

患病中华大蟾蜍中日本棒线虫的分离鉴定及组织病理学分析

胡田^{①#} 高子阳^{②④#} 詹常森^{②④} 姜鹏^{②④} 吕利群^① 王浩^{①③*}

① 上海海洋大学国家水生动物病原库 上海 201306; ② 上海和黄药业有限公司 上海 201401; ③ 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306; ④ 上海市中药固体制剂创新研究中心 上海 201401

摘要: 为探究中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 人工养殖过程中暴发性死亡的原因, 本研究对山东某养殖基地患病死亡蟾蜍进行解剖观察, 发现疑似线虫感染。将检出的线虫样本进行 COI 基因和 ITS 序列扩增比对并结合形态学特征鉴定物种, 对患病大蟾蜍组织病理学分析, 以确定病因。结果表明, 获得的线虫 ITS 序列 (GenBank 序列号为 PQ669203) 与 NCBI 数据库中日本棒线虫 (*Rhabdias nipponica*) ITS 序列 (GenBank 序列号为 AB818377) 的相似度为 99.65%; 获得的线虫 COI 基因序列 (GenBank 序列号为 PQ669209) 与 NCBI 数据库中日本棒线虫 COI 基因序列 (GenBank 序列号为 LC671279) 的相似度为 98.66%。通过普通光学显微镜测量检出线虫样本的各个器官数据, 并使用扫描电子显微镜观察检出线虫样本的细微结构, 确定检出的线虫为日本棒线虫; 组织病理学分析发现, 患病蟾蜍肺组织存在钙化灶、组织空泡化和核空泡化。剖检 84 只患病蟾蜍, 检出寄生在蟾蜍肺部线虫 283 条, 线虫感染阳性蟾蜍 65 只, 感染率为 77.38%, 平均感染强度为 4.4 条/只。本研究结果提示, 日本棒线虫感染是导致本次养殖场中华大蟾蜍大规模死亡的主要病原学因素和重要诱因, 观察到的病理损伤支持其具有较强的致病潜力, 这将为人工养殖中华大蟾蜍的疾病防控提供数据参考。

关键词: 中华大蟾蜍; 线虫; ITS; COI

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2025) 06-871-11

Isolation and Identification of *Rhabdias nipponica* and Lung Pathohistology of Infected *Bufo gargarizans*

HU Tian^{①#} GAO Zi-Yang^{②④#} ZHAN Chang-Sen^{②④} JIANG Peng^{②④}
LÜ Li-Qun^① WANG Hao^{①③*}

① National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ② Shanghai Hehuang Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 201401; ③ Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,

基金项目 上海和黄药业有限公司项目 (No. CGGY-2024-YF-004), 农业农村部农业科研杰出人才培养计划项目 (No. 13210256), 中国科协青年人才托举工程项目 (No. D-8005-19-0012);

* 通讯作者, E-mail: h-wang@shou.edu.cn;

共同第一作者 胡田, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物医学; E-mail: hutian1210222@163.com;

高子阳, 男, 硕士研究生; 研究方向: 中药学; E-mail: gaoziyang@shpl.com.cn。

收稿日期: 2024-12-25, 修回日期: 2025-06-20 DOI: 10.13859/j.cjz.202524267 CSTR: 32109.14.cjz.24267

Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ④ Shanghai Innovation Research Center of Chinese Medicine Solid Preparations, Shanghai 201401, China

Abstract: [Objectives] *Bufo gargarizans*, a nationally protected amphibian species with significant ecological and medicinal value in China, faces critical conservation challenges due to declining wild populations. Its artificial breeding is essential for sustainable resource utilization, particularly for producing Bufonis Venenum—a key component in Chinese patent medicines such as Liushen Pills and Shexiang Baoxin Pills. However, outbreaks of mass mortality in captive breeding facilities threaten conservation and pharmaceutical efforts. This study investigated the etiology of explosive mortality events occurring in June–July 2024 at a *B. gargarizans* farm in Shandong Province, China, where environmental conditions (26–35 °C) coincided with seasonal rainfall. **[Methods]** Eighty-four moribund individuals of *B. gargarizans* were subjected to necropsy, pathological examination, and molecular diagnostics. Gross examination revealed systemic abnormalities: pulmonary edema, hepatomegaly with pallor, hydrops of the gallbladder, and intestinal edema. Histopathological analysis identified severe pulmonary lesions, including multifocal calcification, extensive tissue vacuolization, and nuclear vacuolization (Fig. 9), indicating profound structural damage. Nematodes were exclusively localized in the lungs, with no detection in the liver, kidneys or gastrointestinal tract. Morphological characterization integrated light microscopy (LM; Fig. 3, 4) and scanning electron microscopy (SEM; Fig. 5). The parasites exhibited fusiform bodies (2.866–8.817 mm length × 0.177–0.320 mm width), transverse cuticular annulations, funnel-shaped buccal capsules, cylindrical esophagi, and conical tails with terminal papillae, which were consistent with those of *Rhabdias* spp. Comparative morphometrics against other *Rhabdias* species (Table 2) further supported taxonomic assignment. **[Results]** Molecular identification confirmed the pathogen as *R. nipponica*. Genomic DNA was extracted from nematodes, and ITS (730 bp) and COI (436 bp) genes were amplified with primers NC5/NC2 and COI-F/COI-R, respectively (Table 1). BLAST alignment of the obtained sequences (GenBank accession number: PQ669203 for ITS; GenBank accession number: PQ669209 for COI) showed 99.65% similarity to *R. nipponica* ITS (GenBank accession number: AB818377) and 98.66% similarity to *R. nipponica* COI (GenBank accession number: LC671279). Phylogenetic analysis (neighbor-joining method, 1 000 bootstrap replicates) placed the isolates within the *R. nipponica* clade with strong support (95% for ITS, 63% for COI; Figs. 7, 8). Crucially, PCR screening excluded viral co-infections (LMBV, MRV, RGV, and FV3; Fig. 2). **[Conclusion]** Epidemiological analysis revealed high parasitism: 65 of 84 (77.38%) *B. gargarizans* individuals were infected, harboring 283 nematodes (mean intensity: 4.4 nematodes/toad). The extensive pulmonary damage observed—attributed to mechanical obstruction, inflammatory responses, and impaired gas exchange—directly correlated with clinical symptoms (lethargy, anorexia, and dyspnea) and mortality. This study provides the first conclusive evidence of *R. nipponica* as a primary pathogen causing epizootic mortality in farmed *B. gargarizans*. The integration of histopathology, morphometrics, and molecular phylogenetics establishes a robust diagnostic framework for lung nematodiasis. Our findings underscore the urgent need for targeted anthelmintic protocols (e.g., ivermectin or fenbendazole, validated in related studies) and environmental disinfection strategies to mitigate transmission. This work lays a foundation for biosecurity measures essential for sustainable farming of *B. gargarizans*, aligning with national policies promoting non-food wildlife utilization for medicinal conservation.

