

DOI:10.13350/j.cjpb.220216

• 调查研究 •

日本血吸虫低感染度动物粪便排卵观察*

孙成松,王毓洁,朱海,王玥,汪峰峰,尹晓梅,周莉,汪奇志,张世清,汪天平**

(安徽省血吸虫病防治研究所,安徽合肥 230061)

【摘要】 目的 观察低数量日本血吸虫尾蚴感染实验动物后在其体内存活和粪便排卵状况,为了解低水平流行态势下血吸虫低感染度动物传播能力奠定基础。方法 取新鲜逸出的尾蚴 2、4、6、8 条,分别感染小鼠和家兔,饲养至感染后 42 d 收集小鼠和家兔粪便,连续收集 3 d,利用浓集法镜检计数每克小鼠粪便虫卵数量(EPG),尼龙袋集卵孵化法观察家兔粪便毛蚴孵化率,以判定粪便中血吸虫卵排出情况。解剖全部实验小鼠与家兔,灌注法收集成虫,计算小鼠和家兔的感染率、体内合抱成虫检获率及虫负荷水平;同时观察小鼠和家兔肝脏表面虫卵结节,并收集家兔血清进行血吸虫抗体检测。结果 小鼠感染尾蚴数量为 2 条时,其感染率、体内合抱成虫检获率、肝脏虫卵结节率和粪便排卵率分别为 66.67%、58.33%、58.33% 和 58.33%,随感染尾蚴数量的增加四者趋于 100%,但差异均无统计学意义(χ^2 值分别为 2.455、3.135、3.135 和 3.135,均 $P > 0.05$);小鼠体内平均虫荷和粪便平均 EPG 随感染尾蚴数量增加而增加(r 值分别为 0.588 和 0.533,均 $P < 0.01$)。家兔尾蚴感染数量为 2 条时,其感染率、体内合抱成虫检获率、肝脏虫卵结节率、血检阳性率和粪便孵化阳性率均为 40%,除粪便孵化阳性率外($\chi^2 = 0.003, P > 0.05$),其他指标均随感染尾蚴数量的增加趋于 100%,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 4.473、4.473、4.473 和 6.758, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);随着感染尾蚴数量的增加,家兔体内虫荷增加($r = 0.421, P < 0.01$)。结论 感染一对日本血吸虫的小鼠和家兔即可检测到粪便排卵,提示小型适宜哺乳动物宿主传病能力强,应加强监测与控制,消除潜在的传染源隐患。

【关键词】 日本血吸虫;尾蚴数量;小鼠;家兔;粪便排卵

【中图分类号】 R383.24

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0203-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):203-206, 211.]

Observation on fecal eggs from animals with low infection intensity of *Schistosoma japonicum*

SUN Cheng-song, WANG Yu-jie, ZHU Hai, WANG Yue, WANG Feng-feng, YIN Xiao-mei, ZHOU Li, WANG Qi-zhi, ZHANG Shi-qing, WANG Tian-ping (Anhui Provincial Institute of Schistosomiasis Control, Hefei 230031, China)***

【Abstract】 **Objective** To observe the survival of *Schistosoma japonicum* and fecal eggs excreted from experimental animals infected with low quantity of cercariae, so as to lay a foundation for understanding the transmission ability of animals with low infection intensity. **Methods** The mice and rabbits were infected with 2, 4, 6 and 8 fresh cercariae, respectively. After 42 days of infection, the feces of mice and rabbits were collected for 3 consecutive days. The number of eggs per gram of mice feces (EPG) was counted by microscopy, and the hatching rate of miracidia in rabbit feces was observed to determine the excretion of schistosome eggs in feces. Finally, all the mice and rabbits were dissected under euthanasia and the adult worms were collected. The infection rate, the rate of animals parasitized with pairing worms and the worm burden were calculated. Meanwhile, the egg nodules on the liver surface of mice and rabbits were observed, and the serum of rabbits was collected for detection of antibodies against schistosome. **Results** When the quantity of cercariae for infecting mice was as low as 2, the infection rate, the rate of mice parasitized with pairing worms, the rate of liver egg nodules and fecal eggs excretion were 66.67%, 58.33%, 58.33% and 58.33% respectively. With the increase of quantity of cercariae for infecting mice, the four indexes tended to be 100%, but there were no statistical significance ($\chi^2 = 2.455, P = 0.117; \chi^2 = 3.135, P = 0.077; \chi^2 = 3.135, P = 0.077; \chi^2 = 3.135, P = 0.077$). The average worm burden and EPG of mice increased with the quantity of cercariae ($r = 0.588, P = 0; r = 0.533, P = 0.007$). When the quantity of cercariae for infecting rabbits was 2, the infection rate, the rate of rabbits parasitized with pairing worms, the rate of liver egg nodules, the positive rate of blood test and hatching rate of miracidia in rabbit feces were all 40%. Except the positive hatching rate

