

文章编号: 1000-7423(2012)-02-0081-05

【论著】

扫描电镜观察猴体内寄生的蛇舌状虫属若虫 及基于其 18S rRNA 基因的种系发育关系分析

李健¹, 石云良¹, 施维¹, 方芳¹, 周庆安¹, 李雯雯¹, 何国声², 黄维义^{1*}

【摘要】 目的 运用扫描电镜观察食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 体内分离的蛇舌状虫属若虫虫体表面的超微结构, 并基于其 18S rRNA 序列分析其分子种系发育关系。方法 将从食蟹猴分离的蛇舌状虫属若虫用戊二醛与锇酸双固定法, 置于扫描电镜下观察其体表超微结构。PCR 扩增若虫 18S rRNA 基因并测序; 运用序列比对软件 ClustalX 1.83 将测序结果与 GenBank 上所有已登录的孔头舌虫目 (Porocephalida) 内部虫种序列进行多重比对分析, 并使用 MEGA 4.0 采用邻位相连法构建种系发育树进行分析。结果 扫描电镜示, 若虫呈圆柱状, 前段略粗, 末端变细。腹环由前向后逐渐增宽, 至 12~13 腹环时趋于等宽, 腹环与腹环之间, 在前半段连接紧密, 在后半段有一定间隔。头部腹面正中为口, 呈圆形, 口稍上方两侧各见一对钩, 钩几乎在同一平行线上。两外侧钩的正下方, 头胸部最后一节胸环上各有一个对称的大型感觉乳突, 紧接的第一节腹环靠中线处有一对呈对称的大型感觉乳突, 腹环数目由此算起共 29 个腹环 (末端有 2 个腹面未连接的不完整腹环不计算在内)。若虫全身布满类圆形的感觉乳突, 但在头部背面与末节腹面未见有此类乳突出现。末端腹面有一块状隆起上可见肛门开口。参照文献, 暂将该若虫定为串珠蛇舌状虫 (*Armillifer moniliformis*) 的若虫。PCR 测序后获得 18S rRNA 部分基因序列, 长度为 1 836 bp, 提交 GenBank 后获得登录号为 HM048870。种系发育树显示其与尖吻蝮蛇舌状虫 (*A. agkistrodontis*) 和腕带蛇舌状虫 (*A. armillatus*) 构成自展值为 95% 的分支。前两者又构成一个独立的自展值为 75% 的分支。结论 自食蟹猴体内分离的蛇舌状虫属若虫暂定为串珠蛇舌状虫若虫。

【关键词】 串珠蛇舌状虫; 若虫; 超微结构; 18S rRNA; 种系发育树

中图分类号: R384.9 文献标识码: A

Ultrastructural Observation on Nymphal *Armillifer* sp. by Scanning Electron Microscopy and Phylogenetic Analysis Based on 18S rRNA

LI Jian¹, SHI Yun-liang¹, SHI Wei¹, FANG Fang¹, ZHOU Qing-an¹,
LI Wen-wen¹, HE Guo-sheng², HUANG Wei-yi^{1*}

(1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2 Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS/Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200232, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the ultrastructure of nymphal *Armillifer* sp. isolated from *Macaca fascicularis* by using scanning electron microscope (SEM), and analyze the phylogenetic relationships based on 18S rRNA gene sequences. **Methods** The parasite samples stored in 70% alcohol were fixed by glutaraldehyde and osmium peroxide. Ultrastructural characters of those samples were observed under SEM. Amplification and sequencing of the 18S rRNA gene were performed following the extraction of total genome DNA. Sequence analysis was performed based on multiple alignment using ClustalX1.83, while phylogenetic analysis was made by Neighbor-Joining method using MEGA4.0. **Results** The nymphs were in cylindrical shape, the body slightly claviform tapering to posterior end. Abdominal annuli were gradually widened from anterior to posterior parts, the 12th-13th abdominal annuli of which were similar in width. The annuli ranged closer in the front half body, whereas in the latter part there were certain gaps between them. The circular-shaped mouth located in the middle of head ventrally. Folds were seen in inner margin of the mouth with a pair of curved hooks on both sides above it which practically disposed in a straight line. Two pairs of large sensory papillae were

基金项目: 广西大学动科院科研基金 (No. DK201111)

