

广东省平远县鱼源性吸虫混合感染调查及 DNA (RAPD) 分析^{*}

程由注¹ 李友松¹ 林金祥¹ 许玉德² 杨文川² 汪琦²
石磊² 潘林祥³ 杨佐河³ 余广兴⁴ 彭振强⁴ 余厚章⁴

摘要: **目的** 调查广东省平远县棘隙吸虫及其他鱼源性吸虫混合感染情况。 **方法** 对鱼类宿主取鱼鳃和鱼肉等组织, 镜检囊蚴; 用水洗过筛沉淀法粪检虫卵, 部分虫卵阳性动物解剖检查。采用 DNA-RAPD 技术, 比较福建棘隙吸虫广东株与福建株。 **结果** 查出华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、东方次睾吸虫 (*Metorchis orientalis*)、福建棘隙吸虫 (*Echinochasmus fujianensis*)、日本棘隙吸虫 (*E. japonicus*)、抱茎棘隙吸虫 (*E. perfoliatus*) 和钩棘单睾吸虫 (*Haplorchis pumilio*) 6 种。第二中间宿主为麦穗鱼等 11 种, 感染率 48.3% (182/377), 有 92.4% 的阳性鱼混合感染 2 种以上吸虫囊蚴。保虫宿主狗、猫感染率 79.2% (19/24), 每只阳性动物均有 2 种以上吸虫混合感染。15 个引物在福建棘隙吸虫广东株与福建株两者共获 DNA 片段 185 个, 共享度 (F) = 0.984, 遗传距离 (D) = 0.016。 **结论** 当地为人兽共患的多种鱼源性吸虫混合感染区。形态学观察和分子生物学检测结果相印证, 福建棘隙吸虫广东株与福建棘隙吸虫福建株为同一虫种。

关键词: 鱼源性吸虫; 混合感染; DNA-RAPD

SURVEY OF MIXED INFECTIONS OF FISH-BORNE TREMATODES IN PINYUAN COUNTY AND DNA (RAPD) ANALYSIS^{*}

CHENG Youzhu LI Yousong LIN Jinxiang XU Yude YANG Wenchuan WANG Qi SHI Lei et al

(Fujian Provincial Institute of Parasitic Diseases, Fuzhou 350001)

ABSTRACT: **Aim** To seek the possible existence of mixed infections of *Echinochasmus fujianensis* and other fish-borne trematodes in Pinyuan county, Guangdong. **Methods** Metacercariae of trematodes were detected from gills, muscles and some other tissues of freshwater fish and examined under microscopy. Sedimentation procedures were used to observe parasite ova in stool. Adult worms were obtained from definitive animal hosts upon dissection. Experimental animal infection were performed from metacercariae of *E. fujianensis* strains in Fujian and Guangdong, and its DNA analysis Random amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Results** Six species of trematodes were found, including *Clonorchis sinensis*, *Metorchis orientalis*, *E. fujianensis*, *E. japonicus*, *E. perfoliatus* and *Haplorchis pumilio*. Eleven species of freshwater fish comprising *Pseudorasbora parva* were identified as the second intermediate hosts, with an average positive rate of 48.33% (182/377). The overall mixed infection animals were contracted with 2 or more species. Dogs and cats were detected to be reservoir hosts, the total infection rate being 79.2% (19/24). 92.4% of infected fish were contracted with 2 or 6 species of the metacercariae of trematodes. 185 DNA fragments were obtained by 15 primers, F=0.894 and D=0.016 between *E. fujianensis* Guangdong and Fujian strain. **Conclusion** There are six species of fish-borne trematodes which may cause infections in human and animal in the regions. *E. fujianensis* Guangdong strain and Fujian strain are the same species.