* **【基金项目】** 2020 年度安徽省自然科学基金项目(No. 2008085QH430),安徽省医疗卫生重点专科建设资助项目,安徽省第十四批“115”产业创新团队资助项目。

** **【通讯作者】** 汪天平, E-mail: tpwang906@163.com

【作者简介】 孙成松(1985-),男,安徽舒城人,博士,副主任医师。研究方向:血吸虫生物学与血吸虫病防治。E-mail: schs1985@aliyun.com
孙成松和王毓洁为共同第一作者。

($\chi^2=0.003, P=0.956$), other indexes tended to be 100% with the increase of the quantity of cercariae, and had statistical significance ($\chi^2=4.473, P=0.034; \chi^2=4.473, P=0.034; \chi^2=4.473, P=0.034; \chi^2=6.758, P=0.009$). With the increase of quantity of cercariae, the worm burden in rabbits increased ($r=0.421, P=0.007$). **Conclusion** Mice and rabbits infected with a couple of cercariae of *Schistosoma japonicum* can lead to excretion of fecal eggs, suggesting that small suitable mammalian hosts have strong transmission ability. Therefore, surveillance and control measures should be strengthened to eliminate potential sources of infection.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; quantity of cercariae; mice; rabbits; excretion of fecal eggs

在自然界中,日本血吸虫有 40 多种哺乳动物保虫宿主^[1],宿主多样性导致日本血吸虫病流行与传播特征的复杂性,使其难以达到有效地控制^[2]。人和家畜在血吸虫病传播中居主要地位,而家畜中的牛是血吸虫病流行区尤其是湖沼型地区最重要的传染源和保虫宿主^[3-4]。鉴于此,我国于 2005 年提出了以传染源控制为主的血吸虫病综合防治策略,核心措施包括以机代牛、淘汰牛羊、封洲禁牧以控制传染源粪便对有螺环境的污染、大力查治传染源、加强流动传染源管理等。该策略自全面推广实施以来,流行区人群及钉螺感染率、感染性钉螺密度等均显著降低^[5-7],使得人和牛作为传染源在血吸虫病传播中的作用日益下降,我国血吸虫病疫情也降至极低水平^[8]。然而,其他家养动物(猪、犬等)和野生动物(如野鼠,尤其在山丘地区)等保虫宿主由于难以实施普查普治、粪便管理等防治措施,其在血吸虫病传播中的作用难以估计,极有可能成为有螺地区疫情回升的潜在隐患^[9-12]。本研究采用日本血吸虫低虫荷(低数量尾蚴感染)小鼠和家兔两种实验动物,观察虫体在动物体内的存活和粪便排卵状况,了解低水平流行态势下血吸虫低感染度动物传播能力,为动物传染源的精准防控提供科学依据。

材料与方法

1 材料

6 周龄雌性 ICR 小鼠与体重(2.5±0.5)kg 家兔购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场;日本血吸虫感染性钉螺由湖南省血吸虫病防治所提供。动物实验依照安徽省血吸虫病防治研究所医学伦理委员会的相关规定进行。

2 方法

2.1 低数量日本血吸虫尾蚴感染动物模型的建立

将 pH6.4~7.4、盐浓度 0.02% 以下的去氯自来水在光照培养箱中恒温至 20~25℃,取 30 只感染性钉螺置于上述去氯水中光照逸蚴。取新鲜逸出的尾蚴 2、4、6、8 条,采用腹部贴片法分别感染小鼠和家兔。2 条尾蚴组感染小鼠 12 只,4 条尾蚴组感染小鼠 7 只,其余两组均感染小鼠 8 只,共计 35 只。家兔 2 条和 4 条尾蚴组各感染 5 只,其余两组均感染家兔 6 只,共计 22 只。

