

• 疾病预防控制论著 •

云南宾川地区牛羊片形吸虫感染调查及分子鉴定

艾琳¹, 陈木新¹, 吕山¹, 臧伟¹, 诸廷俊¹, 许学年¹, 蔡玉春¹, 陈韶红¹, 罗家军², 陈宝杰³, 张建国⁴, 周晓农¹, 陈家旭¹

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫与病原生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2. 云南省大理州血吸虫病防治研究所, 云南 大理 671000; 3. 宾川县疾病预防控制中心, 云南 宾川 671600; 4. 宾川县血吸虫病防治站, 云南 宾川 671600)

摘要:目的 对云南宾川地区爆发人体片形吸虫病的村落进行牛羊的片形吸虫感染调查和检测, 为当地片形吸虫病的研究提供数据。方法 采用尼龙袋集卵法收集牛羊粪便中的虫卵, 进行镜检。对检出的样本进行 PCR 扩增和测序; 用 MP 法、NJ 法及 ML 法进行种系发育分析。结果 从 134 (28.63%) 头牛和 27 (25.23%) 头羊中查到了片形吸虫的虫卵, 对所检到的虫卵进行线粒体 *pcox1* 基因的扩增和测序, 比对后发现所检样本主要为肝片吸虫和大片吸虫两个种。采用 MP 法、NJ 法及 ML 法进行种系发育分析表明, 宾川地区牛羊感染的片形吸虫种主要为肝片吸虫和大片吸虫两种。结论 宾川地区牛羊片形吸虫感染严重, 云南宾川为肝片吸虫及大片吸虫混合感染地区, 当地政府应重视该病的防治。

关键词: 宾川; 片形吸虫; 牛; 羊; *pcox1* 基因

中图分类号: R383.26 文献标识码: B 文章编号: 1672-3619(2013)06-0791-03

Surveillance and molecular identification of *Fasciola* spp. from cattle and goats at Binchuan, Yunnan province

AI Lin¹, CHEN Mu-xin¹, LÜ Shan¹, ZANG Wei¹, ZHU Ting-jun¹, XU Xue-nan¹, CAI Yu-chun¹, CHEN Shao-hong¹, LUO Jia-jun², CHEN Bao-jie³, ZHANG Jian-guo⁴, ZHOU Xiao-nong¹, CHEN Jia-xu¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025; 2. Dali Institute of Schistosomiasis Control, Yunnan, Dali 671000; 3. Binchuan Center for Disease Control and Prevention, Yunnan, Binchuan 671600; 4. Binchuan Institute of Schistosomiasis Control, Yunnan, Binchuan 671600, China)

Abstract: **Objective** The aim of the study was to investigate and evaluate the situation of infection of cattle and goats with *Fasciola* spp. in the villages at Binchuan. **Methods** Parasite eggs from cattle and goats were collected by nylon pocket egg concentration method. The eggs were examined using microscopic examination method. Sequencing and PCR method were used for the amplification of *pcox1* gene and species identification. Phylogenetics analysis was performed using MP, NJ, and ML methods. **Results** 134 (28.63%) cattle and 27 (25.23%) goats were found to have infection. After blast comparison and phylogenetics analysis, it was found that the samples belong to the species of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. **Conclusion** *Fasciola* spp. infection of cattle and goats is serious at Binchuan. The infection was mainly *F. hepatica* and *F. gigantica*. The local government should pay more attention to the prevention and treatment of fascioliasis.

Key words: Binchuan; *Fasciola*; cattle; goat; *pcox1* gene

片形吸虫 (*Fasciola* spp.) 隶属于复殖目的片形科片形属, 是危害牛羊等反刍兽和人类的寄生性蠕虫, 呈世界范围分布^[1-4]。据最新报道, 全球约有 7 亿经济动物感染片形吸虫, 这无疑给畜牧业生产带来

