

郝福星,左伟勇,刘莉.猪弓形虫感染的血清肽谱诊断法建立及初步应用[J].江苏农业科学,2018,46(9):165-167.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.038

猪弓形虫感染的血清肽谱诊断法建立及初步应用

郝福星¹,左伟勇¹,刘莉^{1,2}

(1.江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术重点实验室,江苏泰州 225300; 2.扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009)

摘要:为了根据猪弓形虫感染血清差异表达多肽,建立一种新的质谱检测方法,采集江苏泰州地区部分养殖场育肥猪血清,利用间接免疫凝法(IHA)分析弓形虫感染状况,将IHA阳性与阴性血清分别归为感染组和对照组,采用磁珠纯化试剂盒富集血清多肽,应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF Mass Spectrometry)检测,并结合flexAnalysis 2.0与ClinProTools软件分析检测图谱并建立检测模型。对海陵、高港、姜堰部分猪场的IHA检测显示,猪弓形虫感染率分别为16%(8/50)、16%(8/50)、18%(9/50)。质谱检测 m/z 800~12 000区段发现,弓形虫IHA阳性与阴性相比较,在育肥猪血清中共有9个多肽峰表达有显著性差异,其中 m/z 1 608.59、1 971.84、5 004.01、4 617.49、7 808.23的5个多肽峰的表达显著上调,而 m/z 1 233.01、8 007.66、2 356.37、3 735.65的4个峰呈显著下调,应用ClinProTools建模方程建立弓形虫感染猪的检测模型。可见MALDI-TOF质谱结合ClinProTools分析可建立猪弓形虫感染检测新方法,为弓形虫的诊断提供了一种新思路。

关键词:弓形虫;间接免疫凝试验;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;磁珠富集

中图分类号:S858.285.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0165-03

弓形虫病是由刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)引起的一种人兽共患寄生虫病,宿主种类十分广泛^[1]。猫科动物是弓

形虫的终末宿主^[2],在猫体内弓形虫进行有性生殖产生卵囊,卵囊随猫的粪便排出体外,并发育成具有感染性的孢子化卵囊,后者能够感染人和大多数的温血动物。人因与动物接触、误食了受弓形虫卵囊污染的水源、土壤或食物(肉、蛋),会引起弓形虫感染^[3]。据文献报道,人和动物感染呈世界范围内分布,人群的平均感染率25%~50%,多呈隐性感染,推算全世界约1/4的人感染弓形虫^[4];感染弓形虫的动物种类很多,如家畜、家禽、鼠以及鱼类,可引起猪、牛、羊、犬、鸡等畜禽发病,可引起大批发病,死亡率高,给畜牧业生产造成严重

收稿日期:2016-12-21

基金项目:江苏省青蓝工程中青年学术带头人项目;江苏省六大人才高峰科研项目(编号:NY-023)。

作者简介:郝福星(1982—),男,江苏如皋人,硕士,从事动物医学相关研究。E-mail:vethfx@163.com。

通信作者:刘莉,博士,从事动物医学相关研究。E-mail:vetlily@163.com。

[2] Cren E L. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*) [J]. *Journal of Animal Ecology*, 1951, 20(2): 201-219.

[3] Bergendahl I A, Holliland P B, Hansson S, et al. Feeding range of age 1+ year Eurasian perch *Perca fluviatilis*, in the Baltic Sea [J]. *Journal of Fish Biology*, 2017, 90(5): 2060-2072.

[4] Kalous L, Kuřiková P, Kohout J, et al. Differences in spatial communities of European perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) fry in a canyon-shaped reservoir are not attributable to genetics [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2017, 33(2): 306-313.

[5] 马桂珍. 乌伦古湖河鲈的食性研究[J]. 干旱区研究, 1986(2): 23-28.

[6] 黄诚, 葛家春. 河鲈食性分析及其摄食生态策略[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 309-313.

[7] 乔德亮, 凌去非, 殷建国, 等. 河鲈胚胎及卵黄囊期仔鱼发育[J]. 生物学杂志, 2006, 23(1): 34-38.

[8] 唐富江, 姜作发, 阿达可白克·可尔江, 等. 新疆乌伦古湖河鲈二十年来种群生长变化及原因[J]. 湖泊科学, 2009, 21(1): 117-122.

[9] 唐富江. 新疆乌伦古湖外来鱼类对河鲈入侵机制的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.

[10] 卓然江, 蔡小琴, 潘国强. 河鲈人工颗粒饲料池塘驯养技术[J]. 科学养鱼, 2015, 31(10): 34.

[11] 乌兰·荣珍. 乌伦古湖河鲈(*Perca fluviatilis*)繁育规律的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.

[12] 武菲, 胡文革, 王翠华, 等. 河鲈养殖与野生群体遗传多样性比较分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(1): 181-188.

