血 PCR 扩增条带,片段大小为 240 bp。由图 2 可知,1 头琉球库蠓饱血腹部血粉的各血源 PCR 鉴定结果,其中猪泳道为阳性,条带大小为 506 bp、羊泳道为阳性,条带大小为 338 bp、鸡和牛泳道也为阳性,条带大小分别为 240 bp 和 784 bp。



M:DNA Marker;1:阴性对照;2:阳性对照;3~8:荒川库蠓胃血 PCR

图 1 PCR 扩增荒川库蠓 *C. arakawai* 胃血(鸡血源)结果

Fig.1 Results of PCR amplification of *C. arakawai* blood meal (containing DNA of chickens)



M:DNA Marker;1~8:琉球库蠓胃血各血源 PCR 鉴定

图 2 PCR 扩增琉球库蠓 *C. actoni* 胃血(各血源)结果

Fig.2 Results of PCR amplification of *C. actoni* blood meal (all blood sources)

表 4 重庆綦江赶水地区不同畜舍主要蠓种的吸血率

Tab.4 Blood-sucking rate of predominant midge species in different barns in the Ganshui Town, Qijiang, Chongqing

生境	总诱捕数	总吸血数	总吸血率(%)	荒川库蠓 <i>C. arakawai</i>			洋岛库蠓 <i>C. kinabaluensis</i>			刺螯库蠓 <i>C. punctatus</i>			琉球库蠓 <i>C. actoni</i>			尖喙库蠓 <i>C. oxytoma</i>			陵水库蠓 <i>C. lingshuiensis</i>			其他库蠓		
				诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)	诱捕数	吸血数	吸血率(%)
(只)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)	(只)	(只)	(%)
鸡舍	377	260	68.97	323	242	74.92	26	5	19.23	3	0	0	11	0	0	1	0	0	13	13	100	0	0	0
猪舍	371	256	69.00	2	0	0	258	180	69.77	38	27	71.05	21	17	80.95	43	32	74.42	0	0	0	9	0	0
羊舍	120	79	65.83	73	56	76.71	31	16	51.61	5	0	0	10	6	60.00	1	1	100	0	0	0	0	0	0
鸡鸭舍	340	276	81.18	316	270	85.44	9	5	55.56	8	1	12.50	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0
合计	1208	871	72.10	714	568	79.55	324	206	63.58	54	28	51.85	42	23	54.76	49	33	67.35	13	13	100	12	0	0

检测荒川库蠓(*C. arakawai*)的胃血 72 份, 鸡源血 72 份, 占 100.00%; 鸭源血 14 份, 占 19.44%; 牛源血 6 份, 占 8.33%; 鼠源血 3 份, 占 4.17%; 只检出人源血 1 份, 占 1.39%; 未检出猪、犬和羊血源。因此, 荒川库蠓的吸血对象为鸡、鸭、牛、鼠和人 5 种。

检测洋岛库蠓(*C. kinabaluensis*)的胃血 40 份, 鸡源血 38 份, 占 95.00%; 羊源血 31 份, 占 77.50%; 猪源血 28 份, 占 70.00%; 牛源血 6 份, 占 15.00%; 鸭源血 2 份, 占 5.00%; 鼠源血 1 份, 占 2.50%; 未检出人和犬血源。因此, 洋岛库蠓的吸血对象为鸡、羊、猪、牛、鸭和鼠 6 种。

检测刺螯库蠓(*C. punctatus*)的胃血 17 份, 羊源血 11 份, 占 64.71%; 猪源血 10 份, 占 58.82%; 牛源血 6 份, 占 35.29%; 鸡源血 4 份, 占 23.53%; 未检测出鼠、人、鸭和犬源血。因此, 刺螯库蠓的吸血对象为羊、猪、牛和鸡 4 种。

