

应用 FTA/PCR 检测粪便中隐孢子虫的实验研究

田利光¹ 张小萍² 陈韶红¹ 刘琴¹ 郭俭¹ 蔡玉春¹ 陈家旭¹ 周晓农^{1*}

【摘要】 目的 建立用 FTA/PCR 检测粪便中隐孢子虫的技术,并与常用的商业化的粪便 DNA 抽提试剂盒进行比较。方法 选择经病原学检测已经确诊的隐孢子虫阳性和阴性粪便,分别采用 FTA 卡和商业化 DNA 抽提试剂盒抽提粪便样本中 DNA,进行巢式 PCR 扩增,对 PCR 阳性产物进行测序并利用 BLAST 在 NCBI 上与 GenBank 数据库进行比对,做同源性分析,确定虫种。结果 应用商业化 DNA 抽提试剂盒抽提 DNA,无论是否反复冻融破壁,2 个阳性对照样本扩增出目的片段,另 3 个阳性样本未扩增出特异性条带。样本纯化后应用 FTA 卡抽提 DNA 进行 PCR 检测,所有阳性粪样均扩增出 830 bp 左右的目的片段,通过测序和比对,其中 2 个为贝氏隐孢子虫,1 个为火鸡隐孢子虫。结论 应用 FTA 进行粪便样本中隐孢子虫 DNA 的抽提方法具有简单有效、快速灵敏、准确可靠等特点,可以应用于粪便中隐孢子虫的检测。

【关键词】 隐孢子虫;巢式 PCR;检测

Detection of *Cryptosporidium* spp. in human stool samples with FTA-PCR TIAN Li-guang¹, ZHANG Xiao-ping², CHEN Shao-hong¹, LIU Qin¹, GUO Jian¹, CAI Yu-chun¹, CHEN Jia-xu¹, ZHOU Xiao-nong^{1*}.

¹National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China ²Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

* Corresponding author; ZHOU Xiao-nong, Email: ipdzhouxn@sh163.net

Supported by the National S & T Major Project (2008ZX10004-011)

【Abstract】 Objective To develop a FTA-PCR technique for detection of *Cryptosporidium* spp. in human stool samples, and compare it with QIAamp DNA Stool Mini Kit-PCR. **Methods** Both FTA and QIAamp DNA Stool Mini Kit were employed for DNA extraction for *Cryptosporidium* spp. in positive and negative stools which had been confirmed by etiological examination. The SSU rRNA fragment of *Cryptosporidium* spp. was amplified by nested PCR from DNA extracts of human stool samples. After purification, the gene fragments were sequenced and the sequences were determined and analyzed by BLAST. **Results** The amplified fragments of *Cryptosporidium* spp. using FTA-PCR were about 830 bp in length, through identified in the GenBank, two of them were *C. Baileyi* and one of them was *C. meleagridis*. Among stools that were extracted DNA by QIAamp DNA Stool Mini Kit, only two samples were amplified with positive gene fragment of *Cryptosporidium* spp. **Conclusion** The FTA-PCR is a simple, sensitive and valid technique for detecting *Cryptosporidium* spp. in human stool samples.

【Key words】 *Cryptosporidium* spp.; Nested PCR; Detection

隐孢子虫病是一种在全球广泛流行的人兽共患寄生虫病,1907 年由 Tyzzer 首先发现^[1]。1976 年 Nime 等^[2]报告了首例人感染隐孢子虫病例,1980 年以后,随着艾滋病的出现,隐孢子虫才逐渐受到人们的关注。1989 年和 1993 年的两次水源性大暴发^[3-4],使得隐孢子虫成为人们关注的焦点。目前隐