2.2 动物体内成虫、血清与粪便的收集 从感染后 42 d 开始,连续 3 d 收集小鼠和家兔粪便备检。解剖小鼠与家兔,灌注法收集日本血吸虫成虫,计算小鼠和家兔的感染率、雌雄合抱成虫检获率及体内虫负荷水平。解剖小鼠和家兔过程中观察并压片镜检肝脏表面虫卵结节,计算每组小鼠和家兔肝脏虫卵结节率。此外,在解剖家兔前耳缘静脉采血,分离血清,-20℃冻存,用于检测血吸虫抗体。

2.3 小鼠粪便的处理 将一定质量的小鼠粪便(0.2~1 g)置于 2 mL EP 管中,然后加入 1.2% NaCl 溶液,浸泡 1~2 h 后将粪便搅碎,搅碎后的粪便混悬液依次过 60、160、300 目尼龙绢,用 1.2% NaCl 溶液冲洗,待粪便被冲洗完全且从最下层尼龙绢滤出的水变澄清后,收集 300 目尼龙绢内容物于 15 mL 离心管中静置 15 min,倾去上清液,滴加适量 4% 甲醛溶液混匀,计数全部沉渣内的血吸虫虫卵,计算小鼠每克粪便中虫卵数(EPG)及每只小鼠连续 3 d 的平均 EPG。注意处理每一份粪便样品时均需更换尼龙绢,避免交叉污染。

2.4 家兔粪便的处理 将 60 目铜筛扣进 300 目尼龙袋的口沿铁圈内,用夹子夹紧尼龙袋底部。取约 50 g 新鲜家兔粪便置于铜筛内,一边捣碎粪便一边用去氯水冲洗,待粪便捣碎冲洗完全且从尼龙袋滤出的水变澄清后,丢弃铜筛内容物并将尼龙袋内细粪渣用去氯水流入长颈圆底烧瓶内,加去氯水至瓶口,控制瓶内水温于 20~30℃,并在光照条件下分别于 2、4、6、8、10、12 及 24 h 用肉眼或放大镜观察毛蚴,必要时可用移液器将毛蚴吸出镜检,粪便毛蚴孵化阴性的家兔需再重复试验 2 次,计算每组家兔粪便孵化阳性率。注意处理每一份粪便样本时均需更换铜筛和尼龙袋,避免交叉污染。

2.5 家兔血清抗体检测 采用日本血吸虫抗体检测试剂盒(间接血凝法,国械注准 20143401974,购自安徽安吉医药科技有限公司,批号:20150120)对收集的家兔血清进行血吸虫抗体检测,按说明书操作,计算每组家兔血吸虫抗体阳性率。

2.6 数据处理 采用 Excel 2016 软件进行数据录入,进行 Spearman 相关性分析和趋势 χ^2 检验, $P <$

0.05 为差异有统计学意义。使用的统计学软件为 SPSS 18.0。

结果

1 日本血吸虫低虫荷小鼠感染情况

1.1 体内成虫相关指标 当感染尾蚴数量为 2 条时, 12 只小鼠中有 8 只体内检获成虫, 其中 7 只检获的是一对雌雄合抱虫体, 小鼠的感染率和体内合抱成虫检获率分别为 66.67% 和 58.33%。随着感染尾蚴数量的增加, 小鼠感染率及体内合抱成虫检获率均趋 100%, 趋势 χ^2 检验分析显示差异均无统计学意义 (χ^2 值分别为 2.455 和 3.135, 均 $P > 0.05$)。Spearman 相关分析显示, 感染尾蚴数量与小鼠体内虫荷呈正相关 ($r=0.588, P<0.01$), 即随着感染尾蚴数量的增加小鼠体内虫荷增加(表 1)。

表 1 低数量日本血吸虫尾蚴感染小鼠体内成虫相关指标
Table 1 Related indexes of adult worms in mice infected with low quantity cercariae of *S. japonicum*

