

辽宁省猪源弓形虫虫株分离与鉴定

杨娜^{1,2} 邢蒙恩² 王大为² 吴元华¹

1.沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110866; 2.沈阳农业大学畜牧兽医学院,沈阳 110866

摘要 以采自辽宁省某屠宰场 2 063 头猪的血清和心脏组织为试验材料,采用改良凝集试验(MAT)对血清进行定量检测和弓形虫虫株分离,结果显示:2 063 份猪血清中阳性血清(滴度 ≥ 25)共计 233 份,阳性检出率为 11.3%;选取阳性抗体滴度 ≥ 100 所对应的 67 份猪心脏组织进行弓形虫虫株分离,结果从猪心脏组织中共分离出 23 株弓形虫虫体,分离率为 34.3%。此结果提示,辽宁地区猪弓形虫感染率较高,对该地区人们的健康存在潜在威胁。

关键词 弓形虫; 猪; 虫株分离; MAT; PCR

中图分类号 S 855.9⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0084-05

弓形虫是一种专性胞内寄生原虫,宿主类型众多,能够感染所有温血的脊椎动物,包括人、哺乳动物和鸟类;猫和其他猫科动物为其终末宿主。由其引起的疾病称弓形虫病或弓形体病,是一种世界性的人兽共患寄生虫病,世界约有 1/3 人群感染,我国人群感染达 8%^[1-3]。中间宿主的感染主要是由于食用被猫粪便中卵囊污染的食物或饮水,或食用含弓形虫包囊的生肉或未煮熟的肉类等^[4],弓形虫是一种机会性致病原虫,孕妇感染可致流产、早产、死胎或畸胎甚至死亡,免疫功能低下或免疫缺陷者感染弓形虫是导致死亡的一个主要原因^[5-6]。另有资料显示,有 1%~10% 精神病患者与弓形虫感染有关,可能是精神分裂症的致病因素之一^[7-9]。该病不仅给人类健康带来巨大威胁,也给畜牧业造成严重危害和重大经济损失,其产生的危害已不容忽视^[10]。更为重要的是,动物弓形虫病的流行与传播导致了人类弓形虫病的流行与高发^[11]。改良凝集试验具有更高的特异性和敏感性,在流行病学调查中使用较为广泛,被认为是弓形虫血清学检测的金标准。因此,我们采用改良凝集试验(MAT)对采集的辽宁省某屠宰场的猪血清样品进行检测,并进行虫株分离与鉴定,以期对动物弓形虫病的防控提供一定的理论依据,同时也对降低人类感染弓形虫病的风险具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

猪血清和心脏肌肉组织分批次采自辽宁省某屠宰场,共采集样品 2 063 份。

试验动物为 6~7 周龄(SPF 级)雌性昆明小鼠,购自辽宁长生生物技术有限公司。

1.2 改良凝集试验(MAT)

1)定性检测。将待检血清做 1:20 稀释;用 8 联排 100 μL 移液器吸取血清稀释液于 96 孔 U 型板的孔中,每孔 38 μL ,再分别吸取待检血清 2 μL 加入每孔中,充分混匀。并设置阴性血清和阳性血清对照孔;吸取抗原稀释液 2 312 μL 、 β -巯基乙醇 32.2 μL 、台盼蓝 46 μL 、抗原液 92 μL ,充分混匀后加入 96 孔板中,每孔 25 μL ,再加入等体积稀释好的血清于对应孔中,轻轻吹打混匀,且尽量避免出现气泡,封口膜封好后,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,次日显微镜下观察结果。若 U 形孔底部有沉积现象,则该血清为阴性血清;若底部没有沉积现象出现,且沉淀均匀弥散附着在 U 形孔的孔壁,则为阳性^[12]。

2)定量检测。将定性检测阳性血清做倍比稀释;在第 1 孔内加入血清稀释液 96 μL ,第 2~8 孔分别加入血清稀释液 50 μL ,准确吸取血清样品 4 μL 于第 1 孔血清稀释液中,充分混匀后吸出 50 μL 加入第 2 孔并充分混匀,再从第 2 孔吸出 50 μL

收稿日期:2016-06-15

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31201894);中国博士后科学基金面上项目(2014M561252)