孢子虫病已经被确定为引起人类腹泻的 6 大病因之一。正常人感染隐孢子虫后常引起急性自限性腹泻,但免疫力低下和免疫功能缺陷患者如艾滋病患者合并感染隐孢子虫后常造成严重持续性腹泻,是艾滋病患者死亡的主要原因之一^[5]。随着艾滋病在全球的传播和流行,人们对隐孢子虫的研究也在不断深入^[6]。1987 年韩范等^[7]在南京首先发现了我国人感染隐孢子虫病病例,随后全国各地相继报道了一些病例^[8-11]。隐孢子虫病的相关研究逐渐引起我国科研工作者的关注^[12],目前隐孢子虫的检测方法主要是镜检,但是由于隐孢子虫体积小,直径

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2011.04.005

基金项目:国家传染病防治重大专项(2008ZX10004-011)

作者单位:¹200025 上海,中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室;²200336 上海,上海市疾病预防控制中心

* 通信作者:周晓农,Email: ipdzhouxn@sh163.net

在 4.5 ~ 5.5 μm , 在显微镜下很难辨别, 检出率低且易导致误判。利用巢式 PCR 检测粪便中隐孢子虫的方法具有灵敏度高、简便易行、能分辨基因型等特点^[13-14], 但由于粪便中杂质很多, 如何对粪便样本进行前期处理, 获得较为纯净的 DNA 模板成为 PCR 检测成败的关键因素之一, 传统的 DNA 抽提方法如酚/氯仿抽提法、各种 DNA 抽提试剂盒等操作繁琐、费时费力且敏感性低。本文采用英国 Whatman 公司生产的 FTA 卡抽提 DNA 的方法来检测粪便中的隐孢子虫。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验样本

贝氏隐孢子虫 (*Cryptosporidium baileyi*) 阳性粪便和卵囊由上海市疾病预防控制中心惠赠, 贝氏隐孢子虫 DNA 由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠。3 例隐孢子虫阳性粪便和 1 例隐孢子虫阴性粪便从安徽阜阳采集, 经改良抗酸染色镜检确诊, 粪便样本在 2.5% 的重铬酸钾溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒购自美国 QIAGEN 公司, FTA 卡及相应纯化试剂购自英国 Whatman 公司, FTA 卡洗涤试剂 (TE 缓冲液)、1% 小牛血清白蛋白 (BSA) 和 2 \times Taq PCR Master Mix 购自上海莱枫生物科技有限公司。

1.3 巢式 PCR 引物

参照文献[14]设计引物, 第 1 轮 PCR 引物: F1: 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3', R1: 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'。第 2 轮引物: F2: 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3', R2: 5'-CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 粪便纯化方法

取保存于 2.5% 重铬酸钾溶液中的粪便样本, 用 45 μm 的金属筛过滤, 离心, 去上清, 加去离子水至 50 ml, 1 500 \times g 离心 10 min, 弃上清, 按 4:6 (乙酸乙酯: 水) 加入 50 ml 离心管内, 静置 5 min, 1 500 \times g 离心 20 min, 弃上清, 加饱和糖水 40 ml, 静置 10 min, 1 500 \times g 离心, 移取上层 3 ~ 4 ml 液体至 15 ml 离心管内, 用 10 ml 水重悬沉淀, 1 500 \times g 离心 15 min, 洗 2 次, 弃上清, 50 μl 水重悬。

1.5 DNA 抽提方法

FTA 卡抽提: 处理 1: (1) 将上述纯化好的隐孢子虫卵囊 10 μl 滴到 FTA 卡上, 室温干燥, (2) 用直径 6 mm 的打孔器从 FTA 卡上取样本, 放入 1.5 ml 离心管内, (3) 加入 200 μl FTA 纯化试剂, 室温培养 5 min, (4) 吸去纯化试剂, (5) 重复 (3)-(4) 步骤 2 次, (6) 加入 200 μl TE 缓冲液, 室温孵育 5 min, (7) 吸去缓冲液, (8) 重复 (6)-(7) 步骤 1 次, (9) 把 FTA 室温干燥 1 h, 经以上步骤处理的 FTA 卡可以用于 PCR 实验。处理 2: 取未经纯化的粪样和阳性卵囊样本直接点到 FTA 卡上, 重复 (2)-(9)。