Key words: *Bufo gargarizans*; Nematode; ITS; COI

中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 隶属于两栖纲 (Amphibia) 无尾目 (Anura) 蟾蜍科 (Bufonidae) 蟾蜍属, 其广泛分布于我国大部分省区, 从近海至海拔 1 830 m 的各种生境下都可见到它的踪迹 (费梁等 2009)。由于生活在水中, 中华大蟾蜍在越冬和繁殖时期体外常有水蛭寄生, 体内也有线虫和绦虫寄生 (邹寿昌 1966)。目前, 中华大蟾蜍的人工增殖技术尚在起步阶段, 缺乏疫病防控关键技术。

小杆线虫属 (*Rhabdias*) 是小杆线虫科 (Rhabdiasidae) 中最常见的属, 有 90 多种, 广泛分布于全球各地 (Tkach et al. 2014)。小杆线虫属的生活史分为两代: 雌雄同体一代, 成虫寄生在宿主体内; 雌雄异体一代, 成虫栖息在宿主的粪便中或土壤中 (Kuzmin 2013)。小杆线虫属的形态特征为: 口具 3~6 个有乳突或刺的唇片, 口囊由几丁质构成, 食道具前后两个食道球, 雌虫阴门常位于体中部, 雄虫交接刺一对, 具有导刺带、尾翼和尾乳突 (唐仲璋等 2009)。

2024 年山东某中华大蟾蜍人工增殖基地, 雨季来临前后的 6 至 7 月间, 气温 26~35 °C, 中华大蟾蜍出现大规模死亡。为确定其病因, 本研究随机挑选患病蟾蜍进行解剖观察, 发现疑似线虫感染。对检出的疑似线虫样本进一步开展 ITS 和 COI 分子生物学鉴定, 同时结合电镜观察和组织病理学分析, 探究人工养殖中华大蟾蜍的主要疫病及其发生规律。

1 材料与方 法

2024 年 6 月至 7 月在山东省某中华大蟾蜍养殖基地采集死亡中华大蟾蜍 84 只, 带回实验室登记后备用。

1.1 病症观察与病毒检测

首先, 通过现场调查收集当地天气情况及养殖管理数据, 同步记录群体异常行为。其次, 对采集到的死亡蟾蜍编号并记录体重, 观察体

表是否存在溃疡、充血等组织病变并记录。随后使用生理盐水冲洗体表杂质, 使用手术剪刀从泄殖腔孔开始纵向剪开腹腔, 对于内脏器官, 着重检查是否有线虫寄生以及是否存在颜色异常、肿大或坏死等病理特征。使用体视显微镜 (SZ2-ILST, 日本奥林巴斯) 拍照记录。之后, 依次取出肺、肝、胃及肠道, 分别放置于含生理盐水的培养皿中, 用镊子将内脏撕开, 使用体视显微镜依次检查各个脏器并用挑针将虫体挑出保存。

随机取 3 只死亡蟾蜍用酒精棉球擦拭后, 在无菌条件下取肝、肾、脾组织, 用 DNA 提取试剂盒 (DP304, 天根生化科技有限公司) 提取 DNA。采用特异性引物对大口黑鲈虹彩病毒 (Largemouth bass iridovirus, LMBV)、蛙虹彩病毒 (*Rana grylio virus*, RGV)、鳃蛙虹彩病毒 (mandarin fish ranavirus, MRV) 和蛙病毒 3 型 (frog virus 3, FV3) 进行 PCR 扩增 (Pro Flex™ PCR 系统, 美国赛默飞), 引物信息见表 1。PCR 反应体系为 25 μl: 模板 1 μl (202 mg/L); 上下游引物各 1 μl (10 μmol/L); 2 × Premix Taq™ DNA 聚合酶 (RR901A, 日本 Takara 公司) 12.5 μl; ddH₂O 9.5 μl。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共进行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。蛙病毒 3 型 (FV3) 的 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共进行 30 个循环; 72 °C 延伸 15 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2 光学显微镜观察