[13] 陈朋, 马燕武, 祁峰, 等. 博斯腾湖河鲈早期发育阶段关键生境特征的调查[J]. 淡水渔业, 2016(1): 39-45.

[14] 胡伯林, 钱龙, 艾涛. 河鲈鱼种养殖试验总结[J]. 科学养鱼, 2016(3): 12-12.

[15] 冯昭信. 鲈鱼 *Lateolabrax japonicus* (Cuvier et Valenciennes) 骨骼系统的形态观察[J]. 大连水产学院学报, 1982, 3(1): 29-52.

[16] 谢从新. 鱼类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 156-163.

[17] 刁晓明, 李华, 苏胜齐. 岩原鲤脑颅的研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 1994, 16(5): 500-502.

[18] 刘海平, 谢从新, 张磊, 等. 黑斑原鲩脑颅骨骼形态学的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(3): 3-12.

[19] 于美玲, 周传江, 蒲德永. 大眼鳊头骨形态的观察[J]. 四川动物, 2010, 29(2): 215-219.

[20] 李仲辉, 杨太有. 大口黑鲈和尖吻鲈骨骼系统的比较研究[J]. 动物学报, 2001(增刊1): 110-115.

经济损失^[5-7]。而猪作为人类最主要的肉产品来源之一,检测其弓形虫感染状况,在公共卫生与食品安全方面意义重大^[7]。因此,开展猪弓形虫病的研究工作,对畜牧业发展和人类健康具有重要的经济价值和社会意义。

弓形虫感染的诊断主要包括病原学检测、免疫学诊断及分子生物学诊断技术^[8]。病原学检测方法有直接涂片与组织切片染色法,该法可对弓形虫急性感染进行确诊,但存在费时费力的缺点,对弓形虫隐性感染的检测效能不强;动物接种试验和细胞培养法能够直接确认病原体存在,但敏感性低、耗时、易漏诊且难以应用于实际操作。以间接血凝试验(IHA)与酶联免疫吸附试验(ELISA)为主的免疫学诊断方法^[9]具有特异性强、敏感性高、操作简便等优点,是弓形虫病流行病学调查和诊断最常用的方法,但有报道显示,临床诊断中也存在假阳性,需要与其他诊断方法综合判定^[10]。以PCR为主的分子生物学诊断技术^[11]具有灵敏度高的特点,但是因检测样本(如外周血)复杂与PCR技术本身等原因也存在假阳性高、准确性较差等缺点。因此,迫切需要建立一种准确性好、快速灵敏的检测方法。

笔者利用MALDI-TOF质谱结合ClinProTool分析在小鼠动物模型上已成功对弓形虫感染进行判定^[12]。有文献显示,该方法在包括血吸虫感染、肿瘤、神经系统疾病诊断中也有较广泛的应用^[13],具有高通量、灵敏度高、可重复性好及样本需求量少等优势,本研究拟建立一种快速准确诊断猪弓形虫感染的方法,对江苏泰州部分地区猪场的弓形虫感染情况做一调查,为当地猪的养殖与防病提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 受试动物与试剂

江苏省泰州市辖区(海陵、高港、姜堰)小型猪场(<100头猪)育肥猪,共采集3个猪场,每个猪场采集50头。

弓形虫间接血凝试验冻干抗原(IHA抗原,批号:20151011);标准阳性血清、标准阴性血清、稀释液(批号:20151011),均购自中国农业科学院兰州兽医研究所。MB-WCX磁珠纯化试剂盒(美国Bruker Daltonic公司),丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为色谱纯级。基质:HCCA(α -氰-4-羟肉桂酸),300 mg/L,溶于乙醇:丙酮=2:1,新鲜配制。

1.2 血清采集与分离

每头猪行耳静脉采血2~2.5 mL,将采集的新鲜血液,加入1.5 mL无菌EP管中,即刻置于4℃冰箱保存,待30 min后以12 000 r/min、4℃离心10 min,分离血清冷冻于-80℃冰箱待测。

1.3 弓形虫IHA诊断方法

按照试剂说明书进行操作,即于96孔有机玻璃板加入75 μ L稀释液,每个待检血清样品加稀释液4孔,取25 μ L血清加入第一孔,混匀后吸取25 μ L加入第二孔,以此类推,进行倍比稀释。待检血清加完后,每孔加入25 μ L诊断液,将反应板放至微量振荡器上振荡1~2 min,静置于22~37℃恒温箱中作用2~3 h后观察结果。每批次均需设阳性对照与阴性对照。