作者单位: 1 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005; 2 中国农业科学院上海兽医研究所, 农业部动物寄生虫学重点实验室, 上海 200232

* 通讯作者, E-mail: wyhuang@gxu.edu.cn

observed symmetrically over the last thoracic annulus of cephalothorax lying below the outer hook, and the first abdominal annulus was near the median ventral line. The number of abdominal annuli was 29, not including 2 incomplete terminal annuli. Rounded sensory papillae were fully distributed on the body surface, except the dorsal side of head and the ventral part of the terminal annulus. Agglomerate-like anus opening was observed at the end of ventral abdominal annuli and distinctly sub-terminal. These morphological features demonstrated that the nymphs were highly similar with that of *Armillifer moniliformis* Diesing, 1835. A fragment of 18S rRNA gene (1 836 bp) sequences was obtained by PCR combined with sequencing, and was registered to the GeneBank database with an accession number HM048870. The phylogenetic tree indicated that *A. moniliformis*, *A. agkistrodontis* and *A. armillatus* were at the same clade with a bootstrap value at 95%, and *A. moniliformis* and *A. agkistrodontis* were solo at a clade with a bootstrap value of 75%. **Conclusion** The nymphs isolated from *Macaca fascicularis* are identified as *A. moniliformis* temporarily.

[Key words] *Armillifer moniliformis*; Nymph; Ultrastructure; 18S rRNA; Phylogenetic analysis

Supported by Scientific Research Fund of College of Animal Science and Technology, Guangxi University(No. DK201111)

* Corresponding author, E-mail: wyhuang@gxu.edu.cn

由于舌形虫门级分类阶元一直有争议, 现主张将蛇舌状虫属 (*Armillifer*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳亚门 (Crustacea), 颚足纲 (Maxillopoda), 舌形虫亚纲 (Pentastomida), 孔头舌虫目 (Porocephalida), 孔头舌虫科 (Porocephalidae) [1-4]。舌形虫病 (pentastomiasis) 是人兽共患寄生虫病。99%以上的人舌形虫病是由腕带蛇舌状虫 (*Armillifer armillatus*) 与锯齿舌形虫 (*Linguatula serrata*) 的若虫引起的, 以前者为主。在我国共报道 4 个致病种, 分别为锯齿舌形虫、串珠蛇舌状虫 (*A. moniliformis*)、尖吻蝮蛇舌状虫 (*A. agkistrodontis*) 和台湾孔头舌虫 (*Porocephalus taiwana*) [5]。由于我国饮食习惯非常多样化, 舌形虫病作为新发的食源性寄生虫病近年来屡有报道[6], 快速准确诊断该病已成为亟待解决的问题。但在以往的病例报道和致病种鉴定中, 可能出现错误诊断和错误鉴定的情况 [7-10]。本文以食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 中发现的大量舌形虫若虫为研究对象, 利用扫描电镜观察其体表超微结构, 以鉴定该若虫的虫种; 并以 PCR 扩增其 18S rRNA 基因, 通过与孔头舌虫目下的尖吻蝮蛇舌状虫 (FJ607339)、腕带蛇舌状虫 (HM756289)、响尾蛇孔头舌虫 (*Porocephalus crotali*, EF583871 和 M29931)、锯齿舌形虫 (FJ528908) 和赖利舌虫 (*Raillietiella* sp., BMR2008 和 EU370434) 等的 18S rRNA 基因序列进行比较, 探讨其在孔头舌虫目内部的分子种系发育关系。

材料与方法

1 材料

1.1 虫体来源 2009 年 12 月~2010 年 8 月, 剖检广西壮族自治区南宁市某野生动物养殖场死亡的成年食蟹猴 3 只, 检获大量的舌形虫, 保存于 70%乙醇中, 备用。

1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂、DNA 标志物 (DL 2000) 和 pMD18-T 载体均购自宝生物 (大连) 工程有限公司, DNA 提取试剂盒 (DNeasy Blood & Tissue kit) 购自德国 Qiagen 公司, 胶回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 人工胃蛋白酶购自美国 Sigma 公司。