了严重损失。人感染片形吸虫的报道也屡见不鲜, 在被调查的 60 多个国家中, 约有 200 万人患片形吸虫病^[5-6]。目前, 最为常见的两种片形吸虫为肝片吸虫和大片吸虫^[7], 它们在全世界范围内分布广泛, 尤其是在热带地区, 感染尤为严重^[8]。自 2011 年 3 月以来, 云南大理州宾川县陆续报告 26 例不明原因的疾病, 发病集中在 2011 年 10-11 月, 病例分布于州城镇及方圆 5 km 区域内。患者主要表现为高热、肝区疼痛、肝脏肿大及嗜酸性粒细胞增多等, 经过中国疾病预防控制中心寄生虫病所专家们的诊断和调查, 确定病原为片形吸虫。宾川县位于云南省

基金项目: 上海市博士后基金 (12R21416500); 中国博士后基金 (2012M520353); 国家科技重大专项 (2012ZX10004220、2008ZX10004-011); 国家科技支撑计划项目 (2008BAI56B03)

作者简介: 艾琳 (1983-), 女, 博士, 研究方向为分子流行病学

通讯作者: 陈家旭 (1962-), 男, 博士, 研究员, 从事免疫学研究, E-mail: chenjiayu1962@163.com

西部,当地家畜养殖业发达,尤其是肉牛、波尔山羊和小尾寒羊的饲养。牛羊是片形吸虫感染的最常见宿主,在人体片形吸虫病流行区调查牛羊感染的情况,采用分子生物学的方法鉴定片形吸虫的种类,将为宾川县片形吸虫病的防控提供相关的信息,并为当地片形吸虫病的调查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 调查地点和宿主 调查所选择的地点主要是在患者居住的宾川县州城镇、宾居镇、金牛镇、乔甸镇的15个村。采集牛羊粪便共575份,对其中468份牛粪和107份羊粪进行检查(表1)。

1.2 牛羊粪便中虫卵的形态学检测 分别取每个牛羊的粪便约50 g,采用尼龙袋集卵法进行淘洗,吸取沉渣在显微镜下进行观察。

1.3 牛羊粪便中虫卵的PCR扩增

1.3.1 主要试剂 PCR试剂(Buffer、MgCl₂、dNTPs、Taq酶)为大连宝生物公司产品。

1.3.2 样品DNA的制备 在显微镜下操作,用移液器分别吸取15个虫卵到含有20 μl ddH₂O的1.5 ml Eppendorf管中,做好标记。在上述分离好的含有虫卵的离心管中加入液体体积一半的玻璃珠,漩涡震荡1 min后瞬时离心,沸水中煮5 min,最后10 000 r/min离心1 min,取3 μl上清PCR扩增。

1.3.3 PCR扩增 用于扩增线粒体cox1基因部分序列(pcox1)的保守引物的序列为JB3(上游引物)^[9]:5'-TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3';JB4.5(下游引物):5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3';反应体系为25 μl,其中蒸馏水15.25 μl;10×PCR buffer 2.5 μl;MgCl₂(25 mmol/L)3.5 μl;dNTPs(25 mmol/L)2 μl;Primer(50 pmol/μl)0.25 μl;Taq polymerase(5 U/μl)

0.25 μl;模板DNA 1 μl。扩增条件为94℃预变性5 min,然后94℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s,共35个循环,最后72℃后延伸5 min。取5 μl PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,再经紫外透射仪观察并记录结果。预期片段大小约500 bp。

1.3.4 DNA片段序列测定及分析 将PCR产物送上海生工生物工程技术服务有限公司直接测序。测序结果用ClustalX 1.81软件进行分析。从GenBankTM检索现有片形吸虫cox1序列(登录号为NC002546和GU112475),然后与之进行相似性比对和片形吸虫种系发育分析,以日本血吸虫作为外群(登录号为NC002544)。利用Clustal X1.81及Mega 4.0软件对本实验中选出的16个pcox1序列进行比对及计算遗传距离,然后用PhyIip 3.67程序中的最大简约法(maximum parsimony,MP)和Mega 4.0程序中的邻接法(neighbor-joining method,NJ)绘制种系发育树,并用Puzzle 5.2程序构建最大似然树(maximum likelihood,ML)。邻接法在软件默认设置下进行分析;最大简约法采用Branch and bound模型分析,采用自展检验(bootstrap test)估算所构建系统树的可靠性,ML法采用Hky替代模型和Quartet puzzling搜索程序进行分析,复制数均为1 000。同时利用DNASTAR 5.0中的Megalign程序进行相似性分析^[10-11]。

