

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0285-04

【论著】

大理地区肝片形吸虫感染中间宿主实验研究

方文*, 李天美, 李科荣, 陈凤, 刘榆华

【摘要】 目的 了解大理地区肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*) 的中间宿主种类和虫体发育过程及特点。方法 2012 年 7 月~2013 年 7 月, 在大理地区收集牛源肝片形吸虫虫卵, 置 28 °C 水浴箱中孵化; 并在大理农村无粪便污染的农田、沟渠内, 捕捉尖膀胱螺 (*Physa acuta*)、椭圆萝卜螺 (*Radix swinhoei*) 和小土蜗 (*Galba perversa*), 实验前证实无任何吸虫感染。毛蚴分别感染尖膀胱螺、椭圆萝卜螺和小土蜗, 将螺放入泥盆中饲养并观察, 每日检出死螺, 解剖观察幼虫在螺体内发育情况, 直至尾蚴逸出结囊为止。最后收集 10 个囊蚴进行 PCR, 扩增其线粒体 *COX1* 基因部分序列 (*pCOX1*)。结果 前后 8 批次共感染 1 146 只椭圆萝卜螺、996 只尖膀胱螺和 3 307 只小土蜗。2 只椭圆萝卜螺感染后虽发现母雷蚴, 但未见进一步发育到子雷蚴阶段, 而尖膀胱螺则未能感染成功。仅小土蜗感染成功, 感染率为 27.2% (900/3 307)。在水温 22 °C 时, 毛蚴侵入小土蜗后, 发育到胞蚴的时间为 7~15 d、母雷蚴为 11~20 d, 子雷蚴为 30~37 d, 尾蚴成熟逸出, 并结囊形成囊蚴的时间为 42~55 d。囊蚴经 PCR 鉴定为肝片形吸虫, 在约 500 bp 处出现明显的条带。结论 大理地区采集的 3 种螺中, 仅小土蜗成功感染肝片形吸虫。

【关键词】 肝片形吸虫; 中间宿主; 小土蜗; 椭圆萝卜螺; 尖膀胱螺; 大理

中图分类号: 383.26 文献标识码: A

Experimental Infection of *Galba perversa*, *Radix swinhoei* and *Physa acuta* with *Fasciola hepatica* in Dali, Yunnan

FANG Wen*, LI Tian-mei, LI Ke-rong, CHEN Feng, LIU Yu-hua

(Dali Prefectural Institute of Research and Control on Schistosomiasis, Dali 671000, China)

【Abstract】 Objective To determine the intermediate host of *Fasciola hepatica* in Dali of Yunnan Province, and investigate its development and characteristics. **Methods** *F. hepatica* eggs from cattle were collected from July 2012 to July 2013, and placed in 28 °C water bath for incubation. *Galba perversa*, *Radix swinhoei*, and *Physa acuta* were collected from Dali, and used to be infected with *F. hepatica* in the laboratory. Trematode infections were excluded from the snails before experiment. All the snails were infected with *F. hepatica* miracidia, reared in mud pots. Dead snails were dissected for observing the development of *F. hepatica*. The metacercariae were collected and identified by PCR amplification of partial sequence of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COX1*) gene. **Results** A total of 1 146 *R. swinhoei*, 996 *P. acuta*, and 3 307 *G. perversa* snails were infected with *F. hepatica*, respectively. Mother rediae were found in two *R. swinhoei* snails, but no child rediae were observed in the snails. No larval forms were found in *P. acuta*. *G. perversa* was infected by *F. hepatica* with an infection rate of 27.2% (900/3 307). The miracidium escaped from the egg and penetrated into *G. perversa* at temperature 22 °C, developed into a sporocyst after 7–15 days, which transformed into mother redia at the 11st–20th day post-infection. The mother redia developed into daughter redia at the 30th–37th day, and produced cercaria with longtail, and became metacercaria at the 42nd–55th day. PCR confirmed that the metacercariae were that of *F. hepatica*, with an obvious band (approximately 500 bp). **Conclusion** Among the three potential intermediate hosts in Dali, *G. perversa* is experimentally infected with *F. hepatica*.