检测琉球库蠓(*C. actoni*)的胃血 23 份, 鸡源血 23 份, 占 100.00%; 牛源血 16 份, 占 69.57%; 猪源血 15 份, 占 65.22%; 人源血 13 份, 占 56.52%; 羊源血 10 份, 占 43.48%; 未检测出鼠、鸭和犬源血。因此, 琉球库蠓的吸血对象为鸡、牛、猪、人和羊 5 种。

检测尖喙库蠓(*C. oxytoma*)的胃血 26 份, 猪源血 23 份, 占 88.46%; 羊源血 16 份, 占 61.54%; 鸡源血 15 份, 占 57.69%; 牛源血 10 份, 占 38.46%; 未检测出鼠、人、鸭和犬源血。因此, 尖喙库蠓的吸血对象为猪、羊、鸡和牛 4 种。

检测陵水库蠓(*C. lingshuiensis*)的胃血 12 份, 鸡源血 12 份, 占 100%; 鸭源血 4 份, 33.33%; 鼠源血 1 份, 占 8.33%; 牛源血 1 份, 占 8.33%; 未检测出猪、人、羊和犬源血。因此, 陵水库蠓的吸血对象为鸡、鸭、牛和鼠 4 种。不同生境采集的同种库蠓寄主有所不同(表 5)。

表 5 重庆綦江赶水地区 6 种不同吸血库蠓血源鉴定结果

Tab.5 Blood source identification for six different species of *Culicoides* in the Ganshui Town, Qijiang, Chongqing, China

蠓 种	生境	饱血库蠓		抽样率/%	血源								总抽样率/%
		检测数量/只	人		猪	牛	羊	鼠	鸡	鸭	犬		
荒川库蠓(<i>C. arakawai</i>)	鸡舍	40	16.53	1	—	4	—	—	40	6	—	—	12.68
	猪舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	羊舍	4	7.14	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—
	鸡鸭舍	28	10.37	—	—	2	—	3	28	8	—	—	—
洋岛库蠓(<i>C. kinabaluensis</i>)	鸡舍	5	100	—	1	—	1	—	5	—	—	—	19.42
	猪舍	25	13.89	—	23	6	24	—	24	—	—	—	—
	羊舍	5	31.25	—	4	—	5	—	4	—	—	—	—
	鸡鸭舍	5	100	—	—	—	1	1	5	2	—	—	—
刺螯库蠓(<i>C. punctatus</i>)	鸡舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	60.71
	猪舍	16	59.26	—	10	6	11	—	3	—	—	—	—
	羊舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鸡鸭舍	1	100	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—

表 5(续)

螺 种	生境	饱血库蠓 检测数量/ 只	抽样 率/%	血源							总抽样 率/%	
				人	猪	牛	羊	鼠	鸡	鸭		
琉球库蠓(<i>C. actoni</i>)	鸡舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100.00
	猪舍	17	100	11	15	16	8	—	17	—	—	—
	羊舍	6	100	2	—	—	2	—	6	—	—	—
	鸡鸭舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
尖喙库蠓(<i>C. oxystoma</i>)	鸡舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	78.79
	猪舍	25	78.13	—	23	9	15	—	14	—	—	—
	羊舍	1	100	—	—	1	1	—	1	—	—	—
	鸡鸭舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
陵水库蠓(<i>C. lingshuiensis</i>)	鸡舍	12	92.31	—	—	1	—	1	12	4	—	92.31
	猪舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	羊舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鸡鸭舍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
合计		190	21.81	14	76	45	68	5	164	20	0	21.81

3 讨 论

本研究在重庆綦江赶水地区的不同圈舍中共捕获9种库蠓,其中荒川库蠓(*C. arakawai*)所占比例最高,其次是洋岛库蠓(*C. kinabaluensis*)。此外,本研究中禽类圈舍和羊舍均以荒川库蠓为优势种,这与海南省禽类圈舍吸血蠓调查结果相一致^[15],但猪舍的优势种有所不同,后者猪舍和羊舍中尖喙库蠓(*C. oxystoma*)为主要蠓种;云南地区猪舍和鸡舍吸血蠓调查与本研究结果也不同,其猪舍和鸡舍优势种群为卢特库蠓(*C. luteolus*)^[16]。近年来国内不同地区、不同畜舍生境吸血蠓的调查均发现,同种畜舍、不同地理区域的吸血库蠓优势种类组成不同。

