

兔斯氏艾美耳球虫感染模型及巢式 PCR 诊断方法的建立

温福利

(联勤保障部队第九〇〇医院基础医学实验室, 福州 350025)

[摘要] 目的 建立兔斯氏艾美耳球虫 (*Eimeria stiedai*, *E.stiedai*) 感染模型和巢式 PCR 诊断方法。方法 利用剖检、显微镜观察、血液生化和病理组织学检查等方法对建立的兔 *E.stiedai* 模型进行鉴定。通过收集卵囊, 提取 *E.stiedai* 的 DNA, 设计特异性引物, 建立 *E.stiedai* 巢式 PCR 检测方法。结果 临床剖检: 兔腹围明显增大, 解剖见肝脏肿大, 肝脏表面和实质布满白色及淡黄色结节, 胆囊和胆管肿大, 胆汁呈淡黄色。显微镜观察: 虫卵大小为 $(31.72 \sim 38.43) \mu\text{m} \times (18.10 \sim 22.69) \mu\text{m}$ 。血液生化检查: 球蛋白 (GLOB) 指标偏高, 肌酐 (CREA) 和碱性磷酸酶 (ALKP) 指标偏低, 其余检测指标均在参考值范围内。病理组织学检查: 肝组织和胆管中见大量粉红色 *E.stiedai* 虫卵。巢式 PCR 检查: 最低检测限为 1 个卵囊 DNA 样本和 1.14×10^3 拷贝数质粒, 阴性对照和空白对照均未出现条带, 重复性实验变异性系数 $< 5\%$ 。结论 成功构建兔 *E.stiedai* 感染模型, 建立的巢式 PCR 诊断方法可扩增出 *E.stiedai* 的特异片段, 敏感性高, 重复性好。

[关键词] 斯氏艾美耳球虫; 病理组织学; 巢式 PCR; 兔

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)06-0477-06

兔球虫病 (rabbit coccidiosis) 是由兔球虫寄生于肠道或胆管引起的一种感染性寄生虫病^[1]。兔球虫共有 11 种, 其中斯氏艾美耳球虫 (*Eimeria stiedai*, *E.stiedai*) 是唯一寄生于肝胆管上皮细胞的兔球虫, 可导致严重的肝球虫病^[2]。兔球虫病在临床中以肠型和肝型球虫混合感染为主, 经过裂殖生殖和配子生殖的 *E.stiedai* 卵囊到肠腔后与肠型球虫一起随粪便排出^[3]。巢式 PCR 是一种成熟的核酸扩增技术, 通过内引物和外引物的双重基因扩增, 可特异地鉴定是否存在 *E.stiedai* 感染。在科学实验中, 因 *E.stiedai* 寄生部位的特

殊性, 较易获取纯种卵囊。本研究通过建立兔 *E.stiedai* 感染模型可获取更多卵囊, 利用临床剖检、显微镜观察、血液生化检查和病理组织学检查等方法对建立的模型进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性新西兰兔 9 只, 40~45 日龄, 平均体质量为 0.84 kg, 购自福建省连江玉华山自然生态农业试验场 [SCXK(闽)2014-0001], 有抗球虫药物治疗记录。实验兔饲养于联勤保障部队第九〇〇医院普通环境 [SYXK(闽)2018-0005], 动物实验符合相关伦理要求并给予人道关怀。

1.2 主要仪器与试剂

Catalyst One 全自动生化分析仪为美国 IDEXX Laboratories 公司产品; EG1150H 石蜡包埋机、

[收稿日期] 2020-06-24

[基金项目] 军队实验动物专项课题 (SYDW[2018]15); 联勤保障部队第九〇〇医院杰出青年培育专项 (2019Q04)

[作者简介] 温福利 (1987—), 男, 主管技师, 主要从事实验动物寄生虫研究。E-mail: wen_fuli@163.com

RM2245 半自动轮转式切片机、ST5020 多功能染色机、CV5030 全自动化玻片盖片机和DM2000 生物显微镜均为德国 Leica 公司产品; ABI Veriti PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。植物基因组DNA快速抽提试剂盒和DNA扩增相关试剂为生物工程(上海)股份有限公司产品; PCR 反应扩增仪为美国 Bio-Rad 公司产品; DYY-6C 型稳压稳流电泳仪为北京六一生物科技有限公司产品; FR980 凝胶成像系统为上海复日科技有限公司产品。*E.stiedai* 由中国农业大学索勋课题组提供。