KEY WORDS: Fish trematodes, Mixed infection, RAPD analysis

中图分类号: R383.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2000)03-0052-04

根据广东省平远县人体感染棘口吸虫病病例报告线索^[1], 我们对该县坝头村进行鱼类宿主及保虫宿主调查, 在鱼体查见多种吸虫囊蚴, 经保虫宿主解剖以及成虫、虫卵形态学观察, 发现当地有 6 种可

^{*}福建省科技计划基金资助项目 (No. 98-Z-156); 福建省“百万人才”人选培养资金资助项目

作者单位: 1. 福建省寄生虫病研究所 (福州, 350001)

2. 厦门大学生物系

3. 广东省梅州市卫生防疫站

4. 广东省平远县坝头卫生院

寄生人体的鱼源性吸虫,同时应用 RAPD 技术,对福建棘隙吸虫广东株与福建株间作基因组 DNA 分析。

1 材料与方法

1.1 现场调查 捕捉居民区附近塘鱼,按个体分类,逐尾取鱼鳃和鱼肉等组织,用两张载玻片压薄后镜检各种吸虫囊蚴。采集犬、猫新鲜粪便,用水洗过筛沉淀法粪检;对部分虫卵阳性动物解剖检虫。

1.2 标本收集及检测 解剖动物肝胆管与肠道,即挤压肝胆管内容物置生理盐水中漂洗检虫;同时用载片刮取小肠粘膜层内容物,置生理盐水中漂洗检虫。

新鲜虫体分别置生理盐水玻皿中,收集 2h 内自然排出体外的虫卵,每种虫检测卵 40 个。成虫置载片上,复上盖片(或较大的虫体,在玻片两端垫上纸片后复上一载片),轻压,然后滴入 5% 的福尔马林溶液固定,再经卡红染色,制成封片标本,每种虫检测 10 条。

1.3 福建棘隙吸虫虫体收集及 DNA 提取 用从广东省平远县坝头村与福建省龙海市港尾村池塘内自然感染的麦穗鱼分离得的福建棘隙吸虫囊蚴混入饲料,喂饲小狗,感染 2 个月解剖肠道检虫。实验用小狗于感染前 10d 两次粪检吸虫卵阴性。

每条新鲜虫体经观察鉴定后用生理盐水洗涤 3 次,取虫体 1g 研磨,加 2ml TE 缓冲液,匀浆加 1/10 体积 10% SDS 液,于 70℃ 水浴 20min,离心取上清,用等体积酚-氯仿抽提 2 次,离心取上清,加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 2 倍体积无水乙醇,沉淀 30min,离心弃上清液,沉淀风干后加 500 μ l TE 缓冲液,加 RNaseA 至浓度 40 μ g/ml,37℃ 水浴 1h,加蛋白酶 50 μ g,50℃ 水浴 3h,等体积酚-氯仿抽提 2 次,氯仿抽提 1 次,离心取上清加 1/10 体积醋酸钠和 2 倍体积无水乙醇,沉淀 30min,离心弃上清液,沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次,风干后用 100 μ l TE 缓冲液溶解置 4℃ 冰箱内。

测定两地福建棘隙吸虫虫株 DNA 的 A260 与 A280 比值均在 1.8 左右,并经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳只有一条带而无拖带现象,表明供作检测的吸虫基因组 DNA 纯度高,不含蛋白质和 RNA。

1.4 DNA 扩增

1.4.1 引物 本研究应用 15 个随机引物(购自

Openion 公司),其序列如下:

| | | | |
|--------|-------------|--------|------------|
| OPG-01 | CTGAGGTCTC | OPG-10 | GGCTGCAATG |
| OPG-20 | ACAGCCTGCT | OPG-02 | TTGGCGGCCT |
| OPG-13 | CAGCACC GCA | OPH-01 | GGTCGGAGAA |
| OPG-04 | ACCTTCGGAC | OPG-15 | ACTGGGACTC |
| OPH-03 | AGACGTCCAC | OPG-05 | CTGAGACGGA |
| OPG-18 | GGCTCATGTG | OPH-11 | CTTCCGCAGT |
| OPG-08 | TCACGTCCAC | OPG-19 | TGGGTCCCTC |
| OPH-19 | CTGACCAGCC | | |

