

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-01-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

## 桂林地区危重患者弓形虫感染情况调查与 DNA 鉴定分析<sup>①</sup>

梁 雪<sup>1②</sup>, 叶桂山<sup>2</sup>, 谭 洁<sup>1</sup>, 韩明慧<sup>1</sup>, 夏春波<sup>1</sup>, 李中原<sup>1③</sup>

(1. 桂林医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 广西 桂林 541199;  
2. 桂林医学院附属医院感控管理科, 广西 桂林 541001)

**摘要** 目的: 了解广西桂林地区危重患者弓形虫感染情况。方法: 选取 2018 年 11 月至 2019 年 11 月在桂林医学院附属医院住院的危重患者 260 例, 采集患者空腹静脉血, 分离血清, 采用 ELISA 法检测血清弓形虫 IgG 抗体; 分析弓形虫感染与性别、年龄和患病类型间的相关性; 采用 PCR 技术对弓形虫感染阳性患者进行 DNA 鉴定。结果: 260 例危重患者, 弓形虫感染 IgG 阳性男 73 例、女 24 例, 弓形虫 IgG 阳性检出率为 37.31%; 男患者弓形虫 IgG 阳性率 41.01%, 高于女患者 29.27%; 弓形虫感染与危重患者性别、年龄和患病类型无相关性 ( $P>0.05$ ); 弓形虫 IgG 阳性患者血液标本中没有检测到弓形虫特异性 DNA 序列。结论: 桂林地区危重患者弓形虫感染率较高, 年龄、患病类型不是影响弓形虫感染的危险因素。

**关键词:** 弓形虫感染; 危重患者; 桂林地区; DNA 鉴定

中图分类号: R382.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)01-0032-05

### Investigation and DNA identification for *Toxoplasma gondii* infection in critical patients in Guilin region<sup>①</sup>

LIANG Xue<sup>1②</sup>, YE Guishan<sup>2</sup>, TAN Jie<sup>1</sup>, HAN Minghui<sup>1</sup>, XIA Chunbo<sup>1</sup>, LI Zhongyuan<sup>1③</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. Dept. of Hospital-Acquired Infection Control, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

**Abstract** Objective: To investigate the infection status of *T. gondii* in critical patients in the area of Guilin, Guangxi. Methods: 260 fasting venous blood samples of critical patients admitted in the Affiliated Hospital of Guilin Medical University from Nov. 2018 to Nov. 2019 were collected, then the serum was

① 基金项目: 广西自然科学基金项目(2019GXNSFBA185031); 安徽省自然科学基金项目(1908085QC117); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划第 4 期资助项目(2020-58); 桂林医学院新引进博士科研启动项目(31304018021)。

② 第一作者简介: 梁雪, 硕士研究生在读, 研究方向为公共卫生。

③ 通信作者: 李中原, E-mail: lzy210930@163.com。

separated, and the serum IgG antibody level of *T. gondii* was detected by ELISA method. The correlation between *T. gondii* infection and gender, age and type of disease was analyzed, and all *T. gondii* IgG positive samples were identified through DNA extraction. Results: Our data showed that there were 73 male and 24 female critical patients with *T. gondii* IgG antibodies can be positive infection, with the seroprevalence rate of 37.31%; the seroprevalence rate in male was 41.01%, which is higher than 29.27% in female; and there was no correlation between *T. gondii* infection and gender, age and disease type of critical patients ( $P>0.05$ ) and no *T. gondii*-specific DNA sequences were detected in the serum samples of patients with positive IgG. Conclusion: The infection rate of *T. gondii* is higher in critical patients in Guilin region, but the age and type of disease are not the risk factors for the infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; critical patient; Guilin region; DNA identification

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*)简称弓形虫,是一种严格在有核细胞内寄生的原虫,能够感染包括人类在内的所有温血动物,对孕妇、免疫功能缺陷患者和畜牧业生产危害大<sup>[1-2]</sup>。弓形虫分布广泛,血清型众多,感染途径多样,存在速殖子、包囊和卵囊等多种感染形态。研究认为,弓形虫可通过黏膜、受损的皮肤或污染的食物与水而引起感染<sup>[3]</sup>。另外,由于速殖子容易进行体外培养,脑包囊便于体内传代,弓形虫虫体已经成为深入探究人兽共患性病原微生物致病机制和感染引发人与动物行为改变的重要模式生物<sup>[4]</sup>。