使用光学显微镜 (BX43, 日本奥林巴斯) 观察采集到的新鲜虫体, 着重对虫体口、肠、阴门等部位进行详细观察, 并结合相关文献 (唐仲璋等 2009, Marcaida et al. 2022), 对虫体进行初步鉴定。

1.3 扫描电子显微镜观察

取新鲜虫体用 PBS 轻轻漂洗去除样本表面

表 1 PCR 扩增所用引物
Table 1 Primers used for PCR

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	扩增片段长度 (bp) Amplified fragment length
NC2	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAAT	730
NC5	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	
COI-F	TTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT	430
COI-R	ACATAATGAAAATGACTAACAAC	
LMBV-F	TATGTGCTCAACTCTTGGCTGGTC	475
LMBV-R	CCACGATGGGCTTGACTTCTCC	
MRV-F	TATGTGCTCAACTCTTGGCTGGTC	475
MRV-R	CCACGATGGGCTTGACTTCTCC	
RGV-F	CCCCTCCCATTCTTCTCTCC	271
RGV-R	CAACCATGTCCCTGACTGTGC	
FV3-R	CGCAGTCAAGGCCTTGATGT	585
FV3-F	AAAGACCCGTTTGCAGCAAAC	

杂质, 迅速投入电镜固定液 (G1102-100ML, 塞维尔生物科技有限公司) 室温保存 2 h, 再转移至 4 °C 保存。参照任丽花等 (2018) 的方法制作扫描电镜样品。最后使用 HITACHI SU8100 扫描电子显微镜 (日立股份有限公司) 观察并拍照。

1.4 分子生物学鉴定

对于采集到的虫体, 使用 DNA 提取试剂盒 (DP304, 天根生化科技有限公司) 提取虫体基因组 DNA。将提取到的基因组 DNA 放置于 -20 °C 保存。参照文献 (Zhu et al. 1998, 谢沛璇 2022) 分别合成扩增 ITS 和 COI 的引物 (表 1), 预期扩增片段长度分别为 730 bp 和 430 bp 左右。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。COI 和 ITS 反应体系均为 25 μ l, 含有 2 \times Premix TaqTM DNA 聚合酶 12.5 μ l, 上、下游引物各 1 μ l (浓度为 10 μ mol/L), ddH₂O 8.5 μ l, DNA 模板 2 μ l (102 mg/L)。混匀瞬间后进行 PCR 反应。ITS 的 PCR 反应条件为, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共进行 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。COI 的 PCR 反应条件为, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 1 min, 42 °C 1 min, 72 °C 1 min,

共进行 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。反应结束后, 对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果并保存图片。序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。

将测序结果与 GenBank 中公布的相关序列进行 BLAST 比对, 使用 MEGA11.0 软件的 Clustal X 方法对序列进行同源性比对。随后, 构建系统发育树来确定该虫体与近缘种的亲缘关系和分类地位, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构树, 并将 Bootstrap 设置为 1 000。

1.5 感染情况

统计线虫的数量, 并计算线虫感染率和平均感染强度。感染率为肺组织被线虫感染的蟾蜍个体数量占检测蟾蜍总数的百分比。平均感染强度为所有受感染蟾蜍肺组织中的线虫总条数与被线虫感染蟾蜍个体数之比 (单位: 条/只), 此数值反映每只感染蟾蜍体内平均寄生的线虫数量。

1.6 组织病理学检验

患病中华大蟾蜍体表使用 75% 乙醇进行消毒, 取患病蟾蜍肺组织, 用 10% 中性福尔马林固定 48 h, 以健康蟾蜍肺组织作为对照。修块后逐级脱水透明、浸蜡, 常规石蜡包埋后切片。

经 H.E 染色, 中性树胶封片后拍照。

2 结果

共剖检 84 只中华大蟾蜍, 在 65 只蟾蜍肺中共发现肺线虫 283 条, 感染率为 77.38%, 平均感染强度为 4.4 条/只。

2.1 临床症状与病毒检测

患病中华大蟾蜍最开始出现精神萎靡、食欲减退等现象, 后发展为离群、独自趴在水边, 最后死亡。收集死亡蟾蜍带回实验室, 肉眼观察患病蟾蜍体表腹部表面有溃疡。解剖后发现, 肺肿大, 胆肿大且呈水样, 肝发白且血丝明显, 肠道水肿。镜检后发现, 线虫主要集中于肺, 且数量较多, 感染严重的个体出现肺由末端向前端逐渐萎缩的现象 (图 1)。

死亡蟾蜍大口黑鲈虹彩病毒 (LMBV)、蛙虹彩病毒 (RGV)、蛙病毒 3 型 (FV3) 和鳊蛙虹彩病毒 (MRV) PCR 检测结果均为阴性

(图 2), 因此可以排除被以上病毒感染。

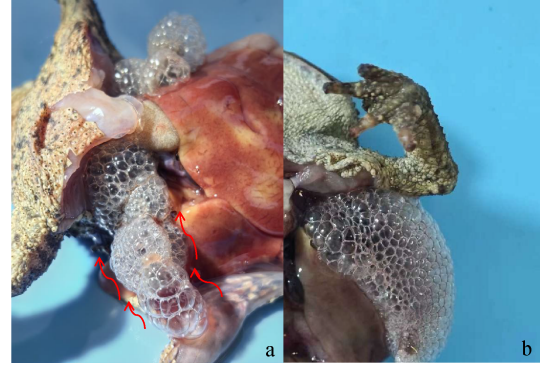


图 1 患病 (a) 和健康 (b) 中华大蟾蜍的肺
Fig. 1 Lungs of diseased (a) and healthy (b) *Bufo gargarizans*

图 a 中箭头所指为病变发展方向, 即从肺部末端向肺部前端发生萎缩。

The arrow in panel a indicates the progression direction of the lesion. That is, atrophy occurs from the end to the front of the lung.