1.3 兔 *E.stiedai* 感染模型的建立

将约 5×10^4 个 *E.stiedai* 通过灌胃法注入实验组新西兰兔体内, 21 d 后对实验兔进行观察, 剖检肝脏病变。取病变肝脏的一小块结节病灶, 加适量 0.9% NaCl 溶液(即生理盐水)进行压片镜检, 拍照后测量虫卵长度。采集耳缘静脉血液于绿色头盖标记的肝素锂采血管中, 进行血液生化检查。同时, 分别取实验组和对照组一小块肝脏组织 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$), 置于体积分数为 10% 的甲醛溶液中固定 24 h。梯度乙醇脱水后二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 切片后进行 HE 染色, 中性树胶封固后, 显微镜下观察。

1.4 血液生化检查

采用全自动生化分析仪对感染后实验兔的血糖 (GLU)、尿素 (UREA)、肌酐 (CREA)、血尿素氮/肌酐比 (BUN/CREA)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLOB)、白蛋白/球蛋白比 (ALB/GLOB)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALKP) 各项血液生化项目进行检查。

1.5 巢式 PCR 检测方法的建立

1.5.1 卵囊收集 将含有白色结节病灶的肝脏剪成小块并置于搅拌机中搅拌均匀, 加入 5 倍 0.25% 胰蛋白酶, 置于 37°C 振荡器 150 r/min 振荡 1 h, 消化后肝脏组织分别用 1 层、2 层和 4 层纱布进行多次过滤, 滤液用饱和盐水漂浮法收集卵囊。以鸡柔嫩艾美耳球虫 (*E.tenella*)、兔巨型艾美耳球虫 (*E.maxima*) 和兔大型艾美耳球虫 (*E.magna*) 为阴性对照, 双蒸水为空白对照。

1.5.2 DNA 提取与质粒构建 将 1×10^6 个卵囊和 2 000 个卵囊分别置于含磁珠的振荡器振荡 20 min,

然后按照植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明提取 DNA, -20°C 保存。将 2 000 个 *E.stiedai* 卵囊的 DNA 稀释成 1 个、5 个、10 个、25 个和 50 个卵囊的 DNA 模板。*E.stiedai* 的重组质粒构建于前期实验, 拷贝数为 1.41×10^{13} , 质粒梯度稀释后用于敏感性和重复性实验。

1.5.3 巢式 PCR 方法的建立 根据 *E.stiedai* 的 ITS1 基因序列, 用软件 Premier 5.0 设计第一轮 PCR 的引物, 正向引物序列为 5'-TTGGGTGGG-TTTTCTGTGCC-3', 反向引物序列为 5'-CGCG-AGCCAAGACATCCATT-3'。配制 25 μL 的反应体系: 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、DNA 模板和 dNTP (10 mmol/L) 均是 0.5 μL , Taq buffer (10 $\times$) 2.5 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 2 μL , 不足部分用双蒸水补充。反应程序: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 连续 30 个循环; 72°C 修复延伸 8 min。

第二轮 PCR 引物的正向序列为 5'-GGTTC-GGTCACCTCTGCATT-3', 反向序列为 5'-CAGC-ACCATCATCCACAGGA-3'。配制 25 μL 的反应体系: 以第一轮 10^6 倍稀释质粒的 PCR 产物为模板, 进行再次梯度稀释, 其余成分的加入量与第一轮反应体系相同, 不足部分用双蒸水补充。退火温度提高至 60°C , 连续 25 个循环, 反应程序与第一轮扩增相同。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。运用 Image-pro Plus 6.0 软件对组内 3 次重复性实验结果进行半定量分析。

2 结果

2.1 临床剖检

实验组兔食欲降低, 腹围明显增大 (图 1A)。解剖后见肝脏肿大明显, 肝脏表面和实质布满白色和淡黄色结节, 胆囊和胆管肿大, 胆汁呈淡绿色, 感染严重的病兔胆汁呈淡黄色 (图 1B)。