杨娜,博士,讲师.研究方向:弓形虫病. E-mail: dayangna@163.com

通信作者:吴元华,博士,教授.研究方向:植物病毒学和生物农药. E-mail: wuyh7799@163.com

加入第3孔,依次填加,则各孔抗体滴度为(1:25)~(1:3200);吸取抗原稀释液2312 μL 、 β -巯基乙醇32.2 μL 、台盼蓝46 μL 、抗原液92 μL 充分混匀后加入96孔板中,每孔25 μL ,再加入等体积稀释好的血清于对应孔中,用移液器轻轻吹打数次,尽量使液体混匀且避免出现气泡影响结果观察。最后,封口膜封好,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜;显微镜下观察结果,可以根据血清稀释度得出血清中弓形虫阳性抗体滴度,阳性血清对应组织将进行进一步实验^[13]。

1.3 虫株的分离

1)样品的处理。将MAT检测结果为阳性且阳性滴度 ≥ 100 的猪心脏肌肉组织上的结缔组织尽量剔除,取约5g猪心脏肌肉用剪刀剪成1~2cm的小块,加入25mL灭菌的PBS,用组织均浆器搅碎,并用25mL灭菌的PBS清洗均浆器的杯壁,一起倒入125mL广口瓶中(室温下可以放置1~3h)。

2)悬液的制备。将研磨好的组织于37 $^{\circ}\text{C}$ 预热10min,再加入50mL37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的胃蛋白酶消化液,置于摇床内37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min消化45min后将消化的组织经177 μm 滤网或尼龙布(2~3层纱布即可)过滤于250mL离心杯中,除掉未绞碎的大的组织块,常温条件下,2500 r/min离心10min。弃去上清液,加入约20mL PBS(pH 7.2)悬浮沉淀,加入适量中性红作为酸碱指示剂,再加入4~6mL(视组织酸碱大小所定)现配的1.2%碳酸氢钠溶液(pH 8.3,过滤除菌)中和其中的酸,充分混匀后,至指示剂由红色变为黄色为止,2500 r/min离心10min。弃去上清液,加入约50mL PBS,2500 r/min离心10min,用PBS洗涤2~3遍(悬液基本无指示剂的颜色)。弃去上清液,加入5mL无菌PBS溶液制成悬浊液,再加入双抗约100 μL (按每毫升1000U青霉素和100 μg 链霉素)^[14]。

3)小鼠接种。将上述制备好的组织悬液腹腔接种6~7周龄雌性昆明小鼠,每只猪的心脏肌肉组织消化后接种5只小鼠(其中3只小鼠提前3d饮水按照1g/L的剂量加入地塞米松,2只给予正常饮水),每只接种1mL,提前3d饲喂地塞米松的3只小鼠腹腔接种,正常饮水的2只小鼠皮下接种,皮下接种可在接种后的2个月进行传代,保证实验可重复性。

1.4 虫株的鉴定

1)样品的消化。取弓形虫感染的小鼠腹腔冲洗液1mL,置1.5mL灭菌离心管中,4000 r/min离

心10min,弃去上清液,再加入300 μL 消化液,用1000 μL 移液器反复吹打,以便促进细胞裂解。再加入20mg/mL蛋白酶K1.5 μL ,至终质量浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,颠倒混匀,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化3h。

2)DNA的提取。取充分消化后的组织悬液1000 μL 于2mL离心管中。加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,颠倒混匀,静置10min,分层后,12000 r/min离心10min(若振荡后上层呈乳白色浑浊可在12000 r/min离心15min左右以分出蛋白质),取上清800 μL 至1个2mL新离心管中。然后加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,颠倒混匀,静置10min,分层后,12000 r/min离心10min(若振荡后上层呈乳白色浑浊可在12000 r/min离心15min左右以分出蛋白质),取上清700 μL 至1个2mL新离心管中。再次加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,颠倒混匀,静置10min,待分层后12000 r/min离心10min(若振荡后上层呈乳白色浑浊可在12000 r/min离心15min左右以分出蛋白质),取上清500 μL 至1个1.5mL新离心管中,加1/10体积的3mol/L NaAc及2倍体积无水乙醇(预冷)温和颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置30min以沉淀DNA。最后10000 r/min离心10min,弃上清,加入75%乙醇7500 r/min离心10min漂洗DNA沉淀,重复漂洗,倒掉离心管内上清液,晾干后加入ddH₂O溶解DNA,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3)PCR扩增。根据弓形虫特异基因序列(AF146527.1)进行引物设计。(F1:GCGAATTCATGTCAGATCCCCCTCT; R1:GCGGATCTCAGCAGGCGACACAAGCT; F2:CGACAGCCGCGTTCATTCTC; R2:GCAACCAGTCAGCGTCGTCC),采用巢氏PCR对分离的弓形虫虫株基因进行检测,产物长度为522bp。反应体系为13 μL :2 \times EasyTaq PCR SuperMix 6.5 μL , ddH₂O 3.5 μL ,模板2 μL ,上下游引物各0.5 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30s共30个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10min。