重庆綦江赶水地区是典型的人畜混住生境,这为库蠓提供了多样的血餐来源,故一种吸血库蠓能以1种及以上的动物为吸血对象,如生态学调查发现荒川库蠓(*C. arakawai*)喜吸食鸡血、兴安库蠓(*C. sinanoensis*)和刺螯库蠓(*C. punctatus*)嗜吸牛血、东方库蠓(*C. orientalis*)偏好吸食猪血^[17-18]。近年来,随着分子技术的发展,DNA检测技术也应用于库蠓胃血血源的鉴定,与生态学调查方法相比,用分子鉴定技术研究昆虫血粉的来源,大大提高了在物种水平上鉴定宿主的准确性。自2003年Hebert等提出线粒体CO I基因是DNA条形码标准基因后^[19],已有越来越多地学者利用CO I基因进行昆虫分子分类和系统发育研究,但我国尚未见基于该分子标记进行吸血蠓的胃血来源研究。本研究则是基于CO I基因条形码,利用不同物种CO I基因序列差异,设计物种特异性引物,采用PCR对库蠓

胃部血粉进行扩增,扩增产物条带大小与理论预测值一致。同时,本研究为了避免PCR检测失误对结果造成误判,每次PCR扩增均设置了阳性对照和阴性对照,该方法可以避免出现假阳性和假阴性结果,进而特异性检测出库蠓胃内不同来源的血粉。另外,针对本研究中饱血库蠓的样本量较大,我们分别对不同地点、不同畜舍和不同种类的饱血库蠓进行了抽样,共检测库蠓腹部血粉190份,研究发现,荒川库蠓、洋岛库蠓、琉球库蠓和陵水库蠓均吸食鸡血,其中荒川库蠓除吸食鸡血外,还吸食鸭、牛、鼠和人,与刘仰青等^[11]研究结果一致;洋岛库蠓(*C. kinabaluensis*)还喜食羊血和猪血,分别占77.50%和70.00%,其吸血对象种类多达6种;而尖喙库蠓和刺螯库蠓则偏好吸食猪血和羊血,分别占88.46%、61.54%和58.82%、64.71%,两者的吸血对象还包括鸡和牛,其中刺螯库蠓吸食牛血与Tomazatos等报道相一致^[20];此外,本研究还发现琉球库蠓和荒川库蠓除喜食鸡血外,还存在吸食人血的现象,其比例分别为56.52%和1.39%,虽然其他库蠓腹部血粉尚未检测出人血成份,但由于抽检的样本量有限,暂不能判断其他库蠓是否吸食人血。本研究中鸡是6种库蠓的取食对象,与此次调查地区中鸡的分布广、数量多有关;除鸡以外,猪、牛、羊也是洋岛库蠓、尖喙库蠓、琉球库蠓和刺螯库蠓的主要取食对象,这可能与上述4种库蠓具有相似的吸血习性有关。最后,本研究中未检测到犬的血源,这可能与此次采集地区村落中犬的数量较少有关,亦或未抽取到吸食犬血的库蠓样本,具体原因尚需进一步研究。由于

本研究样本量相对较大,抽样检测导致检测结果具有一定的局限性,希望在后期的工作中可进一步研究建立多重、快速且更为灵敏的检测方法,批量开展吸血库蠓胃血血源鉴定。

本研究通过对库蠓胃血来源的鉴定,初步明确6种库蠓的吸血习性,主要以4~6种动物为寄主,揭示了不同种类吸血库蠓具有不同的吸血偏好以及存在吸血多样性的特点。此外,当多种动物同时存在时,库蠓选择寄主具有一定的随机性和机会性,其吸血行为被干扰后,可以另一种动物为食。本研究为重庆地区常见库蠓的取食偏好提供了重要的信息,为该地区蠓传疾病的防控提供参考,具有重要的公共卫生意义。