2 方法

2.1 扫描电镜观察 取 2 条虫体, 用 0.1 mol/L pH 7.4 的 NaH_2PO_4 缓冲液清洗 3 次, 每次 15 min, 置于浓度为 2.5% 的戊二醛溶液中固定 3 h 后, 用 NaH_2PO_4 再清洗 3 次, 每次 15 min; 置于浓度为 1% 的锇酸溶液中固定 1.5 h 后, 用 NaH_2PO_4 再清洗 3 次, 每次 15 min; 将虫体经乙醇梯度脱水后进行临界点干燥, 喷金后置扫描电镜下观察。

2.2 PCR 扩增与测序 取单条虫体, 按照 DNA 提取试剂盒使用说明书提取虫体基因组 DNA, 置 -20 °C 保存备用。参照文献[10]设计引物, 上游引物为 18S rRNA-F: 5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG- 3', 下游引物为 18S rRNA-R: 5'- GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC- 3', 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 2.5 μl , MgCl_2 (25 mmol/L) 2.5 μl , 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP, 2.5 mmol/L) 2.5 μl , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μl , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μl) 0.2 μl , DNA 模板 2.5 μl , 加双蒸水至 25 μl 。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 7 min。18S rRNA 扩增片段经 pMD18-T 载体克隆后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

2.3 序列分析

测序结果一并与 GenBank 中获得的以下物种的 18S rRNA 基因序列: 尖吻蝮蛇舌状虫 (FJ607339)、

腕带蛇舌状虫 (HM756289)、响尾蛇孔头舌虫 (EF583871、M29931)、锯齿舌形虫 (FJ528908)、赖利舌虫 (EU370434)、秃鹰希斯潘尼亚头走舌虫 (AY304520); 使用昆虫纲 (Insecta) 的衣鱼 (*Thermobia* sp., AY338726) 和蜘蛛蟹纲 (Malacostrata) 的棒眼糠虾 (*Rhopalophthalmus* sp., AM422488) 作为外类群。运用 ClustalX 1.83 进行多重序列比对后, 利用 MEGA 4.0 使用邻位相连法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建 50% 多数一致树, 自展值 (Bootstrap values) 重复 1 000 次。

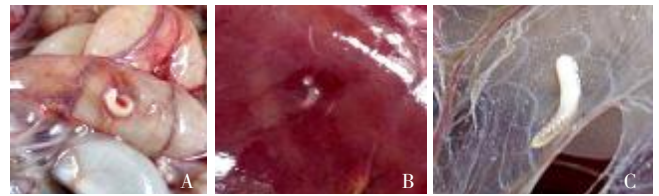
结 果

1 虫体形态观察

剖检的 3 只死亡食蟹猴, 其中 2 只猴在腹腔大网膜上发现有舌形虫的若虫, 形成“C”形半透明包裹和钙化包裹 (图 1A); 1 只猴在肝脏内有若虫寄生 (图 1B)。成活时的若虫长约为 1.6 cm, 呈圆柱状蠕虫样, 头端钝圆略粗, 呈略透明的淡黄色 (图 1C)。检获的虫体用生理盐水反复清洗后, 置 70% 乙醇中 4 °C 保存。

2 扫描电镜观察

扫描电镜示, 若虫呈圆柱状, 前段略粗, 末端变细, 呈纺锤形。头部腹面正中为口, 呈圆形 (图 2A、B), 其口径为 0.15~0.19 mm, 口稍上方两侧各见一对钩, 钩与口几乎在同一平行线上, 基部宽 0.07~0.09 mm, 弧直径 0.11~0.14 mm (图 2C、D)。两外

