

应用细胞培养方法分离猪源弓形虫虫株

张东林^{1,2,3}, 惠 煜^{1,4}, 周艳琴³, 王玉海⁴, 董海岚^{1,4}, 王正松^{1,3}, 赵俊龙^{1,3*}

(1. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061; 3. 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070; 4. 南阳市动物疫病防控中心, 河南 南阳 473010)

摘要: 为获得猪源弓形虫野生虫株, 对细胞培养过程中的培养基种类、血清用量及培养佐剂等条件进行优化, 选择最佳分离条件。对临床血清学检测呈阳性猪场的 19 份血液样品进行弓形虫虫株的培养检测, 共获得野生虫株 10 株。运用 PCR 方法进行初步鉴定, 证实分离虫株为弓形虫野生虫株。结果表明, 细胞培养方法是一种分离弓形虫虫株较为理想的方法。

关键词: 弓形虫; 虫株; 分离; 细胞培养

中图分类号: S852.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)03-0103-03

Isolation and Identification of the *Toxoplasma Gondii* Field Strains from Pigs by Cell Culture

ZHANG Dong-lin^{1,2,3}, HUI Yu^{1,4}, ZHOU Yan-qin³, WANG Yu-hai⁴,
DONG Hai-lan^{1,4}, WANG Zheng-song^{1,3}, ZHAO Jun-long^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Agromicrobiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China;
3. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
4. Centers for Disease Control and Prevention of Nanyang, Nanyang 473010, China)

Abstract: To obtain the *Toxoplasma gondii* field strains from pigs, the kinds of media, serum concentration and the usage of supernatant of RH strain culture (SRC) were first optimized. Total of 19 blood samples of which the *T. gondii* antibody are positive were cultured with PK-15 cells and 10 strains of *T. gondii* were isolated. The results of PCR and ELISA further confirmed that all of the isolates are field strains. Our data demonstrate that the method of cell culture is an effective way to isolate *T. gondii* field strains from pigs.

Key words: *Toxoplasma gondii*; Strain; Isolation; Cell culture

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是寄生于人和多种脊椎动物组织和细胞内的机会性致病原虫, 广泛分布于世界各地, 能引起孕妇流产、胎儿或婴幼儿发育畸形, 甚至死亡。近年来又发现该寄生虫是人类艾滋病、脑炎的重要并发或继发病原体^[1]。在畜牧业生产中, 弓形虫病也是猪、牛、羊的重要原虫

病, 尤以猪的感染率较高, 给养猪生产造成巨大经济损失。不少病例报告以及血清学调查结果证明, 猪弓形虫病仍然是养猪生产以及公共卫生的一大隐患^[2~4]。

作为一种机会性致病原虫, 当机体免疫水平下降时, 弓形虫对猪只的危害将更加严重。我国目前

收稿日期: 2008-11-15

基金项目: 教育部重点科研项目(105120); 农业公益性行业科研专项经费项目(200803017)

作者简介: 张东林(1968-), 男, 河南南阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物病原微生物学研究。

通讯作者: 赵俊龙(1967-), 男, 河南上蔡人, 教授, 博士生导师, 主要从事寄生虫分子生物学与基因工程研究。

养猪业发展不平衡,部分猪场因致病微生物或饲料中霉菌毒素等原因,导致猪体免疫抑制问题比较突出^[5,6]。因此,弓形虫病的危害更应引起兽医界的高度重视。而分离病原是研究疾病的前提。常见的弓形虫分离方法包括动物接种及细胞培养2种,前者检出周期较长,且存在扩散病原的风险,因此,应用细胞培养方法日渐增多。本试验在农业微生物国家重点实验室已有工作的基础上^[7,8],参考文献[9]报道的方法,首先对细胞培养条件进行优化,随后对采自血清学阳性猪场的血液样品进行弓形虫虫株的分离,并运用血清学及PCR等方法进行鉴定,初步确定得到弓形虫分离株10株。野生虫株的获得为该病的流行病学、免疫预防及药物治疗等方面的深入研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫株及细胞 弓形虫 RH 株由湖北省预防医学科学院赠送; PK-15 细胞由深圳出入境检验检疫局赠送。

1.1.2 培养基与试剂 RPMI1640 培养基、DMEM 低糖培养基、DMEM 高糖培养基及胎牛血清均购自 Invitrogen 公司,胰蛋白酶为 Sigma 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 抗凝全血及血清 从华中农业大学兽医院临床病猪、南阳市周边弓形虫抗体阳性猪场,无菌采集血样;每头猪采集抗凝全血及全血各1份,前者用于虫株分离,后者用于检测弓形虫抗体。