利益冲突:无

引用本文格式:卢雪,汪琳,徐媛媛,等.重庆綦江赶水地区库蠓及胃血血源分子鉴定[J].中国人兽共患病学报,2021,37(12):1064-1070. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.155

参 考 文 献:

- [1] Borkent A, Dominiak P. Catalog of the biting midges of the world (diptera: ceratopogonidae) [J]. Zootaxa, 2020, 4787 (1): 377. DOI: 10.11646/zootaxa.4787.1.1
- [2] 杨定,李竹,刘启飞,等.中国生物物种名录[M].北京:科学出版社,2020:119-220.
- [3] Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, et al. Implication of haemaphagous arthropod salivary proteins in host–vector interactions [J]. Parasit Vector, 2011, 4: 187. DOI: 10.1186/1756-3305-4-187
- [4] Lehiy CJ, Drolet BS. The salivary secretome of the biting midge, *Culicoides sonorensis* [J]. PeerJ, 2014, 2 (1): e426. DOI: 10.7717/peerj.426
- [5] Russell CL, Heesom KJ, Arthur CJ, et al. Identification and isolation of cDNA clones encoding the abundant secreted proteins in the saliva proteome of *Culicoides nubeculosus* [J]. Insect Mol Biol, 2009, 18: 383-393. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2009.00882.x
- [6] Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, et al. PCR identification of *Culicoides* biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses [J]. Parasit Vector, 2012, 5: 213. DOI: 10.1186/1756-3305-5-213
- [7] 范娜,程睿,鲁晓晴,等.蠓虫及其传播的虫媒病毒[J].中国热带医学,2018,18(2):182-187.
- [8] 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.
- [9] 常琼琼,段琛,韩晓静,等.贵州省绥阳县吸血蠓类的调查研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2017,28(2):138-140. DOI:10.11853/j.issn.1003-8280.2017.02.010
- [10] England ME, Pearce-Kelly P, Brugman VA, et al. *Culicoides* species composition and molecular identification of host blood meals at two zoos in the UK [J]. Parasite Vector, 2020, 13: 139. DOI:10.1186/s13071-020-04018-0
- [11] 刘仰青,陶卉英,虞以新,等.吸血库蠓胃血血源分子鉴定及吸血习性多样性研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2019,30(4):418-421. DOI:10.11853/j.issn.1003-8280.2019.04.014
- [12] 岳巧云,邱德义,黄艺文,等.应用DNA条形码技术鉴定未知双翅目蛹[J].中国国境卫生检疫杂志,2011,34(5):343-347.
- [13] Hebert PDN, Cywinski A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(7): 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218
- [14] 虞以新,刘金华,刘国平,等.中国蠓科昆虫[M].北京:军事医学科学出版社,2005:989-1036.
- [15] 刘国平,孙定炜,范娜,等.海南省5市县禽畜厩舍吸血蠓调查[J].中国热带医学,2020,20(5):413-416,428.
- [16] 杨军,张明,王泽,等.云南河口口岸吸血蠓调查[J].中国国境卫生检疫杂志,2018,41(3):170-172.
- [17] 任清明,刘国平,杨军,等.辽宁省宽甸县吸血蠓种群调查研究[J].中华卫生杀虫药械,2020,26(5):433-435.
- [18] 任清明,刘国平,王治,等.东北3省7县(市)牛舍吸血蠓调查研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2021,32(1):5.
- [19] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270 (Suppl 1): 96-99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025
- [20] Tomazatos A, Jöst H, Schulze J, et al. Blood-meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a broad host range and new species records for Romania [J]. Parasit Vector, 2020, 13: 79. DOI: 10.1186/s13071-020-3938-1

收稿日期:2021-03-12 编辑:王晓欢