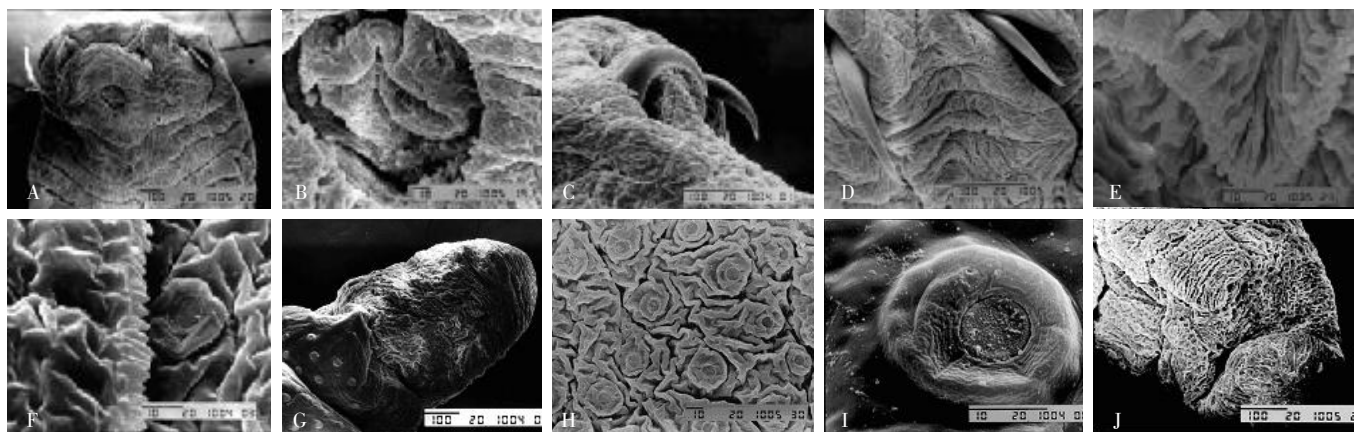


A: 若虫形成典型的 C 型包裹; B: 若虫寄生于肝脏; C: 大网膜上的若虫。

A: Typical encapsulated shaped nymphal stage; B: Nymph in liver; C: Nymph on the omentum.

图 1 食蟹猴腹腔内寄生的蛇舌状虫若虫
Fig. 1 Nymph parasitized in *Macaca fascicularis*

侧钩的正下方, 头胸部最后一节胸环上各有一个对称的大型感觉乳突, 约 0.07 mm×0.05 mm, 紧接其第一节腹环靠中线处有一对对称的大型感觉乳突, 约 0.06 mm×0.05 mm (图 2A), 腹环数目由此算起共 29 个腹环 (末端有 2 个腹面未连接的不完整腹环不计算在内)。前段腹环上下距离逐渐增宽, 至 12~13 腹环时趋于等宽, 约 0.38 mm, 腹环之间, 在前半段连接紧密, 在后半段有一定间隔。各腹环在若虫腹面正中处内褶, 在其后缘能见到“锯齿样”结构 (图 2E、F)。若虫全身布满近圆形的感觉乳突, 但在头部背面与末节腹面未见有类似的乳突 (图 2G、H、I)。在头胸部、腹环上和尾端背面分布的感觉乳突, 约为 (0.015~0.025) mm×(0.015~0.020) mm, 平均每 100 μm² 约有 407 个, 最后一节腹环和末端的两个不完整腹环上的感觉乳突明显增大, 约为 (0.040~0.047) mm×(0.027~0.040) mm, 平均每 100 μm² 约有 119 个乳突。末端



A: 若虫头胸部, 腹面 (×100); B: 若虫口 (×750); C: 若虫钩 (×350); D: 若虫钩, 腹面 (×350); E: 腹环于腹面中线内折呈“V”型 (×2 000); F: 腹环后缘“锯齿样”结构 (×2 000); G: 若虫末端 (×150); H: 腹环上的感觉乳突 (×150); I: 不完整腹环上的感觉乳突 (×3 500); J: 若虫末端肛门开口 (×500)。

A: Cephalothorax of nymph, ventral view (×100); B: Mouth of nymph (×750); C: Hooks of nymph (×350); D: Hooks of nymph, ventral view (×350); E: Abdominal annuli inflexed V-shape in the ventral middle line (×2 000); F: Posterior edge of abdominal annuli showing saw-like structure (×2 000); G: Terminal segment of nymph (×150); H: Sensory papillae on the abdominal annuli (×150); I: Sensory papillae on the incomplete annulus (×3 500); J: Anus opening at the ventral terminal segment of nymph (×500) .

