

已有的研究表明IL-17A是强大的炎性细胞趋化因子,这可能就是注射了抗体后鸡盲肠中炎性细胞浸润显著减少的主要原因。Guiton等人在研究过程中也发现注射抗小鼠IL-17A抗体能够显著减轻弓形虫感染小鼠的急性肠道损伤,全身炎症反应以及减低脑中寄生虫的载量。而粪便卵囊产量的显著减低可能是与其盲肠IELs中产生的高水平的IL-12和IFN- $\gamma$ 有关。以往有研究表明IL-17能够通过降低IL-12的表达来限制IFN- $\gamma$ 对Th17分化的抑制作用,因而注射了抗IL-17A抗体组能够显著提升IL-12和IFN- $\gamma$ 表达。综上所述,本实验的研究结果表明鸡IL-17A能够加剧球虫感染导致的病理变化,中和其作用能够在一定程度上提高宿主抵抗球虫感染的能力。

## 上海原水中隐孢子虫和贾第虫污染源追踪 及对人致病性研究

冯耀宇<sup>1\*</sup> 赵旭坤<sup>1</sup> 陈家旭<sup>2</sup> 周晓农<sup>2</sup> 李娜<sup>3</sup> 王琳<sup>1</sup> Lihua Xiao<sup>3</sup>

(华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237<sup>1</sup>)

(中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025<sup>2</sup>)

(Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, USA<sup>3</sup>)

**摘要:** 目前所有对污染水的隐孢子虫来源及其对人致病性的基因分型研究只在发达国家开展过。本研究中,我们从上海收集了 50 个原水水样,并采用美国环境保护总署的 1623 标准方法进行研究。为了找到一种经济有效的方法取代 1623 方法中的过滤步骤,我们同时采用了碳酸钙絮凝的方法(CCF)对水样进行浓缩。采用 1623 方法,发现 50 个原水样品的 32% 的样品为隐孢子虫阳性, 18% 的样品为贾第虫阳性;而采用 CCF 进行浓缩,发现 22% 的样品为隐孢子虫阳性, 10% 的样品为贾第虫阳性。将 CCF 浓缩和 PCR 检测结合,发现隐孢子虫的检出率(28%)和采用 1623 方法结果相近。对所有水样进行基因分型发现 17 个样品为隐孢子虫阳性,其中安氏隐孢子虫阳性样品为 14 个,猪隐孢子虫 7 个,贝氏隐孢子虫 2 个,火鸡隐孢子虫 1 个和人隐孢子虫 1 个。因此,家畜,尤其是牛和猪是上海原水中的主要污染源,并且在该区域原水中的大部分卵囊都不能感染人。用 CCF 方法进行浓缩并结合 PCR 进行基因分型可用于对水中隐孢子虫污染检测,并且该方法具有比常规过滤-显微镜镜检方法成本低的优势。

**【致谢】** 自然科学基金(30928019 和 81041078),上海市科委项目(09540704400)。

通讯作者: 冯耀宇, email: yfeng@ecust.edu.cn

### 1. 引言

介水传播的隐孢子虫病和贾第虫病严重影响公众健康。隐孢子虫卵囊和贾第虫孢囊由于对氯消毒具有高抗性,致病剂量低,来自多种动物,因此对供水造成威胁。目前有记录的隐孢子虫病和贾第虫病暴发已达上百起,因此隐孢子虫和贾第虫是发达国家和我国饮用水标准中两个必检的病原。

家畜、人和野生动物都是地表水中隐孢子虫和贾第虫的主要来源,而每种动物对环境的污染程度取决于环境因素。隐孢子虫属的所有虫种卵囊都有可能污染水,但只有一小部分虫种能够感染人。

由于大部分隐孢子虫卵囊在形态学上难以区分,并且都有污染水的可能性,因此对水中隐孢子虫进行基因分型对于原水管理和风险评估非常重要。基于同样原因,对贾第虫的基因分型也非常重要。

目前对于环境中隐孢子虫卵囊和贾第虫孢囊的检测主要是依赖于美国国家环保局(USEPA)的1623标准方法,英国和其它国家的检测方法与该方法类似。1623方法通过过滤对水中卵囊(孢囊)进行浓缩,进一步对浓缩物用免疫磁分离(IMS)进行纯化后,用免疫荧光抗体和DAPI对卵囊(孢囊)进行染色,并用显微镜观察对染色的卵囊或孢囊进行计数。但是该方法的高运行成本(>21000 RMB/样品)严重制约了它在我国水质检测中的实际应用。另一方面,絮凝已经被证明是一种成本低廉而且操作方便的方法,可用于对不同类型水中隐孢子虫,贾第虫,弓形虫,细菌和病毒的检测。研究表明,明矾絮凝隐孢子虫回收率为59%(接种1,000卵囊/L时);碳酸钙絮凝隐孢子虫回收率为64-75%(接种75-1,000卵囊/L)。当接种85个孢囊/L到河水或者自来水中时,碳酸钙絮凝贾第虫回收率为72-77%。

