

保存在重铬酸钾中的微小隐孢子虫卵囊活性及传染性研究

陈甫^{1,2}, 黄克和¹

(¹南京农业大学动物医学院, 南京 210095; ²青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109)

摘要:探索保存在4℃ 2.5%重铬酸钾(K₂Cr₂O₇)中1~30个月的微小隐孢子虫卵囊(CPO)的活性和对免疫抑制BALB/c小鼠的传染性。通过体外脱囊技术评价卵囊的活性,以BALB/c小鼠为感染模型,通过检测CPO感染小鼠的潜伏期、排卵囊数量和回肠末端绒毛中的隐孢子虫数量来评价卵囊的传染性。结果表明:保存在K₂Cr₂O₇中1~16个月的卵囊出现脱囊;免疫抑制BALB/c小鼠在感染保存1~16个月的卵囊后3~8天开始排出大量的卵囊,且在末端回肠绒毛中寄生有大量的隐孢子虫;卵囊的保存时间与潜伏期之间存在强烈的相关性($R^2=0.92$)。因此,CPO在4℃ K₂Cr₂O₇中能保持活性和传染性至少16个月,K₂Cr₂O₇是保存CPO的良好介质。

关键词:重铬酸钾;微小隐孢子虫卵囊;活性;传染性;体外脱囊

中图分类号:S852.7 文献标识码:A

Viability and Infectivity of *C. parvum* oocysts Preserved in 2.5 Percent of Potassium Dichromate

Chen Fu^{1,2}, Huang Kehe¹

(¹College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

²College of Animal science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109)

Abstract: The present study was undertaken to compare the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts (CPO) that had been stored for 1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 25 and 30 months at 4 °C in 2.5% potassium dichromate (K₂Cr₂O₇), respectively. An excystation protocol was performed *in vitro* to evaluate the viability of oocysts. One hundred and eighty female BALB/c mice were used to evaluate the infectivity of oocysts by detecting the prepatent period of *C. parvum* infection, the quantity of oocysts excreted, and the number of parasites that colonized the villi of the ileum. Results showed that CPO preserved in K₂Cr₂O₇ for 1 to 16 months were capable of excystation *in vitro* and infection of mice *in vivo*. The prepatent period was extended from 3 to 8 days as the storage time of oocysts increased. There was a strong correlation between prepatent period and duration of oocyst storage ($R^2=0.92$). Large number of oocysts were isolated and purified from feces of mice inoculated oocysts preserved for 1 to 16 months in K₂Cr₂O₇, respectively. *Cryptosporidia* parasitized in the terminal ilea were found in mice inoculated with oocysts stored in K₂Cr₂O₇ for 1 to 16 months. Conclusion: *C. parvum* oocysts may be stored at 4 °C in K₂Cr₂O₇ for at least 16 months for the purposes of laboratory research, and K₂Cr₂O₇ is a good medium of keeping viability and infectivity of CPO for a long time.

Key words: potassium dichromate, *C. parvum* oocyst, viability, infectivity, excystation *in vitro*

基金项目:国家自然科学基金资助项目“动物隐孢子虫病免疫诊断方法和自由基生物学研究”(39870575);博士点基金资助项目“动物隐孢子虫的基因分型和分子流行病学研究”(20030307022);国家重点实验室开放基金“动物隐孢子虫病的发病机理与中药防治研究”。

第一作者简介:陈甫,男,1979年出生,博士,讲师,主要从事动物隐孢子虫病和营养免疫学与营养代谢病的研究,现已发表论文17篇,SCI论文5篇。通信地址:266109 青岛市城阳区长城路700号,青岛农业大学动物科技学院, E-mail: cf507@sohu.com。

通讯作者:黄克和,男,1958年出生,教授,主要从事动物隐孢子虫病和营养免疫学与营养代谢病的研究。Tel:025-84395507, E-mail: khhuang@njau.edu.cn。