2 结果与分析

2.1 猪血清弓形虫抗体检测结果

从采集的2063份猪血清样品中,经MAT检测后共检出不同滴度的阳性血清233份,阳性检出

率为 11.24%，具体检测结果见表 1。

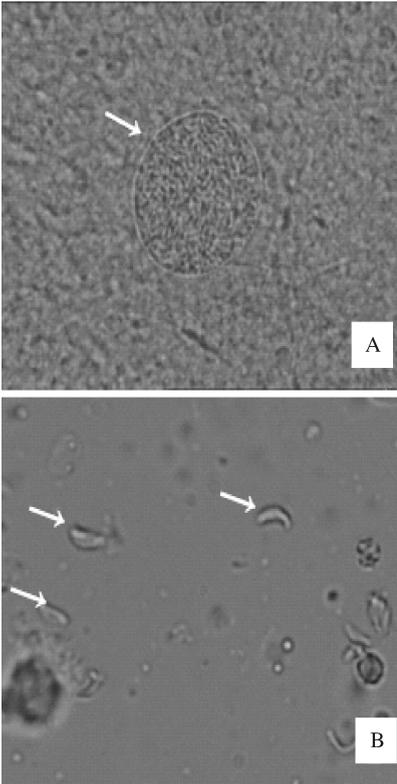
表 1 猪血清弓形虫抗体检测结果

Table 1 The result of swine serum antibody

抗体滴度 Antibody titer	阳性数 No. of positive pigs	检出率/% No. of <i>T. gondii</i> isolates
1 : 25	108	5.2
1 : 50	58	2.8
1 : 100	24	1.2
1 : 200	6	0.3
1 : 400	13	0.6
1 : 800	17	0.8
1 : 1 600	6	0.3
1 : 3 200	1	0.04
合计 Total	233	11.24

2.2 虫株分离结果

67 份阳性滴度 ≥ 100 的血清对应的猪心脏肌肉组织接种的 67 组昆明小鼠(5 只/组)中共分离出 23 株虫株(表 2),有 7 组在接种后的 7~14 d 内均出现不同程度的被毛松竖、不活泼、弓背、闭目、腹部膨大、颤动或呼吸急促等症状,并在小鼠的腹腔冲洗液中镜检到大量新月形的速殖子,其中 1 只小鼠脑组织中发现包囊(图 1A);有 6 组和 10 组分别在盲传 2 代和盲传 3 代后也得到了大量的速殖子(图 1B);



A.包囊 Cyst; B.速殖子 Tachyzoite.

图 1 包囊与速殖子

Fig.1 Cyst and tachyzoite

表 2 分离虫株的抗体滴度及盲传代数

Table 2 The MAT titers and blind passage of isolated *T. gondii*

编号 No.	MAT 抗体滴度 MAT titers	盲传代数 Blind passage
1	1 : 800	3
2	1 : 800	2
3	1 : 800	3
4	1 : 400	2
5	1 : 400	3
6	1 : 800	2
7	1 : 400	3
8	1 : 800	3
9	1 : 400	2
10	1 : 800	0
11	1 : 800	0
12	1 : 800	0
13	1 : 800	0
14	1 : 800	2
15	1 : 1 600	3
16	1 : 800	3
17	1 : 800	3
18	1 : 400	3
19	1 : 400	2
20	1 : 800	3
21	1 : 800	0
22	1 : 400	0
23	1 : 400	0