基于PCR技术检测和鉴定水中隐孢子虫和贾第虫的研究日渐增多。与1623方法不同,目前的PCR方法可以区分感染人和不感染人的隐孢子虫和贾第虫虫种。由于大多数隐孢子虫虫种和基因型具有宿主特异性,因此基因分型工具也经常用于污染源追踪。目前最常采用的隐孢子虫基因分型工具是基于小核糖体亚基(SSU) rRNA基因的PCR结合酶切(RFLP)技术,该方法已被证明可有效用于对地表水、暴雨水、出厂水以及污水样品中隐孢子虫卵囊的基因分型。同样,基于TPI或GDH基因的PCR结合测序的方法可用于区分感染人的贾第虫基因型A和B,以及不感染人的基因型C到H。由于基因型A和B具有广泛的宿主范围,因此对水中贾第虫污染源准确追踪比较困难。

对原水或饮用水中隐孢子虫的基因分型大多在发达国家开展。在发展中国家,只在肯尼亚的一个小研究中对9个原水样品中的隐孢子虫进行了基因分型。由于污水处理和排放标准的严格程度,以及养殖业集中程度在发达国家和发展中国家非常不同,发达国家的研究结果很难适用于发展中国家。在我国,已经有一些通过显微镜镜检检测水中隐孢子虫和贾第虫的报导,但是还没有对原水和饮用水中隐孢子虫分子鉴定的报导。因此,我国以及其它发展中国家水中隐孢子虫污染源以及对人潜在致病性目前还不清楚。本研究目的如下:1)评估我国上海原水被隐孢子虫和贾第虫污染的情况;2)确定污染上海原水的隐孢子虫基因型;3)推断隐孢子虫污染来源和对人的潜在致病性;4)发现一种检测水中隐孢子虫和贾第虫的成本较低的方法;5)分析水质参数和两虫检出之间的关系。

## 2. 材料和方法

### 2.1 取样点

上海是我国最大的城市之一,占地面积为6341 km<sup>2</sup>,人口超过2000万,全长113.4 km的黄浦江为贯穿该城市的主要河流。黄浦江是一条集饮用、灌溉、排放、运输、渔业和旅游/娱乐为一身的多功能河流,目前为上海70%的人口提供原水。2012年,当来自长江的一个水库全部通水后,黄浦江将为上海50%的人口提供原水。黄浦江起源于太湖,流经太浦河、淀山湖以及大治河。大治河在上海1058 km<sup>2</sup>的水源保护区范围内,而在该保护区内,污水排放和养殖业被限制,但是太浦河沿岸,有23个村庄和市镇,总人口为120万,其中一些村镇还是上海家畜和家禽的主要供货源。本研究中原水的取样点位于黄浦江上游,上海自来水厂的取水口。

### 2.2 样品采集和预处理

在2009年5月底到2010年1月中旬期间,共采集50个原水水样,每个样品都被分为2份,每

份 20L。其中一份采用 1623 标准方法进行处理。20L 水通过 Filt-Max xpress 滤芯(IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA)进行过滤后, 采用 Filt-Max xpress 淘洗设备 (IDEXX Laboratories, Inc.)进行淘洗。如果由于堵塞样品没有过滤完, 记录实际过滤体积。19 个(38%)样品没有全部过滤, 过滤的体积在 10-18L 之间, 其中 5 个样品的过滤体积多于 15L, 其它的都在 10-15L 之间。对淘洗液 1500×g 离心(Eppendorf 5810; Eppendorf, Hamburg, Germany)15 分钟后, 采用隐孢子虫和贾第虫的免疫磁分离试剂盒(Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway)对沉淀进行免疫磁分离(IMS)。对每个样品沉淀中的 0.5ml 沉淀 (总沉淀体积的 1/4 到 1/2)通过 IMS 进行纯化。用 FITC 标记的隐孢子虫和贾第虫单克隆抗体 (Aqua-Glo G/C kit, Waterborne, Inc., New Orleans, LA)进行荧光染色, 卵囊和孢囊的内部结构确定采用 DAPI 染色法。根据检测到的卵囊和孢囊数量, 显微镜检所用沉淀占总沉淀的比例, 以及实际过滤的样品体积, 将卵囊和孢囊的数量换算为相当于 10L 水中的含量。另一部分沉淀(0.5 ml)用于提取 DNA 和进行 PCR 分析。