收稿日期:2008-11-09, 修回日期:2009-02-11。

0 引言

隐孢子虫能感染90多个国家包括人、家畜和野生动物在内的240种不同的动物^[1],是致儿童和免疫缺陷患者腹泻的重要病原,估计全世界每年有5 000万5岁以下儿童发生感染^[2]。尽管有许多关于通过免疫疗法或化学疗法治疗隐孢子虫病的研究,但是其效果不理想^[3-4]。微小隐孢子虫卵囊,直径在4~6 μm 之间,是隐孢子虫的感染阶段,其被排出并完全在宿主的粪便中孢子化^[5]。微小隐孢子虫卵囊能抵制广泛的环境压力,并能在各种各样的环境压力和消毒状态下长期存活,这无疑是对自来水工业生产的挑战^[6-8]。几次大的爆发均与水污染有关,如1987年,CDC报告了发生在美国Carrollton的一次大爆发,大约13 000人在饮用同一经过滤和氯处理过的水后发生胃肠炎^[9];1993年,最严重的一次由于饮水污染隐孢子虫卵囊而爆发的病例中,美国Milwaukee 40多万人受感染且有100人死亡^[9];而且国内外的调查结果表明,各种类型的水源均受到不同程度的污染,世界各国有关隐孢子虫病爆发流行的报道呈上升趋势^[10-11],现今隐孢子虫已经被认为是人和动物腹泻与胃肠炎的主要原因之一^[1]。

隐孢子虫病作为一种重要的人兽共患传染病,已经刺激了许多研究者对此病的传播以及隐孢子虫卵囊的体外活性和体内传染性的研究^[12]。大多数研究者一般会将分离的隐孢子虫卵囊保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 的2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 中,并在分离纯化后3~6个月内传代以保持其卵囊的活性和传染性。关于卵囊活性的研究通常是通过体外活性染色技术和/或脱囊技术,但是在易感动物中产生潜在感染的能力无疑是体内研究卵囊感染性的重要手段。在国外已有大量关于隐孢子虫卵囊活性和传染性的报道,国内未见有关这方面的报道。因此,笔者应用体外脱囊技术研究了保存于2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 中不同时间的微小隐孢子虫卵囊的活性,并通过隐孢子虫感染BALB/c小鼠模型,观察其潜伏期、排卵囊强度和回肠末端的隐孢子虫数,探索隐孢子虫卵囊在 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液中保持活性和感染性的时间,以期对隐孢子虫病的防治提供可用资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 饱和蔗糖溶液(500 g 蔗糖,320 ml H_2O ,6.7 ml 苯酚);pH 7.4 0.01 mol/L PBS(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.85 g,蒸馏水1 000 ml,溶解);2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液;地塞米松磷酸钠注射液(湖北潜江制药股份有限公司生产,批号:20050501);庆大霉素注射液(北潜江制药股份有限公司生产,批号:

20050501)。

1.1.2 隐孢子虫卵囊的传代与保存 微小隐孢子虫卵囊由实验室从猪粪中分离保存,每隔一段时间用8只BALB/c小鼠(6周龄,体重18~20 g,雌性)传代一次,分离纯化后的卵囊保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液中,保存时间分别为1、4、7、10、13、16、20、25、30个月。接种感染时稀释成 10^6 个/ml,用含有60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的PBS洗涤3次,备用。

1.2 方法

1.2.1 体外活性检测—脱囊技术 脱囊技术按照Vergara-Castiblanco(2000)和Castro-Hermida(2003)的方法进行。 2.0×10^6 个卵囊用生理盐水洗涤3次,重悬于10 ml生理盐水中,并加入0.5%的胃蛋白酶和70 μl 的浓盐酸,混合后在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育30 min,加入2.2%碳酸氢钠中和盐酸。加入22 mg牛磺胆酸钠和4 mg的牛胰蛋白酶,在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育2 h,加入2.5%戊二醛固定。取10 μl 悬液记录连续视野中的卵囊空壳和完整卵囊的数量,脱囊率以以下公式计算:脱囊率=卵囊空壳数/卵囊总数 $\times 100\%$ 。所有样品重复检测3次,取平均值。

