

DOI:10.13350/j.cjpb.220611

• 调查研究 •

基于分子生物学技术对四川省石渠县野外犬科动物 蠕虫感染情况调查^{*}

李春阳¹, 王旭¹, 陈齐鲁¹, 付梅花², 刘白雪¹, 伍卫平^{1**}, 官亚宜^{1**}

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所(国家热带病研究中心), 国家卫生健康委员会寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心, 国家级热带病国际联合研究中心, 上海 200025; 2. 上海市疾病预防控制中心)

【摘要】 **目的** 采用分子生物学技术检测四川省石渠县野外犬科动物蠕虫感染情况, 为当地人畜共患寄生虫的防控提供参考。 **方法** 于2021年5月在四川省石渠县色须镇野外环境中收集新鲜犬科动物粪便, 提取DNA, 通过PCR扩增核糖体的18srna基因、线粒体的cox1基因和nad1基因进行虫种鉴定, 并计算野外犬科动物蠕虫检出率。 **结果** 石渠县野外犬科动物粪便中蠕虫检出率为36.43%(47/129)。虫种检出率分别为: 狭首钩刺线虫(*Uncinaria stenocephala*) 27.13%(35/129), 犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*) 6.98%(9/129)、猪蛔虫(*Ascaris suum*) 3.10%(4/129), 狐环体线虫(*Crenosoma vulpis*) 1.55%(2/129), 有齿冠尾线虫(*Stephanurus dentatus*) 0.78%(1/129), 石渠棘球绦虫(*Echinococcus shiquicus*) 4.65%(6/129), 田氏带绦虫(*Taenia tianguangfui*) 和线形中殖孔绦虫(*Mesocestoides lineatus*) 0.78%(1/129)。虫种检出率差异具有统计学意义($\chi^2=133.730, P<0.05$)。129份犬粪样品中有12份检出两种以上蠕虫。3种通用引物对线虫的检出率依次为8.53%(11/129), 28.68%(37/129)和13.18%(17/129), 差异具有统计学意义($\chi^2=20.561, P<0.05$); 通用引物和特异性引物对石渠棘球绦虫的检出率分别为0和4.65%, 差异具有统计学意义($\chi^2=4.266, P<0.05$)。 **结论** 四川省石渠县野外犬科动物蠕虫感染普遍, 检出率较高, 需加强对当地狭首钩刺线虫、犬弓首蛔虫、石渠棘球绦虫等人畜共患寄生虫的防控。扁形动物门通用引物在检测带绦虫感染时的检出效率较低, 需要研发更为高效的带绦虫检测通用引物。

【关键词】 蠕虫; 狭首钩刺线虫; 犬弓首蛔虫; 石渠棘球绦虫; 野外犬科动物

【中图分类号】 R383

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0675-07

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.; 17(6): 675-681.]

Investigation of helminth infection in wild canines in Shiqu County, Sichuan Province based on molecular biology technology

LI Chun-yang¹, WANG Xu¹, CHEN Qi-lu¹, FU Mei-hua², LIU Bai-xue¹, WU Wei-ping¹, GUAN Ya-yi¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention (Chinese Center for Tropical Diseases Research); NHC Key Laboratory of Parasite and Vector Biology; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention) ^{**}

【Abstract】 **Objective** The worm infection of wild canines in Shiqu county, Sichuan Province was detected by molecular biology technique, which provided reference for the prevention and control of zoonotic parasites in the local area. **Methods** In May, 2021, fresh canine feces samples were collected in the wild environment of Sexu Town, Shiqu County, Sichuan. DNA was extracted from stool samples, and the 18srna gene of ribosome, cox1 gene and nad1 gene of mitochondria were amplified by PCR, then the insect species were identified, and the positive rate of the worm infection of canine in the field was calculated. **Results** The positive rate of the worm detected in the feces of wild canines in Shiqu County was 36.43%(47/129). The worm detection rates were 27.13% (35/129) for *Uncinaria stenocephala*, 6.98% (9/129) for *Toxocara canis*, 3.10% (4/129) for *Ascaris suum*, 1.55% (2/129) for *Crenosoma vulpis*, and 0.78% (1/129) for *Stephanurus dentatus*, 4.65% (6/129) for *Echinococcus shiquicus*, 0.78% (1/129) for *Taenia tianguangfui* and 0.78% (1/129) for *Mesocestoides lineatus*, respectively. The difference in detection rate among worm species was statistically significant ($\chi^2=133.730, P<0.05$). Among the 129 samples, 12 samples were mixed with two or more worms. The detection rates of the three universal primer pairs in *Caenorhabditis elegans* were 8.53% (11/129), 28.68% (37/129) and