【Key words】 *Fasciola hepatica*; Intermediate host; *Galba perversa*; *Radix swinhoei*; *Physa acuta*; Dali

* Corresponding author, E-mail: fangwenee@126.com

片形吸虫病是由肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*) 或巨片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 感染引起的, 是

危害牛羊等反刍动物和人的食源性人兽共患寄生虫病, 呈世界性分布。成虫主要寄生于牛、羊等动物和人的肝、胆管内, 引起急、慢性肝、胆管炎等, 致全球每年畜牧业经济损失约 20 亿美元^[1-4]。全球报告人体

作者单位: 云南省大理州血吸虫病防治研究所, 大理 671000

* 通讯作者, E-mail: fangwenee@126.com

感染的国家有60多个，约200多万人^[5]。云南省大理地区不但牛、羊感染肝片形吸虫普遍且局部地区严重流行^[6-8]。2011年11月~2012年2月，大理宾川县曾暴发一起人体巨片形吸虫感染疫情^[9,10]。鉴于当地广泛分布着小土蜗 (*Galba perversa*)、椭圆萝卜螺 (*Radix swinhoei*) 和尖膀胱螺 (*Physa acuta*)^[11]等3种螺类，提示当地可能存在片形吸虫的自然疫源地。为明确大理地区肝片形吸虫的中间宿主种类与虫体在中间宿主体内的发育过程和特点，于2012年7月~2013年7月，开展了肝片形吸虫中间宿主感染的实验研究，结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 肝片形吸虫虫卵来源 收集大理市泰兴市场出售的牛肝中形态符合肝片形吸虫的成虫，解剖镜下剥离子宫，水洗沉淀法收集虫卵，并在显微镜下测量虫卵大小。

1.2 螺类来源 在大理当地农村无粪便污染的农田、沟渠内，捕捉尖膀胱螺、椭圆萝卜螺和小土蜗，并采用压碎法随机抽查所采集螺类总数的10%，以证实无任何吸虫感染。在泥盆中仿照自然生态环境，除种植鱼腥草等水生植物外，还放入高出水面的鹅卵石，以便于各螺爬出水面^[12]。用生菜作为饲料^[13]。

1.3 感染实验 将虫卵分装于小烧杯中，加入去氯水，置28℃水浴箱中孵育，直至毛蚴孵出。采取两种方式感染：①在50~80 ml烧杯中置入10~30只螺，按螺与毛蚴1:50、1:30、1:20和1:10的比例加入毛蚴进行随机感染；②在直径1.5 cm的24孔板中，每孔按螺与毛蚴1:2和1:5比例进行单独感染。感染时需防止螺上爬。感染时间为4~5 h，然后将感染螺放入泥盆中，室温下饲养。每日检出死螺置于玻片上，用压碎法检查并记录幼虫在螺体内的发育情况。

1.4 PCR扩增 取10个囊蚴置含20 μl ddH₂O的Epp管中，加入液体体积一半的玻璃珠，旋涡震荡1 min后瞬时离心，沸水浴5 min，9 600×g离心1 min，上清即为DNA。用于扩增肝片形吸虫线粒体COX1基因部分序列 (pCOX1) 的保守引物的序列为：上游引物JB3: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'；下游引物JB45: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'，引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。反应体系为：ddH₂O 1525 μl、10×PCR缓冲液 25 μl、MgCl₂ 3.5 μl、dNTPs (25 mmol/L) 2 μl，上、下游引物 (50 pmol/μl) 各0.25 μl、Taq DNA聚合酶 (5 U/μl) 0.25 μl、模板DNA 1 μl，总体积25 μl。反应条件为：94℃ 5 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共35个循环；72℃

5 min。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物大小。将PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果用ClustalX 1.81软件进行比对分析。