1.2.2 体内感染性检测

(1) 试验动物处理^[13-15]。90只BALB/c小鼠(6周龄,体重14~16 g,雌性)随机分为9组,分别为1月组、4月组、7月组、10月组、13月组、16月组、20月组、25月组、30月组,每组5只,每只小鼠编号。实验前彻底消毒器具和环境,实验期间,饲养适应3天后,鼠粪镜检确定没有寄生虫感染。各组小鼠免疫抑制3天后,分别依次接种保存在2.5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液中1、4、7、10、13、16、20、25、30个月的微小隐孢子虫卵囊 2.0×10^5 个/只;各组小鼠免疫抑制方法均采用在饮水中加入16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 地塞米松磷酸钠和5%的庆大霉素,自由饮用,每日换水。

(2) 潜伏期的检测。各组小鼠感染卵囊后,逐日从直肠收集各组中每只小鼠的新鲜粪便,涂成硬币大小,用抗酸染色法染色^[16],400倍光镜检查,确定各组中每只小鼠排出卵囊的时间即潜伏期。

(3) 卵囊数量的检测。在鼠粪中检查到有卵囊排出后,继续收集各组小鼠鼠粪,加入 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 中,储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里。实验结束时用蔗糖密度梯度离心法分离纯化卵囊^[17]。纯化的隐孢子虫卵囊保存在1 ml的PBS中,统一计数。

(4) 组织病理学检查。试验结束后,每组小鼠,取回肠末端部分(2 cm)保存固定于10%福尔马林中,常规组织切片,每段小肠组织切8片(横切和纵切各4

片), HE 染色, 每个切片随机选择并记录 20 个小肠绒毛中的隐孢子虫数量和感染率。

1.3 统计分析

用 Microsoft Office Excel 2003 和 SPSS 12.0 软件进行统计分析。不同组间的结果应用方差分析和卡方检验进行比较, 用二次回归模型鉴定潜伏期和卵囊储存时间之间的相关性。

2 试验结果

2.1 脱囊率

体外脱囊试验结果表明, 在 $K_2Cr_2O_7$ 中保存超过 16 个月的卵囊没有发现脱囊(如图 1)。保存在 $K_2Cr_2O_7$ 中 1~7 个月的卵囊脱囊率较高, 分别在 74%~

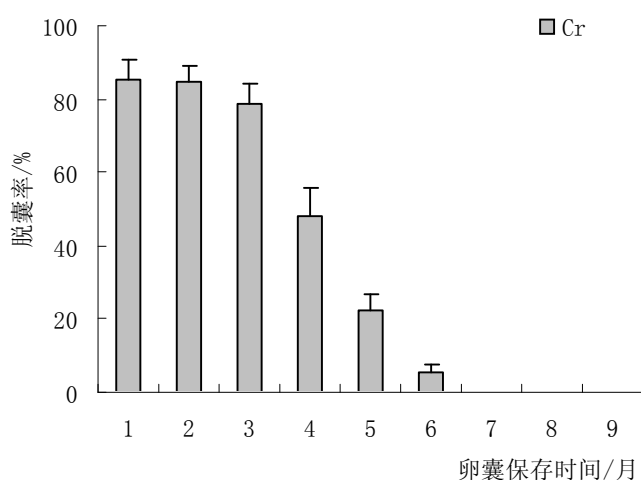


图1 保存在 $K_2Cr_2O_7$ 溶液中不同时间的卵囊的脱囊率

87%之间。当卵囊在 $K_2Cr_2O_7$ 中保存 16 个月时, 其脱囊率下降至 5.5%。

2.2 潜伏期

感染小鼠的粪球检测显示, 各组小鼠潜伏期分别在 3~8 天之间, 其中, 1 月组、4 月组和 7 月组均在感染后第 3 天的粪便中发现卵囊, 第 4 天全部检测到卵囊排出。潜伏期最长的一组是接种 16 个月卵囊的小鼠, 直到感染后第 8 天全部小鼠才全部发现均排出卵囊。在整个实验期间, 20~30 月组没有发现卵囊排出, 其他各组的潜伏期分别为 3.4、3.4、3.6、3.6、6.4 和 7.2 天。卵囊的保存时间与潜伏期之间存在显著相关性 ($R^2=0.92$)。如图 2 所示。