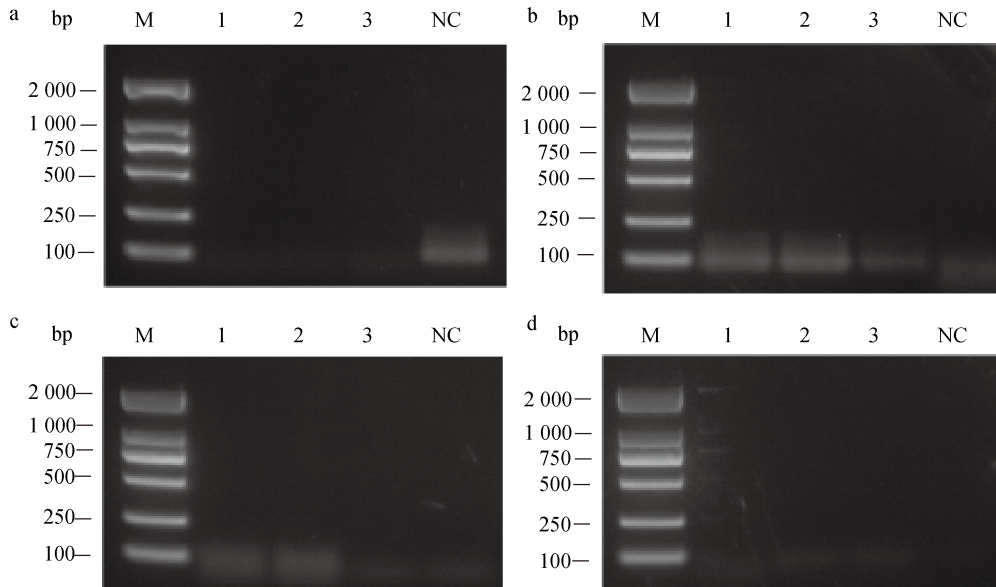


图 2 大口黑鲈虹彩病毒 (a)、鳊蛙虹彩病毒 (b)、蛙虹彩病毒 (c) 和蛙病毒 3 型 (d) 检测结果

Fig. 2 Results of Largemouth bass iridovirus (LMBV, a), mandarinfinch ranavirus (MRV, b), *Rana grylio* virus (RGV, c), and frog virus 3 (FV3, d) detection

1. 死亡蟾蜍 1; 2. 死亡蟾蜍 2; 3. 死亡蟾蜍 3; M. DL 2 000 DNA 分子量标准; NC. 阴性对照

1. Dead *B. gargarizans* 1; 2. Dead *B. gargarizans* 2; 3. Dead *B. gargarizans* 3; M. DL 2000 DNA marker; NC. Negative control

2.2 虫体形态及鉴定

2.2.1 光学显微镜下的形态学鉴定 通过显微镜观察，虫体主要集中在蟾蜍肺部，在肝、肾

及肠道均未检出。所有虫体外部形态大致相似，可初步判断为一种虫体（图 3，表 2）。虫体呈纺锤形，最大体宽位于中部，体表角质层具有

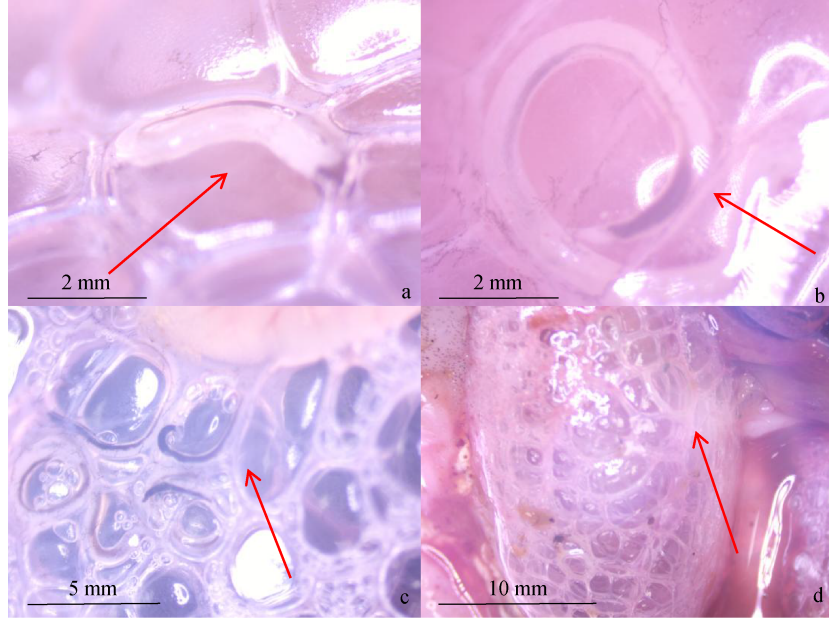


图 3 体视显微镜下观察的日本棒线虫

Fig. 3 Observation of *Rhabdias nipponica* under the stereomicroscope

图 a、b 为 6 倍下观察结果，图 c 为 4 倍下观察结果，图 d 为 2 倍下观察结果。箭头指示中华大蟾蜍肺泡中寄生的日本棒线虫。

Panels a and b show the results of observation at 6 ×; panel c shows the results of observation at 4 ×; and panel d shows the results of observation at 2 ×. The arrows indicate the parasitism of *Rhabdias nipponica* in the alveoli of *Bufo gargarizans*.