1.2 方法

1.2.1 RH 株速殖子培养上清的制备 常规培养细胞,待培养瓶底部接近 80% 长满细胞时,将 RH 株速殖子从液氮中取出,置 37℃ 水浴速溶,离心去除冻存液后接种细胞。待虫体大量增殖后(约 72 h),取其上层培养液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即为速殖子培养上清(SRC),置-20℃保存备用。

1.2.2 细胞培养法分离虫体条件的优化 固定其他条件,先后以不同类型培养基及不同浓度 SRC 进行细胞培养,接种已知数量的 RH 株速殖子,在倒置显微镜下计数速殖子总数及侵入细胞的数量,依次确定最佳培养基及 SRC 最适用量,为提高临床样品中野生虫株的分离率提供保证。

1.2.3 野生虫株的分离 在最适条件下(1%胎牛血清,10%SRC 的 DMEM 高糖完全培养基)培养 PK-15 细胞。同时,采集抗凝全血进行轻度离心或

自然沉淀,以去除沉淀底部的红细胞。小心吸取上层及中间层部分,1000 g 离心 5 min,弃上清,以 pH7.2 PBS 悬浮沉于底部的虫体或淋巴细胞,混匀后接种 80%长满单层的 PK-15 细胞,25 mL 细胞瓶每瓶加 1 mL 或 24 孔板每孔加 0.1 mL。置 37℃,50%(V/V) CO₂ 培养箱培养,逐日观察。当在倒置显微镜下发现 1 个以上细胞内出现二联虫体时,即可初步判定为虫株分离阳性。待虫体数量增多时进行扩大培养或置液氮中长期保存。

1.2.4 分离虫株的进一步鉴定 取分离培养上清,提取其总 DNA,以农业微生物国家重点实验室建立的方法进行 PCR 检测^[7]。根据特异性条带的有无,判定野生虫株是否成功分离。所有样品所对应的血清样品均用农业微生物国家重点实验室建立的 AG-ELISA 方法^[8]检测弓形虫抗体。

2 结果与分析

2.1 细胞培养条件的优化结果

不同类型培养基培养细胞后,接种相同数量的 RH 株速殖子,培养一定时间后得到的虫体数量结果见表 1。DMEM 高糖培养基组在培养 96 h 后得到虫体浓度为 1980 万个/mL,明显高于 RPMI1640 (1103 万个/mL)及 DMEM 低糖(970 万个/mL)。说明高浓度葡萄糖有利于弓形虫速殖子的生长。

不同浓度胎牛血清及 SRC 接种 RH 速殖子后细胞虫体计数情况见表 2、表 3。在 10% SRC 浓度下,细胞感染率明显高于对照组及其他浓度组。

表 1 不同类型培养基 RH 速殖子繁殖数量 (万个/mL)

| 接种时间(h) | 培养基类型 | | |
|---------|-----------|---------|---------|
| | RPMI 1640 | DMEM 低糖 | DMEM 高糖 |
| 24 | 550 | 480 | 630 |
| 48 | 1133 | 1030 | 1280 |
| 72 | 1485 | 1120 | 1920 |
| 96 | 1103 | 970 | 1980 |

表 2 不同浓度 SRC RH 速殖子侵入细胞的百分率 (%)

| 速殖子接种量 (个/mL) | SRC 添加量 | | | |
|------------------|---------|------|------|------|
| | 0 | 10% | 20% | 30% |
| 10 ³ | 18.0 | 36.5 | 35.0 | 19.6 |
| 10 ² | 3.5 | 10.6 | 5.8 | 4.4 |

2.2 野生虫株的分离及其鉴定结果

共采集抗凝全血 19 份,接种细胞单层后,有 10 份分离到椭圆形、弓形或瓜子状虫体;对初步判定为阳性的分离培养物,进行 PCR 扩增,产物为弓形虫 SAG1 基因阳性,其所对应的血清 AG-ELISA 抗体 OD₆₃₀值在 0.56~1.10 之间(表 3)。