2 结果

2.1 显微镜检查结果 从134(28.63%)头牛和27(25.23%)头羊中查到了片形吸虫的虫卵(表1)。片形吸虫虫卵大小为130~190 μm×60~100 μm,呈淡黄色或淡黄褐色,长椭圆形,卵壳薄,分两层,卵盖小,卵内充满许多卵黄细胞和一个位于卵盖下方或虫卵中央的卵细胞(图1)。

表1 抽样各村牛羊片形吸虫感染情况

Tab.1 Cattle and goat infected with *Fasciola* spp. from sample villages

	牛											羊										
	A 组							B 组		C 组		州城镇										
	新庄	新队	马官营	周官	州城	大罗城	利官	双墩	石马坪	新坪	官通	新庄	新队	马官营	后所	北门	东门	力六	大罗城	中梁子	周官	利官
总数(头)	46	22	23	117	25	46	10	55	27	72	25	25	3	20	11	2	8	7	20	3	1	7
阳性数(头)	15	7	2	37	1	18	2	9	8	26	9	21	1	0	1	0	1	0	2	0	1	0
阳性率(%)	32.61	31.82	8.70	31.62	4.00	39.13	20.00	16.36	29.63	36.11	36.00	84.00	33.33	0	9.09	0	12.50	0	10.00	0	100	0
平均阳性率(%)	28.37							20.73		36.08		25.23										

2.2 PCR扩增结果 对收集到的虫卵样本进行PCR扩增,所抽取的样品均成功扩增出约500 bp的片段,与预期pcox1目的片段长度相符,且无非特异性条带,空白对照为阴性。取其中16个样品为代表(表2),其PCR产物电泳图见图2。

2.3 测序结果及分析 将测得的序列去掉引物,得到446 bp的序列。经过BLAST分析比对后,其中,牛的粪便中虫卵经测序确定为肝片吸虫52个,大片吸虫82个;羊的粪便中虫卵经测序确定为肝片吸虫17个,大片吸虫10个。

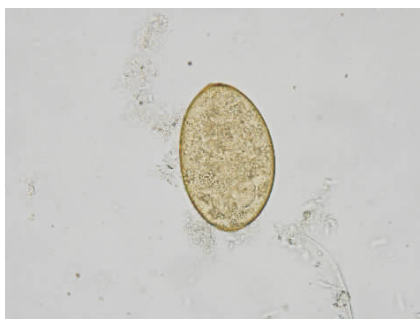


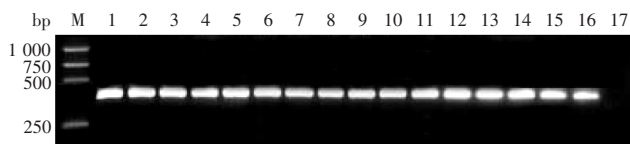
图 1 片形吸虫虫卵图片

Fig.1 The eggs of Fasciola spp

表 2 代表性样本编号及 PCR 鉴定结果

Tab.2 The number of representative samples and the results of PCR

样品代码	编号	发育期	地区	宿主	PCR 定种
BCC1	1	虫卵	宾川新庄	黄牛	大片吸虫
BCC2	2	虫卵	宾川周官	黄牛	大片吸虫
BCC3	3	虫卵	宾川州城	黄牛	大片吸虫
BCC4	4	虫卵	宾川大罗城	黄牛	大片吸虫
BCC5	5	虫卵	宾川双墩	黄牛	大片吸虫
BCC6	6	虫卵	宾川石马坪	黄牛	大片吸虫
BCC7	7	虫卵	宾川新坪	黄牛	肝片吸虫
BCC8	8	虫卵	宾川官通	黄牛	肝片吸虫
BCG1	9	虫卵	宾川新庄	山羊	大片吸虫
BCG2	10	虫卵	宾川新队	山羊	大片吸虫
BCG3	11	虫卵	宾川后所	山羊	大片吸虫
BCG4	12	虫卵	宾川东门	山羊	大片吸虫
BCG5	13	虫卵	宾川力六	山羊	肝片吸虫
BCG6	14	虫卵	宾川大罗城	山羊	肝片吸虫
BCG7	15	虫卵	宾川周官	山羊	肝片吸虫
BCG8	16	虫卵	宾川新庄	山羊	肝片吸虫