表 2 小杆线虫属中不同物种的测量结果比较

Table 2 Comparison of measurements of different species of *Rhabditis*

	线虫种类 Nematode species			
	蟾蜍棒线虫 ^A <i>Rhabdias bufonis</i> Morsy et al. 2018	<i>R. esculentorum</i> ^B Cipriani et al. 2012	蟾蜍棒线虫 ^C <i>R. bufonis</i> 谢沛璇等 2022	日本棒线虫 ^D <i>R. nipponica</i> 本研究 This study
体长 Body length (mm)	2.990 - 13.020	7.180 - 13.410	4.640 - 8.230	2.866 - 8.817
体宽 Body width (mm)	0.136 - 0.476	0.265 - 0.441	0.280 - 0.410	0.177 - 0.320
食道长 Oesophagus length (mm)	0.288 - 0.510	0.447 - 0.600	0.320 - 0.470	0.233 - 0.406
尾部长 Tail length (mm)	0.144 - 0.420	0.300 - 0.459	0.246 - 0.360	0.157 - 0.371
阴门距头端 Vulva-head distance (mm)	—	3.660 - 7.350	2.330 - 4.150	1.727 - 5.314
虫卵长 Egg length (mm)	0.117 - 0.144	—	0.102 - 0.110	0.068 - 0.093
虫卵宽 Egg width (mm)	0.051 - 0.072	—	0.050 - 0.060	0.032 - 0.047

表中“—”表示原始文献未提供相关数据。A. 宿主为非洲蟾蜍；B. 宿主为欧洲食用蛙；C. 宿主为黑龙江林蛙；D. 宿主为中华大蟾蜍

The symbol “—” in the table denotes data not provided in the source literature. A. Host is *Amietophrynus regularis*; B. Host is *Rana esculenta*; C. Host is *R. chensinensis*; D. Host is *Bufo gargarizans*

褶皱，漏斗状口腔囊及棒状食管，厚壁肠管内容物呈黑色；外阴开口位于体中部偏后，体内充满椭圆形卵，尾部圆锥形且末端具圆形突起（图 4），上述形态特征符合两栖类小杆线虫属的鉴定特征（Kuzmin et al. 2013, Marcaida et al. 2022）。相较于 Marcaida 等（2022）对小杆线虫属的记载，本研究分离的线虫未检出角质层局部膨胀现象，但观察到虫体内幼虫发育状态。

2.2.2 扫描电子显微镜观察 扫描电子显微镜观察显示，本实验分离的线虫身体细长，长度约 3 mm（图 5a），最大宽度约在身体中部（图 5b~e），具有椭圆形的前端，有横向皱褶的身体角质层和环绕食道前部的神经环，而其圆锥形且稍长的尾（图 5f）在扫描电镜中很突出。

2.2.3 分子生物学鉴定 以该虫体总 DNA 为模板，成功扩增其 ITS 和 COI 基因序列。经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，ITS 和 COI 基因扩增反应产物大小分别为 730 bp 和 436 bp（图 6）。通

过 BLAST 比对后发现此虫体序列与 GenBank 上下载的日本棒线虫 (*Rhabdias nipponica*) ITS 序列 (GenBank 序列号 AB818377) 相似度为 99.65%，与日本棒线虫 COI 序列 (GenBank 序列号 LC671279.1) 相似度为 98.66%。

以麻生氏新昆虫黑线虫 (*Neoentomelas asatoi*) 为外群，基于 11 种线虫的 COI 基因序列采用邻接法构建系统发育树，本研究分离寄生线虫的 COI 基因序列 (GenBank 序列号 PQ669209) 与日本棒线虫的 COI 基因序列 (GenBank 序列号 LC671279.1) 聚在一起 (图 7)，支持率为 63%。

以日本饰尾线虫 (*Cosmocerca japonica*) 和易变异饰尾线虫 (*C. commutata*) 为外群，基于 12 种线虫的 ITS 区序列采用邻接法构建系统发育树，线虫分为两大支，一支为 *Serpentirhabdias* 属线虫，另外一支由 *Rhabdias* 属和 *Entomelas* 属线虫组成，本研究分离寄生



图 4 光学显微镜下观察的日本棒线虫

Fig. 4 Observation of *Rhabdias nipponica* under the optical microscope

a. 虫体头部；b. 虫体整体观；c. 虫体尾部；d. 虫体中部。图 a、c 和 d 为 100 倍下观察结果，图 b 为 40 倍下观察结果。

a. Anterior end; b. Overall body; c. Posterior end; d. Middle part. Panels a, c, and d show the results of observation at 100 ×, and panel b shows the results of observation at 40 ×.