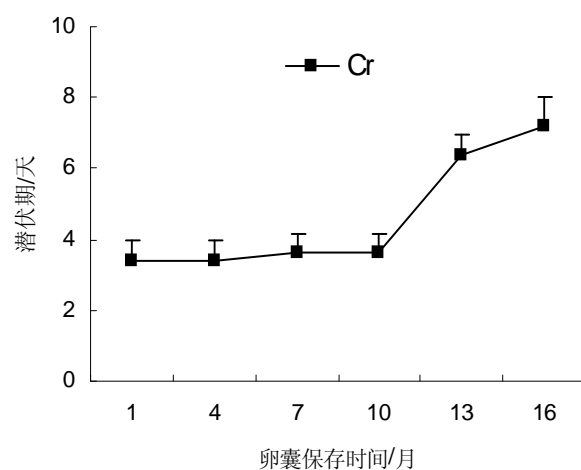


图2 保存时间不同的卵囊感染小鼠的潜伏期

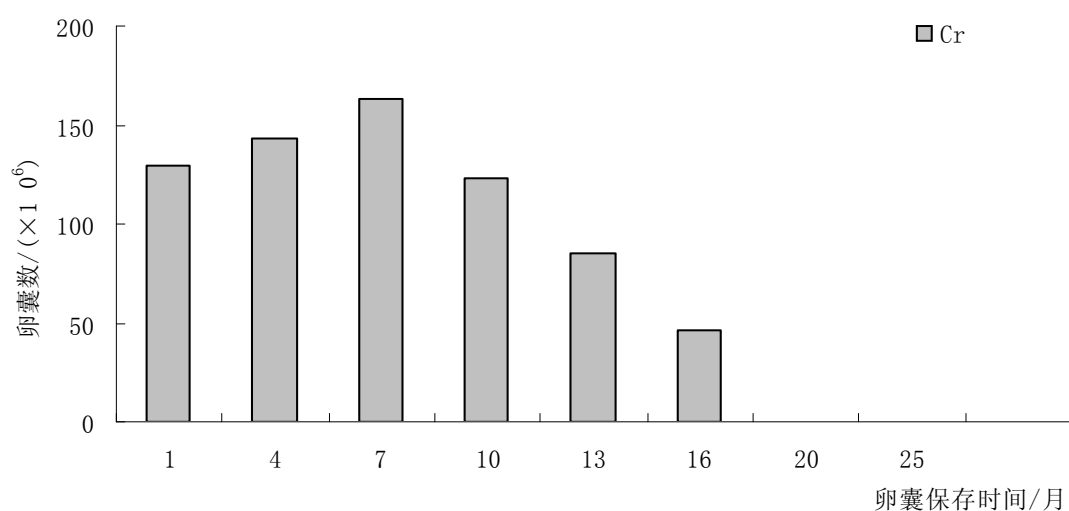


图3 保存时间不同的卵囊感染各组小鼠的排卵囊强度的比较

2.3 感染强度

如图 3 所示, 在整个实验期间, 各组的排卵囊总量差异很大。除了 $K_2Cr_2O_7$ 20~30 月组没有卵囊排出之外, 其他各组均有卵囊排出。在各组小鼠排卵囊数量中, 以 7 月组排卵囊强度最大, 其次是 4 月组, 最少的是

16 月组。

2.4 组织病理学

在小鼠的回肠末端, 除了 20~30 月组未发现隐孢子虫寄生外, 其他各试验组均有隐孢子虫寄生。最多的隐孢子虫出现在 4 月组, 最少的发现于 16 月组(图 4)。

