

# 宠物豚鼠隐孢子虫感染情况调查及其虫种鉴定

宋 丹, 赵子方, 齐 萌, 张龙现\*

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了解宠物豚鼠隐孢子虫感染情况, 用饱和蔗糖溶液漂浮法对郑州某宠物市场 55 份豚鼠粪便和免疫抑制后的 30 只豚鼠新鲜粪便样本进行检查。结果发现, 隐孢子虫总感染率分别为 12.7% 和 80%, 卵囊呈近圆形, 卵囊大小为  $5.3 \mu\text{m} \times 4.7 \mu\text{m}$  [ $(5.0 \sim 5.5) \mu\text{m} \times (4.4 \sim 4.9) \mu\text{m}$ ], 卵囊指数为 1.11。基于 18S rRNA 基因位点, 对调查中发现的 7 个隐孢子虫分离株进行 PCR 扩增, PCR-RFLP 和测序结果显示, 7 个分离株均为维瑞隐孢子虫。宠物豚鼠隐孢子虫感染较为普遍, 感染虫种是维瑞隐孢子虫, 且豚鼠在免疫抑制后, 其隐孢子虫感染率显著增高。

**关键词:** 豚鼠; 隐孢子虫; 分离; 鉴定

**中图分类号:** S852.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0147-03

## Survey on *Cryptosporidium* Infection and Identification of Species in Pet Guinea Pig

SONG Dan, ZHAO Zi-fang, QI Meng, ZHANG Long-xian\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to investigate the infection status of *Cryptosporidium* in pet guinea pig, a total of 55 samples from pet market in Zhengzhou and 30 fresh stool samples from immunosuppressive guinea pigs were examined by Sheather's sugar flotation method. The results showed that the *Cryptosporidium* infection rates were 12.7% and 80%, respectively. The oocysts were nearly circular, with size of  $5.3 \mu\text{m} \times 4.7 \mu\text{m}$  and a length to width shape index of 1.11. PCR amplification of the 18S rRNA, PCR-RFLP and sequencing showed that all the seven isolates were *Cryptosporidium wrairi*, indicating that the infection of *Cryptosporidium* in guinea pig was common after immunosuppression, and the infection rate was significantly higher.

**Key words:** guinea pig; *Cryptosporidium*; isolation; identification

豚鼠又名荷兰猪、天竺鼠、葵鼠等, 经过人工长期驯化, 作为毛皮动物和实验动物, 具有较高的经济价值, 近年来, 豚鼠作为宠物深受人们喜爱。隐孢子虫是一种重要的机会性致病人兽共患原虫, 可感染包括人在内的 260 多种动物, 导致免疫功能受损的人或动物发生渐进性致死性腹泻<sup>[1]</sup>。资料显示, 多种宠物均可感染和传播人兽共患病, 尤其是机会性感染原虫病<sup>[2]</sup>。公认的隐孢子虫有效种有 24 个, 寄生于豚鼠的隐孢子虫主要是维瑞隐孢子虫(*Cryptosporidium wrairi*), 也有报道称,

豚鼠感染隐孢子虫豚鼠基因型 II (*Cryptosporidium* sp. guinea pig genotype II), 均可引起豚鼠腹泻和食欲减退<sup>[3-4]</sup>。有关豚鼠隐孢子虫感染情况的调查报告很少, Caryn 等<sup>[4]</sup>曾报道, 儿童饲养宠物豚鼠患隐孢子虫病几率增高, 国内鲜有对宠物豚鼠隐孢子虫的报道。为此, 进行了郑州市豚鼠隐孢子虫感染情况调查及其虫种鉴定, 旨在了解宠物豚鼠隐孢子虫感染及携带传播情况, 评价其共患风险, 为人兽共患寄生虫病防治提供参考依据。

收稿日期: 2012-05-15

基金项目: 河南省重大公益科研项目(81100912300)

作者简介: 宋 丹(1986-), 女, 河北涿州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 隐孢子虫生物学特性。E-mail: sd56103498@163.com

\* 通讯作者: 张龙现(1965-), 男, 河南汝州人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事人兽共患原虫生物学研究。

E-mail: zhanglx8999@yahoo.com.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

2009 年 9 月—2010 年 6 月于郑州某市场 4 家宠物店采集 55 笼豚鼠的新鲜粪便(每笼 10~25 只豚鼠,记为 1 份),每份粪便约 30 g,装入干净塑料袋,带回实验室,置 4℃下保存,用于隐孢子虫的检测。