* **【基金项目】** 上海市卫生健康委员会科研项目(No. 20214Y0213)。

** **【通讯作者】** 官亚宜, E-mail: guanyy@nipd.chinacdc.cn; 伍卫平, E-mail: wuwp@nipd.chinacdc.cn

【作者简介】 李春阳(1996-), 女, 天津人, 硕士研究生。研究方向: 寄生虫病流行病学。E-mail: lichunyang1996@126.com

13.18% (17/129), and the difference between them was statistically significant ($\chi^2 = 20.561, P < 0.05$). The detection rates of *Echinococcus shiquicus* by universal primer and specific primer were 0% and 4.65% respectively, and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 4.266, P < 0.05$). **Conclusion** In Shiqu County, Sichuan province, wild canine helminth infection is common and the positive rate of the detection rate is high. It is necessary to strengthen the prevention and control of local zoonotic parasites such as *U. stenocephala*, *T. canis*, and *E. shiquicus*. The detection efficiency of the universal primers for the *Platyhelminthes* in the detection of *Taeniata* species infection is poor, and it is necessary to continue to explore efficient universal primers for the detection of *Taeniata species*.

【Key words】 Worm; *Uncinaria stenocephala*; *Toxocara canis*; *Echinococcus shiquicus*; Wild canids

四川省石渠县位于青藏高原东部,四川省、青海省及西藏自治区三省交界处,平均海拔在4 000 m以上,以牧业为主要的生产方式。青藏高原东部地区具有良好的生态环境和种类数量丰富的动植物,属于世界生物多样性热点地区,是世界大型食肉动物物种最丰富的地区之一^[1],诸多因素造成当地牧民成为蠕虫感染的重点人群。2015年全国人体重点寄生虫病现状调查四川省人体蠕虫感染率为24.13%,且牧民为蠕虫感染的重点人群^[2]。

目前石渠县关于动物寄生虫感染调查及监测多集中于牲畜和家犬,有关野生动物作为寄生虫潜在宿主的作用有待进一步探究。此外当地寄生虫相关调查研究主要集中于对人体健康具有较大危害的棘球绦虫,对其他蠕虫的感染现状特别是当地野生犬科动物蠕虫感染的现状了解较少。粪便是常用的检查野生动物寄生虫感染的生物材料,运用分子生物学方法,通过对粪便中寄生虫的特定基因进行扩增和测定,可以高效确定野生动物寄生虫感染情况并可鉴别虫种^[1,3]。本研究采集四川省石渠县野外犬科动物粪便并利用PCR技术对其蠕虫感染情况进行检测,旨在探究该地区野生犬科动物体内蠕虫感染情况并为今后实施针对性更强的寄生虫病防治措施提供数据支撑。

内容与方法

1 调查点选择

在四川省石渠县色须镇远离人群聚居点的区域选择4个500 m×1 000 m的区域作为样方展开研究。样方1-4的经纬度分别为:33°12′22″N,97°37′58″E;33°11′7″N,97°38′29″E;33°11′15″N,97°37′45″E;33°11′21″N,97°38′48″E。石渠县位于青藏高原东部,四川省、青海省及西藏自治区三省交界处,以牧业为主要的生产方式,当地年平均气温约1.7℃,属高寒地带^[4],有种类和数量丰富的野生动物分布,是蠕虫感染的重点区域。本研究为非损伤性采样,不涉及伦理问题。

2 样品采集

于2021年5月在石渠县色须镇的4个样方采集野外犬科动物粪便,根据形状、大小、气味及颜色等特征选择其中较为新鲜的样品保存于50 mL离心管中并编号。采集粪便样品时均使用新的一次性筷子以避免交叉污染。所有样品均于-80℃冷冻3周进行灭活。

3 粪便DNA提取

灭活的粪便样品每份取2 g,按照QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(50)试剂盒说明书提取DNA,-20℃保存。试剂盒购于凯杰企业管理(上海)有限公司。

4 PCR扩增目的基因

取粪便DNA,分别使用18s核糖体RNA(18srna)基因序列引物^[5],线粒体细胞色素c氧化酶亚基1(cytochrome c oxidase subunit 1,cox 1)基因序列引物^[6]和线粒体NADH脱氢氧化酶亚基(NADH dehydrogenase subunit 1,nad 1)基因序列引物^[7]PCR扩增相应目的基因,检测蠕虫、绦虫、棘球绦虫的感染情况。引物信息见表1。PCR反应体系(25 μL):上、下游引物各1 μL,Ex Taq™ PCR Premix(2×)12 μL,牛血清蛋白0.5 μL,模板DNA 2 μL,RNase-free Water 9 μL。PCR反应均在Bio-Rad DNA Engine Dyad PCR仪器上进行,扩增反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,退火30 s(退火温度根据引物选择),72℃延伸30 s,共35个循环;72℃下再延伸10 min。PCR产物4℃保存。