2.2 血液生化检查

GLOB 含量偏高, CREA 和 ALKP 含量偏低 (表 1), 其余检测指标均在全自动生化分析仪提供的兔血液生化检查参考值范围内。



A 图示实验兔腹围明显增大；B 图示解剖后肝脏、胆囊和胆管。

图 1 斯氏艾美耳球虫感染兔的临床剖检

Figure 1 Clinical biopsy of *Eimeria stiedai* infected rabbits

表 1 斯氏艾美耳球虫感染的兔血液生化检测
Table 1 Blood biochemistry of *Eimeria stiedai* infected rabbits

检测项目	结 果	参考范围
GLU/(mmol · L ⁻¹)	7.41 ± 1.46	4.17~8.06
UREA/(mmol · L ⁻¹)	8.30 ± 0.17	3.6~8.6
CREA/(μmol · L ⁻¹)	32.00 ± 0.55 ↓	71~159
BUN/CREA	80.00 ± 2.13	—
TP/(g · L ⁻¹)	72.00 ± 1.29	55~72
ALB/(g · L ⁻¹)	27.00 ± 0.62	27~46
GLOB/(g · L ⁻¹)	44.00 ± 0.51 ↑	15~28
ALB/GLOB	0.60 ± 0.01	—
ALT/(U · L ⁻¹)	32.00 ± 0.48	31~53
ALKP/(U · L ⁻¹)	63.00 ± 1.29 ↓	70~145

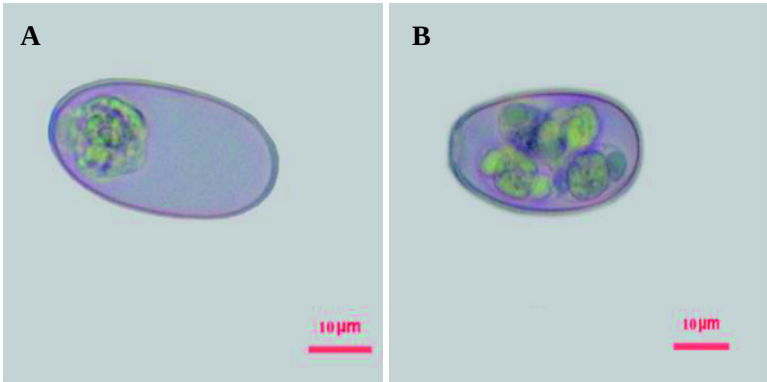
注：参考范围由生化分析仪系统提供。

2.3 显微镜观察

E.stiedai 呈长椭圆形，借助于显微镜及其计算机辅助系统对虫卵形态特征进行观察鉴定。取肝脏结节和胆管上皮进行压片镜检，可见大量未孢子化 *E.stiedai* 虫卵，未孢子化卵囊大小为 36.26 μm × 19.73 μm（图 2A）。将卵囊进行分离培养，镜下孢子化卵囊大小为 34.35 μm × 18.32 μm，卵囊内孢子囊呈卵圆形，有斯氏体（图 2B）。

