



不同来源树鼩的弓形虫感染调查

仝品芬, 王文广, 匡德宣, 张媛, 孙晓梅, 代解杰

(中国协和医学院/中国医学科学院 医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 调查不同群体树鼩弓形虫的感染情况, 为建树鼩寄生虫学监测指标提供依据。方法 分别从野外来源、人工驯化一年和人工繁殖的子一代三个树鼩群体中, 随机采集动物全血样本各 40 份, 用间接血凝试验(IHA)检测弓形虫抗体, PCR方法检测其核酸, 根据两种方法的检测结果分析树鼩弓形虫的感染情况。结果 IHA和PCR检测结果显示, 120份树鼩血样均为阴性, 两种检测方法结果一致。结论 本次调查三个群体来源的树鼩均未感染弓形虫, 树鼩对弓形虫的易感情况还需要通过扩大样本量和感染性实验来进一步验证。

【关键词】 树鼩; 弓形虫; 间接血凝试验; 聚合酶链反应

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0028-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.007

Infection investigation of *Toxoplasma gondii* in tree shrews from various sources

TONG Pin-fen, WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, Zhang Yuan, SUN Xiao-mei, DAI Jie-jie
(Center of Tree shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To investigate the infection status of *Toxoplasma gondii* in different colonies of tree shrews and then provide the basis for parasitological monitoring. **Methods** Each of the forty blood samples were randomly collected from three tree shrews colonies: wild origin, domesticated and first generation, respectively. Both indirect hemagglutination test (IHA) and PCR assay were used to detect the *Toxoplasma gondii*. **Results** No positive sample of *Toxoplasma gondii* was detected from either IHA or PCR results. The results from IHA and PCR assays were in coincidence with each other. **Conclusions** According to the survey none of the tree shrews from the three groups is infected with *Toxoplasma gondii*. More samples or infection experiments are needed to determine whether tree shrews can be infected with *Toxoplasma gondii*.

【Key words】 Tree Shrews; *Toxoplasma gondii*; Infection; Indirect hemagglutination Test; PCR

树鼩(tree shrew, *Tupaia belangeri*)的基因组分析发现,其神经、代谢和免疫系统等方面与人类具有较高的同源性,特别适合于病毒免疫学、神经生物学和代谢性疾病研究,受到了科研工作者的重

视^[1]。树鼩作为我国特有的实验动物新品种,开展树鼩规模化、标准化种群的饲养繁殖是一项重大的基础性工作,虽然近年来在驯养繁殖、种群建立、生物学特性研究、自身携带微生物情况以及人类疾病模型建立等方面取得了可喜的进展,但是离实验动

[基金项目] 国家科技支撑计划(2011BAI15B01-21; 2012BAI39B01; 2014BAI01B01); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 仝品芬(1967-)女,主管技师,研究方向:实验动物繁育研究。E-mail: tpf@imbcams.com.cn。

[通讯作者] 代解杰(1961-)男,研究员,项目负责人, E-mail: dj@imbcams.com.cn。

物标准化仍有较大差距^[2,3]。

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)病是常见的人兽共患疾病,可引起怀孕动物流产、死胎,甚至导致患病动物大批死亡,造成巨大的经济损失。因此,弓形虫被列为实验动物质量控制的必检项目。本文采用间接血凝法和 PCR 法对树鼩进行弓形虫检测,以了解弓形虫感染树鼩的情况,为制定树鼩质量标准和质量监测提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:实验树鼩由中国医学科学院医学生物研究所树鼩种质资源中心提供[SCXK(滇)K2013-0001,SYXK(滇)K2013-0001],来源于野外、驯化饲养一年和人工繁育子一代 3 个群体,每个群体随机挑选 40 只,分为三个组,共 120 只。