PCR产物经1.4%琼脂糖凝胶电泳分析后送至上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序。测序结果在NCBI(National Center for Biotechnology Information,https://www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库中进行比对分析,以获取虫种信息。

5 统计学分析

应用Excel 2019建立数据库,采用SPSS19.0软件进行统计学分析。率的比较采用 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

表 1 引物序列及目的基因 PCR 扩增产物长度
Table 1 Sequences of the primers and amplicon lengths of PCR products of target genes

通用/特异性引物	物种 Species	引物对名称 Primer pair name	目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primers sequence	产物长度 (bp) Amplicon lengths	退火温度 (°C) Annealing Temperature	参考文献 Reference		
通用引物 Universal primers	线形动物门 Nematode	18SRNA A	18srna	NEMAF	CACCCGTGAGGATTGACAG	320-335	53	Cannon, et al. 2018 ^[5]		
				NEMAR	CGATCACGGAGGATTTTCAA					
		18SRNA B	18srna	NEMBF	CGTCATTGCTGCGGTTAAAA					
	扁形动物门 Platyhelminthes				NEMBR	CCGTCCTTCGAACCTCTGAC	380-410		55	
					NEMCF	AGTGGAGCATGCGGCTTAAT				
		18SRNA C	18srna	NEMCR	TGCAATTCCTRTCCAGTC					
特异性引物 Specific primers	细粒棘球绦虫 <i>E. granulosus</i>	CO1 JP	cox1	JP3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	444	55	Bowles, et al. 1992 ^[6]		
				JP4.5	TAAAGAAAAGAACATAATGAAAAATG					
				Eg1F81	GTTTTTGGCTGCCGCCAGAAC					
	多房棘球绦虫 <i>E. multilocularis</i>	ND1 Em	nad1	EmF19/3	FP:TAGTTGTTGATGAAGCTTGTG	207	53		Boufana, et al. 2013 ^[7]	
				EmR6/1	RP:ATCAACCATGAAAACACATATACAAC					
				EsF50	FP:TTATTCTCAGTCTCGTAAGGGTCCG					
石渠棘球绦虫 <i>E. shiquicus</i>	ND1 Es	nad1	EsR73	RP:CAATAACCAACTACATCAATAATT	442	60	Boufana, et al. 2013 ^[7]			

结 果

1 蠕虫感染情况

共采集 129 份新鲜野生犬科动物粪便,提取 DNA 后 PCR 扩增目的基因片段,阳性者确定为相应寄生虫感染。4 个样方中犬科动物粪便中检出的蠕虫种类及数量如表 2。47 份样品检出蠕虫,检出率为 36.43%。不同虫种检出率差异具有统计学意义($\chi^2 = 133.730, P < 0.05$),其中以狭首钩刺线虫(*Uncinaria stenocephala*)检出率较高,为 27.13%。

有 12 份样品检出两种以上蠕虫,其中 6 份为线虫与绦虫混合感染,有 1 份样品同时检出狭首钩刺线虫、田氏带绦虫(*Taenia tianguangfui*)及线形中殖孔绦虫(*Mesocestoides lineatus*)。其余均为线虫混合感染。8 对不同引物的 PCR 产物测序结果在 NCBI 数据库中进行比对,确定野外犬科动物粪便中检出的蠕虫种类如表 3。

2 线虫感染情况

PCR 扩增犬粪样品 DNA 中的目的基因,线虫检出率为 35.66%。其中,狭首钩刺线虫检出率为 27.13%,犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)为 6.98%,猪蛔虫(*Ascaris suum*)为 3.10%,狐环体线虫(*Crenosoma vulpis*)为 1.55%,有齿冠尾线虫(*Stephanurus dentatus*)为 0.78%。不同线虫的检出率差异具有统计学意义($\chi^2 = 85.889, P < 0.05$)。有 3 份样品存在犬弓首蛔虫与狭首钩刺线虫混合感染,3 份样本存在犬弓首蛔虫与猪蛔虫的混合感染。

3 绦虫感染情况

129 份新鲜野生犬科动物粪便绦虫检出率为 5.43%。其中 5 份样品石渠棘球绦虫(*E. shiquicus*)阳性,检出率为 4.65%。有 5 份样品存在石渠棘球绦虫与线虫(狭首钩刺线虫、犬弓首蛔虫、狐环体线虫、有齿冠尾线虫)的混合感染。另在 1 份样品存在田氏带绦虫、线形中殖孔绦虫及狭首钩刺线虫的混合感染。