1.4 血清肽质谱检测法

根据磁珠纯化血清多肽试剂盒标准操作规程,将10 μ L样本结合液与10 μ L磁珠试剂混合,与血清样本10 μ L混匀并室温静置5 min;将磁珠进行富集并弃上清,清洗磁珠后加洗脱液(ES)5 μ L与磁珠混匀,室温静置5 min后置磁珠富集器并弃上清,最后加5 μ L稳定液(SS)至离心管并混匀,取1 μ L与基质10 μ L完全混合,制成混悬液,取1 μ L混悬液点靶,室温干燥后上机检测,设置MALDI-TOF-MS仪器参数,选择LP-Clinprot. pa方法,靶MTP_polished steel 384,激光能量在40%左右,检测分子量范围为 m/z 800~12 000;应用flexanalysis与Clin ProTools软件对采集图谱进行分析,应用MASCOT数据库对差异多肽峰进行初步搜库鉴定。

2 结果与分析

2.1 血清间接血凝试验结果

根据IHA阳性结果标准,在阳性对照血清效价不低于1:1 024,阴性对照孔血清除第1孔允许有前滞现象“+”外,其余各孔及对照孔均为“?”的前提下,对被检血清进行判定,被检血清抗体效价达到或超过1:64为阳性。结果显示,本研究采集的泰州市辖区(海陵、高港、姜堰)3个小型猪场的150头份血清样本中阳性血清为25份,阳性率为16.67%(表1)。

表1 泰州部分地区猪弓形虫感染情况调查(IHA法)

地点	检测总数 (份)	IHA阳性数 (份)	IHA阳性率 (%)
海陵	50	8	16
高港	50	8	16
姜堰	50	9	18
总计	150	25	16.67

2.2 血清多肽指纹图谱分析

将25份IHA阳性血清与125份阴性血清分别归为感染组与对照组,利用磁珠纯化血清多肽,并与基质混匀后点靶进行质谱检测。结果显示,与阴性对照组相比,IHA阳性组猪血清中在 m/z 1 608.59、1 971.84、5 004.01、4 617.49、7 808.23的5个多肽峰的表达显著上调,而 m/z 1 233.01、8 007.66、2 356.37、3 735.65的4个峰呈显著下调(表2)。

表2 猪弓形虫感染组与对照组血清差异表达多肽(ClinProTool法)

质荷比 (m/z)	峰值		P值
	感染组	对照组	
1 608.59	331.21 \pm 79.10	99.87 \pm 39.98 *	<0.01
1 971.84	109.76 \pm 69.11	21.32 \pm 8.95 *	<0.01
5 004.01	47.34 \pm 10.10	11.12 \pm 3.53 *	<0.01
4 617.49	66.75 \pm 12.14	9.87 \pm 5.01	<0.01
7 808.23	201.01 \pm 44.35	67.33 \pm 14.76 *	<0.05
1 233.01	38.47 \pm 8.05	8.66 \pm 6.01 *	<0.05
8 007.66	249.17 \pm 44.36	78.81 \pm 56.01 **	<0.01
2 356.37	125.75 \pm 42.35	49.93 \pm 18.35 **	<0.05
3 735.65	377.97 \pm 178.05	189.58 \pm 55.76 **	<0.05

注:“*”表达上调,“**”表达下调。

2.3 弓形虫检测方法的建立与验证

将血清多肽指纹图谱导入Clin ProTools软件,并将IHA

阳性血清与阴性血清进行分组,寻找并依据组间谱图差异,建立猪的弓形虫感染诊断方法,为验证诊断方法的敏感性与特异性,将阳性与阴性血清指纹图谱导入,质谱可自动化判定,结果显示,25份IHA阳性血清可以成功被质谱诊断模型判定为弓形虫感染,敏感性达100%,而125份阴性血清中有119份可被判定为未感染,准确性达95.2%(119/125),另6份不能判定。

3 结论与讨论

猪弓形虫病呈世界范围流行,我国分布十分广泛,食入猫粪便中的卵囊、通过损伤的黏膜与皮肤、母猪孕期经胎盘感染仔猪,均为本病的感染途径^[14]。规模化、现代化的养殖方式虽可以避免传统粗放养殖中的寄生虫感染情况,如疥螨和蛔虫等感染率得以大大降低,但畜牧场外部环境、猪群内部引进和繁殖等一系列环节的存在,使得弓形虫仍然有较高的感染机会,甚至呈暴发流行^[15],而弓形虫作为人兽共患寄生虫病,禽、犬、猫等多种动物均可携带^[16],对公共卫生威胁更大,有必要对该病进行重点防控。有报道显示,部分猪场发病率可高达60%以上^[17],病死率可高达64%。随着养殖水平提高,该病在我国多呈隐性感染,一旦疏于防范,有可能造成弓形虫病的流行和暴发,因此,对规模化养殖猪场尤其要加强该病的监测。相比传统的检测方法,血清多肽指纹图谱检测法具有高通量、检测效率高的优势,且在实验小鼠^[18]、家兔^[19]等动物已成功建立了寄生虫病的诊断方法,在猪的弓形虫感染诊断中,还较少见报道。