图 2 蛇舌状虫若虫扫描电镜图

Fig. 2 Nymphal *Armillifer* sp. by scanning electron microscopy

腹面一块状隆起上可见肛门开口，肛门直径约为 0.24 mm (图 2J)。体表的超微结构特征，在口与钩的相对位置、腹环数和乳突的分布特点与澳大利亚蛇舌状虫 (*A. australis*) 及串珠蛇舌状虫成虫 [7] 相似，但在末端的不完整腹环数上更接近于澳大利亚蛇舌状虫成虫形态。查阅相关资料未见有对这两种蛇舌状虫属的若虫的形态作详细描述，故无法进行比较。裘明华等 [4] 认为舌形虫的地域分布也是定种的依据，由于食蟹猴的自然栖息地为东南亚，故暂将该若虫定为串珠蛇舌状虫的若虫 (图 3)。

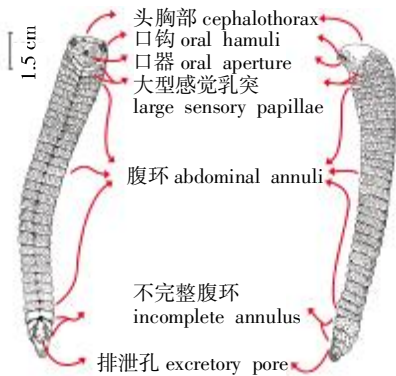
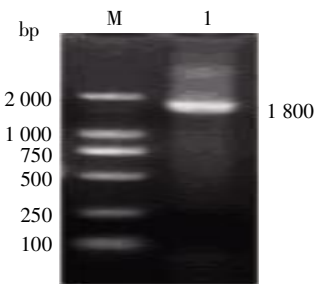


图 3 蛇舌状虫属若虫体表示意图
Fig. 3 Schematic representation of a nymph showing different structures on the body surface

3 18S rRNA 部分基因扩增测序结果

PCR 扩增蛇舌状虫 18S rRNA 基因，产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析，出现一条约 1 800 bp 片段，与预期目的片段一致 (图 4)。

测序结果经 Lasergene 6 (SeqMan) 进行人工校正，得到 1 836 bp 片段，提交 GenBank 获得登录号为 HM048870，进行多重比对后经 NJ 法构建的 50% 多数一致树显示，舌形虫亚纲独立于昆虫纲、蜘蛛蟹纲形成的一个大型拓扑结构分支，该若虫与尖吻蝮蛇舌状虫和腕带蛇舌状虫构成自展值为 95% 的分支，前两者又构成一个独立的自展值为 75% 的分支 (图 5)。



M: DNA 标志物; 1: 串珠蛇舌状虫扩增产物。
M: DNA marker; 1: PCR product of *A. moniliformis*.

图 4 串珠蛇舌状虫 18S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Fig. 4 Analysis of PCR amplified 18S rRNA from *A. moniliformis*

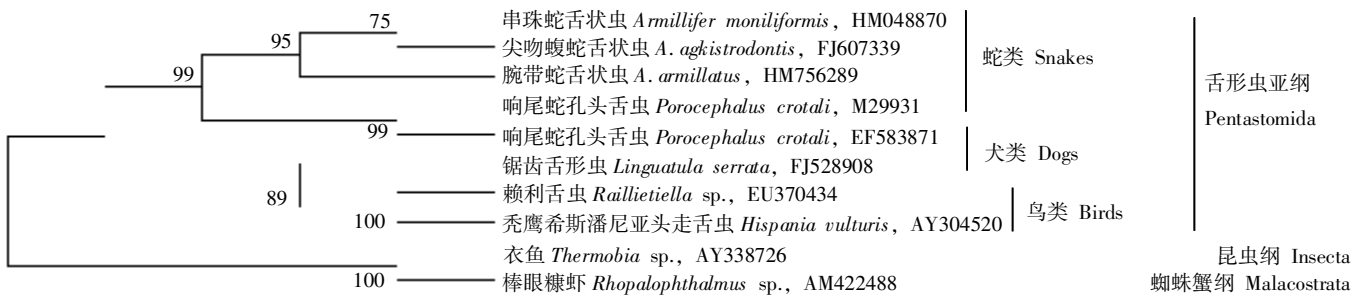


图 5 基于 18S rRNA 基因序列以邻位相连法所构建的 50% 多数一致树

Fig. 5 A bootstrap 50% cut-off consensus tree inferred from 18S rRNA gene given in text using the Neighbor-Joining method