表 2 粪检野外犬科动物蠕虫感染情况
Table 2 Detection rate of helminths in canine feces in the field

样方 Survey spot	狭首钩刺线虫 <i>Uncinaria stenocephala</i>			犬弓首蛔虫 <i>Toxocara canis</i>			猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>			狐环体线虫 <i>Crenosoma vulpis</i>			环体线虫属 <i>Crenosoma</i> sp.			有齿冠尾线虫 <i>Stephanurus dentatus</i>			石渠棘球绦虫 <i>E. shiquicus</i>			田氏带绦虫 <i>Taenia tianguangfui</i>			线形中殖孔绦虫 <i>Mesocestoides lineatus</i>		
	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)	检查 份数	阳性 份数	感染率 (%)
	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate	No.	positive	Rate
1	38	9	23.68	38	0	0	38	0	0	38	0	0	38	0	0	38	2	5.26	38	0	0	38	0	0	38	0	0
2	22	4	18.18	22	2	9.09	22	0	0	22	1	4.55	22	0	0	22	1	4.55	22	2	9.09	22	0	0	22	0	0
3	33	13	39.39	33	2	6.06	33	0	0	33	1	3.03	33	1	3.03	33	0	0	33	0	0	33	0	0	33	0	0
4	36	9	25	36	5	13.89	36	4	11.11	36	0	0	36	0	0	36	0	0	36	2	5.56	36	1	2.78	36	1	2.78
合计 Total	129	35	27.13	129	9	6.98	129	4	3.10	129	2	1.55	129	1	0.78	129	6	4.65	129	1	0.78	129	1	0.78	129	1	0.78

表 3 野外犬科动物粪便 PCR 检测蠕虫感染率 (%)
Table 3 Detection of helminth infection in canine feces in the field by PCR amplification products

样品 编号 Sample	通用引物 Universal primers					特异性引物 Specific primers		
	18SRNA A	18SRNA B	18SRNA C	18SRNA PLA	COI JP	ND1 Eg	ND1 Em	ND1 Es
002	\	\	U. s 99. 471	\	\	\	\	\
006		\	U. s 97. 48. 30	\	\	\	\	E. s 81. 496. 40
007	U. s 99. 30	U. s 98. 9 87	U. s 98. 69. 42	Taenia. sp 99. 9 85	M. l 99. 0 8. 98		\	\
008	T. c 100. 00		\	\	\	\	\	E. s 95. 09. 02
010	\	U. s 92. 78. 02	\	\	\	\	\	\
011	\	U. s 98. 987	\	\	U. s 96. 11	\	\	\
012	\	U. s 99. 13	\	\	\	\	\	\
014	\	U. s 99. 13	\	\	\	\	\	\
020	T. c 100. 00	A. s 99. 73	\	\	\	\	\	\
021	\	U. s 98. 69. 41	\	\	\	\	\	\
022	\	C. v 99. 2 15	\	\	\	\	\	\
023	\	U. s 98. 9 87	\	\	\	\	\	\
024	\	A. s 99. 45	\	\	\	\	\	\
025	T. c 99. 7 66	A. s 98. 90	\	\	\	\	\	\
028	T. c 99. 7 65	\	\	\	\	\	\	\
030	T. c 99. 300	A. s 99. 182	\	\	\	\	\	\
039	T. c 99. 657	\	\	\	\	\	\	\
044	\	\	U. s 99. 42	\	\	\	\	\
046	\	\	S. d 87. 32	\	\	\	\	E. s 99. 51
050	T. c 99. 31	U. s 95. 70	U. s 99. 43	\	\	\	\	\
051	\	U. s 98. 9 87	U. s 99. 43	\	\	\	\	\
055	\	U. s 98. 9 86	U. s 99. 14	\	\	\	\	\
056	\	C. v 98. 566	\	\	\	\	\	E. s 99. 51
062	T. c 99. 657	U. s 99. 13	U. s 99. 42	\	\	\	\	\
064	\	U. s 99. 42	\	\	\	\	\	\
069	\	\	U. s 99. 14	\	\	\	\	\
070	\	U. s 99. 13	\	\	\	\	\	\
073	\	Crenosoma sp 95. 061	\	\	\	\	\	\
074	\	U. s 98. 253	\	\	\	\	\	\
075	U. s 97. 879	U. s 99. 091	U. s 99. 14	\	\	\	\	\
076	\	U. s 95. 485	\	\	\	\	\	\
077	\	U. s 85. 11	\	\	\	\	\	\
078	\	U. s 98. 879	\	\	\	\	\	\
081	\	U. s 99. 42	\	\	\	\	\	\
084	\	U. s 98. 9 86	\	\	\	\	\	\
087	\	U. s 98. 83	U. s 99. 42	\	\	\	\	\
090	T. c 99. 31	[U. s 99. 14	\	\	\	\	\	\
092	\	U. s 99. 091	U. s 98. 9 85	\	\	\	\	\
093	\	U. s 99. 394	U. s 99. 14	\	\	\	\	\
095	\	U. s 99. 13	U. s 99. 42	\	\	\	\	E. s 98. 80
105	\	U. s 99. 40	\	\	\	\	\	\
111	\	\	\	\	\	\	\	E. s 100. 00
112	\	U. s 99. 12	\	\	\	\	\	\
116	\	U. s 99. 14	\	\	\	\	\	\
117	\	U. s 99. 40	U. s 99. 14	\	\	\	\	\
126	\	U. s 99. 14	\	\	\	\	\	\
128	\	U. s 98. 9 87	\	\	\	\	\	\