MALDI-TOF质谱结合ClinProTools软件分析,可以将弓形虫感染与未感染猪血清中的多肽进行区别,并以血清差异表达多肽建立诊断方法,对该方法的验证结果显示,与传统的IHA方法一致,可以用于猪感染弓形虫的诊断与早期筛查。本研究采用的质谱检测法,可以在30~60min内实现384个样本的检测,具有高通量、快速、自动化程度高等特点,且血清样本需求量为传统IHA实验的1/20,很大程度上减少受试猪的失血量。对血清差异表达多肽的检测与MASCOT搜库分析显示,与笔者之前的研究比较, m/z 1 971.84、5 004.01同样出现在弓形虫感染的小鼠与本研究选取的IHA阳性猪血清中,经二级质谱鉴定,该2种多肽分子可能为弓形虫表面膜蛋白的片段,有望成为弓形虫感染动物的指征性分子。ClinProTools分析显示,利用猪血清中9个差异性多肽峰建立诊断方法,其敏感性与准确性较高,该方法以多个差异多肽作为判断指标,其准确性要优于单一指标,且血清多肽检测方法是建立在群体基础上,更好地规避了个体差异,在同组血清样本中能够最大限度地体现共性,可重复性强。因此,该方法有望成为判定猪弓形虫感染状况的辅助筛查手段。

参考文献:

[1] Szabo E K, Finney C A M. *Toxoplasma gondii*: one organism, multiple models[J]. Trends in Parasitology, 2016, 33(2): 113-127.
 [2] Yin Q, El-Ashram S, Liu X Y, et al. Early detection of *Toxoplasma gondii* - infected cats by interferon-gamma release assay[J]. Exp Parasitol, 2015, 157: 145-149.

[3] Chen M X, Ai L, Chen J H, et al. DNA microarray detection of 18 important human blood protozoan species[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(12): e0005160.
 [4] 张燕萍, 宋任浩. 孕妇弓形虫感染妊娠结局及危险因素调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2014(2): 221-223.
 [5] 卓国荣, 周红蕾, 张斌, 等. 泰州地区犬血清弓形虫抗体间接血凝与胶体金试纸对比调查研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 211-212.
 [6] Mose J M, Kagira J M, Karanja S M. Detection of natural *Toxoplasma gondii* infection in chicken in thika region of Kenya using nested polymerase chain reaction[J]. BioMed Research International, 2016, 2016(5): 1-5.
 [7] Guo M, Buchanan R L, Dubey J P, et al. Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States[J]. J Food Prot, 2015, 78(12): 2207-2219.
 [8] Satbige A S, Vijaya Bharathi M, Ganesan P I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Chennai using PCR and modified direct agglutination test[J]. J Parasit Dis, 2016, 40(4): 1466-1469.
 [9] Zhuo X, Huang B, Luo J, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays based on ITS-1 for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in pork[J]. Vet Parasitol, 2015, 208(3/4): 246-249.
 [10] Li F, Wang S P, Wang C J, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats in Hunan Province, China[J]. Parasite, 2016, 23: 44.
 [11] Satbige A S, Bharathi M V, Ganesan P I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Chennai using PCR and modified direct agglutination test[J]. J Parasit Dis, 2016, 40(4): 1466-1469.
 [12] 郝福星, 左伟勇, 刘莉. ClinProTool结合质谱分析弓形虫急性感染小鼠血清多肽[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 240-241.
 [13] Savino R, Paduano S, Preiano M, et al. The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11): 13926-13948.
 [14] 孔猛, 白昉, 冯志新, 等. 弓形虫NT株猪体人工发病实验研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(11): 1016-1020.
 [15] Dzib - Paredes G F, Rosado - Aguilar J A, Acosta - Viana K Y, et al. Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico[J]. Vet Parasitol, 2016, 229(15): 45-49.
 [16] 卓国荣, 狄和双, 卢炜, 等. 不同检测方法分析泰州地区猫血清中弓形虫抗体[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 190-191.
 [17] 向忠菊, 段永兰, 岳新军, 等. 安徽部分地区猪弓形虫病的血清学调查研究[J]. 湖南农业科学, 2011, 1(17): 134-135, 138.
 [18] Huang Y, Li W, Liu K, et al. Detection of sentinel mice using ClinProTool algorithm established by acute *Schistosomiasis japonica* mice[J]. Parasitol Res, 2016, 115(11): 4173-4181.
 [19] Huang Y, Yang G, Kurian D, et al. Proteomic patterns as biomarkers for the early detection of *Schistosomiasis japonica* in a rabbit model[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2011, 299(2/3): 191-195.