从市场随机购买 31~90 日龄豚鼠共 30 只,单笼饲喂,将醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,0.75 mg)碾碎,经口灌服豚鼠,每只 0.5 mg/d,连续免疫抑制 5 d,自免疫抑制第 2 天起,每日取其新鲜粪便进行检查,连续检查 15 d。

### 1.2 检查方法

用饱和蔗糖溶液漂浮法检查粪便中隐孢子虫感染情况。

### 1.3 DNA 提取

收集隐孢子虫阳性粪便样本,采用美国 OMEGA Bio-Tek 生产的 Stool DNA Kit 试剂盒(型号为 D4015-02),按照其 DNA 提取流程进行操作。

### 1.4 PCR 扩增

基于 18S rRNA 基因位点对隐孢子虫 DNA 进行 PCR 扩增,其引物设计和反应程序参照 Jiang 等<sup>[6]</sup>的报道,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.5 PCR-RFLP 和测序

PCR-RFLP 分析参照梁楠等<sup>[6]</sup>的方法,*Ssp* I 和 *Vsp* I 购自大连宝生物工程有限公司,PCR 产物测序由北京诺赛基因有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 隐孢子虫形态结构特征

对分离到的隐孢子虫卵囊进行形态学鉴定。卵囊呈近圆形,测量 100 个卵囊,大小为  $5.3 \mu\text{m} \times 4.7 \mu\text{m}$  [(5.0~5.5)  $\mu\text{m} \times$  (4.4~4.9)  $\mu\text{m}$ ],卵囊指数为 1.11 (1.10~1.12),饱和蔗糖溶液中呈淡蓝紫色,卵囊周围显黄绿色(图 1),初步鉴定为维瑞隐孢子虫(*C. wrairi*)。

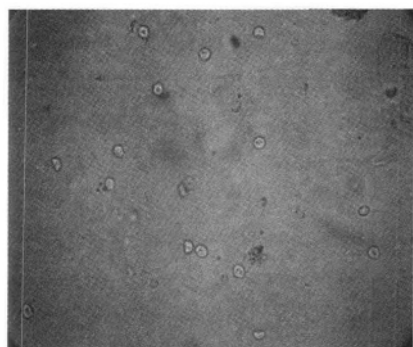


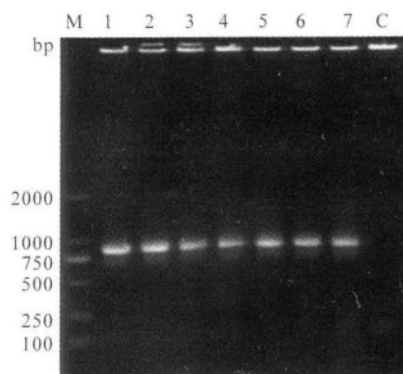
图 1 饱和蔗糖溶液中隐孢子虫卵囊(400×)

### 2.2 豚鼠隐孢子虫感染情况

对 55 份新鲜粪样进行检查,发现隐孢子虫阳性样本 7 份,感染率为 12.7%,其中 30 日龄以下、31~90 日龄、91 日龄以上豚鼠隐孢子虫感染率分别为 5.6%(1/18)、19.2%(5/26)和 9.1%(1/11)。对所购豚鼠进行免疫抑制,结果显示,免疫抑制后宠物豚鼠隐孢子虫阳性率高达 80%(24/30)。