注: 1) U. s: 狭首钩刺线虫; E. s: 石渠棘球绦虫; M. l: 线形中殖孔绦虫; T. c: 犬弓首蛔虫; A. s: 猪蛔虫; C. v: 环体线虫; S. d: 有齿冠尾线虫。2) 括号内为序列一致性。
Notes: 1) U. s: Uncinaria stenocephala; E. s: E. shiqucus; M. l: Mesocostoides lineatus; T. c: Toxocara canis; A. s: Ascaris suum; C. v: Crenosoma vulpis; S. d: Stephanurus dentatus. 2) Sequence consistency in brackets.

4 不同引物对检测蠕虫感染的差异性

使用通用引物及特异性引物检测样本中蠕虫感染情况如表 4。3 对线形动物门(Nematode)通用引物检测线虫感染的检出率差异具有统计学意义($\chi^2 =$

20. 561, $P < 0. 05$), 通用引物对 18SRNA B 的检测效率较高; 3 对引物狭首钩刺线虫、犬弓首蛔虫、猪蛔虫检出率差异均具有统计学意义(χ^2 值分别为 27. 969, 15. 431 和 5. 720, 均 $P < 0. 05$)。引物对 18SRNA A

可检出犬弓首蛔虫的 DNA 序列,引物对 18SRNA B 可检出猪蛔虫的 DNA 序列。

表 4 不同引物对不同蠕虫的检出率 (%)
 Table 4 Detection rate of different prim pairs in different worm

引物对名称 Primer pair name	狭首钩刺线虫 <i>Uncinaria stenocephala</i>	犬弓首蛔虫 <i>Toxocara canis</i>	猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>	狐环体线虫 <i>Crenosoma vulpis</i>	环体线虫属 <i>Crenosoma sp.</i>	有齿冠尾线虫 <i>Stephanurus dentatus</i>	石渠棘球绦虫 <i>E. shiqucus</i>	田氏带绦虫 <i>Taenia tianguangfui</i>	线形中殖孔绦虫 <i>Mesocestoides lineatus</i>	合计 Total
18SRNA A	1.55(2/129)	6.98(9/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	8.53(11/129)
18SRNA B	23.26(30/129)	0.00(0/129)	3.10(4/129)	1.55(2/129)	0.78(1/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	28.68(37/129)
18SRNA C	12.40(16/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.78(1/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	13.18(17/129)
COI JP	0.78(1/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.78(1/129)	1.55(2/129)
18SRNA PLA	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.78(1/129)	0.00(0/129)	0.78(1/129)
NDI Es	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	4.65(6/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	4.65(6/129)
NDI Em	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)
NDI Es	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)	0.00(0/129)

采用扁形动物门(Platyhelminthes)通用引物检测绦虫及吸虫感染,仅 1 份样品田氏带绦虫阳性,未检出棘球绦虫;使用特异性引物检测有 6 份样品石渠棘球绦虫阳性。通用引物 18SRNA PLA 与特异性引物 NDI Es 对石渠棘球绦虫的检出率差异具有统计学意义($\chi^2=4.266, P<0.05$),通用引物 18SRNA PLA 对石渠棘球绦虫的检出率较低。

讨论

本次调查石渠县野生犬科动物粪便样品中线虫检出率 35.66%,显著高于绦虫的检出率 5.43%,且线虫中主要检出的虫种为狭首钩刺线虫,其次为犬弓首蛔虫和猪蛔虫。检出的绦虫包括石渠棘球绦虫、田氏带绦虫以及线形中殖孔绦虫。