2.4 病理组织学检查

HE 组织染色结果显示，健康肝组织细胞排列紧密，未见 *E.stiedai* 虫卵（图 3A）。实验兔肝组织 HE 染色后，镜下可见肝脏组织结节含大



A 为未孢子化卵囊，B 为孢子化卵囊。

图 2 斯氏艾美耳球虫感染兔卵囊的显微镜观察（× 400）

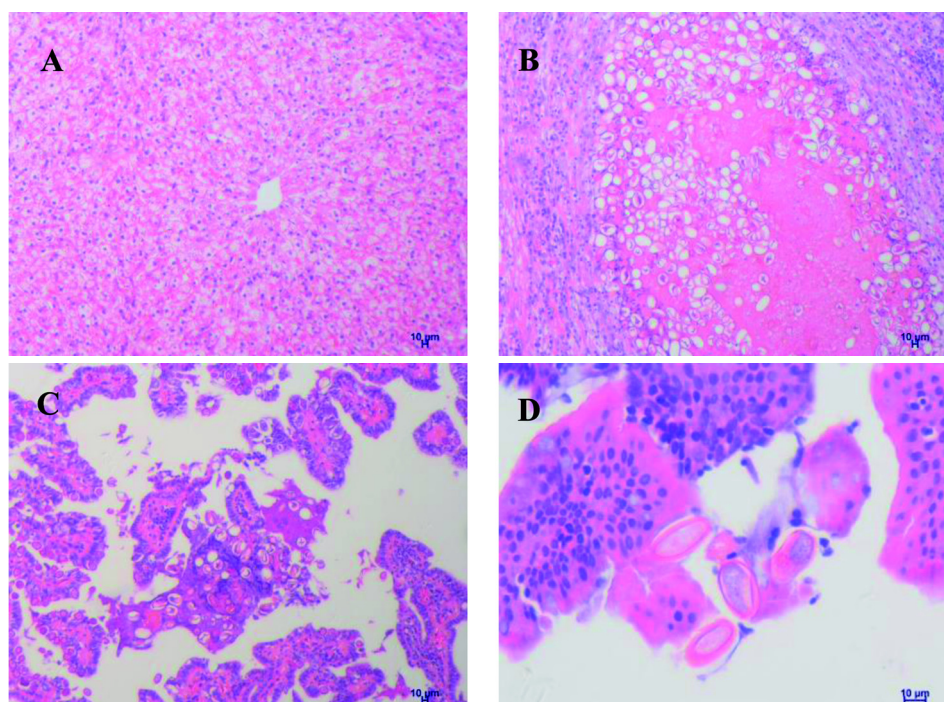
Figure 2 Microscopic observation on oocyst of *Eimeria stiedai* infected rabbits (× 400)

量 *E.stiedai* 虫卵, 虫卵在 10 倍目镜下呈空泡样 (图 3B)。肝胆管上皮增生, 组织内出现大量被切成纵横等不同断面的兔 *E.stiedai* 虫卵 (图 3C)。40 倍目镜下, 可见胆管内虫卵呈椭圆形, 粉红色 (图 3D)。

2.5 巢式 PCR 检测方法

建立的 *E. stiedai* 巢式 PCR 检测方法可扩增出

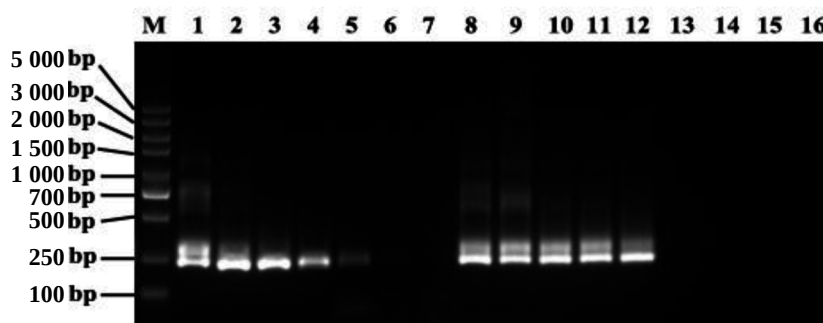
特异性片段, 最低检测限为 1 个卵囊 DNA 样本, 重组质粒最低检测限为 10^{10} 倍稀释的质粒, 拷贝数为 1.14×10^3 。以 *E.maxima*、*E.magna*、*E.tenella* 的 DNA 样本为阴性对照组, 以双蒸水为空白对照组, 两组均未扩增出条带 (图 4)。分析组内 3 次重复性实验结果表明, 变异性系数 $< 5\%$, 重复性较好 (表 2)。



A 为正常肝脏组织细胞 (HE, $\times 100$); B 为肝组织结节, 含大量虫卵 (HE, $\times 100$); C 为肝胆管, 含大量虫卵 (HE, $\times 100$); D 为肝胆管, 含大量虫卵 (HE, $\times 400$)。

图 3 斯氏艾美耳球虫感染兔肝组织病理学检查

Figure 3 Pathological observation on the liver of *Eimeria stiedai* infected rabbits