QIAamp DNA 试剂盒抽提: 处理 1: 取保存在 2.5% 的重铬酸钾内的粪便样本 0.5 ml 加入到 2.0 ml 的离心管中, 用蒸馏水洗涤 3 次, 1 500 \times g 离心 10 min, 反复冻融 5 次 (-70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min), 按照试剂盒操作说明抽提 DNA。处理 2: 未进行反复冻融, 直接按照试剂盒操作说明抽提 DNA。

1.6 巢式 PCR 扩增

第 1 轮 PCR 反应体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 50 μl 、F1 1 μl 、R1 1 μl 、BSA 2 μl 、ddH₂O 45 μl 、样本 DNA 1 μl (或 FTA 样品卡直接做模板); 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 第 2 轮 PCR 反应体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μl 、F2 1 μl 、R2 1 μl 、BSA 1 μl 、ddH₂O 20 μl 、第 1 轮 PCR 产物 2 μl ; 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 扩增产物 10 μl , 在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察并拍照。

1.7 DNA 纯化、测序与数据库比对分析

将第 1 轮 PCR 产物直接纯化送上海生工生物技术服务公司双向测序, 利用 BLAST 在 NCBI 上与 GenBank 数据库进行比对, 做同源性分析, 确定虫种。

2 结果

2.1 DNA 试剂盒抽提 DNA 检测结果

6 个样品无论是否进行冻融破壁, 阳性粪便对照和阳性卵囊对照均扩增出了 830 bp 左右的目的片段, 而另外 3 份阳性粪便和 1 份阴性粪便样本均未扩增出特异性目的片段 (表 1)。

表 1 用不同方法抽提 DNA 进行 PCR 检测粪便中隐孢子虫结果

Table 1 PCR detection results of using different methods to extract DNA from stool samples

样本 Samples	试剂盒抽提 DNA QIAamp Mini Kit extracting DNA		FTA 卡抽提 DNA FTA extracting DNA	
	反复冻融破壁	未反复冻融破壁	经饱和糖水纯化	未经饱和糖水纯化
阳性粪便对照 Positive control stool	+	+	+	-
阳性卵囊对照 Positive egg stool	+	+	N	+
阳性粪便 A Positive stool A	-	-	+	-
阳性粪便 B Positive stool B	-	-	+	-
阳性粪便 C Positive stool C	-	-	+	-
阴性粪便 Negative stool	-	-	-	-

+ : 扩增出 830 bp 目的片段, - : 未扩增出目的片段, N: 无此项

2.2 FTA 卡抽提 DNA 检测结果

经饱和糖水纯化后的再点样到 FTA 卡上的 5 个粪便样本, 除阴性粪便样本外, 均扩增出了 830 bp 左右的目的片段, 而未经饱和糖水纯化, 直接点样到 FTA 卡上的 5 个粪便样本均未扩增出特异的目的片段, 直接点样到 FTA 卡上的阳性卵囊对照扩增出 830 bp 左右的目的片段(表 1, 图 1、2)。

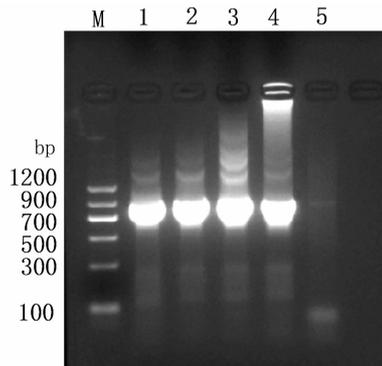


图 1 阳性对照样本 FTA 卡抽提 DNA 后 PCR 产物电泳结果
M: DNA 标志物; 1: 纯化-FTA 卡抽提 DNA 的阳性粪便对照;
2: 未纯化-FTA 卡抽提 DNA 的阳性卵囊对照; 3~4: DNA 阳性对照; 5: 阴性对照

Fig. 1 PCR detection results of using FTA to extract DNA from positive control samples

M: DNA marker, 1: Positive control extracted DNA by FTA card with purification, 2: Positive control extracted by FTA card without purification, 3-4: Positive DNA control, 5: Negative control