讨 论

Heymons [3] 曾依据串珠蛇舌状虫雌虫的长度，将其划分出 3 个亚种，分别为串珠蛇舌状虫串珠亚种 (*A. moniliformis moniliformis*)，串珠蛇舌状虫黑默尼斯亚种 (*A. moniliformis heymonisi*)，串珠蛇舌状虫澳大利亚亚种 (*A. moniliformis australis*)。Riley 等 [11] 认为对于蛇舌状虫属成虫的鉴定必须依据其钩的维度 (hook dimensions)、腹环数和尾部末节的形状，依据此重新修正该属，分别为分布于非洲的腕带蛇舌状虫

和大蛇舌状虫 (*A. grandis*)，分布于东南亚的串珠蛇舌状虫，分布于中国台湾的尖吻蝮蛇舌状虫，分布于澳大利亚的澳大利亚蛇舌状虫、马扎伊蛇舌状虫 (*A. mazzai*) 和树栖蛇舌状虫 (*A. arborealis*) 等 7 个种。由于蛇舌状虫若虫阶段一些形态并未得到充分发育，舌形虫成虫定种时重要的衡量指标 (即钩的维度) 无法在若虫上进行测量，使得该属下各相似种若虫的鉴定存在困难。Krishnasamy 等 [12] 将马来西亚食蟹猴中分离到的若虫鉴定为串珠蛇舌状虫。Shiori 等 [13] 报道中国出口的食蟹猴有大量串珠蛇舌状虫若虫感染。

Pan 等^[14] 运用组织切片方法确定致病种为串珠蛇舌状虫若虫。以上的研究中若虫定种主要依据均是根据其地域分布这一特点, 并未见体表结构细节特征描述与对比。本研究从食蟹猴分离到的若虫, 依照地域分布依据将暂定为串珠蛇舌状虫若虫, 并对其体表的超微结构进行详细描述, 为今后的虫种鉴定和生活史等研究提供基础资料。

Shiori 等^[13] 曾对其鉴定为串珠蛇舌状虫若虫进行了扫描电镜观察, 但描述不够详细。本研究通过扫描电镜观察该若虫的体表特征, 与张永年等^[15] 报道的尖吻蝮蛇舌形虫若虫相比较, 有明显的不同点: ①前者钩在口的上方两侧, 而后者钩与口几近平行排布; ②前者的腹环数为 29 个, 以及末端的 2 个不完整腹环, 远多于后者的 7 个完整腹环; ③两种若虫在虫体表面都分布有小型感觉乳突, 但前者并非整体都有分布, 大小与密度在不同部位也有一定差异, 而且分布有类似串珠蛇舌状虫成虫的大型乳突。该若虫较 Banaja^[16] 报道的锯齿舌形虫若虫存在显著的差异, 值得一提的是, 该若虫腹环后缘形成的“锯齿样”结构与锯齿舌形虫若虫腹环后缘的单行细刺是不一样的。

分子标记已被运用于研究舌形虫亚纲在甲壳亚门的分子分类学地位^[17,18], 18S rRNA 基因一直被认为是研究寄生虫属间水平分子种系进化关系的分子标记, 在蛇舌状虫属中已经成功运用于尖吻蝮蛇舌状虫^[10]与腕带蛇舌状虫^[19]的种系发育进化分析中。Tappe 等^[19] 基于腕带蛇舌状虫的 18S rRNA 基因序列构建种系发育树时, 发现其拓扑结构暗示舌形虫与其宿主存在协同进化 (coevolution), 本研究的种系发育树结果支持这一观点, 而且该若虫与同处于亚洲分布的尖吻蝮蛇舌状虫两个种独立于非洲分布的腕带蛇舌状虫能形成一个自展值为 75% 的拓扑分支, 该结果一定程度上印证了之前依据地域分布鉴定虫种的合理性。而之前被错误鉴定的锯齿舌形虫^[6]、响尾蛇孔头舌虫^[9]在本次种系发育分析结果中与串珠蛇舌状虫分处于各自分支, 这为今后串珠蛇舌状虫若虫所致的人类舌形虫病提供了建立分子诊断的可能。