1.1.2 主要设备及试剂:电热恒温培养箱(78-1,湖北省黄石市医疗器械厂),台式高速冷冻离心机(Hitachi,CT15RE),梯度 PCR 仪(Bio-Rad,CFX96™ Real-Time PCR Detection System),数显恒温振荡器(ZD-85,杭州贵驰科技有限公司)。弓形虫间接血凝试验试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所(批号:130815),电泳仪(Bio-Rad, PowerPac Basic),弓形虫阳性对照品由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 间接血凝试验:(1)弓形虫 IHA 诊断制剂按使用说明标示加入灭菌蒸馏水稀释摇匀,2 000 r/min 离心 5 min~10 min,弃上清液,加等量稀释液摇匀,置 4℃ 下静置 24 h 使用,10 d 内效价不变。(2)每只树鼩取全血 0.3 mL,室温下静置 1 h,4℃ 冰箱静置 1.5 h。4 000 r/min 离心 5 min,分离血清。(3)用微量移液器在 96 孔有机玻璃反应板上每孔加 0.075 mL 稀释液。检测时每个样品需加稀释液 4 孔。分别再加阴性对照血清,阳性对照血清和待检血清:第一孔加相应血清 0.025 mL,倍比稀释至第 3

孔,第 4 孔为稀释液对照。(4)加诊断液:将诊断液摇匀,每孔加 0.025 mL 诊断液,加完后将反应板置微型振荡器上震荡 1 min~2 min,取下反应板,盖上一块与反应板大小相近的玻璃置 22℃~37℃ 作用 2 h~3 h 后观察结果。出现凝集者为阳性,仍呈混匀状未凝集者为阴性,难于判断时需重做一次。

1.2.2 PCR 检测:(1)外周全血中 DNA 的制备:采集树鼩血 0.2 mL,EDTA 抗凝,按照试剂盒 TaKaRa MiniBEST Whole Blood Genomic DNA Extraction Kit (Code No. 9781)进行 DNA 提取。(2)PCR 扩增:引物:根据 P30 基因保守区设计引物,目的片段 914 bp,

F: 5'-TTGCCGCGCCACACTGATG-3'; R: 5'-CGCGACACAAGCTGCGATAG-3' PCR 反应按照 PCR Amplification Kit (Code No. R011)试剂盒操作进行,体系总体积 50 μL,内含 10 × PCR buffer(含 Mg²⁺)5 μL,dNTP Mixture 4 μL,上下游引物各 1 μL(终浓度 0.2 μmol/L),模板 DNA 2 μL,TaKaRa Taq 0.25 μL,补充去离子水至 50 μL。上述反应混合物于 94℃ × 5 min 预变性后,在经过 94℃ × 30 s, 55℃ × 30 s,72℃ × 30 s,25 个循环后,再经过 72℃ 延伸 5 min。(3)扩增产物鉴定:分别取 PCR 扩增产物 10 μL,1.8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下观察结果,对照位置出现阳性条带者为阳性,无条带者为阴性,条带不清晰的重做一次。

2 结果

2.1 间接血凝试验结果

阳性和阴性对照成立,所有三组树鼩样品均未出现凝集,全部为阴性结果(表 1)。

2.2 PCR 检测结果

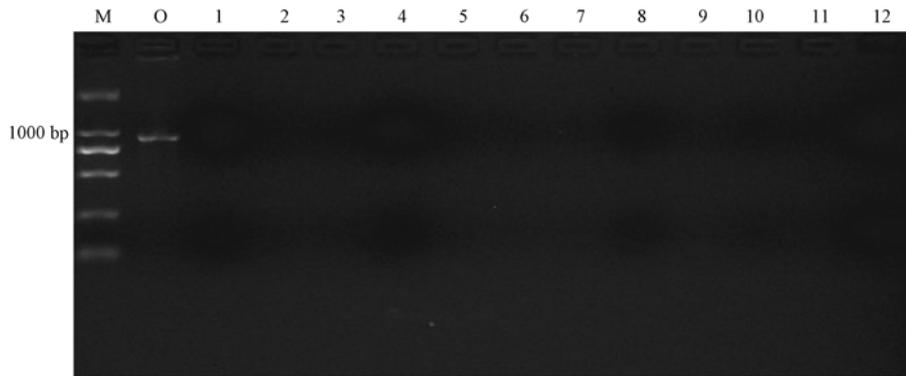
PCR 检测阳性对照样本出现单一条带,片段大小与设计目的片段 914 bp 一致,3 组树鼩全血 DNA 样本的 PCR 扩增产物电泳均未出现阳性条带,结果见(表 1 和图 1)。

表 1 三个群体树鼩的弓形虫检测间接血凝试验和 PCR 结果
Tab. 1 Results of IHA and PCR for *Toxoplasma gondii* in the tree shrews

组别 Groups	数量 Number	间接血凝试验(IHA)结果		PCR 检测结果	
		-	+	-	+
野外来源 Wild origin	40	40	0	40	0
驯化一年 Domesticated	40	40	0	40	0
人工繁育子一代 First generation	40	40	0	40	0