另外的 20L 原水通过碳酸钙絮凝的方法(CCF)进行浓缩。将每个样品分为 2 份, 每份 10L, 并放在广口的塑料桶中。在磁力搅拌器持续搅拌下, 加入 100 ml 1M 氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )和 100 ml 1M 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ), 再用 5M 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )将 pH 调节到 10。将样品静置过夜后, 虹吸吸取上清液, 剩余的沉淀通过加入 200ml 10%的氨基磺酸来溶解。如果沉淀没有完全溶解再加入 100ml 的氨基磺酸, 并将溶解后的沉淀转移到离心管中。用 0.01%的吐温 80 对塑料桶进行洗涤, 先加入 200ml, 然后再加入 100ml, 将这些洗涤液一并转入离心管中, 3000×g 离心 20 分钟后, 去除上清, 记录沉淀体积。采用杜氏磷酸盐对沉淀进行离心洗涤直到 pH 为 7.0。一部分沉淀(0.5 ml) (大部分样品都是样品沉淀的 1/3 或者 1/4, 只有两个样品是 1/9 和 1/12) 通过 USEPA 1623 方法的 IMS, 荧光染色和显微镜检进行处理并将卵囊和孢囊数量换算到相当于 10L 水中的数量, 对另一部分沉淀提取 DNA 并用 PCR 分析。

对于水质参数分析, 总大肠菌群和大肠埃希氏菌采用标准方法 SM 9223B 进行, 采用 Quanti-tray/2000 (IDEXX Laboratories, Inc.)分析。样品的菌落总数也通过 SimPlate(IDEXX Laboratories, Inc.)来分析。浊度通过 HACH 2100P 浊度仪(Hach Co., Loveland, CO)来测量, 总溶解固体(TDS)以及电导率通过 HACH HMP 6P 检测仪(Hach Co.)来检测。

### 2.3 DNA 提取和隐孢子虫基因分型

从过滤或者 CCF 浓缩的 0.5ml 沉淀中提取 DNA, 采用 Fast DNA SPIN 试剂盒(BIO 101, Carlsbad, CA, USA)。样品中的隐孢子虫卵囊通过巢式 PCR 方法进行扩增, 扩增片段为 830-bp 的 SSU rRNA 基因。采用 RFLP 对第二轮 PCR 产物进行分析, 所采用的限制性内切酶为 *SspI* and *VspI*。每个样品都采用 PCR-RFLP 技术进行 5 个平行样分析, 每个 PCR 反应都加入 2ul 的 DNA, 用贝氏隐孢子虫作为阳性参照。为了去除 PCR 抑制物, 在第一轮 PCR 中, 加入了 400ug/ul 的牛血清蛋白(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 所有阳性样品的第二轮 PCR 产物都通过测序确认其基因型。

### 2.4 序列分析

采用 ABI BigDye Terminator v. 3.1 cycle 测序试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 在 ABI 3130 基因分析仪(Applied Biosystems)上对第二轮 SSU rRNA 基因 PCR 产物进行直接测序。序列的准确性通过对 PCR 序列双向测序以及对所有的阳性 PCR 产物进行测序来确定。将测序结果与参考序列用 ClustalX 1.81 来获得([ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/](http://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/))对照分析确定隐孢子虫基因

型。

2.5 统计分析

用 T 检验判断隐孢子虫和贾第虫检出率和物化参数 (浊度, 电导率, TDS)以及微生物参数 (菌落总数、总大肠菌群和大肠埃希氏菌) 的关系。不同方法对隐孢子虫检出率差异比较通过卡方检验分析。 $p < 0.05$  被认为是具有统计学意义。所有的统计分析都是通过 SPSS10 完成(SPSS Inc., Somers, NY, USA)。

3. 结果

3.1 隐孢子虫卵囊和贾第虫孢囊的阳性率

50 个原水样品中, 采用 1623 方法, FITC 染色检出了 16 个样品(32%)为隐孢子虫阳性, 9 个样品(18%)为贾第虫阳性(表 1)。在阳性样品中, 隐孢子虫的密度为 1.8-22 个/10L, 平均 5.2 个/10L, 贾第虫的密度为 2-8 个/10L, 平均 4 个/10L。DAPI 染色表明 16 个隐孢子虫阳性样品中 14 个为 DAPI 阳性, 密度范围为 1.8-9 个/10L, 平均 3.5 个/10L。相反, 9 个贾第虫阳性样品中只有 3 个是 DAPI 阳性, 密度为 3.5-3 个/10L, 平均 2.8 个/10L。两种寄生虫的阳性率和过滤水样体积没有相关性。