M: DL-2000 标准分子量; 1-17 分别代表样品 BCC1、BCC2、BCC3、BCC4、BCC5、BCC6、BCC7、BCC8、BCG1、BCG2、BCG3、BCG4、BCG5、BCG6、BCG7、BCG8、阴性对照。

图 2 代表性样本 pcx1 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析

Fig.2 Representative PCR products for a portion of the pcx1

2.4 *cox1* 基因序列相似性 本实验样品序列与 GenBank™ 收录的片形吸虫的相应序列 (登录号为 NC002546 和 GU112475) 进行比较。经 ClustalX 1.81 软件分析显示,宾川地区片形吸虫与 GenBank™ 公布的肝片吸虫相应序列的种内变异为 0.0%~0.3%;该地区大片吸虫与已报道的大片吸虫相应序列的种内变异为 0.0%~0.1%。采用 MP 法、NJ 法及 ML 法进行

种系发育分析表明,宾川地区牛羊感染的片形吸虫虫种主要为肝片吸虫和大片吸虫两种 (图 3)。

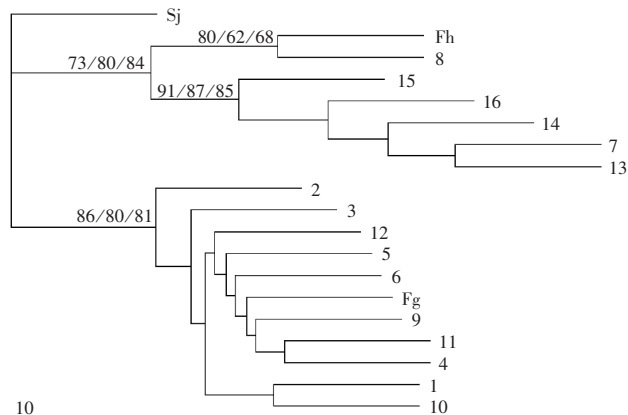


图 3 基于 pcx1 基因序列以 MP/NJ/ML 法所构建的片形吸虫自展一致树

Fig.3 Phylogenetic relationship of *Fasciola* spp. isolates by MP/NJ/ML methods

3 讨论

宾川县的牛羊片形吸虫感染调查结果显示,牛羊片形吸虫病流行严重。本研究除了采用尼龙袋集卵镜检法对牛羊的粪便进行形态学检查,还采用分子生物学的方法,通过 PCR 扩增线粒体 *cox1* 基因,以鉴定当地牛羊感染的片形吸虫虫种。线粒体 DNA 分析在动物进化遗传学、分子生态学、种群遗传结构、遗传多样性、物种及品系鉴定等方面得到了广泛的应用,使之成为研究寄生虫系统进化的一种很好的分子标记^[12]。由于线粒体为母系遗传,线粒体基因间不发生重组,可以反映出母系的进化历史,这样线粒体一个基因就可以代表整个线粒体基因组的变异情况。

线粒体基因组 *cox1* 基因在种间、种内、群体间和群体内具有广泛的多态性,可以用作片形吸虫种类鉴定的遗传标记^[13-15]。本研究通过镜检和线粒体 *cox1* 基因的扩增,发现宾川地区牛羊的片形吸虫的感染率较高,抽样各村牛羊的感染率平均在 20% 左右,个别村落的牛羊感染竟高达 30% 以上。在虫种鉴定的过程中,牛、羊大片、肝片吸虫的感染率是不同的,前者以大片吸虫为主,而后者则以肝片吸虫为主,但总体感染状态是以大片吸虫为主,占 57.14%。由此可见,云南宾川地区是大片吸虫与肝片吸虫的混合流行区,但以大片吸虫为主。