尾蚴感染数量 (条)	感染小鼠只数	检获成虫小鼠只数	感染率 (%)	检获合抱成虫小鼠只数	合抱成虫检获率 (%)	平均虫荷 ($\bar{x} \pm s$)
Quantity of cercariae	No. of infected mice	No. of mice parasitized with adult worms	Infection rate (%)	No. of mice parasitized with paring worms	Rate of mice parasitized with paring worms (%)	Average worm burden ($\bar{x} \pm s$)
2	12	8	66.67	7	58.33	1.33 ± 0.98
4	7	6	85.71	4	57.14	2.29 ± 1.25
6	8	6	75.00	5	62.50	2.75 ± 2.37
8	8	8	100.00	8	100.00	4.88 ± 2.47

1.2 肝脏虫卵结节与粪便排卵情况 不同尾蚴数量组体内检获雌雄合抱成虫的小鼠, 其肝脏表面均有虫卵结节, 且随粪便排出虫卵。当感染小鼠的尾蚴数量为 2 条时, 有 7 只小鼠肝脏表面出现虫卵结节且随粪便排出虫卵, 小鼠肝脏虫卵结节率和粪便排卵率均为 58.33%。随着感染尾蚴数量的增加, 小鼠肝脏虫卵结节率与粪便排卵率趋于 100%, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.135, P > 0.05$)。当感染小鼠的尾蚴数量为 2 条时, 小鼠连续 3 d 粪便的平均 EPG 为 95.04 ± 29.68; 随着感染尾蚴数量的增加, 小鼠排卵量逐渐增大, 经 Spearman 分析两者具有相关性 ($r = 0.533, P = 0.007$) (表 2)。

2 日本血吸虫低虫荷家兔感染情况

2.1 体内成虫相关指标 当感染尾蚴数量为 2 条时, 5 只家兔中有 2 只体内检获成虫, 且均为一对雌雄合抱虫体, 家兔感染率及体内合抱成虫检获率均为 40%。各尾蚴数量组体内检获成虫的家兔均含有雌雄合抱虫体。随着感染尾蚴数量的增加, 家兔感染率及体内合抱成虫检获率均趋于 100% ($\chi^2 = 4.473, P < 0.05$)。Spearman 相关分析显示, 感染尾蚴数量与家兔体内虫荷呈正相关 ($r=0.421, P < 0.01$), 即随着感

染尾蚴数量的增加家兔体内虫荷增加(表 3)。

表 2 低数量日本血吸虫尾蚴感染小鼠肝脏虫卵结节率及粪便排卵率与平均 EPG

Table 2 Positive rate of liver egg nodules, stool examination and average EPG in mice infected with low quantity cercariae of *S. japonicum*

尾蚴感染数量 (条)	感染小鼠只数	肝脏虫卵结节小鼠只数	肝脏虫卵结节率 (%)	随粪便排出虫卵小鼠只数	粪便排卵率 (%)	EPG ($\bar{x} \pm s$)
Quantity of cercariae	No. of infected mice	No. of mice with hepatic egg nodules	Rate of mice with hepatic egg nodules (%)	No. of mice excreting eggs	Rate of mice excreting eggs (%)	EPG ($\bar{x} \pm s$)
2	12	7	58.33	7	58.33	95.04 ± 29.68
4	7	4	57.14	4	57.14	134.79 ± 18.99
6	8	5	62.50	5	62.50	199.84 ± 18.45
8	8	8	100.00	8	100.00	432.10 ± 184.50

表 3 低数量日本血吸虫尾蚴感染家兔体内成虫相关指标
Table 3 Related indexes of adult worms in rabbits infected with low quantity cercariae of *S. japonicum*

尾蚴感染数量 (条)	感染家兔只数	检获成虫家兔只数	感染率 (%)	检获合抱成虫家兔只数	合抱成虫检获率 (%)	平均虫荷 ($\bar{x} \pm s$)
Quantity of cercariae	No. of infected rabbits	No. of rabbits parasitized with adult worms	Infection rate (%)	No. of rabbits parasitized with paring worms	Rate of rabbits parasitized with paring worms (%)	Average worm burden ($\bar{x} \pm s$)
2	5	2	40.00	2	40.00	0.80 ± 1.10
4	5	5	100.00	5	100.00	3.20 ± 1.10
6	6	5	83.33	5	83.33	2.67 ± 2.07
8	6	6	100.00	6	100.00	2.33 ± 0.82