对于显微镜检分析的 CCF 浓缩原水样品, FITC 染色表明, 11 个样品(22%)为隐孢子虫阳性, 5 个(10%)为贾第虫阳性(表 1)。在阳性样品中, 隐孢子虫的浓度范围为 2-16 个/10L, 平均 4.5 个/10L, 贾第虫的密度为 1-4.5 个/10L, 平均 2.2 个/10L (表 1)。DAPI 染色表明, 11 个隐孢子虫阳性样品中有 10 个为 DAPI 阳性, 密度为 2-16 个/10L, 平均 4.4 个/10L。5 个贾第虫阳性样品中 3 个为 DAPI 阳性, 密度为 1-2 个/10L, 平均为 1.7 个/10L。有 8 个原水样品用两种方法检测都为隐孢子虫阳性, 但没有一个样品用两种方法检测都是贾第虫阳性。

用 PCR 方法发现 17 个样品为隐孢子虫阳性, 其中 6 个样品来自过滤方法的沉淀, 14 个样品来自 CCF 方法的沉淀, 3 个样品为过滤沉淀和 CCF 沉淀都是阳性。对于过滤沉淀, 所有 PCR 阳性的样品显微镜检都是阴性。对于 CCF 沉淀, 2 个 PCR 检测阳性样品, 显微镜检也是阳性, 剩余 12 个 PCR 阳性样品都是镜检阴性。因为 20 个贾第虫孢囊中只有 6 个是 DAPI 阳性, 而且贾第虫 PCR 分析灵敏性比较低, 所以没有对贾第虫进行 PCR 分析。

表 1 上海原水中隐孢子虫和贾第虫的阳性率

检测 方法	隐孢子虫				贾第虫			
	过滤		CCF		过滤		CCF	
	密度		密度		密度		密度	
	检出率 <sup>a</sup>	(平均值 ±SD) <sup>b</sup>	检出率 <sup>a</sup>	(平均值 ±SD) <sup>b</sup>	检出率 <sup>a</sup>	(平均值 ±SD) <sup>b</sup>	检出率 <sup>a</sup>	(平均值 ±SD) <sup>b</sup>
镜检	16/50 <sup>c</sup>	5.2±6.5	11/50 <sup>c</sup>	4.5±4.3	9/50 <sup>d</sup>	3.8 ±2.1	5/50 <sup>d</sup>	2.2±0.5
PCR	6/50	1.8±0.8	14/50	2.1±1.2	ND <sup>e</sup>		ND	

<sup>a</sup> 阳性样品量/分析样品量 <sup>b</sup> 对于显微镜镜检, 为 10L 水中隐孢子虫卵囊或贾第虫孢囊的密度; 对于 PCR 方法, PCR 阳性重复/每个样品 5 个重复 <sup>c</sup> 8 个样品两种方法检测均为隐孢子虫阳性 <sup>d</sup> 0 个样品为两种方法检测均为贾第虫阳性 <sup>e</sup> ND, 没有检测

3.2 标准方法和 CCF-改进的 1623 方法对于检测隐孢子虫和贾第虫比较

统计分析表明, 虽然过滤法对隐孢子虫和贾第虫均具有较高检出率, 但过滤和 CCF 结合镜检的

方法并无统计学上的差异( $p \geq 0.25$ )。对于隐孢子虫,当样品用过滤方法浓缩时,镜检方法检出率明显高于 PCR 方法 ( $p = 0.02$ );反之,当样品用 CCF 方法浓缩时,镜检方法和 PCR 方法检出率没有统计学差异 ( $p = 0.49$ ) (表 1)。CCF 结合 PCR 检测的隐孢子虫检出率和标准 1623 方法相近 ( $p = 0.66$ )。

3.3 水质参数和隐孢子虫和贾第虫检出之间的关系

在所有的原水样品中,用镜检或 PCR 检测的隐孢子虫阳性样品具有明显低的总大肠菌群( $p = 0.003$ )和大肠埃希氏菌值(表 2;  $p = 0.02$ )。与此相反,隐孢子虫阳性样品具有明显高的电导率( $p = 0.0001$ )和 TDS ( $p = 0.001$ ) (表 3)。对贾第虫,没有发现检出率和水质参数之间的相关性。

3.4 PCR 方法检出的隐孢子虫阳性率

采用限制性内切酶 SspI 和 VspI 对 PCR 产物进行 RFLP 分析,发现了至少 5 个不同的隐孢子虫虫种。对所有 PCR 产物进行 DNA 测序验证了 RFLP 结果,这 5 个虫种分别为:

表 2 原水中总大肠菌群, 大肠埃希氏菌和菌落总数和  
隐孢子虫和贾第虫的检测关系<sup>a</sup>

组别	N	菌落总数的对数		总大肠菌群的对数		大肠埃希氏菌	
		平均值±SD <sup>b</sup>	<i>p</i>	平均值±SD <sup>c</sup>	<i>p</i>	平均值±SD <sup>c</sup>	<i>p</i>
隐孢子虫							
阳性	30	3.98 ±0.44	0.24	3.18 ±0.67	0.003	1.96 ±1.01	0.02
阴性	20	4.12 ±0.31		3.65 ±0.20		2.55 ±0.34	
贾第虫							
阳性	14	3.94 ±0.50	0.30	3.43 ±0.68	0.63	2.15 ±1.00	0.81
阴性	36	4.07 ±0.35		3.34 ±0.55		2.21 ±0.82	

<sup>a</sup> 所有方法检出的隐孢子虫或贾第虫阳性

<sup>b</sup> 1ml 样品的数量

<sup>c</sup> 100 ml 样品的数量

表 3 原水中隐孢子虫和贾第虫的检出和浊度, 电导率和 TDS 的关系<sup>a</sup>

组别	N	浊度 (NTU)		电导率 (uS/cm)		TDS (mg/L)	
		平均值±SD	<i>p</i>	平均值±SD	<i>p</i>	平均值±SD	<i>p</i>
隐孢子虫							
阳性	30	38.20 ± 25.63	0.71	965.23 ± 218.42	0.0001	509.33 ± 154.21	0.001
阴性	20	35.37 ± 26.31		759.60 ± 122.69		380.15 ± 62.02	
贾第虫							
阳性	14	41.79 ± 34.52	0.42	879.71 ± 218.85	0.95	498.36 ± 204.02	0.20
阴性	36	35.24 ± 21.63		884.25 ± 210.72		441.83 ± 105.52	

<sup>a</sup> 所有方法检出的隐孢子虫或贾第虫阳性

表 4 原水样品中的隐孢子虫虫种

样品代码	虫种(检出次数 <sup>a</sup> )	
	过滤方法	絮凝方法
29765		安氏隐孢子虫 (1)
29412		安氏隐孢子虫 (1)
29416		贝氏隐孢子虫 (2), 安氏隐孢子虫(1)
29418		猪隐孢子虫 (1)
29426		安氏隐孢子虫 (2)
29427	猪隐孢子虫 (1)	
29430		安氏隐孢子虫 (1)
29432		安氏隐孢子虫 (3)
29433, 29434	安氏隐孢子虫 (2)	猪隐孢子虫 (1)
29436		安氏隐孢子虫 (3), 猪隐孢子虫 (1)
29437, 29438	安氏隐孢子虫 (2), 猪隐孢子虫 (1)	安氏隐孢子虫 (4)
29439	猪隐孢子虫 (1), 安 氏隐孢子虫 (1)	
29441	人隐孢子虫 (1)	
29443, 29444	猪隐孢子虫 (2)	猪隐孢子虫 (1), 安氏隐孢子虫 (1)
29446		安氏隐孢子虫 (1)
29448		安氏隐孢子虫 (2)
29452		火鸡隐孢子虫 (2), 安氏隐孢子虫 (1), 贝氏隐孢子虫 (1)
Total positive	6	14
Total species	安氏隐孢子虫 (5), 猪隐孢子虫 (5), 人 隐孢子虫 (1)	安氏隐孢子虫 (21), 猪隐孢子虫 (4), 贝氏隐孢子虫 (3), 火鸡 隐孢子虫 (2)

<sup>a</sup> 检出的 PCR 阳性重复次数

安氏隐孢子虫, 猪隐孢子虫, 贝氏隐孢子虫, 人隐孢子虫和火鸡隐孢子虫 (表 4 和表 5)。其中, 安氏隐孢子虫最普遍, 在 14 个样品的 26 个 PCR 产物中被检出。猪隐孢子虫在 7 个样品的 9 个 PCR 产物中被发现, 贝氏隐孢子虫在 2 个样品的 3 个 PCR 产物中被发现, 人隐孢子虫在 1 个样品的 1 个 PCR 产物中被发现, 火鸡隐孢子虫在 1 个样品的 2 个 PCR 产物中被发现(表 5)。在所有的 17 个 PCR 阳性样品中, 7 个样品(41.2%)具有 2 个或以上虫种, 其中 6 个样品包括 2 个虫种, 1 个样品包括 3 个虫种(表 4)。