狭首钩刺线虫属于线形动物门线虫纲钩口科刺属线虫(*Uncinaria sp.*),可寄生于猫、犬、猪、狐、狼、獾和浣熊的小肠。其幼虫丝状蚴为感染阶段,可经皮肤接触或经口或粘膜感染,幼虫在宿主体内移行后发育为成虫,寄生于小肠上段吸附在肠粘膜上,以宿主的血液、组织液及肠粘膜为食。犬科动物是其主要的宿主,也可寄生于人体,犬感染狭首钩刺线虫可造成消化功能紊乱、贫血甚至死亡^[8]。钩虫可通过皮肤接触感染人体,造成肠出血,缺铁性贫血及蛋白质营养不良等健康问题^[9]。2018 年三江源区域首次发现犬感染狭首钩刺线虫^[8]。Martinez-Moreno 等^[10]对西班牙的科尔多瓦地区进行犬寄生虫调查,结果显示所有寄生虫中以狭首钩刺线虫的检出率最高,为 33.28%^[10]。在阿尔巴尼亚的地拉那地区^[11]、波兰^[12]、英国^[13]等多个地区的调查中犬感染狭首钩刺线虫十分常见,而在我国青藏高原地区犬感染狭首钩刺线虫的报道尚少,其感染情况有待进一步调查与研究。

犬弓首蛔虫属于线形动物门线虫纲弓首科弓首线虫属(*Toxocara sp.*),在犬科动物中的传播效率很高^[14],是世界范围内犬类动物的主要寄生虫物种之一^[15]。其虫卵广泛存在于土壤、水及食物中,发育至

含 2 期幼虫的虫卵具有感染性,犬科动物及人食入后可造成直接感染,感染后虫卵在小肠中发育至幼虫继而移行至其他组织和器官,最终回到小肠部位发育为成虫^[16]。幼犬可通过胎盘或乳汁感染犬弓首蛔虫,在我国青海牧区藏犬寄生虫病流行病学调查中发现犬弓首蛔虫为当地藏犬寄生虫的优势虫种^[17],犬感染后会造造成消化障碍并且会随血液分散到不同的组织肌肉中,移行过程可对机体不同组织造成损伤^[18]。犬弓首蛔虫感染人后,会对人体不同组织器官造成损伤,引起内脏幼虫移行症、眼睛幼虫移行症和隐性弓首蛔虫病^[19]。其高危人群为儿童^[15],通过控制犬及猫等家养宠物犬弓首蛔虫感染可有效避免人类感染该寄生虫而引起的健康损害。

猪蛔虫属于线形动物门尾感器纲蛔虫科蛔虫属(*Ascaris sp.*),是一种人畜共患寄生虫,可感染猪、牛等家畜及人类,其含感染期幼虫的虫卵可通过食物或水经口感染宿主,在宿主小肠中孵化为幼虫,继而进入血管移行至其他组织器官,最后回到小肠部位发育为成虫。寄生于小肠部位的成虫主要以黏膜表层物质及肠内容物为食^[20],2019 年,Xie 等^[21]通过形态学特征观察以及分子生物学技术在四川省发现家养犬存在猪蛔虫感染。本次调查通过分子生物学技术检测四川省石渠县野外犬科动物中存在猪蛔虫感染,为犬作为猪蛔虫的宿主提供了更多的实验室证据。同时提示猪蛔虫的防治过程中应注意犬与猪及人与猪之间的传播,需定期检查家养犬与猪的感染情况,需要对家猪及家犬的粪便进行无害化处理,避免用未经处理的猪粪便作为肥料而将猪蛔虫传播给人或家犬。

石渠棘球绦虫为 2005 年在四川省甘孜州石渠县新发现的一种扁形动物门绦虫纲带科棘球属绦虫(*Echinococcus sp.*)^[22],主要分布于青海、四川和西藏等地。其生活史包括两种宿主,主要中间宿主为高原鼠兔,主要终末宿主为藏狐,另外在沙狐和红狐中也有感染的相关报道^[23]。石渠棘球绦虫的幼虫在终末宿主

体内发育至成虫,产生的虫卵随粪便排出体外污染环境,中间宿主摄入环境中的虫卵后即可被感染,随后虫卵在中间宿主体内发育形成微型小囊,此时若中间宿主被终末宿主捕食则棘球绦虫的幼虫得以进入终末宿主完成完整的生活史^[23]。石渠棘球绦虫是否对人体致病尚不清楚。

田氏带绦虫属于扁形动物门绦虫纲带绦虫科带绦虫属(*Taenia sp.*),为青海地区田鼠体内发现的新物种田氏囊尾蚴的成虫,其生活史与多房棘球绦虫及石渠棘球绦虫相近,以啮齿动物为主要的中间宿主^[24]。此前在四川省石渠县收集到的犬科动物粪便中已检出相同的基因序列^[25],证实犬科动物可作为其终末宿主。田氏带绦虫与肥头带绦虫具有较近的亲缘关系,而肥头带绦虫的幼虫可感染人^[24],因此田氏带绦虫可能对人具有感染性。