1.4.2 PCR 反应条件 反应在 0.5ml PCR 仪(美国 PE 公司 480 型)反应管中进行,反应体系总体积 25 μ l,其中 10 \times Buffer 2.5 μ l、25mmol/L Mg²⁺ 2 μ l、2mmol/L dNTP 2.5 μ l、Taq 酶 1.0IU、10 μ mol/L 引物 1 μ l、DNA (20ng/ μ l) 4 μ l。

PCR 扩增反应热循环程序为:94℃ 1min,36℃ 1min,72℃ 2min,共 40 个循环;72℃ 5min,1 个循环;4℃ 保存。扩增产物经 1.4% 琼脂凝胶电泳分离,0.5 μ g/ml 溴化乙锭(EB)染色,在紫外灯下观察结果,扫描。

扩增多态 DNA 片段数结果统计,按 Nei 和 Li (1979) 公式计算。

2 结果

2.1 鱼类宿主混合感染情况 采麦穗鱼、青鳉、鳊条、鲢鱼、草鱼、鲤鱼、鲫鱼、棒花鱼、斗鱼、虾虎鱼等 11 种,均查见可感染人体的鱼源性吸虫囊蚴,福建棘隙吸虫、日本棘隙吸虫和抱茎棘隙吸虫囊蚴均仅见于鱼鳃;华支睾吸虫、东方次睾吸虫与钩棘单睾吸虫囊蚴多数在肌肉内,少数寄生于鳃、鳍、鳞皮和内脏。共检鱼 377 尾,阳性 182 尾,平均感染率 48.3%,其中麦穗鱼感染率最高,达 87.4% (159/182)。有 92.4 的感染鱼有 2 种以上吸虫囊蚴混合感染;1 条鱼同时感染 2、3、4、5、6 种吸虫囊蚴分别占感染鱼的 19.7%、31.8%、21.5%、14.8%、5.1%。

2.2 虫种鉴定及保虫宿主感染情况 染色成虫标本经分类鉴定有 6 种吸虫,隶属棘口科吸虫 3 种(福建棘隙吸虫、日本棘隙吸虫和抱茎棘隙吸虫)、后睾科吸虫 2 种(华支睾吸虫、东方次睾吸虫)和异形科吸虫 1 种(钩棘单睾吸虫)。

共粪检犬 17 只和猫 7 只,感染率 79.2% (19/24),感染动物均发现 2 种以上吸虫卵混合存在,犬、猫感染率分别为 75% 与 100%。各虫感染率见表 1。

表 1 犬、猫宿主各种鱼源性吸虫卵阳性检出率 (%)

Table 1 Examination of eggs for six kinds of fish-borne trematodes in stool of dogs and cats (%)

| 宿主 Final hosts | 华支睾吸虫 <i>C. sinensis</i> | 东方次睾吸虫 <i>M. orientalis</i> | 福建棘隙吸虫 <i>E. fujianensis</i> | 日本棘隙吸虫 <i>E. japonicus</i> | 抱茎棘隙吸虫 <i>E. perfoliatus</i> | 钩棘单睾吸虫 <i>H. pumilio</i> |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 犬 dog | 47.1 | 23.5 | 52.9 | 23.5 | 11.8 | 29.4 |
| 猫 cat | 100 | 57.1 | 28.6 | 42.9 | | 28.6 |