M 为 DL~5000 Maker。1~7 泳道分别为倍比稀释质粒: 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 倍。8~12 泳道分别为特定个数卵囊: 50、25、10、5、1 个。13~16 泳道分别为阴性对照艾美耳球虫 *E.maxima*、*E.magna*、*E.tenella* 及双蒸水空白对照。

图 4 巢式 PCR 检测斯氏艾美耳球虫卵囊 DNA

Figure 4 Detection of oocyst DNA of *Eimeria stiedai* by nested PCR

表 2 巢式 PCR 组内重复性实验
Table 2 Intra-group repeatability test of nested PCR

DNA 稀释倍数	累积吸光度			吸光度平均值	变异系数 /%
	1	2	3		
10 ⁶	4.96	5.07	4.83	4.95 ± 0.12	2.43
10 ⁷	2.08	2.25	2.21	2.18 ± 0.09	4.08
10 ⁸	0.99	1.04	1.07	1.03 ± 0.04	3.91
10 ⁹	0.57	0.61	0.59	0.59 ± 0.02	3.39
10 ¹⁰	0.31	0.31	0.29	0.30 ± 0.01	3.81
10 ¹¹	0	0	0	0	—
10 ¹²	0	0	0	0	—

3 讨论

实验兔在医学、生命科学等领域发挥重要作用,已广泛应用于肝癌、肝移植、脂肪肝、肝硬化等相关基础研究^[4-6]。兔球虫病危害较大,耐过球虫病的实验兔肝损伤难以修复,并将长期携带虫卵,成为隐性传染源。本实验通过解剖感染 *E.stiedai* 的实验兔发现,与健康肝组织相比,实验组肝脏肿大 1.5~2 倍,肝质量增加 4~5 倍,肝脏表面和实质布满结节和少量钙化灶;镜下病理切片可见大量粉红色的虫卵,形状和大小与 *E.stiedai* 相符,初步鉴定建模成功。

GLOB 是机体抵抗病毒、寄生虫等病原入侵的重要指标,它可反映肝脏的病变程度^[7]。本实验对感染 *E.stiedai* 的新西兰兔进行血液生化检查发现,GLOB 含量显著上升,辅助验证了 *E.stiedai* 成功感染。CREA 和 ALKP 指标偏低可能与球虫感染后引起的贫血有关系。肝脏是代谢过程中的一个重要器官,ALT 是反映肝细胞受损的灵敏指标。本实验未见 ALT 升高,可能是与感染后肝衰竭,正常细胞减少,导致释放到血液中的转氨酶减少有关。

兔球虫种类有 11 种,以混合感染为主,在兔粪样中经常可以检测到肠型和肝型球虫卵囊。目前,主要通过显微镜观察孢子化后卵囊的形态进行鉴定,该方法的准确性有待提高。PCR 技术已广泛应用于兔球虫的检测。温福利等^[8]建立了 *E.stiedai* 的荧光定量 PCR 检测方法。闫文朝等^[9]克隆了 *E.stiedai* 完整的 ITS1-5.8sRNA-ITS2 基因序列,建立了 PCR 检测方法,最低检测限为

50 个卵囊的 DNA。许家园等^[10]对兔肠型艾美耳球虫 (*E.intestinalis*)、黄艾美耳球虫 (*E.flavesce*)、*E.magna* 进行了 ITS 序列测定,结果表明 ITS 序列种内同源性高于种间同源性,可用于 3 种球虫的分子标志。梁子平等^[11]根据兔球虫 ITS1 序列分别设计了针对 11 种兔艾美耳球虫的特异性引物,建立了兔艾美耳球虫多重 PCR 检测方法。宫鹏涛等^[12]建立了用于 11 种兔艾美耳球虫的巢式 PCR 检测试剂盒。本研究通过建立的 *E.stiedai* 感染模型收集了足够卵囊,并根据 ITS1 序列设计了两对特异性引物,该方法的最低检测限为 1 个卵囊 DNA 样本,重组质粒最低检测限为 10¹⁰ 倍稀释的质粒,说明该方法的灵敏度高。阴性对照和空白对照结果表明特异性较好,组内 3 次重复性实验的变异性系数 < 5%,说明重复性较好。后期将应用该方法对实验兔生产和使用单位进行 *E.stiedai* 检测。