其他 44 组小鼠连续盲传 3 代后没有发现弓形虫感染,于是停止盲传。

2.3 分离虫株鉴定结果

将分离的 23 株虫株经 PCR 扩增结果(图 2)如下:分离得到的虫株均在 522 bp 处出现特异性扩增条带,说明所接种的猪肉样品中存在弓形虫感染的情况。

3 讨 论

3.1 试验方法的选择

目前,弓形虫虫体分离的报道日渐增多,但是大部分集中于猫科动物,而猪源弓形虫虫体的分离并不多见,此外猪肉是广大人民群众接触和使用最多的肉产品之一,因此,本研究选取猪作为弓形虫虫体分离的来源。本研究采用盐酸-胃蛋白酶消化法分离弓形虫,与直接研磨组织接种法相比,该方法对分离弓形虫的效果更佳,因为盐酸-胃蛋白酶消化组织后能够除去大量的组织细胞,还能使弓形虫的包囊壁溶解释放出缓殖子,使虫体浓缩,加大了小鼠感

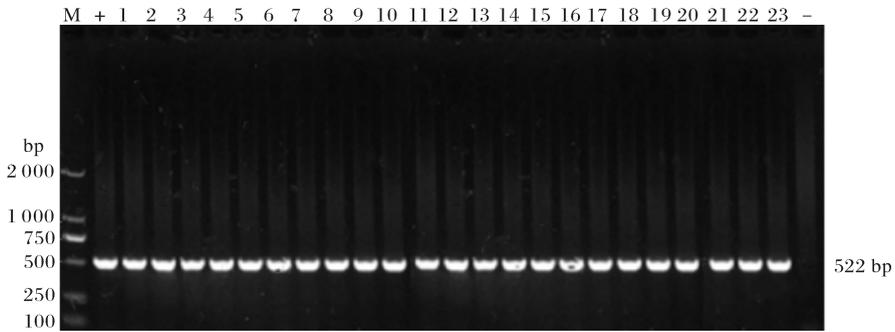


图 2 分离株 PCR 鉴定结果

Fig.2 The PCR result of isolated *T. gondii*

染的可能性。本研究采用的是腹腔和皮下同时接种的方法,既有可能在 6~9 d 内获得虫体,大大缩短获得虫体的时间,同时皮下接种又保证实验的可重复性。但腹腔接种要求比较严格,接种的组织必须无菌,避免接种后因感染引起小鼠非特异性死亡。

本研究中采用的 PCR 技术是巢氏 PCR 技术,巢氏 PCR 比普通 PCR 更加敏感^[15]。2003 年,陈俏梅^[16]分别用普通 PCR 和巢氏 PCR 检测自然状态下的豚鼠弓形虫感染情况,结果表明巢氏 PCR 比普通 PCR 敏感 100 倍,可以检测到 0.01 pg 弓形虫 DNA 含量^[16]。另外,本研究借鉴了骆红梅等^[17]的关于弓形虫基因鉴定的特异性基因片段,结果显示扩增该基因的引物亦具有较高的特异性和敏感性等,并且敏感性比 B1 基因的更高^[18-19],B1 基因由 Burg 等^[20]首次鉴定,其在基因组中有 35 个拷贝,应用 PCR 扩增 B1 基因发现,扩增该基因的引物具有较高特异性和敏感性^[21-22]。

本研究通过 PCR 扩增弓形虫特异性的 522 bp 序列,对弓形虫基因进行检测和鉴定,显示了扩增该基因的引物具有较好的特异性。

3.2 影响虫体分离的因素

本研究分离到的弓形虫只有 1 株在小鼠脑内形成了包囊,且数量少,可能是因为虫体还没有完全适应小鼠体内的生长,也可能是该分离株和小鼠自身的身体状况有关。另外,分离出弓形虫虫体的 23 组猪肉样品所对应的血清检测阳性滴度 ≥ 400 。虽然也存在一定的技术原因,可能存在一定的误差,但是这种结果在一定程度上可以说明血清检测阳性滴度越高,分离出弓形虫虫体的可能性就越大,可为以后弓形虫虫体的分离提供一定的指导意义。

本研究中采用接种前 3 d 饲喂接种小白鼠混有地塞米松的水(1 g/L),主要是为了破坏小白鼠的免

疫系统,增加小鼠感染弓形虫的机率;同时,本研究选用雌鼠主要是因为雌鼠的免疫力相对雄鼠低,而且雄鼠之间易争斗,以尽可能减少同组小鼠间容易发生撕咬等情况造成小鼠死亡,而影响弓形虫虫株分离。