注: -: 阴性, + : 阳性

Note. - : Negative, + : Positive



注: M: Marker(DL2000),泳道 0:阳性对照,泳道 1-12:树鼩样品

图 1 树鼩全血 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果

Note. M: Marker (DL2000); Track 0: Psitive control; Track 1-12: Samples from tree shrews

Fig.1 Results of electrophoresis of whole blood DNA from the tree shrews

从间接血凝试验和 PCR 检测结果可看出,两种检测结果完全一致,且均为阴性,说明所检测的三组树鼩的样品无弓形虫感染。

3 讨论

弓形虫是细胞内寄生虫。弓形虫有极广泛的地理区域和宿主范围,猫是弓形虫的终宿主兼中间宿主,能感染哺乳动物、鸟类,包括人和灵长类动物。弓形体病为世界性分布的危害较大的人兽共患病。弓形虫感染一般呈隐性,无明显的临床症状。猫科动物是弓形虫病传播过程中惟一的终末宿主,也是惟一的可以排泄含有弓形虫的卵囊到环境中的动物,弓形虫在其肠道内通过有性生殖产生大量的卵囊,卵囊随着粪便而散播到环境之中,动物或人类一旦不小心进食被卵囊污染的食物或者水就很有可能感染弓形虫^[4]。

野生动物在饮食习惯和食物种类方面具有多样性,从而感染弓形虫的几率也有所不同^[5]。Millcin J 等调查了西班牙东部马洛卡地区的野生猫科动物弓形虫感染情况,结果显示当地的野猫弓形虫阳性率甚至高达 84.7%^[6]。从有关研究结果中可以看到,野生猫科动物弓形虫阳性率很高,野生犬科动物也具有较高的感染率,而且肉食野生动物的弓形虫感染率一般要高于杂食野生动物和草食野生动物,而杂食野生动物的弓形虫阳性率基本上要高于草食野生动物^[7]。野生树鼩属杂食类动物,食物主要以植物性粮食、水果和少量虫卵为主。不过从间接血凝试验和 PCR 检测结果均为阴性来看,野外来源树鼩无弓形虫感染,也是驯化养殖树鼩和人工繁殖子一代树鼩也无弓形虫感染的客观因素,

或者也可能是树鼩本身就不易感染弓形虫的原因造成的。但由于本次采样数量的局限性,树鼩对弓形虫的易感情况还需要通过扩大样本量和感染性实验来进一步验证。

近年来,弓形虫病的诊断方法以普通病原学和免疫学诊断为主,而随着分子生物学技术的不断发展,逐步建立了核酸探针、PCR、基因芯片以及 LAMP 等多种快速、准确的检测方法,使该病的诊断方法日益完善^[8]。IHA 操作简便,敏感性高,适用于现场检测,可用于辅助诊断及作为流行病学调查和综合查病的方法^[9]。崔平等^[10]以弓形虫 P30 基因为 PCR 引物,可以检测出 5 个弓形虫速殖子的 DNA,并且可在病猪的肝脏、肺脏、肺门淋巴结、脾脏、肠系膜淋巴结、腹水的 DNA 样品中检测出弓形虫,该方法特异性较好。而本文也是根据弓形虫 P30 的保守区设计的检测引物,检测结果应该同样是比较可靠的。

本文所采用的两种检测方法阳性对照均较好,所有样品检测结果完全一致,达到了相互印证的目的,检测结果均为阴性,提示树鼩可能自然不感染弓形虫,或者有可能是感染率极低所造成,这方面尚需以后做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 许凌,范宇,蒋学龙,等. 树鼩进化分类地位的分子证据[J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 70-76.
- [2] 高家红,江勤芳,罗志武,等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 24-26.
- [3] 邢进,冯育芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带

(下转第 46 页)

脏器系数实验结果显示:OTC10 组的肝脏系数显著低于 IVC305 ($P < 0.05$), 该参数在其它组间无显著差异, 原因未明。研究未见其它脏器系数有明显组间差异。