采用 CCF 浓缩的样品 PCR 检出阳性率(14 个样品, 30 个 PCR 重复)比采用过滤浓缩的样品要多(6 个样品, 11 个 PCR 重复)(表 4 和 5)。与之对应, CCF 浓缩样品中所发现的隐孢子虫虫种(安氏隐孢子虫, 猪隐孢子虫, 贝氏隐孢子虫和火鸡隐孢子虫)比过滤浓缩发现的虫种(安氏隐孢子虫, 猪隐孢子虫和人隐孢子虫)也要多。在 CCF 浓缩样品中, 12 个样品含有安氏隐孢子虫, 4 个有猪隐孢子虫, 2 个有贝氏隐孢子虫, 1 个有火鸡隐孢子虫。过滤样品中, 3 个样品有安氏隐孢子虫, 3 个有猪隐孢子虫, 1 个有人隐孢子虫 (表 4)。

4. 讨论

采用标准 1623 方法, 50 个原水样品, 32%为隐孢子虫阳性, 18%为贾第虫阳性。在原水中发现

隐孢子虫卵囊和贾第虫的孢囊在预期之中，因为研究区域靠近人口密集的发达区域。本研究中隐孢子虫的检出率和我国其它研究类似，但贾第虫检出率比其它研究要低。隐孢子虫在原水中检出率和法国、芬兰、匈牙利、葡萄牙和西班牙的研究结果(20-40%)类似。同时，贾第虫的阳性率和芬兰、挪威、葡萄牙的研究结果类似(11.8%-16.7%)。

表 5 过滤和 CCF 方法检测水中隐孢子虫的密度

虫种	主要宿主	人类致病性?	阳性样品数	检出次数 <sup>a</sup>	
				过滤	CCF
安氏隐孢子虫	牛	很少	14	5	21
猪隐孢子虫	猪	很少	7	5	4
贝氏隐孢子虫	禽类	否	2	0	3
人隐孢子虫	人	是	1	1	0
火鸡隐孢子虫	禽类	是	1	0	2

<sup>a</sup> 阳性 PCR 重复次数

采用显微镜镜检检测隐孢子虫和贾第虫，尽管过滤浓缩结果高于 CCF 浓缩，但这些结果在统计学上没有差异( $p \geq 0.25$ )。本研究中的差异可能由于原水样品的浊度过高 (12 到 157 NTU)。以前研究发现，隐孢子虫卵囊和贾第虫孢囊过滤浓缩的回收率和样品浊度正相关，但 CCF 浓缩的回收率和浊度负相关。另外，本研究中 CCF 方法得到的沉淀量(2-4 ml)要比过滤方法(1-2.5 ml)多，由此导致用 CCF 过滤时，用于 IMS 纯化和镜检的沉淀量比过滤浓缩要多。另外，絮凝物可能对 IMS 分离卵囊或孢囊时具有一定抑制效应，尽管该因素在本研究以及以前研究中并未被报道。

和镜检相比，当进行 PCR 分析时，过滤浓缩隐孢子虫检出率(12%)比 CCF 浓缩检出率低(28%) (表 1)，尽管采用 FastDNA SPIN 试剂盒，并加入了 400 ng/μl 牛血清蛋白去除 PCR 抑制物，但这些方法被认为比直接从 IMS 纯化物中提取 DNA 并进行 PCR 方法灵敏性要低。至于絮凝过程中一些化学处理是否对 PCR 抑制物产生了中和，由此提高了 PCR 对隐孢子虫的检出率，目前尚不清楚。

本研究中，大部分显微镜检隐孢子虫阳性样品都为 PCR 阴性，这可能由多种因素导致。水样中隐孢子虫卵囊比较少，只有一部分沉淀被用来进行镜检或 PCR 检测，而且在大多数的镜检阳性样品中只检测到了 1 个卵囊。卵囊的随机分配有可能是导致 PCR 和镜检结果不一致的原因之一。环境样品中隐孢子虫空壳的比例会比较高。本研究中过滤浓缩的 37 个卵囊中有 15 个，CCF 浓缩的 25 个卵囊中有 3 个都是 DAPI 阴性。在过滤浓缩时空壳频率可能是导致 PCR 检出率低的原因之一，因为显微镜检能够检出空壳而 PCR 不能。在最近卢森堡的一个研究中，显微镜阳性的结果中只有 25%可以通过 PCR 验证。