参 考 文 献

- [1] 张居作,陈汉忠,徐君飞.我国弓形虫的感染现状[J].动物医学进展,2008,29(7):101-104.
- [2] DUBEY J P. Toxoplasmosis of animals and humans[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2010: 313.
- [3] ZHOU P, CHEN Z G, LI H L, et al. *Toxoplasma gondii* infection in humans in China[J]. Parasit vectors, 2011, 4: 165-173.
- [4] DUBEY J P, DESMONTS G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts[J]. Equine Vet J, 1987, 19(4): 337-339.
- [5] ZHOU D H, ZHAO F R, HUANG S Y, et al. Changes in the proteomic profiles of mouse brain after infection with cyst-forming *Toxoplasma gondii* [J]. Parasit vectors, 2013, 6: 96-109.
- [6] WANG L, CHENG H W, HUANG K Q, et al. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity[J]. Parasit vectors, 2013, 6: 273-278.
- [7] QIN S Y, CONG W, LIU Y, et al. Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in bats in four provinces of China[J]. Parasit vectors, 2014, 7: 558-562.
- [8] WANG L, HE L Y, MENG D D, et al. Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in cancer patients in Anhui Province, Eastern China[J]. Parasite vectors, 2015, 8: 162-168.
- [9] JAROSLAV F. How and why *Toxoplasma* makes us crazy[J]. Trends parasitol, 2013, 29(4): 156-163.
- [10] 刘建枝,陈裕祥,夏晨阳,等.弓形虫病危害性及其诊断与防治研究进展[J].西藏科技,2010(11):52-55.
- [11] 李祥瑞.弓形虫病的流行的新趋势[J].动物医学进展,2010,31

- (S):234-236.
- [12] 王贝贝,刘帅,崔丽丽,等.改良凝集试验(MAT)检测动物弓形虫血清抗体[J].中国兽医杂志,2012,48(6):25-27.
- [13] 王凤阳.弓形虫改良凝集试验的建立及我国部分地区犬、鸡弓形虫病流行病学调查[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [14] 江海海,邓舜洲,高洋根,等.猪源弓形虫的分离鉴定及基因型的研究[J].中国兽医科学,2014(5):453-457.
- [15] 糜祖煌,秦玲.弓形虫 B1 基因套式 PCR 检测技术研究[J].中国人兽共患病杂志,1999,5(2):63-64.
- [16] 陈俏梅.检测实验动物弓形虫感染的两种 PCR 方法的建立和比较[J].中国兽医寄生虫病,2003,11(2):6-8.
- [17] 骆红梅,楼兰花.应用巢氏-PCR 杂交技术检出人血样及动物排泄物中弓形虫 DNA[J].中国兽医杂志,2003,39(1):12-14.
- [18] EDVINSSON B, LAPPALAINEN M, EVENGARD B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis[J].Clin Microbiol Infect,2006,12:131-136.
- [19] RICHOMME C, AUBERT D, GILOT-FROMONT E, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France[J].Vet parasitol,2009,164(2/3/4):296-300.
- [20] BURG J L, GROVER C M, POULETTY P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction[J].J Clin Microbiol,1989,27:1787-1792.
- [21] CONTINI C, CULTRERA R, SERACENI S, et al. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS[J].J Med Microbiol,2002,51:879-890.
- [22] LEE P Y, MANGAN J, HOLLIMAN R E, et al. Quantitation of *Toxoplasma gondii* DNA in a competitive nested polymerase chain reaction[J].J Clin Pathol,1999,52:61-64.

Isolation and identification of *Toxoplasma gondii* strains from pigs in Liaoning Province

YANG Na^{1,2} XING Meng'en² WANG Dawei² WU Yuanhua¹

1. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract Serum from 2 063 pigs from a slaughterhouse in Liaoning Province were collected and detected by modified agglutination test (MAT). The results showed that the samples with titer ≥ 25 were 233 and the positive rate was 11.3%. A total of 67 pigs with titer ≥ 100 were chosen for *Toxoplasma gondii* isolation, in which 23 *T. gondii* strains were isolated from the heart tissues with an isolation rate of 34.3%. In this study, *T. gondii* strains were isolated successfully, showing the infectious status of pig toxoplasmosis in Liaoning Province, which poses a huge potential threat to public health.

Keywords *Toxoplasma gondii*; pigs; isolation; modified agglutination test (MAT); polymerase chain reaction (PCR)

(责任编辑:边书京)