综合分析及结论: 本研究所选 2 种饲养密度中, 5 只/笼符合各规范要求及常规操作, 10 只/笼的密度明显高过各规范的要求, 数据也显示其对体重增长产生负面影响。另按文献资料要求, 本研究所用 IVC 的笼底面积可满足饲养 7 只 Balb/c 小鼠, 但无直接研究数据给予支持, 不作为可行选项。因此, 基于当前实验的设计, 推荐换气次数为 50 次/h 时饲养 5 只/笼为该型号 IVC 饲养 Balb/c 小鼠的最佳条件。

参考文献:

- [1] Clough G, Wallace J, Gamble MR, et al. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel[J]. Lab Anim, 1995, 29:139 - 151.
- [2] Cook RO. New ventilated isolation cage [J]. Appl Microbiol, 1968, 16(5):762 - 771.
- [3] 施正良, 仲晓萍, 饶江宁. IVC 应用研究初报[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(2):109 - 110.
- [4] Lipman NS, Corning BF, Saifuddin M. Evaluation of isolator caging systems for protection of mice against challenge with mouse hepatitis virus[J]. Lab Anim, 1993, 27:134 - 140.
- [5] Reeb-Whitaker CKI, Paigen BI, Beame WG, et al. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages [J]. Lab Anim, 2001, 35(1):58 - 73.
- [6] 高文婷, 邱译文, 尹金星, 等. IVC 环境中裸小鼠的繁育及生长[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(2):111 - 112.
- [7] 罗金环, 王洪波. 简便、节能、解放人工的通气实验动物设备

[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(2):127 - 128.

- [8] 战大伟, 江其辉, 仇志华, 等. 独立通风笼(IVC)在实验动物学中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(10):631 - 634.
- [9] 张海峰, 卢胜明, 康峰, 等. 独立通风笼盒(IVC)在动物实验中的应用[J]. 实验动物科学, 2011, 28(6):54 - 56.
- [10] 欧阳剑东. IVC 市场前景分析[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2):120 - 122.
- [11] 张继明. IVC 在动物实验中规范使用的体会[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(9):567
- [12] 王洪宝, 战大伟, 江其辉, 等. IVC 与屏障级设施检测探讨[J]. 实验动物科学, 2007, 24(1):28 - 30.
- [13] Carolyn R, Robert J, David B, et al. Microenvironment in ventilated animal cages with differing ventilation rates, mice populations, and frequency of bedding changes [J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 1998, 37(2):43 - 49.
- [14] 施正良, 饶江宁. 医学实验动物屏障环境内独立通风笼具的安放[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(7):60 - 62.
- [15] Hoglund AU, Renstrom A. Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: cage environment and animal health aspects[J]. Lab Anim, 2001, 35(1):51 - 57.
- [16] 田小芸, 颜培实, 恽时锋, 等. IVC2B 型独立通气笼盒系统运行时的微环境分析[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(9):529 - 532.
- [17] National Research council. Guide for the care and use of laboratory animals[M]. The eighth edition. Washington, D. C. : National Academy Press, 2010:55 - 63.
- [18] GB14925 - 2010. 实验动物环境及设施[S].
- [19] Kostomitsopoulos N, Dontas IA, Alexakos P, et al. Growing male rats in individually ventilated and open-top cages[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(6):879 - 883.

[修回日期] 2014-06-03

(上接第 30 页)

情况的调查 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(3):34 - 38.

- [4] Dubey J P. Toxoplasmosis of Animals and Humans [M]. 2nd. CRC Press Inc. Boca Raton; New York, 2009:1 - 313.
- [5] Sepflveda MA, Munoz-Zanzi C, Rosenfeld C, et al. *Toxoplasma gondii* in feral American minks at the Maullin river [J]. Chile Vet Parasitol, 2011, 175(1 - 2):60 - 65.
- [6] Millan J, Cabezon O, Pabon M, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris*) in Majorca, Balearic Islands, Spain [J]. Vet Parasitol, 2009, 165(3 - 4):323 - 326.
- [7] 丛伟, 吴松明, 黄思扬, 等. 野生动物弓形虫病研究进展

[J]. 动物医学进展, 2012, 33(2):83 - 86.

- [8] 王萌, 王艳华, 蔡志杰, 等. 弓形虫病的分子诊断技术研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(12):1160 - 1162.
- [9] 李冕, 尹昆, 闫歌. 弓形虫病的诊断技术及其研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(12):942 - 944.
- [10] 崔平, 刘红彬, 方素芳, 等. PCR 检测猪弓形虫病方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26(5):62 - 63.

[修回日期] 2014-05-27