狭首钩刺线虫、犬弓首蛔虫、猪蛔虫等均能引起人畜共患寄生虫病,且狭首钩刺线虫^[10-13]及犬弓首蛔虫^[15]在多个地区均为犬感染的主要寄生虫物种。而石渠棘球绦虫虽目前尚无对人致病的报道,但其在形态特征及生活史等方面均与对人致病的多房棘球绦虫具有相似性^[23],同样田氏带绦虫也具有感染人体的可能性^[24]。这些蠕虫对犬科动物及人体健康具有较大威胁,本次初步调查了石渠县当地野外犬科动物的蠕虫感染情况,可为当地野外犬科动物蠕虫感染的防治提供参考。

随着近年来生态保护观念的逐渐加强,粪便 DNA 物种鉴定技术与非损伤取样技术逐渐成为寄生虫病流行病学领域主要的研究方法^[26],使用通用引物对特定基因片段进行 PCR 扩增成为主要的分子物种鉴定方法^[27-28]。但同一通用引物在不同的样品中具有不同的检测效果,本研究中扁形动物门通用引物的检测效果相对较差,可能是由于野外犬科动物粪便 DNA 的组成成分较为复杂,干扰了通用引物对带绦虫的检测能力。为此,本研究采用了特异性引物对既往研究中发现当地主要感染的棘球绦虫进行检测,但特异性引物无法检测到其他的带绦虫感染,对当地犬科动物带绦虫感染总体情况的调查带来了阻碍。因此需开发更为敏感的带绦虫通用引物以提高对粪便中带绦虫 DNA 的检测能力及物种鉴定能力。

石渠县位于青藏高原东缘,当地居民主要为游牧民族,具有饲养犬以及外出游牧的习俗,人与犬科动物的接触密切,且当地牧民受高原地区地理条件及人文习惯因素影响难以对食物及水源进行彻底消毒,高发人兽共患寄生虫感染为当地带来较大的疾病负担^[29]。本次对当地犬感染蠕虫情况进行了初步调查,结果显示当地野生犬科动物蠕虫检出率相对较高,提示石渠

县应加强对犬科动物中狭首钩刺线虫、犬弓首蛔虫、石渠棘球绦虫等蠕虫感染的防控。此外扁形动物门通用引物对带绦虫的检测效率相对较差,需要开发高效的带绦虫属通用引物以提高带绦虫属 PCR 检测技术的敏感性。

致谢:感谢四川省疾控中心、甘孜疾控中心和石渠县疾控中心在现场调查工作中提供的帮助和支持。

【参考文献】

- [1] 邵昕宁,宋大昭,黄巧雯,等. 基于粪便 DNA 及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析[J]. 生物多样性,2019,27(5): 543-556.
- [2] 陈颖丹,周长海,朱慧慧,等. 2015 年全国人体重点寄生虫病现状调查分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2020,38(1):5-16.
- [3] 周璨林,宁礼群,马合木提·哈力克. 野生动物粪便研究进展[J]. 野生动物学报,2015,36(2):232-239.
- [4] 唐天才,袁东波,郭莉,等. 四川石渠县犬多房棘球绦虫感染情况调查[J]. 中国兽医杂志,2020,56(1):10-12,17.
- [5] Cannon MV, Bogale H, Rutt L, et al. A high-throughput sequencing assay to comprehensively detect and characterize unicellular eukaryotes and helminths from biological and environmental samples[J]. Microbiome,2018,6(1):195.
- [6] Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing [J]. Mol Biochem Parasitol,1992,54(2):165-173.
- [7] Boufana B, Umhang G, Qiu J, et al. Development of three PCR assays for the differentiation between *Echinococcus shiquicus*, *E. granulosus* (G1 genotype), and *E. multilocularis* DNA in the co-endemic region of Qinghai-Tibet plateau, China[J]. Am J Trop Med Hyg,2013,88(4):795-802.
- [8] 张志平,胡广卫,赵全邦,等. 三江源地区发现狭头钩刺线虫[J]. 畜牧兽医科技信息,2019,35(11):29-30.
- [9] Hotez PJ, Bethony JM, Diemert DJ, et al. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis [J]. Nat Rev Microbiol,2010,8(11):814-826.
- [10] Martinez-Moreno FJ, Hernandez S, Lopez-Cobos E, et al. Estimation of canine intestinal parasites in C rdoaba (Spain) and their risk to public health[J]. Vet Parasitol,2007,143(1):7-13.
- [11] Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, et al. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania[J]. Parasitol Res,2011,108(2):341-353.
- [12] Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Pilarczyk B, et al. Fauna of gastrointestinal parasites in red foxes in Western Poland[J]. Med Veter,2003,59(10):922-925.
- [13] Smith GC, Gangadharan B, Taylor Z, et al. Prevalence of zoonotic important parasites in the red fox (*Vulpes vulpes*) in Great Britain[J]. Vet Parasitol,2003,118(1-2):133-142.
- [14] Messier V, Levesque B, Proulx JF, et al. Seroprevalence of seven zoonotic infections in Nunavik, Quebec (Canada) [J]. Zoonoses Public Health,2012,59(2):107-117.
- [15] Traversa D, Frangipane Di Regalbono A, Di Cesare A, et al. Environmental contamination by canine geohelminths[J]. Parasit Vectors,2014,7:67.
- [16] 张艺琳,张森棹,古小彬,等. 犬弓首蛔虫卵体外发育的形态观察