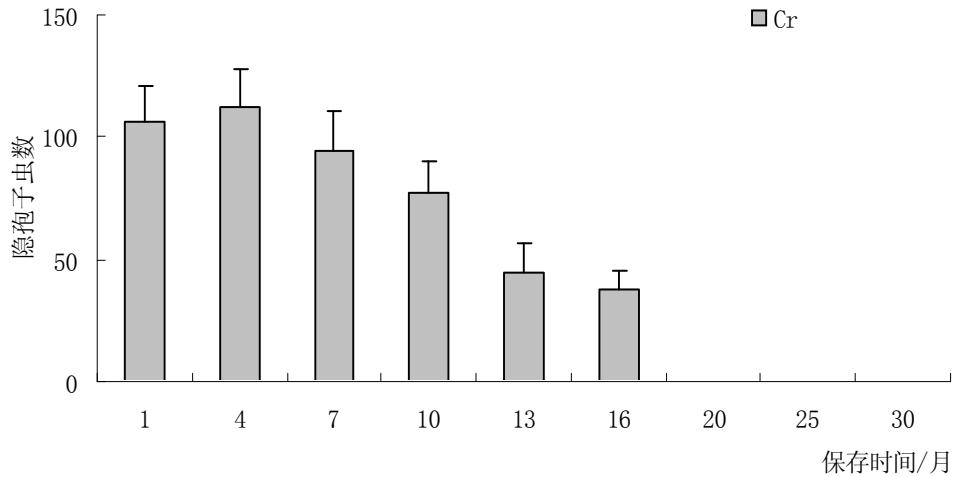


图4 不同保存时间的卵囊感染小鼠末端回肠20个绒毛中的隐孢子虫数

3 讨论

为了保持卵囊有较长时间的活性和节省需要大量隐孢子虫卵囊研究者的时间,探索保存微小隐孢子虫卵囊的合适介质是非常重要的。许多的早期研究结果显示,原虫储藏在低温下的重铬酸钾溶液中是长期保持活性的有效方式。而且,现今在大多数的实验室也一般应用重铬酸钾做为隐孢子虫卵囊的保存溶液。以前的报道已经证明,当卵囊保存在4℃时,早在2个月时开始丢失感染性,其他的报道显示:保存仅有6~9个月的仍保持感染性,并且在18个月时偶而有传染性^[7,14]。笔者通过研究保存在K₂Cr₂O₇中的微小隐孢子虫卵囊的活性和传染性发现,保存在K₂Cr₂O₇中16个月的微小隐孢子虫卵囊仍有活性,卵囊的储存时间与潜伏期之间存在强烈的相关性。因此,笔者认为,K₂Cr₂O₇是保持隐孢子虫卵囊活性和传染性较好的储存溶液。这也是国内关于隐孢子虫卵囊活性和传染性的首次报道,为隐孢子虫病的防治提供了重要的可参考资料。

研究中也发现,保存在K₂Cr₂O₇中1~16个月卵囊在3~8天之间能使该组全部小鼠感染,且能分离纯化到不同数量的卵囊。这与Yang等^[17]报道的保存在K₂Cr₂O₇中的卵囊感染小鼠的潜伏期(2~6天)和卵囊保持活性的保存时间(18个月)相似。通过分析发现,两种方法得到的潜伏期随保存时间的延长均呈上升趋势,而且潜伏期之间差异不显著,卵囊保存时间与潜伏期之间显著相关,因此,卵囊保存时间对卵囊活性有较大的影响。研究表明,排卵囊强度最强的组不是接种保存1个月的卵囊,而是保存7个月(K₂Cr₂O₇)的卵囊。在排卵囊强度方面,排卵囊强度均以4、7月组排卵囊强度较大,两者之间差异不显著,而且在末端回肠绒毛中,寄生的隐孢子虫数量也均以7月组最多,通过分析