2.3 DNA 序列与生物信息学分析

对 PCR 产物进行基因测序发现, 经过纯化后再用 FTA 卡抽提 DNA 的 6 号、8 号阳性粪便样本的产物长度分别为 828 bp 和 830 bp, 序列比对分析显示该基因序列与贝氏隐孢子虫的同源性为 99%, 推测 6 号和 8 号样本均为贝氏隐孢子虫。9 号产物长度为 849 bp, 序列比对分析显示该基因序列与火鸡隐孢子虫的同源性为 99%, 推测 9 号样本为火鸡隐孢子虫。

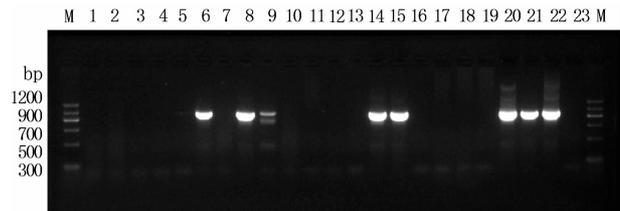


图 2 不同 DNA 抽提方法 PCR 产物电泳结果

M: DNA 标志物; 1~5: 未纯化-FTA 抽提 DNA; 6~9: 纯化-FTA 卡抽提 DNA; 10~15: 反复冻融-试剂盒抽提 DNA; 16~21: 未反复冻融-试剂盒抽提 DNA; 22: 阳性对照; 23: 阴性对照

Fig. 2 PCR detection results of using different methods to extract DNA from stool samples

M: DNA marker, 1-5: DNA extracted by FTA card without purification, 6-9: DNA extracted by FTA card with purification, 10-15: DNA extracted by Kit with freezing and thawing repeatedly, 16-21: DNA extracted by Kit without freezing and thawing repeatedly, 22: Positive control, 23: Negative control

3 讨论

隐孢子虫为体积微小的球虫类寄生虫, 广泛寄生于人和动物体内, 人群对该病原体普遍易感^[15], 常产生无症状感染或自限性腹泻。婴幼儿、艾滋病患者及免疫功能低下人群更易感染, 是艾滋病患者常见的机会性感染病原体之一。正常宿主感染隐孢子虫一般呈自限性, 并产生稳固的免疫力, 主要临床表现为水泻, 偶可带有黏液, 但不含白细胞及血液, 部分患者伴有恶心、呕吐、发热、腹痛或不适。先天性或获得性免疫缺陷者感染隐孢子虫病情多较严重, 且病程迁延, 甚至致命。目前病原学诊断仍是隐孢子虫病确诊的金标准, 现在多使用分离纯化方法将粪便中的隐孢子虫卵囊进行浓集, 再通过染色法后检查, 可以有效地提高检出率, 但是由于隐孢子虫卵囊很小, 通常直径在 4.5~5.5 μm, 在普通光镜下不易识别, 常导致漏诊或误诊^[16], 需要有经验的阅片人员来诊断, 因此常用的病原学诊断方法如改良

抗酸染色法的检出率很低,且无法对卵囊进行准确分型,随着分子生物学技术的发展,PCR 检测技术在病原检测和分子诊断方面得到了广泛的应用,已经成为一种最为常用的病原学检测方法。应用 PCR 技术检测粪便中隐孢子虫卵囊的技术日趋成熟^[17-19],但是传统的 DNA 抽提方法存在操作步骤繁琐、对实验设备要求高、价格昂贵、限于实验室里完成等缺点。本研究采用 Whatman 公司生产的 FTA 卡抽提 DNA 的技术,其操作简单,敏感性高^[20-21],证明是一个较好的抽提粪便中隐孢子虫卵囊的方法,值得推广。