表 3 临床样品虫体检出时间、抗体水平及 PCR 扩增结果

| 样品编号 | 虫体检出时间(d) | OD ₆₃₀ 值 | PCR 扩增结果 |
|------|-----------|---------------------|----------|
| 3 | 2 | 1. 10 | + |
| 6 | 2 | 1. 04 | + |
| 8 | 5 | 0. 86 | + |
| 10 | 5 | 0. 85 | + |
| 11 | 6 | 0. 71 | + |
| 13 | 6 | 0. 75 | + |
| 14 | 8 | 0. 56 | + |
| 16 | 4 | 0. 71 | + |
| 18 | 2 | 0. 98 | + |
| 19 | 5 | 0. 78 | + |

3 讨论

利用细胞培养方法分离弓形虫虫株,具有条件一致、分离周期短的优点,克服了动物接种个体差异所可能导致的假阴性结果,有利于提高检出率。于恩庶等^[9]以血液作为被检材料,应用细胞培养方法进行家兔弓形虫的分离,证明细胞培养方法的阳性率比小鼠接种法高,结果判定快,尤其是在虫数较少时差别更明显。本次试验以血清学阳性猪场抗凝全血为被检材料,接种 PK-15 细胞单层,共检测样品 19 份,得到阳性结果 10 份,证明细胞培养方法是一种比较合适的弓形虫虫株分离方法。

Saffer 等^[10,11]报道,磷脂酶 A2(PLA2)对弓形虫速殖子侵入成纤维细胞有促进作用,并证实 RH 株速殖子有内源性 PLA2 的存在。通过使用不同浓度 SRC 对 RH 株速殖子感染细胞百分率的比较试验也验证了该观点。可以认为,用 SRC 作为培养基佐剂,可显著提高利用细胞培养方法分离弓形虫的敏感性。由于细胞种类及培养条件不同, SRC 中有效成分的含量会发生变化,因此在实际应用中,建议通过比对试验,确定其最适添加量。

弓形虫除嘌呤代谢必须依靠宿主提供外,其他物质均可以自身合成,培养液中添加适量葡萄糖不仅对于支撑细胞是必需的,对于弓形虫速殖子的生长繁殖也具有直接影响^[12]。比对试验表明,DMEM 高糖培养基(葡萄糖含量 5%)较之 DMEM 低糖培养基(葡萄糖含量 1.5%)和 RPMI1640 培养基(含葡萄糖 2%)更适宜弓形虫速殖子的生长。

试验表明,弓形虫只能在有核细胞内生长繁殖。而猪红细胞是无核细胞,因此无虫体存在。血液样品经离心或静置处理后,去除下层红细胞,血细胞数目明显降低,而其中的游离虫体及淋巴细胞成分保持不变。这样在相同的细胞单层表面,可适当增加样品接种量,还可以避免大量红细胞覆盖细胞单层所导致的对细胞生长及速殖子侵入的不利影响,提高分离方法的敏感性。

参考文献:

[1] Zangerle A, Allerberger F, Pohl P, *et al.* High risk of developing toxoplasmic encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*[J] . Med Microbio Immunol, 1991, 180 (2): 59— 66.

[2] Roberts T, Frenkel J K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States[J] . J Am Vet Med Assoc 1990, 196(2): 249— 256.

[3] Dubey J P. Validation of the specificity of the modified agglutination test for *Toxoplasmosis* in pigs[J] . Vet Para, 1997, 71: 307— 310.

[4] Dubey J P. *Toxoplasmosis*[J] . Am J Vet Res, 1994, 205: 1593— 1598.

[5] 程海庆, 郝瑞芳, 李海峰. 猪弓形虫与附红细胞体混合感染的诊治[J] . 河南畜牧兽医, 2002, 23(9): 12— 13.

[6] 杨汉春. 规模化猪场疫病流行动态与趋势分析[J] . 今日畜牧兽医, 2006(7): 46— 47.

[7] 王金苹. 弓形虫病 PCR 和 ELISA 诊断方法的建立和初步应用[D] . 武汉: 华中农业大学, 2005.

[8] 江涛. 猪弓形虫病分子诊断方法的建立与基因免疫研究[D] . 武汉: 华中农业大学, 2006.

[9] 于恩庶. 弓形体的体外培养[J] . 寄生虫学报, 1965, 2 (1): 23.

[10] Saffer L D, Schwartzman J D. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration[J] . J Protozool, 1991, 38(5): 454— 460.

[11] Saffer L D, Long Krug S A, Schwartzman J D. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*[J] . Am J Trop Med Hyg, 1989, 40 (2): 145— 149.

[12] 于恩庶. 弓形虫病学[M] . 福州: 福建科学技术出版社, 1992: 23— 26.