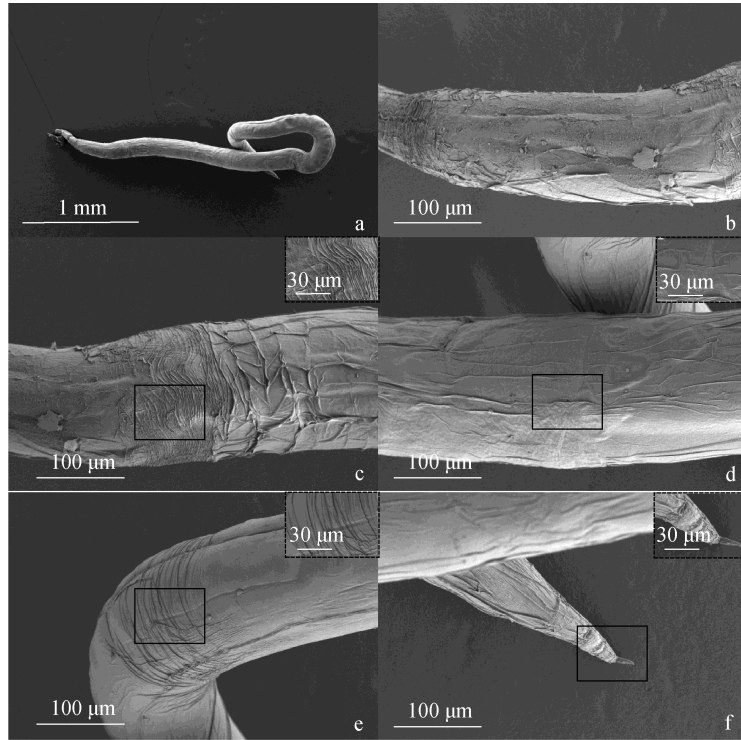


图 5 日本棒线虫扫描电镜图像

Fig. 5 Scanning electron microscopy micrographs of *Rhabditis nipponica*

a. 整体观; b ~ e. 中部; f. 尾部。a. Overall body; b - e. Middle part; f. Posterior end.

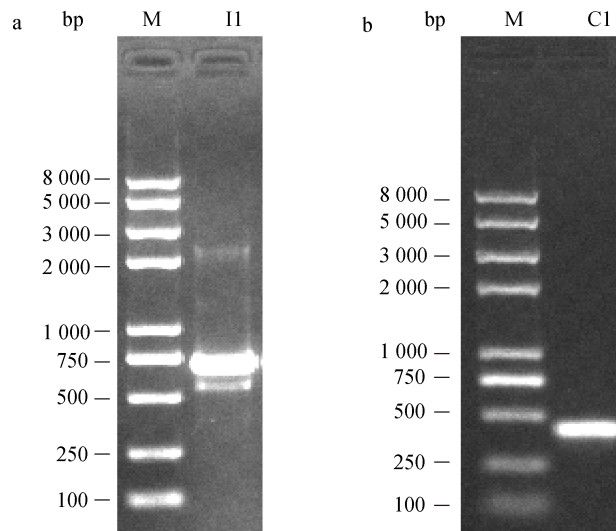


图 6 ITS (a) 和 COI (b) 序列扩增结果

Fig. 6 PCR amplification of ITS (a) and COI (b) sequences

C1. 实验虫体 COI 序列扩增产物; II. 实验虫体 ITS 序列扩增产物; M. DL 5 000 Plus DNA 分子量标准

C1. COI sequence amplification products of nematodes in this study; II. ITS sequence amplification products of nematodes in this study; M. DL 5 000 Plus DNA marker

线虫的 ITS 序列 (GenBank 序列号 PQ669203) 与日本棒线虫的 ITS 序列 (GenBank 序列号 AB818377) 聚集在一起 (图 8), 支持率为 95%。

2.3 组织病理学观察

组织病理检查发现, 患病蟾蜍的肝、脾、肺、肾和肠道均出现不同程度的病变, 病理损伤最为严重的器官为肺。对照组健康蟾蜍的肺组织中肺泡结构清晰, 细胞排列均匀; 而被肺线虫寄生的蟾蜍肺组织中出现钙化灶, 疑似炎症后导致组织坏死留下的痕迹, 组织空泡化, 核空泡化 (图 9)。

3 讨论

在研究过程中采集到的虫体, 经过显微镜下观察, 发现其形态学结构基本一致, 符合小杆线虫属的鉴别特征 (Marcaida et al. 2022)。通过 BLAST 比对分析后发现, 实验采集到的虫体序列与此前在 GenBank 上发表的日本棒线虫 ITS 序列 (序列号 AB818377) 的相似度高达 99.65%, 与日本棒线虫 COI 基因序列 (序列号 LC671279) 的相似度为 98.66%。此外, 利用邻接法构建的系统发育树结果显示, 所获得