笔者认为,K₂Cr₂O₇溶液对卵囊的感染性影响不大,这也与King BJ等^[18]研究水质不能影响卵囊的活性相似。这也说明了卵囊保存在K₂Cr₂O₇中7个月时开始丢失其感染活性。

总之,通过研究发现,保存在2.5% K₂Cr₂O₇溶液中的隐孢子虫卵囊1~16个月均有活性和对免疫抑制BALB/C小鼠有感染活性,并且保存7个月的卵囊具有相对较强的活性,因此即不必因为担心隐孢子虫卵囊失活而每隔3个月进行传代,也节省了时间和费用,而且这为防治隐孢子虫病的研究提供了可用的参考数据。

参考文献

- [1] David B.H., Cynthia C., Pablo C. Okhuysen *Cryptosporidiosis in children*[J]. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2004, 4(15): 253-259.
- [2] O'Donoghue P.J.. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in man and animals*[J]. *International Journal for Parasitology*, 1990, 2(25): 139-195.
- [3] Ronald F., Una M., Steve J. U., *Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification*[J]. *International Journal for Parasitology* 2000, 30: 1305-1322.
- [4] Guerrant RL, Dillingham RA, Lima AA, et al. *Cryptosporidiosis: epidemiology and impact*[J]. *Microbes and Infection*, 2002, 10 (4): 1059-1066
- [5] Carey C.M., Lee H., Trevors J.T.. *Biology, persistence and detection of C. parvum and C. hominis oocysts*[J]. *Water Research*, 2004, 38: 818-862.
- [6] Huang K, Yang S. *Inhibitory effect of selenium on Cryptosporidium parvum infection in vitro and in vivo*[J]. *Biol Trace Elem Res*. 2002, 90(1-3): 261-72.
- [7] Huang K., Donna E.A. *Development of patent infection in immunosuppressed C57BL/6 mice with a single Cryptosporidium*

- meleagidis oocyst[J]. The Journal of Parasitology, 2003, (89): 620-622.
- [8] Campbell A.T., Robertson L.J., Finzer W.F., et al. Effects of presentatives on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts[J]. Appl. Environ. Microbiol. 59:4361-4362.
- [9] F. Mendez-Hermida, J. A. Castro-Hermida, E. Ares-Mazas, et al. Effect of Batch-Process Solar Disinfection on Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Drinking Water[J]. Applied and environmental microbiology, 2005: 1653 - 1654.
- [10] Fayer R. Effect of High Temperature on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water[J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 60(8):12732-2735.
- [11] Castro-Hermida, J.A., I. Pors, F. Mendez-Hermida, et al. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts[J]. The Veterinary Journal, 2006, 171:340-345.
- [12] Robertson L. J., Campbell A. T., Smith H. V., et al. Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts under Various Environmental Pressures[J] 1992, 58(11):3494-3500.
- [13] Fayer R., Nerad T.. Effects of Low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts[J]. Applied and environmental microbiology, 1996, 62(4):1431-1433.
- [14] Chan-Gu S., Se-Min K., Hyeon-Cheon K.. Viability of preserved *Cryptosporidium baileyi* oocysts[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2003, 41(4): 197-201.
- [15] Normanf. N., Lyndonl. G., Leslieg., et al. Comparison of Animal Infectivity and Nucleic Acid Staining for Assessment of *Cryptosporidium parvum* Viability in Water [J]. Applied and environmental microbiology, 2000, 66(1): 406-412.
- [16] Li X, Brasseur P, Agnamey P, Ballet JJ, et al. Time and temperature effects on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in chlorinated tap water[J]. Arch Environ Health. 2004, 59(9):462-466.
- [17] Yang S.G., Mark C.H., Chunwei D. Infectivity of preserved *C. parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice[J]. Immunology and Medical Microbiology, 1996, 13:141-145.
- [18] Gostin LO, Lazzarini Z., Neslund VS, et al. Water quality law and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens [J]. Am J Public Health, 2000, 90(6):847-853.