建议宾川县各级政府和畜牧部门要高度重视牛羊片形吸虫病的防治工作,向全县牛羊养殖户广泛宣传片形吸虫病的危害性和防治方法。本次调查为宾川地区甚至大理人群和家畜片形吸虫病的防控提供宝贵资料。

参考文献

- [1] Huang WY, He B, Wang CR, et al. Characterisation of *Fasciola* species from mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence [J]. Vet Parasitol, 2004, 120(1-2): 75-83.
- [2] Ai L, Chen MX, Alasaad S, et al. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches [J]. Parasit Vectors, 2011, 4: 101.
- [3] Ai L, Weng YB, Elsheikha HM, et al. Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different hosts and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences [J]. Vet Parasitol, 2011, 181(2-4): 329-334.
- [4] Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, et al. Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA [J]. Parasitol Int, 2009, 58(1): 81-85.
- [5] Valero MA, Perez-Crespo I, Periago MV, et al. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* [J]. Acta Trop, 2009, 111(2): 150-159.
- [6] Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. *Fasciola*, lymphatic and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control [J]. Adv Parasitol, 2009, 69: 41-146.
- [7] Lin RQ, Dong SJ, Nie K, et al. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China [J]. Parasitol Res, 2007, 101(3): 813-818.
- [8] Nithiuthai S, Anantaphruti MT, Waikagul J, et al. Waterborne zoonotic helminthiasis [J]. Vet Parasitol, 2004, 126(1-2): 167-193.
- [9] Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequence [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54(2): 165-174.
- [10] Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sunderland, MA, Sinauer Associates. 2002.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [12] 郭凯文. 线粒体基因组及其在寄生虫学中的应用 [J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2002, 29(4): 149-153.
- [13] 董世娟, 黄维义, 林瑞庆, 等. 我国片形吸虫 (*Fasciola*) 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基基因 (cox1) 部分序列的多态性 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 378-381.
- [14] Amer S, Dar Y, Ichikawa M, et al. Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (ND1 and COI) gene markers [J]. Parasitol Int, 2011, 60(1): 5-12.
- [15] Nguyen TG, Van De N, Vercruysse J, et al. Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam [J]. Exp Parasitol, 2009, 123(4): 354-361.

收稿日期: 2013-01-08

(上接第 779 页)

- 2004, 24(2): 70-73, 81.
- [2] 刘涛, 陈娟娟, 尹宗智, 等. 人巨细胞病毒影响绒毛外细胞滋养细胞增殖功能的体外研究 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(9): 1397-1399.
- [3] 朱剑文, 邹丽, 何明, 等. 无症状沙眼衣原体和解脲支原体感染对早孕绒毛滋养细胞表达 CXCL12/CXCR4 的影响 [J]. 华中科技大学学报, 2007, 36(6): 768-772.
- [4] Marshall NE, Fraley G, Feist C, et al. Chorionic villus sampling for abnormal screening compared to historical indications: prevalence of abnormal karyotypes [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(8): 1463-1466.
- [5] 毛倩倩, 鲁莉萍, 陈铁峰, 等. 4008 例羊水细胞的染色体分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(1): 98-99.
- [6] 戴美珍, 褚帮勇, 陈雪娇, 等. 6431 份高危孕妇羊水细胞染色体核型分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(4): 492-493.
- [7] 许平, 曾艳, 范佳鸣. 产前诊断中嵌合体的发现与处理 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(2): 236.
- [8] 梁丽, 廖灿, 潘敏, 等. 荧光定量聚合酶链反应技术快速产前诊断常见染色体非整倍体的临床应用 [J]. 中华围产医学杂志, 2012, 15(2): 106-112.
- [9] Gaudry P, Lebbar A, Choiset A, et al. Is rapid aneuploidy screening used alone acceptable in prenatal diagnosis? An evaluation of the possible role of ultrasound examination [J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 25(2): 285-290.

收稿日期: 2013-01-28