参 考 文 献

- [1] Martin JW, Davis GE. An Updated Classification of the Recent Crustacea. Science Series, 39 [M]. Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County, 2001: VII.
- [2] Self JT. Biological relationships of the Pentastomida; a bibliography on the Pentastomida [J]. Exp Parasitol, 1969, 24 (1): 63-119.
- [3] Heymons R. Ein Beitrag zur Kenntnis der pentastomiden australiens und benachbarter gebiete [J]. Parasitol Res, 1932, 4 (3): 409-430. (In Deutsch)
- [4] Qiu MH, Dong DJ. Pentastomids and pentastomiasis [J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 1998, 5(2): 117-124. (in Chinese) (裘明华, 董旦君. 舌形虫和舌形虫病 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, 5(2): 117-124.)
- [5] Yao MH, Wu F, Tang LF. Human pentastomiasis in China: case report and literature review [J]. J Parasitol, 2008, 94(6): 1295-1298.
- [6] Qiu MH, Chen ML. Misidentification of pentastomida parasite in a case of human pentastomiasis in China [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1999, 17(3): 188. (in Chinese) (裘明华, 陈茂梁. 中国一例人体舌形虫病虫种的错误鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(3): 188.)
- [7] Qiu MH, Jiang YY. Advances in studies of human pentastomiasis [J]. Int J Med Parasit Dis, 2006, 33(6): 281-287. (in Chinese) (裘明华, 蒋玉燕. 人舌形虫病的研究进展 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(6): 281-287.)
- [8] Qiu MH, Ma GJ, Fan PC, et al. Discovery of a new species of the pentastomid genus *Porocephalus* (Humboldt, 1811) from Taiwan, China and its pathogenic features [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(2): 69-72. (in Chinese) (裘明华, 马国钧, 范秉真, 等. 中国台湾孔头舌虫新种的发现及其致病特征 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(2): 69-72.)
- [9] Rêgo AA. Pentastomiasis in rodents of Bahia, identification of *Porocephalus* larvae [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1984, 79 (3): 393-394. (In Portuguese)
- [10] Chen SH, Liu Q, Zhang YN, et al. Multi-host model-based identification of *Armillifer agkistrodontis* (Pentastomida), a New zoonotic parasite from China [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4 (4): e647.
- [11] Riley J, Self JT. Some observations on the taxonomy and systematics of the pentastomid genus *Armillifer* (Sambon, 1922) in South East Asian and Australian snakes [J]. Syst Parasitol, 1981, 2(3): 171-179.
- [12] Krishnasamy M, Singh I, de Witt GF, et al. The natural infection of wild animals in West Malaysia with nymphs of *Armillifer moniliformis* (Diesing, 1835) Sambon, 1922 [J]. Malays J Pathol, 1981, 4: 29-34.
- [13] Shiori A, Hiroshi S, Hiroshi U. Pentastomiasis in Chinese crab-eating monkey [J]. J Exp Ani Tec, 2003, 38(2): 63-65. (in Japanese)
- [14] Pan CM, Tang HF, Qiu MH. Heavy infection with *Armillifer moniliformis*: a case report [J]. Chin Med J, 2005, 118(3): 262-264
- [15] Zhang YN, Chang ZS, Chen SH, et al. Ultrastructural observations on nymphal *Armillifer agkistrodontis* [J]. Int J Med Parasit Dis, 2008, 35(3): 128-131. (in Chinese) (张永年, 常正山, 陈韶红, 等. 尖吻蝮蛇舌状虫若虫超微结构观察 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2008, 35(3): 128-131.)
- [16] Banaja AA. Scanning electron microscopy examination of larval *Linguatula serrata* Frölich (Linguatulidae: Pentastomida) [J]. Z Parasitenkd, 1983, 69(2): 271-277.
- [17] Lavrov VD, Brown WM, Boore JL. Phylogenetic position of the pentastomida and (pan) crustacean relationships [J]. Proc Biol Sci, 2004, 271(1538): 537-544.
- [18] Abele LG, Kim W, Felgenhauer BE. Molecular evidence for inclusion of the phylum Pentastomida in the Crustacea [J]. Mol Biol Evol, 1989, 6(6): 685-691.
- [19] Tappe D, Meyer M, Oesterlein A, et al. Transmission of *Armillifer armillatus* ova at snake farm, The Gambia, West Africa [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(2): 251-254.

(收稿日期: 2011-08-29 编辑: 衣凤芸)