2.2 肝脏虫卵结节、血检及粪便孵化情况 不同尾蚴数量感染组体内检获雌雄合抱成虫的家兔肝脏表面均产生虫卵结节, 且血吸虫抗体检测均阳性。2 条尾蚴组体内未检获虫体的 3 只家兔血吸虫抗体均阴性, 6 条尾蚴组体内未检获虫体的 1 只家兔血吸虫抗体检测阳性。随着感染尾蚴数量的增加, 家兔肝脏虫卵结节率及抗体阳性率趋于 100%, 不同感染组家兔肝脏虫卵结节率及抗体阳性率差异均有统计学意义 (χ^2 值分别为 4.473 和 6.758, $P < 0.05$) (表 4)。

表 4 低数量日本血吸虫尾蚴感染家兔肝脏虫卵结节、血检及粪便孵化情况

Table 4 Observation on liver egg nodules, serological test and fecal hatching of rabbits infected with low quantity cercariae of *S. japonicum*

尾蚴感染数量 (条)	感染家兔只数	肝脏虫卵结节家兔只数	肝脏虫卵结节率 (%)	血检阳性家兔只数	血检阳性率 (%)	粪便孵化阳性家兔只数	粪便孵化阳性率 (%)
Quantity of cercariae	No. of infected rabbits	No. of rabbits with hepatic egg nodules	Rate of rabbits with hepatic egg nodules (%)	No. of positive rabbits with serological test	Positive rate of serological test (%)	positive rabbits with fecal hatching	Positive rate of fecal hatching (%)
2	5	2	40.00	2	40.00	2	40.00
4	5	5	100.00	5	100.00	5	100.00
6	6	5	83.33	6	100.00	5	83.33
8	6	6	100.00	6	100.00	3	50.00

2、4、6 条尾蚴组肝脏有虫卵结节的家兔粪便孵化结果均为阳性, 但 8 条尾蚴组家兔虽然肝脏虫卵结节率和血检阳性率均为 100%, 但连续 3 d 粪便孵化阳性率仅为 50%, 组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 =$

0.003, $P > 0.05$ 。

讨 论

基本消除血吸虫病地区实施以传染源控制为主的综合性防治策略后,牛羊等主要传染源被控制,而家犬、野鼠等野生动物已成为局部地区血吸虫病的主要传染源^[13]。从流行病学角度来说,血吸虫只有在其体内能够发育成熟并排出虫卵的动物才能成为传染源,而动物宿主传播血吸虫病能力的大小主要取决于其易感性、感染机率、感染度、粪便排卵数、虫卵孵化率以及粪便对有螺环境的污染程度等因素^[14]。现阶段,我国血吸虫病呈现低水平流行态势^[8],推测流行区宿主的感染率与感染度低。本研究以日本血吸虫适宜宿主小鼠和家兔为动物模型,采用低数量尾蚴感染,结果发现当感染的尾蚴数量低至2条时即可成功感染并在小鼠和家兔体内存活,若存活的两条虫体为一对雌雄合抱成虫,小鼠和家兔均可随粪便排出血吸虫虫卵,表明小型适宜哺乳动物宿主传播血吸虫病能力强,在全面推进血吸虫病消除工作进程中,要进一步加强对传染源的控制,在淘汰牛羊传染源的同时,应对其他家养动物(猪、犬等)传染源和野生动物类保虫宿主(如野鼠)的实际传播能力和维系传播的能力进行重新评价,并加强监测与控制,消除潜在的传染源隐患。

理论上,当一批感染性钉螺逸出的尾蚴雌雄比相当时,随着感染尾蚴数量的增加,宿主感染成功率和双性感染的概率提高,如本研究中的家兔动物模型。而小鼠模型的感染率不随尾蚴数量的增加而增加,说明其易感性高,即使2条尾蚴感染也可逃避小鼠免疫系统攻击而在其体内存活。小鼠体内雌雄合抱成虫检获率未随尾蚴数量增加而增加,可能是因为本次试验用于逸蚴的感染性钉螺数量较多。据文献报道,自然界中感染性钉螺单性感染的概率在95%以上,其中雌雄虫感染占比对半^[15],所以当逸蚴的感染性钉螺超过一定数量,即使2条尾蚴感染也比较容易检获合抱虫体。