本实验成功建立了兔 *E.stiedai* 巢式 PCR 检测方法,有助于进一步补充和完善 *E.stiedai* 的分子生物学检测方法,更好地保障实验兔的供应质量和相关科学实验结果的准确性。

参考文献:

- [1] Yin GW, Goraya MU, Huang JH, et al. Survey of coccidial infection of rabbits in Sichuan Province, Southwest China [J]. Springerplus, 2016, 5(1):1-4.
- [2] 杨光友. 动物寄生虫病学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2005:270-274.
- [3] 江斌, 吴胜会, 林琳, 等. 畜禽寄生虫病诊治图谱[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2012: 144-147.
- [4] Ludwig JM, Xing M, Gai Y, et al. Targeted Yttrium 89-doxorubicin drug-eluting bead a safety and feasibility pilot

- study in a rabbit liver cancer model[J]. Mol Pharm, 2017, 14(8):2824-2830.
- [5] Yoo MC, Vanatta JM, Modanlou KA, et al. Steroid-free liver transplantation using rabbit antithymocyte globulin induction in 500 consecutive patients[J]. Transplantation, 2015, 99(6):1231-1235.
- [6] Joo I, Lee JM, Yoon JH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging — an experimental study in a rabbit model[J]. Radiology, 2014, 270(1):131-140.
- [7] 李世葵, 杜贤. 肝脏疾病患者血清免疫球蛋白与补体检测的临床意义[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(3):261-262.
- [8] 温福利, 郑和平, 党源, 等. 兔斯氏艾美耳球虫荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6):448-454.
- [9] 闫文朝, 韩利方, 张龙现, 等. 斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的克隆及 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(6):1003-1008.
- [10] 许家园, 廖贵城, 胡会朋, 等. 3 种兔艾美耳球虫 rDNA ITS 序列测定与系统进化分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(12):30-33.
- [11] 梁子平, 王照, 王铁峰. 11 种兔源艾美耳球虫多重 PCR 联检法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(10):131-133.
- [12] 宫鹏涛, 林永超, 张西臣, 等. 一种用于 11 种兔艾美耳球虫巢式 PCR 检测试剂盒: CN201610695420.5[P]. 2016-08-22.

Establishment of *Eimeria stiedai* Infected Rabbit Model and Nested PCR Assay

WEN Fuli

(Laboratory of Basic Medicine, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, PLA, Fuzhou 350025, China)

Correspondence to: WEN Fuli, E-mail: wen-fuli@163.com

[Abstract] Objective To establish an infection model and nested PCR assay method for *Eimeria stiedai* (*E.stiedai*) in rabbit. **Methods** The established infection model of *E.stiedai* in rabbits was identified by clinical examination, microscopic observation, blood biochemistry and histopathology. By collecting oocysts, DNA of *E.stiedai* was extracted, and the specific primers were designed to establish nested PCR for detection of *E.stiedai*. **Results** Clinical necropsy: the abdominal circumference of the rabbit was obviously enlarged. The liver enlargement and a large number of white and light yellow nodules were found by biopsy, while the gallbladder and bile duct were swollen, and the bile was pale yellow. Microscopic examination: the size of the eggs was $(31.72-38.43) \mu\text{m} \times (18.10-22.69) \mu\text{m}$. Blood biochemical examination: the content of globulin (GLOB) was increased, while the levels of creatinine (CREA) and alkaline phosphatase (ALKP) were decreased, and the rest of the detection indicators were in the reference range. Histopathological examination: a large number of pink *E. stiedai* eggs were seen in the liver tissue and the bile duct. Nested PCR: the lower limit of detection was 1 oocyst DNA sample and 1.14×10^3 copies of plasmids, and the negative control and blank control showed no bands. The variability coefficient was less than 5%. **Conclusion** The *E.stiedai* infection model in rabbits can be successfully constructed, and the nested PCR assay can amplify the specific fragments of *E.stiedai* with high sensitivity and good repeatability.

[Key words] *Eimeria stiedai*; Histopathology; Nested PCR; Rabbits