2 结果

2.1 虫卵孵化 虫卵大小为 (142.5~175.8) μm×(66.6~99.8) μm，平均 (157.5×81.1) μm，卵内充满卵黄细胞，卵盖清晰但卵细胞不明显 (图1A)。孵育后第3天即出现较为明显的卵细胞分裂和聚集 (图1B)。第4天形成毛蚴雏形 (图1C)。第8天卵内毛蚴发育成熟，其乳突、纤毛和眼点等清晰可见，眼点为黑色圆点或X形，活动明显 (图1D)。第10天，毛蚴孵出 (图1E)。



A: 刚分离虫卵; B: 孵育第3天虫卵; C: 孵育第4天虫卵; D: 孵育第8天虫卵; E: 第10天孵出的毛蚴。

A: Fresh egg; B: Eggs on the 3rd day of incubation; C: Eggs on the 4th day; D: Eggs on the 8th day; E: Miracidium on the 10th day.

图1 虫卵孵化 (×400)

Fig. 1 Eggs during the incubation period (×400)

2.2 感染实验 共感染8批螺，仅第8批小土蜗完成胞蚴、母雷蚴、子雷蚴和尾蚴发育的全过程。

第1至4批，平均水温14~23℃，螺与毛蚴按1:50的比例，感染椭圆萝卜螺557只，尖膀胱螺526只，均未感染成功。

第5批，平均水温10℃，以1:20、1:30和1:50的比例感染191只小土蜗，感染时可见大量毛蚴入侵螺软体 (图2)，最后仅有14只检出胞蚴，感染率为



图2 毛蚴正在入侵小土蜗软体 (×50)

Fig. 2 *F. hepatica* miracidium is penetrating *Galba perversa* infected (×50)

7.3% (14/191), 最早1只于感染后第14天检出, 在感染后第41和49天分别检出6只和7只。

第6批, 平均水温12℃, 以1:50的比例感染565只小土蜗, 其中169只检出胞蚴和母雷蚴, 感染率为29.9% (169/565)。胞蚴检出时间为感染后第28~36天, 母雷蚴检出则在感染后第30~40天。以后母雷蚴则停止发育, 未能发育到子雷蚴。

第7批, 平均水温18℃, 以1:10的比例感染椭圆萝卜螺589只、尖膀胱螺470只、小土蜗1 005只, 每种螺分别挑选出100只为对照。椭圆萝卜螺于感染后第36和37天各在1只螺体内检出母雷蚴; 而小土蜗检出胞蚴和母雷蚴者235只, 感染率为23.4% (235/1005), 检出胞蚴时间为感染后第12~14天、母雷蚴为第15~23天。还有2只螺分别第42、44天时, 检出早期子雷蚴。后因水温迅速降至16℃, 且持续2周, 致早期子雷蚴未能进一步发育。而尖膀胱螺和对照螺均未发现感染。

第8批, 平均水温22℃, 以1:2和1:5的比例集中感染1 546只小土蜗, 结果检出胞蚴、母雷蚴和子雷蚴者482只, 感染率为31.2% (482/1546)。检出胞蚴时间为感染后第7~15天, 母雷蚴为第11~20天, 子雷蚴为第30~37天, 此时子雷蚴体内已见成熟尾蚴活动。第42~55天时, 即在泥盆水生植物根茎部、土表、盆壁、放在水面的叶片上和插在泥盆中的温度计上, 均检出具3层囊壁的成熟囊蚴。

2.3 螺体内各期幼虫形态结构

2.3.1 胞蚴 早期, 大小为(421.0×171.0) μm, 与毛蚴相似, 只是略大和脱去纤毛, 眼点清晰可见。随着发育, 胞蚴长大呈蝌蚪样或花生样, 内含大小不一的胚球, 最大的胚球大小为(146.0×101.0) μm。后期, 胞蚴进一步发育, 呈大囊袋样, 内含母雷蚴(图3A)。

2.3.2 雷蚴 早期母雷蚴, 大小为(1544.0×238.0) μm, 体内含十余个胚球。母雷蚴的口吸盘直径为29 μm,

厚度约10 μm。咽呈圆形, 咽下为盲肠, 占体长的1/3~2/3, 充满黑褐色的物质。成熟母雷蚴, 内含子雷蚴和胚球, 且可见子雷蚴从生殖孔逸出。成熟子雷蚴, 长2~6 mm, 体内含4~7条成熟尾蚴(图3B-E)。