- [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2019,37(4):486-489.
- [17] 李春花,蔡进忠,贾万忠,等. 青海牧区藏犬寄生虫病流行病学调查研究[J]. 青海畜牧兽医杂志,2014,44(4):1-4.
- [18] 庞博,郭瑞,郭文洁. 1例犬弓首蛔虫病的治疗[J]. 养殖与饲料,2021,20(11):157-158.
- [19] Wolfe A, Wright IP. Human toxocarasis and direct contact with dogs[J]. Vet Rec, 2003, 152(14):419-422.
- [20] 陶小琴,徐清富. 猪蛔虫病的防治[J]. 今日畜牧兽医,2020,36(3):84.
- [21] Xie Y, Liu Y, Gu X, et al. First report on aberrant *Ascaris suum* infection in a dog, China[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1):86.
- [22] 肖宁,邱加闽. 青藏高原东部地区发现的新种:石渠棘球绦虫的生物学特征[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2008,26(4):307-312.
- [23] 朱国强,李立,闫鸿斌,等. 石渠棘球绦虫研究进展[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(1):112-117.
- [24] 范彦雷,姜忠子,李立,等. 青藏高原青海田鼠体内囊尾蚴分类学地位的初步研究[J]. 中国兽医科学,2014,44(8):789-793.
- [25] Zhang QQ, Sun XH, Xu W, et al. Taeniid cestodes in *Tibetan foxes (Vulpes Ferrilata)* detected by copro-PCR: Applications and challenges[J]. Int J Parasitol Parasites Wildl, 2020(12): 242-249.
- [26] 李秦豫,艾斯卡尔·买买提,肖白桦,等. 分子粪便学在濒危野生动物研究中的应用[J]. 河南科技学院学报,2010,38(3):42-46.
- [27] H ttner M, Siefert L, Mackenstedt U, et al. A survey of *Echinococcus* species in wild carnivores and livestock in East Africa[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(11):1269-1276.
- [28] Jiang W, Liu N, Zhang G, et al. Specific detection of *Echinococcus spp.* from the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*) and the red fox (*V. vulpes*) using copro-DNA PCR analysis[J]. Parasitol Res, 2012, 111(4):1531-1539.
- [29] 张梦媛,伍卫平,官宜宜,等. 我国棘球蚴病疾病负担分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(1):15-19,25.
- 【收稿日期】 2022-02-20 【修回日期】 2022-05-15

(上接 674 页)

- [5] 王帅. 鸡源弓形虫治疗药物的筛选及弓形虫排泄分泌抗原巨噬细胞结合分子的鉴定和功能研究[D]. 南京:南京农业大学,2017.
- [6] Zong JL, Wang YN, Wang Q, et al. *Echinococcus granulosus*, 14-3-3 protein: A potential vaccine candidate against challenge with *Echinococcus granulosus*, in mice[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(3):352-358.
- [7] 钱春艳,宋丽君,余传信,等. 抗日本血吸虫 14-3-3 蛋白单克隆抗体 5C6 抗原识别表位的鉴定[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2012, 24(1):45-49.
- [8] Liberator P, Anderson J, Feiglin M, et al. Molecular cloning and functional expression of mannitol-1-phosphatase from the apicomplexan parasite *Eimeria tenella* [J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 4237-4244.
- [9] 刘亭岐. 巨型艾美耳球虫 4 种侵入相关蛋白分子特性及免疫保护性研究[D]. 南京:南京农业大学,2018.
- [10] 李鹏飞,冯将,刘媛,等. 羊口疮病毒重庆株 F1L 基因克隆与生物信息学分析[J]. 西北农业学报,2017,26(9):1281-1288.
- [11] Saha S, Raghav GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. Proteins, 2006, 65(1):40-48.
- 【收稿日期】 2022-01-20 【修回日期】 2022-04-10