本研究显示,直接把粪样不经任何纯化处理,直接在 FTA 卡上抽提 DNA 的方法效果最差,包括阳性对照在内均未扩增出有效的目的片段,而经过对粪样过滤、纯化后在 FTA 卡上点样抽提 DNA 的方法效果最好,3 个阳性粪样和 2 个阳性对照样本均扩增出目的片段。由于隐孢子虫卵囊壁比较厚,在抽提 DNA 时必须使卵囊破壁后才能有效地抽提 DNA,本次使用 DNA 抽提试剂盒方法抽提粪样中隐孢子虫的 DNA,无论抽提前是否进行反复冻融破壁,2 个阳性对照样本均扩增出有效的目的片段,而 3 个阳性粪便样本均未扩增出有效的目的片段,提示在粪便隐孢子虫浓度较低的情况下不适宜用 DNA 抽提试剂盒来抽提 DNA。

FTA 卡是英国 Whatman 公司的专利产品,由变性剂、螯合剂和自由基浸渍而成,隐孢子虫卵囊滴加到 FTA 卡上后,卵囊自动破壁,释放出 DNA 结合到滤膜上,其他的裂解碎片以及 PCR 抑制因子等均被纯化试剂和洗涤剂洗涤除去,因此可以达到较高的敏感性,而且 FTA 卡携带方便,在室温下可以长期保存,整个过程操作简单方便,对设备要求低,在现场点样完成后可以很方便地把 FTA 卡带回实验室进行后续步骤的操作,具有很强的实用性,非常适合在野外或是实验条件较差的现场使用。本研究应用 FTA 卡抽提 DNA,巢式 PCR 和 DNA 测序相结合检测粪便中隐孢子虫的方法,证明是简单有效、快速灵敏、准确可靠的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1907, 5:12-13.
- [2] Nime FA, Burek JD, Page DL, et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*[J]. Gastroenterology, 1976, 70(4): 592-598.
- [3] Richardson AJ, Frankenberg RA, Buck AC, et al. An outbreak

of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire[J]. Epidemiol Infect, 1991, 107(3): 485-495.

- [4] Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply[J]. N Engl J Med, 1994, 331(3):161-167.
- [5] O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals[J]. Int J Parasitol, 1995, 25(2):139-195.
- [6] Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis[J]. Trends Parasitol, 2008, 24(4):184-189.
- [7] 韩范, 谭渭仙, 周性兰. 南京地区人体隐孢子虫病 2 例报告[J]. 江苏医药, 1987, 13:692.
- [8] 黄民主, 戴卫平. 男性静脉吸毒人员中隐孢子虫感染的调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2):121, 132.
- [9] 申丽洁, 李伟. 大理地区静脉吸毒人群隐孢子虫感染调查[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(11):1295-1296.
- [10] 许礼发, 李朝品, 张荣波, 等. 安徽省学生隐孢子虫感染特征的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(4):265-267.
- [11] 周红芳, 朱民, 袁家麟, 等. 上海市卢湾区不同人群隐孢子虫感染情况调查[J]. 上海预防医学, 2005, 17(9):430-432.
- [12] 张晓琴, 路浩, 罗予, 等. 河南省三株人源隐孢子虫分离株鉴定[J]. 河南预防医学杂志, 2006, 17(2):79.
- [13] 赵杰, 张龙现, 李逐波. 隐孢子虫病研究进展[J]. 河南畜牧兽医, 2008, 29(5): 8-9.
- [14] Xiao L, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(4):1578-1583.
- [15] 沈继龙. 线虫//李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 202-204.
- [16] Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(12-13):1305-1322.
- [17] Amar CF, Dear PH, McLauchlin J. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt8): 681-683.
- [18] McLauchlin J, Amar CF, Pedraza-Diaz S, et al. Polymerase chain reaction-based diagnosis of infection with *Cryptosporidium* in children with primary immunodeficiencies[J]. Pediatr Infect Dis J, 2003, 22(4):329-335.
- [19] Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, et al. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(11): 3849-3855.
- [20] 李晓虹, 闫东丽. FTA/PCR 检测加入饮料中的隐孢子虫[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(2):158-159.
- [21] 闫东丽, 李晓虹, 叶邦策. 3 种抽提隐孢子虫卵囊 DNA 方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2):276-278.

(收稿日期:2011-03-03)

(本文编辑:陈勤)