絮凝和 PCR 结合是一个有效的检测水中隐孢子虫并对其溯源的方法。尽管隐孢子虫和贾第虫检测在我国的水质标准中有规定，但由于 1623 标准方法具有高运行成本(每个样品 2100RMB，包括滤芯，化学试剂，IMS 和染色试剂)的弊端，导致了这两种病原在日常水质检测中很难被定期检测，使得昂贵的检测设备 (53 万 RMB，包括离心，过滤，淘洗，IMS 设备,荧光显微镜)在许多水厂和实验室被闲置。本研究中，尽管 CCF 浓缩的样品经显微镜镜检的阳性率比过滤浓缩要低，但当 CCF 和 PCR 结合后，隐孢子虫的检出率和标准 1623 方法相近( $p = 0.66$ )。目前，一些管理机构正在制定将隐孢子虫分型作为标准 1623 方法的后续方法，CCF 结合 PCR 方法可能是一个可行的选择。CCF 结合 PCR 的一个缺点就是它不能像 1623 方法那样进行定量，但这可以通过用阳性 PCR 重复占有

PCR 重复的比例(表 1)来估计污染严重程度而得到部分解决。许多研究都表明 1623 方法会高估水中隐孢子虫对人类的危害,因为它无法区分使人致病和不致病的虫种,而 CCF 结合 PCR 方法以其基因分型能力在这方面占有优势。和传统的过滤/IMS/显微镜检相比,CCF 结合 PCR 具有成本低的优势(700 RMB/样品,包括化学试剂,PCR 试剂盒和测序等;18 万 RMB 设备费用,包括离心机和 PCR 仪等),使得它可以成为发展中国家原水中隐孢子虫检测的一个经济实用的方法。CCF 方法的一个不足之处就是它不能对出厂水进行研究,因为出厂水浊度较低,而且需要处理大量的体积(100 L 或者更多)。

本研究中,显微镜检或者 PCR 检出的隐孢子虫阳性都具有较高的电导率和 TDS,但具有较低的总大肠菌群和大肠埃希氏菌。导致这些现象的生物和环境基础目前并不清楚。隐孢子虫和贾第虫的检出与电导率的关系在马来西亚的娱乐水中以及卢森堡的饮用水研究中有报道。在阿根廷,有机物被发现能够明显影响隐孢子虫和贾第虫在原水中的检出。在一些研究中,总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌被报道和隐孢子虫和贾第虫的检出相关,如在意大利,卢森堡公园,西班牙,美国,加拿大和阿根廷,尽管在一些其它研究中,并没有发现总大肠菌群和大肠埃希氏和隐孢子虫检出之间具有相关性。无论如何,本研究中微生物参数和隐孢子虫的检出负相关是出乎意料的。本研究中一些原水样品中的高浊度和较低的样品量可能是导致本研究和其它研究结果有差异的原因。

基因分型结果表明隐孢子虫对上海原水中的污染主要来自于养殖业,尤其是养牛场。在本研究中安氏隐孢子虫是隐孢子虫主要虫种,80% (14/17)的阳性样品都含有此虫种。安氏隐孢子虫主要感染幼龄牛和成年牛,很少在其它动物,如羊、猪或马中被发现。有趣的是,其它在牛中比较流行的隐孢子虫种,如感染断奶前犊牛的微小隐孢子虫,和感染成年牛的牛隐孢子虫和瑞氏隐孢子虫(*C. ryanae*)在本研究中并没有被发现,表明上海原水中污染的隐孢子虫主要来自于成年牛。类似结果在美国波拖马可河和其它流域以及一些其它发达国家的研究报告中也有报道。

基因分型结果还表明猪和鸟类也一定程度上污染了上海原水。本研究发现的猪隐孢子虫是感染猪的主要虫种,而贝氏隐孢子虫和火鸡隐孢子虫是感染鸟的主要虫种。猪隐孢子虫目前还没有在其它研究的原水中被发现,贝氏隐孢子虫仅在一个加拿大样品和一个德国样品中被报道,火鸡隐孢子虫仅在日本的 2 个样品中被发现。在一个国际化大都市的较短河流中发现来自于农场的虫种在意料之外,但该结果与河流上游流经的一些乡镇是家畜的主要供应商的情况相一致。

令人奇怪的是,城市污水排放并不是本研究中隐孢子虫污染的主要来源。之前在上海未经处理的污水中研究发现,人隐孢子虫是最主要的虫种。但在本研究中,只发现 1 个原水样品有人隐孢子虫虫种,这可能是由于取样点位于上海的水源保护区。来自于野生动物的隐孢子虫虫种在本研究中没有被发现,这与许多发达国家野生动物是污染水的隐孢子虫主要来源之一的情况明显不同。所研究的黄浦江河流位于中国最发达的区域之一,具有较高的人口密度和高动物养殖密度。