检出 6 种鱼源性吸虫卵, 大致可分为两大类: 一类是卵壳薄且呈金黄色的大型虫卵, 包括福建棘隙吸虫、日本棘隙吸虫和抱茎棘隙吸虫; 一类是呈

暗褐色小型虫卵, 包括华支睾吸虫、东方次睾吸虫和钩棘单睾吸虫。各虫卵的形态特征见表 2, 图 1。

表 2 6 种鱼源性吸虫卵的形态

Table 2 Morphology of eggs for six kinds of fish-borne trematodes

| 虫种 Species | 大小 Size (μm) | 形状 Shape | 颜色 Color | 卵盖 Operculum | 卵壳 Shell | 内容物 Content |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------|------------------|------------------------|--------------------|
| 福建棘隙吸虫 <i>E. fujianensis</i> | 98 ~ 113 × 64 ~ 72 | 椭圆形 | 金黄色 | 盖明显 | 壳薄且光滑, 呈紫褐色折光, 末端有增厚结节 | 胚细胞 1 个和卵黄细胞 20 余个 |
| 日本棘隙吸虫 <i>E. japonicus</i> | 74 ~ 85 × 45 ~ 56 | 卵圆形 | 金黄色 | 盖较小 | 壳薄且光滑, 呈紫褐色折光, 末端有增厚结节 | 胚细胞 1 个和卵黄细胞 20 余个 |
| 抱茎棘隙吸虫 <i>E. perfoliatus</i> | 93 ~ 102 × 56 ~ 60 | 卵圆形 | 金黄色 | 盖较小 | 壳薄且光滑, 呈紫褐色折光, 末端有增厚结节 | 胚细胞 1 个和卵黄细胞 20 余个 |
| 华支睾吸虫 <i>C. sinensis</i> | 26.3 ~ 32.5 × 13.8 ~ 19.5 | 似灯泡形成芝麻状, 两侧多为弧形 | 黄褐色 | 小盖明显突出, 盖两旁肩峰样突起 | 壳面较粗糙, 末端具逗号样小棘 | 毛蚴 |
| 东方次睾吸虫 <i>M. orientalis</i> | 28.8 ~ 35 × 13.8 ~ 18.3 | 呈酒瓶状两侧近平行; 部分虫卵芝麻状 | 黄褐色 | 小盖明显突出, 稍有“肩峰” | 壳面较光滑, 末端逗号棘小 | 毛蚴 |
| 钩棘单睾吸虫 <i>H. pumilio</i> | 28.8 ~ 32.5 × 13.8 ~ 17.6 | 呈芝麻状, 卵中部宽, 向两端缓缓趋窄 | 暗褐色 | 小盖不突出, 无“肩峰” | 壳面十分光滑, 末端棘细小 | 毛蚴 |



图 1 粪检出的小型吸虫卵 1100 ×

1. 华支睾吸虫卵; 2. 东方次睾吸虫卵; 3. 钩棘单睾吸虫卵; 4-6. 不同形态的东方次睾吸虫卵。

fig 1 Small eggs of trematodes in stool 1100 ×

1. Egg of *C. sinensis*; 2. Egg of *M. orientalis*; 3. Egg of *H. pumilio*; 4-6. Different morphology of eggs of *C. orientalis*

解剖犬 2 只和猫 1 只, 2 只犬均检出 6 种吸虫, 1 只猫检出 5 种吸虫, 在 3 种棘隙吸虫中以福建棘隙吸虫检出数最多 (表 3)。

表 3 犬、猫宿主各种鱼源性吸虫成虫检出数 (条)

Table 3 Examination of adult worms for six kinds of fish-borne trematodes in animal

| 宿主 Final hosts | 华支睾吸虫 <i>C. sinensis</i> | 东方次睾吸虫 <i>M. orientalis</i> | 福建棘隙吸虫 <i>E. fujianensis</i> | 日本棘隙吸虫 <i>E. japonicus</i> | 抱茎棘隙吸虫 <i>E. perfoliatus</i> | 钩棘单睾吸虫 <i>H. pumilio</i> |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| I 犬 I dog | 56 | 17 | 1124 | 84 | 14 | 22 |
| II 犬 II dog | 39 | 11 | 976 | 71 | 11 | 47 |
| 猫 cat | 191 | 185 | 83 | 28 | | 36 |

2.3 福建棘隙吸虫基因组 DNA 的 RAPD 分析

采用 15 个引物, 每个引物均重复扩增 1 次, 重复性良好。扩增产物共有 DNA 片段 185 个, 其中福建株扩增片段 91 个, 广东株扩增片段 94 个, 两者差异片段发生在 OPG-02 和 OPG-15 引物上 (图 2)。每个引物的扩增片段在 4 ~ 10 个之间, 平均每个引物扩增 6 个片段。经统计两者扩增 DNA