2.3.3 尾蚴 分体部和尾部, 体部为圆形或椭圆形, 大小为(247.0~323.0) × (237.5~275.5) μm; 尾部无色透明, 长(760.0~921.5) μm, 伸长时可达988.0 μm。尾部为体部的2~4倍。肠管呈黑褐色, 分支明显, 几乎充满整个体部; 体部有口、腹吸盘, 前者大小为(109.25×94.75) μm, 后者为(95.0×85.5) μm, 腹吸盘常被肠管遮住。尾蚴逸出后运动极其活跃, 不停地呈∞形运动(图3F)。

2.3.4 囊蚴 呈乳白色, 圆形, 直径为318.0 μm, 脱去表层囊壁后, 直径为228.3 μm。具3层囊壁, 第1层较疏松, 为黄褐色, 常附着在盆壁、根茎和叶面下, 极易脱落。第2、3层囊壁紧紧包裹着虫体(图3G、H)。



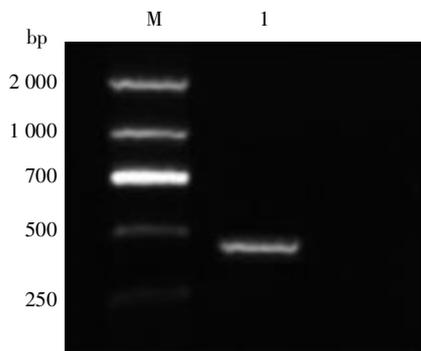
A: 胞蚴 (×400); B: 大量母雷蚴 (×100); C: 母雷蚴 (×400); D: 早期子雷蚴 (含未成熟尾蚴, ×400); E: 成熟子雷蚴 (×400); F: 尾蚴 (×400); G: 囊蚴 (×400); H: 脱去外层囊壁的囊蚴 (×400)。

A: Sporocyst (×400); B: Amount of mother rediae (×100); C: Mother redia (×400); D: Early daughter rediae (including immature cercariae), (×400); E: Mature daughter rediae (×400); F: Cercariae (×400); G: Metacercaria (×400); H: Outer wall removed metacercaria (×400) .

图3 螺体内各期幼虫形态结构

Fig. 3 Morphology of *Fasciola hepatica* larvae

2.4 测序结果 PCR成功扩增出大小约500 bp的片段, 与pCOX1目的片段大小相符(图4)。所测序列去掉引物后, 得到399 bp序列。经过BLAST分析比对, 确认为肝片形吸虫。与肝片形吸虫的相应序列(GenBank登录号为GU112471和GU112482)进行比对, 经ClustalX 1.81软件分析, 同源率为99%~100%。



M: DNA 标志物; 1: pCOX1 基因。

M: DNA marker; 1: pCOX1 gene.

图4 PCR产物电泳图

Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR product

3 讨论

在肝片形吸虫病流行区,牛、羊等保虫宿主,可同时感染肝片形吸虫和巨片形吸虫,因两种虫体的形态、大小和结构等均极其相似,从形态上很难区分。从牛体内收集到的肝片形吸虫虫卵,大小差距甚大,大者达(175.75×85.5) μm,小者仅(142.5×66.6) μm。若按林宇光等^[14]根据虫卵大小区分两种片形吸虫虫种的方法,即大于(160.0×80.0) μm拟为巨片形吸虫,小于则为肝片形吸虫,很可能造成误判。在这种情况下只能依靠PCR才能最后予以证实。

肝片形吸虫虫卵在28℃水浴箱孵育10~11 d,取出置阳光下5~11 min,毛蚴陆续孵出,30 min后达高峰,再过40 min后逐渐减少直至不再孵出。水浴箱内自成暗室,无需再用锡纸将孵化瓶包裹避光^[13]。虫卵孵育过程中,毛蚴发育时间有快有慢,差别在于出现明显的细胞分裂和聚集的时间不同,快者3 d,慢者7 d,但毛蚴最终孵出的时间并不会随之推移,即快者至第10天即可孵出毛蚴;而慢者至第11天毛蚴也孵化而出,这是肝片形吸虫虫卵孵化的特点。有文献报道,肝片形吸虫虫卵在-13℃下冰冻13 d,毛蚴则不能孵出^[15]。而本实验观察到虫卵结冰7 h,其孵化并未受到影响,或因冰冻时间短,未影响其孵化。