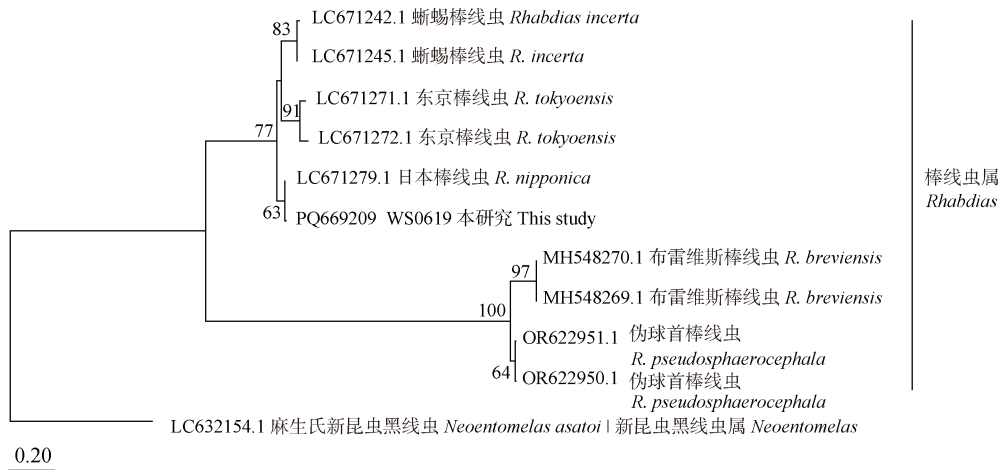


图 7 基于 COI 基因序列构建的邻接系统发育树

Fig. 7 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the COI sequences

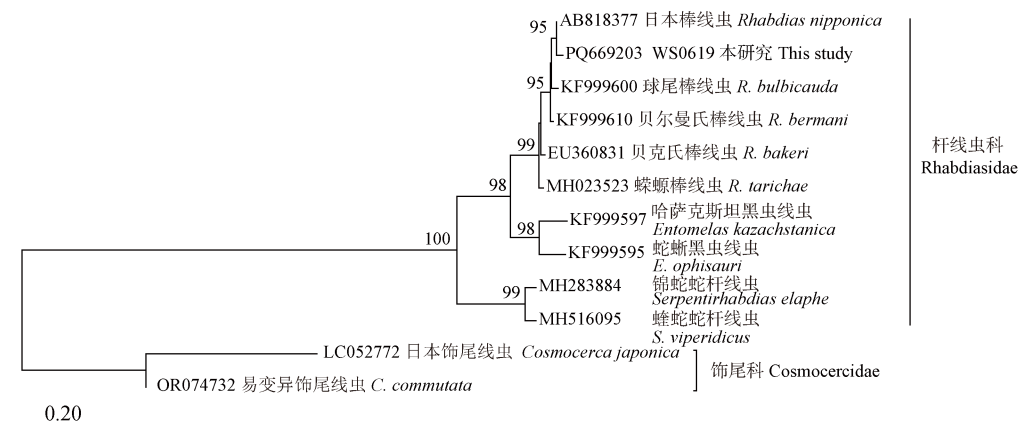


图 8 基于 ITS 序列的邻接系统发育树

Fig. 8 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the ITS sequences



图9 日本棒线虫寄生的中华大蟾蜍肺的组织病理学观察

Fig. 9 Histopathological observation of the lung of *Bufo gargarizans* infected with *Rhabdias nipponica*

a. 对照组健康中华大蟾蜍肺组织; b. 患病中华大蟾蜍肺组织中出现钙化灶疑似炎症后导致组织坏死留下的痕迹(红色箭头指示); c. 患病中华大蟾蜍肺组织空泡化(黄色箭头指示)及核空泡化(蓝色箭头指示)。

a. Control group of healthy *B. gargarizans*; b. Calcified foci in the lung tissue suspected to be traces of tissue necrosis following inflammation (red arrow); c. vacuolization of tissue (yellow arrow), and vacuolization of nuclei (blue arrow).

虫体与日本棒线虫处于同一分支中。因此,形态学观察结果和分子生物学结果互相印证,可判定此种线虫为日本棒线虫。

寄生虫种类繁多,在寄生严重的情况下不但会剥夺宿主的营养,而且会损伤宿主的组织器官,进而引起感染。有研究报道,黄鳝(*Monopterus albus*)肠道中的隐藏新棘虫[*Pallisentis (Neosentis) celatus*]和体腔内的胃瘤线虫(*Eustrongylides* sp.)可造成其肠道完全被虫体阻塞,肠壁穿孔,而当胃瘤线虫大量寄生时,还会造成黄鳝内脏器官的萎缩、损伤,体壁与内脏粘连(宋锐等 2013)。在两栖动物感染棒线虫早期,感染强度较低,仅表现为轻微的炎性反应,而在两栖动物肺寄生大量棒状线虫的情况下则会导致其携氧能力下降(Kelehear et al. 2009, Pizzatto et al. 2011)。寄生虫对两栖动物的频繁感染会影响其生长,严重时甚至会引发个体死亡(Santos et al. 2016)。研究表明,棒状线虫在寄生蟾蜍后能够操纵蟾蜍的行动模式,让蟾蜍向更有利于虫卵和幼虫发育的环境移动,且促使蟾蜍产生含水量更高的粪便(Finnerty et al. 2018a)。还有研究报道,在实验室条件下,将棒状线虫幼虫接种于两栖动物体内后,炎症反应随时间增加而加剧,可能导致以肉芽肿为主要特征的病变,并造成粒细胞与淋巴细胞出现病理性异常变化(Pizzatto

et al. 2010)。组织病理学分析证实肺线虫对中华大蟾蜍组织器官有不同程度的侵害,其中病理损伤最为严重的器官为肺。肺损伤可能会使得宿主肺血氧循环产生障碍,导致呼吸不畅,使其出现摄食量下降、精神萎靡等状态。

本研究调查了山东省某中华大蟾蜍养殖基地肺线虫对中华大蟾蜍的感染率和感染强度,对患病蟾蜍肺寄生线虫的种类进行了鉴定,并通过组织病理分析证实了肺线虫对中华大蟾蜍肺器官的损伤。然而,目前针对棒线虫的防控研究报道较少。伊维菌素和阿苯达唑等药物对蟾蜍棒线虫具有驱虫作用,可增强血清的杀菌活性(Finnerty et al. 2017)。美国休斯敦动物园利用芬苯达唑和左旋咪唑为野生蟾蜍种群进行了驱虫治疗,效果显著且副作用较小(Bianchi et al. 2014)。据报道,在人工养殖蟾蜍中,治疗肺线虫病可提高蟾蜍的活动能力和觅食成功率(Crane et al. 2024)。而针对野生蟾蜍治疗肺线虫病感染使宿主存活率提高 8%,移动率提高 20%,生长率提高 28%,雄性第二性征的发育率提高 30%(Finnerty et al. 2018b)。