片段共享度 $F=0.984$, 其遗传距离 $D=0.016$ 。

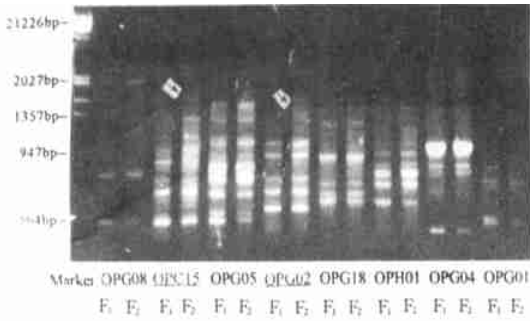


图2 福建棘隙吸虫基因组 DNA 的 RAPD 扩增产物电泳图 (其中的 8 个引物)

F₁ 福建棘隙吸虫福建株; F₂ 福建棘隙吸虫广东株

Fig 2. Genome DNA (RAPD) of *Echinocasmus fujianensis*

F₁ *E. fujianensis* (Fujian strain); F₂ *E. fujianensis* (Guangdong strain)

3 讨论

潘林祥 (1990) 在广东省平远县坝头村开展华支睾吸虫病流行病学调查, 粪检并通过感染者驱虫, 发现一户 4 人感染棘口吸虫, 但未作虫种鉴定。而从人体驱出的成虫标本形态学资料来看, 其与福建棘隙吸虫十分相近。本研究在对囊蚴, 成虫及虫卵形态观察的基础上, 应用随机引物扩增多态基因组 DNA 进行分析, 两者结果相互印证, 为同一虫种, 因此曾报告的人体感染棘口吸虫, 即为福建棘隙吸虫。

根据调查^[2-3], 漳州市是福建省人体寄生虫虫种最多的地区, 同时存在多种鱼源性吸虫混合感染区。广东汕头、梅县地区与漳州毗邻, 两者螺、鱼生态环境相似, 但后者居民食生鱼习惯较为普遍, 虽是华支睾吸虫病流行区^[4], 但未见多种鱼源性吸虫混合感染的报告。由于鱼类与当地居民食用关系

密切, 因此提示在感染华支睾吸虫的同时, 也有可能感染上其他鱼源性吸虫。通常, 华支睾吸虫病的漏检情况就已存在, 其虫卵形态不仅与同科的虫种, 包括东方次睾虫卵等相似, 而也与异形科吸虫卵相似, 因此粪检时易于造成漏检或误诊。由表 2 看出, 不同种类的吸虫卵大小及形态特征仍有差异, 而华支睾吸虫与东方次睾吸虫中部分卵均呈芝麻形状, 最常见相混淆, 但在高倍镜 (15×40) 下华支睾吸虫卵壳表面至少有一个以上颗粒状物质, 可与东方次睾吸虫卵相鉴别。

本次调查坝头村, 查出 6 种可寄生人体的鱼源性吸虫^[5], 其中福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫为广东省首次纪录, 有 92.4% 的阳性鱼感染 2 种以上吸虫囊蚴, 最多 1 条感染 6 种吸虫囊蚴, 保虫宿主狗、猫感染率高达 79.2%。综上所述, 表明当地为人兽共患的多种鱼源性吸虫混合感染区, 为进一步开展防治研究提供依据。

4 参考文献

- 1 潘林祥, 姚良治, 余碧秀. 棘口科吸虫人体感染 1 户 4 例报告 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6 (2): 23.
- 2 程由注, 许贤让, 林爱琴, 等. 福建省人体肠道蠕虫虫种与分布调查 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1993, (全国人体寄生虫分布调查特辑) 9: 60.
- 3 程由注, 许国防, 郭忠福, 等. 福建棘隙吸虫与 4 种鱼源性吸虫混合感染的调查 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15 (4): 228.
- 4 陈锡琪, 方悦怡, 张瑞锦, 等. 广东省华支睾吸虫病流行特点和防治对策 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1993, (全国人体寄生虫分布调查特辑) 9: 36.
- 5 赵慰先. 人体寄生虫学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994, 545

1999 年 10 月 16 日收稿