大理地区虽然广泛分布尖膀胱螺、椭圆萝卜螺和小土蜗,但本研究证实尖膀胱螺不能感染肝片形吸虫;椭圆萝卜螺仅极少数能感染,且感染后只能发育到母雷蚴阶段,所以它并非是肝片形吸虫适宜的中间宿主;尽管小土蜗是3种螺中分布最局限的一种,但

却是惟一适宜肝片形吸虫无性繁殖的中间宿主。

当温度低于10℃时,小土蜗感染率低,仅能发育到胞蚴阶段;温度上升至10~20℃时,感染率显著上升,幼虫能发育到母雷蚴阶段,甚至个别还可发育到早期子雷蚴,此时如果温度不再上升,不但母雷蚴停止发育,且随着低温持续时间延长,螺的肝脏会因充满大量发育不等的雷蚴而陆续死亡。只有当平均水温达到22℃时,螺体内的虫体才能顺利地完成了从胞蚴→母雷蚴→子雷蚴→尾蚴→直至形成囊蚴的发育。

致谢 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所郭云海博士帮助鉴定螺种;福建省疾病预防控制中心林金祥主任医师帮助鉴定吸虫种类并指导实验;宾川县血防站和宾川县疾病预防控制中心部分同志协助现场采集螺,在此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses [J]. *Int J Parasitol*, 2005, 35 (11-12): 1255-1278.
- [2] Zhou P, Chen N, Zhang RL, *et al.* Food-borne parasitic zoonoses in China: perspective for control[J]. *Trends Parasitol*, 2008, 24: 190-196.
- [3] Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification [J]. *Bull World Health Organ*, 1999, 77(4): 340-346.
- [4] Spithill TW, Dalton JP. Progress in development of liver fluke vaccines[J]. *Parasitol Today*, 1998, 14: 224-228.
- [5] Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control[J]. *Adv Parasitol*, 2009, 69: 41-146.
- [6] 王映琴. 云南省漾濞县牛羊肝片形吸虫病的查治[J]. *中国兽医寄生虫病*, 2007, 15(2): 27-28.
- [7] 胡小九, 李石友, 李文学, 等. 弥渡县牛肝片形吸虫病流行调查[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(1): 286-289.
- [8] 吕红生. 祥云县羊肝片形吸虫病及防治效果调查[J]. *云南畜牧兽医*, 1998, (2): 17.
- [9] 陈木新, 艾琳, 许学年, 等. 云南省大理州大片形吸虫群体感染26例分析[J]. *中国地方病学杂志*, 2012, 31(6): 595-598.
- [10] Chen JX, Chen MX, Ai L, *et al.* An Outbreak of human fascioliasis *gigantica* in southwest China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71520.
- [11] 郭云海, 王承民, 罗静, 等. 北京发现尖膀胱螺 [J]. *动物学杂志*, 2009, 44(2): 127-128.
- [12] 闵正沛, 李军, 黎志强. 肝片形吸虫囊蚴培育及其中间宿主的研究[J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23(11): 6-7.
- [13] 王冬英. 广西片形吸虫流行情况, 在中间宿主体内的发育与分类学的初步研究[D]. 广西: 广西大学, 2006.
- [14] 林宇光, 孙毓兰, 陈存瑞, 等. 大片吸虫的发育史和二种片形吸虫的流行病学研究[J]. *动物学报*, 1974, 20(4): 378-390.
- [15] 李树荣, 许琳, 李莲军, 等. 肝片吸虫虫卵的人工孵化及感染萝卜螺试验[J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(3): 360-364.

(收稿日期: 2014-03-04 编辑: 衣凤芸)