2020 年国家林业和草原局发布《关于规范禁食野生动物分类管理范围的通知》,将中华大蟾蜍及黑眶蟾蜍(*Duttaphrynus melanostictus*)列为禁食野生动物分类管理范围二类,允许出于药用、展示、科研等非食用性目的开展养殖,

为以药用为目的的中华大蟾蜍养殖提供了政策支持 and 依据。目前, 中华大蟾蜍的种质资源、生活史、发育生物学研究和人工增养殖技术尚在起步阶段。推进中华大蟾蜍人工增养殖技术的发展、突破其规模化养殖生物安保技术等, 对其科学使用及保护具有重要意义。本研究明确了中华大蟾蜍人工养殖过程中寄生虫疾病的主要病原, 并开展了病理学分析, 下一步将在本研究基础上, 针对引种过程和养殖环境中线虫的检测以及开展养殖消毒技术研究, 建立中华大蟾蜍人工养殖生物安保技术, 为中华大蟾蜍的保护和药用开发提供支撑。

参 考 文 献

- Bianchi C M, Johnson C B, Howard L L, et al. 2014. Efficacy of fenbendazole and levamisole treatments in captive Houston toads (*Bufo* [*Anaxyrus*] *houstonensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(3): 564–568.
- Cipriani P, Mattiucci S, Paoletti M, et al. 2012. *Rhabdias esculentorum* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from green frogs of the *Rana esculenta* species complex in Italy: molecular evidence, morphological description and genetic differentiation from its congeners in frogs and toads. *Systematic Parasitology*, 82(2): 131–146.
- Crane H R, Rollins L A, Shine R, et al. 2024. Effect of parasite infection and invasion history on feeding, growth, and energy allocation of cane toads. *Biological Journal of the Linnean Society*, 144(4): bla054.
- Finnerty P B, Shilton C M, Shine R, et al. 2017. Using experimental de-worming to measure the immunological and pathological impacts of lungworm infection in cane toads. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(3): 310–319.
- Finnerty P B, Shine R, Brown G P. 2018a. Survival of the feces: Does a nematode lungworm adaptively manipulate the behavior of its cane toad host? *Ecology and Evolution*, 8(9): 4606–4618.
- Finnerty P B, Shine R, Brown G P. 2018b. The costs of parasite infection: Effects of removing lungworms on performance, growth and survival of free-ranging cane toads. *Functional Ecology*, 32(2): 402–415.
- Kelehear C, Webb J K, Shine R. 2009. *Rhabdias pseudosphaerocephala* infection in *Bufo marinus*: lung nematodes reduce viability of metamorph cane toads. *Parasitology*, 136(8): 919–927.
- Kuzmin Y. 2013. Review of Rhabdiasidae (Nematoda) from the Holarctic. *Zootaxa*, 3639: 1–76.
- Marcaida A J B, Nakao M, Fukutani K, et al. 2022. Phylogeography of *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) collected from *Bufo* species in Honshu, Shikoku, and Kyushu, Japan including possible cryptic species. *Parasitology International*, 90: 102612.
- Morsy K, Ali Mohamed S, Abdel-Ghaffar F, et al. 2018. *Rhabdias bufonis* (Rhabdiasidae) from the lung of the African common toad, *Ameiophrynus regularis* (Bufonidae) in Egypt: new data on the basis of light and scanning electron microscopic study. *PeerJ*, 6: e5328.
- Pizzatto L, Shilton C M, Shine R. 2010. Infection dynamics of the lungworm *Rhabdias pseudosphaerocephala* in its natural host, the cane toad (*Bufo marinus*), and in novel hosts (native Australian frogs). *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4): 1152–1164.
- Pizzatto L, Shine R. 2011. The effects of experimentally infecting Australian tree frogs with lungworms (*Rhabdias pseudosphaerocephala*) from invasive cane toads. *International Journal for Parasitology*, 41(9): 943–949.
- Santos J N, da Silva D C, Feitosa L A, et al. 2016. *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) versus *Rhabdias paraensis* (Nematoda: Rhabdiasidae): expanding the view on a natural infection. *The Journal of Parasitology*, 102(3): 349–355.
- Tkach V V, Kuzmin Y, Snyder S D. 2014. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. *International Journal for Parasitology*, 44(5): 273–284.
- Zhu X Q, Gasser R B, Podolska M, et al. 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(12): 1911–1921.
- 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2009. 中国动物志 (中卷) 无尾目蟾蜍科. 北京: 科学出版社, 518–546.
- 任丽花, 罗钦, 刘洋, 等. 2018. 小瓜虫侵染澳洲龙纹斑鳃的扫描电镜观察. *福建农业学报*, 33(6): 571–574.
- 宋锐, 李文祥, 邹红, 等. 2013. 黄鳝体内寄生隐藏棘虫和胃瘤线虫的频率分布及季节动态. *水生生物学报*, 37(6): 1044–1050.
- 唐仲璋, 唐崇扬. 2009. 人兽线虫学. 北京: 科学出版社, 76–97.
- 谢沛璇. 2022. 黑龙江两种林蛙线虫感染调查及优势虫种遗传多样性分析. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文.
- 谢沛璇, 姜岩, 安琪, 等. 2022. 黑龙江省林蛙肺线虫的鉴定及感染情况调查. *动物医学进展*, 43(9): 72–76.
- 邹寿昌. 1966. 徐州市郊大蟾蜍生态的初步观察. *动物学杂志*, 8(2): 67–69.