体内检获雌雄合抱成虫的小鼠肝脏表面均出现虫卵结节且随粪便排出虫卵,小鼠肝脏虫卵结节率与粪便排卵率未随感染尾蚴数量增加而增加。即使体内存活一对雌雄合抱成虫,小鼠也会出现肝脏虫卵沉积和粪便排卵,与文献^[16-17]报道的结果一致,同时也从侧面证实小鼠感染血吸虫不存在隐性感染现象。

日本血吸虫在感染适宜终宿主后约24 d开始产卵,平均每条性成熟雌虫每天产卵1 000~3 500个^[18],肝脏沉积占比22.5%,7.7%随粪便排出^[19]。在感染后45 d解剖,肝脏沉积虫卵量3 375~11 812.5个。因此,家兔体内仅有一对雌雄合抱虫体也可在肝脏表面观察到明显的虫卵结节。

对于各尾蚴感染组内,有部分小鼠和家兔体内未检获成虫,可能是由于个体差异,低数量的尾蚴在钻皮后受宿主免疫系统攻击且被清除,也有可能是因为单性感染的虫体发育不良、体型较小^[15,20-21],造成漏检,特别是体型较大的家兔在门静脉灌注过程中更容易漏检单性感染的虫体,而合抱虫体因为发育成熟,特别是雌虫卵黄腺呈深褐色,不易漏检。受免疫系统攻击清除或单性虫体存活体内都会诱导宿主免疫学反应并产生抗体,但2条尾蚴感染的家兔有3只体内未检获成虫的抗体检测阴性,而6条尾蚴组有1只家兔体内未检获虫体抗体检测却呈阳性,可能是因为2条尾蚴感染所诱导产生的抗体滴度过低,未达到试剂盒的最低检测限。

2、4、6条尾蚴感染组肝脏表面有虫卵结节的家兔粪便孵化均为阳性,8条尾蚴感染组所有家兔肝脏表面均有虫卵结节,抗体检测全为阳性,但有3只家兔粪便连续3d孵化均为阴性。在现阶段血吸虫病防治中,流行区人群也存在抗体检测阳性率高,而病原学检测阳性率低的现象^[22-23],这与8条尾蚴感染组家兔血检结果均为阳性,而粪检却有3只家兔连续3d阴性的现象类似。上述结果的出现可能是由于使用的病原学检测方法敏感性低,抑或是宿主存在个体差异,解剖检查3只抗体阳性而粪检阴性的家兔在感染后44 d肠道病变仍未达到破溃排卵的程度,也可能是虫卵随粪便排出的不规则性所导致。因此,在实施以传染源控制为主的防治策略进程中,提高病原学检测方法的敏感性或开发免疫学、分子生物学等确诊病原存在的检测手段,以利于发现新的传染源。

本次研究通过小型实验动物试验评估了低水平流行态势下血吸虫低感染度动物的传播能力,关于低感染度大型动物(如牛或羊),以及灵长类动物的血吸虫病传播能力值得进一步实验研究。

【参考文献】

- [1] He YX, Salafsky B, Ramaswamy K. Host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in mammalian hosts[J]. Trends Parasitol, 2001, 17(7): 320-324.
- [2] Wang TP, Shrivastava J, Johansen MV, et al. Does multiple hosts mean multiple parasites? Population genetic structure of *Schistosoma japonicum* between definitive host species[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(12): 1317-1325.
- [3] Guo JG, Li YS, Gray D, et al. A drug-based intervention study on the importance of buffaloes for human *Schistosoma japonicum* infection around Poyang Lake, People's Republic of China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 74(2): 335-341.
- [4] Wang TP, Johansen MV, Zhang SQ, et al. Transmission of *Schistosoma japonicum* by humans and domestic animals in the Yangtze River valley, Anhui province, China[J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 198-204.

(下转 211 页)