### 2.3 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

用巢式 PCR 成功扩增出 7 个隐孢子虫分离株的 18S rRNA 基因片段,目的片段大小为 830~850 bp,与预期结果相符(图 2)。



M, DNA 分子质量标准; 1—7, 隐孢子虫 PCR 扩增产物; C, 双蒸水对照

图 2 隐孢子虫阳性样品 18S rRNA 基因的 PCR 产物

### 2.4 PCR-RFLP 分析

扩增出的 PCR 产物经 *Ssp* I 和 *Vsp* I 酶切后显示(图 3、图 4),7 个隐孢子虫分离株均为 *C. wrairi*。

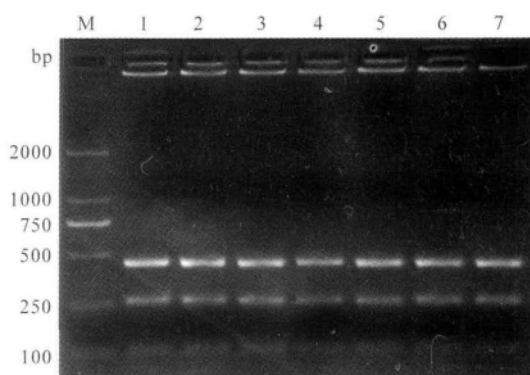


图 3 PCR 产物的 *Ssp* I 酶切结果

### 2.5 序列分析结果

在 GenBank 上用 BLAST 搜索同源序列,利用 Clustal X1.83 和 DNASTAR 5.0 等生物学软件对序列进行比对和同源性分析,结果发现,7 个隐孢子虫分离株和 *C. wrairi* 同源性为 100%,故将 7 个隐孢子虫分离株鉴定为 *C. wrairi*。

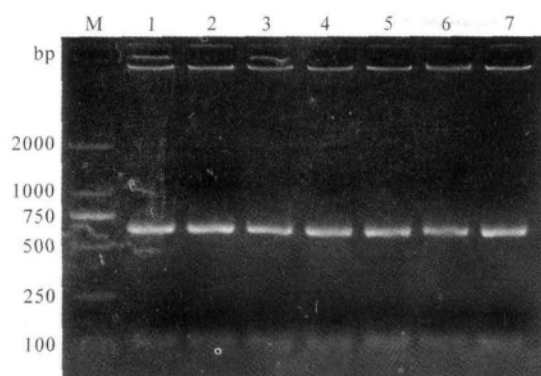


图 4 PCR 产物的 *Vsp* I 酶切结果

### 3 讨论

国内外许多研究人员在隐孢子虫分类、生物学特性及免疫学等方面取得了较多的研究成果。流行病学调查、形态学观察不能将特征相似的虫种予以有效区分,而分子遗传学是研究不同物种进化种系发生关系的重要方法之一,广泛应用于隐孢子虫分类和鉴定。

寄生于豚鼠的隐孢子虫主要是维瑞隐孢子虫(*C. wrairi*),该虫种由 Vetterling 等<sup>[7]</sup>于 1971 年根据形态学观察和宿主特异性命名,感染的豚鼠一般无腹泻症状,严重者出现肠炎;以幼年豚鼠较易感染,并可导致腹泻。动物感染试验发现,*C. wrairi*不感染兔、鸡和火鸡,仅可感染豚鼠,表明该种具有明显的宿主适应性。Huber 等<sup>[8]</sup>收集 2 份巴西家养豚鼠隐孢子虫阳性粪便样品,基于 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增和序列分析,发现该序列和已知隐孢子虫序列存在差异,将其命名为隐孢子虫豚鼠基因型 II。

本次调查发现,宠物豚鼠隐孢子虫感染率为 12.7%,以 31~90 日龄豚鼠感染率较高,为 19.2%,免疫抑制后宠物豚鼠隐孢子虫阳性率高达 80%。本研究根据形态学特征观察和分子遗传学标记,对宠物豚鼠源隐孢子虫分离株进行鉴定,确定其

为 *C. wrairi*,为进一步开展隐孢子虫的病原生物学研究奠定了基础。有关豚鼠隐孢子虫的研究较少,目前发现 *C. wrairi* 具有严格的宿主特异性,其是否存在人兽共患风险,及豚鼠是否感染其他隐孢子虫种尚不清楚,有待于进行深入地调查和研究。

#### 参考文献:

- [1] Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*[J]. Exp Parasitol, 2010, 124(1): 90-97.
- [2] Rbertson I D, Irwin P J, Lymbery A J, et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(12/13): 1369-1377.
- [3] Lü C, Zhang L, Wang R, et al. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: Prevalence and molecular characterization[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(24): 7692-7699.
- [4] Caryn B, Ynes O, William C, et al. Epidemiologic differences between *Cyclosporiasis* and *Cryptosporidiosis* in Peruvian children[J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(6): 581-585.
- [5] Jiang J, Alderisio K A, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8): 4446-4454.
- [6] 梁楠, 菅复春, 李家诚, 等. 乳牛源隐孢子虫种类的 PCR-RFLP 和分子种系发育分析鉴定[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(1): 22-28.
- [7] Vetterling J M, Jervis H R, Merrill T G, et al. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus[J]. J Protozool, 1971, 18(2): 243-247.
- [8] Huber F, da Silva S, Bomfim T C, et al. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil[J]. Vet Parasitol, 2007, 150(1/2): 65-74.