在水中发现的所有的 5 个隐孢子虫虫种中,只有人隐孢子虫和火鸡隐孢子虫是感染人的主要虫种。人的隐孢子虫病主要由人隐孢子虫和微小隐孢子虫导致。尽管火鸡隐孢子虫也感染人,但它在本研究中阳性率较低。到目前为止,安氏隐孢子虫和猪隐孢子虫感染人的案例仅有 2 例和 3 例。由于本研究中所发现的大部分卵囊都不使人致病,显示用基因分型方法研究水中隐孢子虫虫种的必要性。

总之,上海原水中隐孢子虫和贾第虫的检出,代表一些可能的水质安全问题和对公众健康的影



响。研究结果也表明对原水进行两虫常规检测是必要的,但常规检测受到 1623 方法高昂运行费用的制约,并且 1623 方法无法准确评估水中污染的隐孢子虫的致病风险。相反,将 CCF 方法和 PCR 结合用于对病原体的浓缩、检测和基因分型可以对水中隐孢子虫的污染程度、污染来源和对人致病性进行有效评估。本研究中,采用 CCF 和 PCR 结合的方法,发现隐孢子虫主要来源于家畜,并发现大多数隐孢子虫卵囊不使人致病。在进一步改进后,该技术有可能可被用于发展中国家检测原水中隐孢子虫和贾第虫的一个替代标准 1623 方法的更为经济有效的方法。

## CP15 亚单位疫苗对小鼠隐孢子虫感染的免疫保护效果研究

苏庆美<sup>1,2</sup> 何生虎<sup>2</sup> 米荣升<sup>1</sup> 黄燕<sup>1</sup> 周鹏<sup>1</sup> 张国恩<sup>1</sup> 秦培兰<sup>1</sup> 呼高伟<sup>1</sup> 陈兆国<sup>1\*</sup>

(1. 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开放实验室

中国农业科学院动物源性食品安全研究中心, 上海 200241)

(2. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 为观察重组表达的 CP15 抗原对小鼠隐孢子虫感染的免疫保护效果,将重组质粒 pET-28a-CP15 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达,用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析蛋白的表达情况和反应原性。将纯化的重组表达蛋白与弗氏佐剂充分乳化后免疫 BALB/c 小鼠,观察疫苗诱导的体液、细胞免疫水平及对隐孢子虫感染的免疫保护效果。结果显示,成功表达了隐孢子虫鼠基因型 (*Cryptosporidium* mouse genotype) CP15 基因,Western blot 分析表明制备的重组蛋白具有良好的免疫活性。免疫小鼠血清中特异性抗体 IgG 水平随免疫次数的增加而增加,在第 3 次免疫后达到最高,极显著高于对照组 ( $P<0.01$ );  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞百分率、T 淋巴细胞增殖反应、IL-18 和 IFN- $\gamma$  分泌水平均极显著高于对照组 ( $P<0.01$ )。感染后小鼠粪便卵囊的 real time PCR 检测结果显示,与对照组相比,免疫组小鼠卵囊排出量极显著低于对照组 ( $P<0.01$ ),减卵率达到 99.3%,排卵时间缩短为 1 d,表明制备的亚单位疫苗免疫后小鼠产生了较强的免疫保护效果。

**关键词:** 隐孢子虫鼠基因型; 子孢子表面抗原 CP15; 亚单位疫苗; 免疫保护; 细胞免疫

隐孢子虫 (*Cryptosporidium* spp.) 是一种重要的呈世界性分布的机会性致病寄生原虫,可感染从热带到温带的 170 多种动物,引起人兽共患的隐孢子虫病 (cryptosporidiosis),导致严重的腹泻、厌食、精神沉郁和进行性消瘦,甚至死亡,造成重大的经济损失。由于目前没有治疗隐孢子虫病的特效药,有必要开发安全有效的疫苗来防治该病。

基因工程亚单位疫苗 (subunit vaccine) 是利用 DNA 重组技术,把编码保护性抗原的基因与载体连接,形成重组体,再转化感受态细胞,使得保护性抗原基因在被转化的细胞中表达,表达蛋白经纯化后加佐剂制备成疫苗。迄今,基因工程亚单位疫苗仍然是动物疫病疫苗发展的主要方向之一,在口蹄疫 (foot-and-mouth disease)、传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD), 以及疟疾 (malaria)、利什曼原虫病 (leishmaniasis)、弓形虫病 (toxoplasmosis) 等疫苗中取得了明显的进展,部分疫苗已经上市或进入 III 期临床试验,主要原因在于亚单位疫苗具有抗原明确,不受环境影响等