人类社会,伴侣动物比如宠物猫和宠物狗携带弓形虫的现象十分常见,已经成为弓形虫感染人的重要来源<sup>[5]</sup>。弓形虫感染有急性和慢性之分,其中急性感染危害较明显,通常伴有持续性高热、关节痛和斑丘疹等症状,除导致弓形虫感染性炎症外<sup>[6]</sup>,严重时还能造成患者死亡<sup>[7]</sup>;慢性感染一般症状不明显,但与人和动物的行为改变紧密相关<sup>[8]</sup>。有资料显示,弓形虫感染造成的危害与被感染宿主的免疫功能相关<sup>[9]</sup>。但弓形虫对危重患者的感染情况,至今未见报道。因此,本研究以广西桂林地区危重患者为观察对象,探讨桂林地区危重患者弓形虫感染情况及其影响因素,为弓形虫病的预防、危重患者的治疗与监护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

Premix Taq™ Version 2.0 plus dye(购自 TaKaRa 公司); DL2000 DNA Marker[购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司]; 血液、细胞和组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)[购自天根生化科技(北京)有限公司]; 人用弓形虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒(上海谷研实业有限公司产品)。PCR 扩增仪、电泳仪和 iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司产品); 凝胶成像系统(上海培清科技有限公司产品); 台式高速离心机(美国 Sigma 公司产品); -80 °C 医用低温冰箱(购自日本 Panasonic 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 标准品与引物 弓形虫 RH 株 DNA 标准品为广西脑与认知神经科学重点实验室保存。针对弓形虫 529 bp 重复序列(Toxo-529)<sup>[10]</sup>设计 PCR 扩增引物,委托北京六合华大基因科技有限公司合成。Toxo-529 F:5'-CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3', Toxo-529 R:5'-CTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'。

1.2.2 样品采集 收集 2018 年 11 月至 2019 年 11 月因癌症、糖尿病、脑病等病因在桂林医学院附属医院住院的 260 例危重患者的血液样品,其中包括男性血液样品 178 份,女性血液样品 82 份;少年(<18 周岁)、青年(≥18 周岁且<35 周岁)、中年(≥35 周岁且<60 周岁)和老年(≥60 岁)血液样品分别为 17

份、22 份、93 份和 128 份;癌症、糖尿病、脑病和其他疾病患者血液样品分别为 61 份、36 份、47 份和 116 份。本研究经桂林医学院医学伦理委员会审核批准;患者及其家属知情同意,以匿名形式参与研究。

**1.2.3 血清制备与抗体检测** 采集的血液样品于室温条件下放置 20 min 后,以 5 000 r/min 的速度离心 5 min,分离血清;血清与沉淀物分别置于-20 ℃、-80 ℃冰箱冻存,备用。血清中弓形虫 IgG 特异性抗体的检测依照上海谷研实业有限公司人用弓形虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的使用说明进行。从弓形虫 IgG 阳性血液样品的沉淀物中提取 DNA,进行 PCR 扩增与分析。

**1.2.4 DNA 提取** 弓形虫 IgG 阳性血液样品沉淀物 100 μg,加等量 GA 缓冲液后,充分混匀,其余步骤参照天根生化科技(北京)有限公司血液、细胞和组织基因组 DNA 提取试剂盒的使用说明进行。需要注意的是提取基因组 DNA 时,需滴加 100 μl TE 缓冲液,室温放置 3 min 后,以 12 000 r/min 的速度离心 2 min,对所得 DNA 进行洗脱。

**1.2.5 PCR 扩增与凝胶电泳** 以提取的 DNA 为模板,Toxo-529 F/R 为引物,对弓形虫 Toxo-529 高度重复序列进行特异性 PCR 扩增,设阳性、阴性和空白对照。PCR 反应体系为:Premix Taq 25.0 μl,Toxo-529 F/R(20 μM)1.0 μl,DNA 2.0 μl,补加 ddH<sub>2</sub>O 至 50.0 μl;扩增条件为:94 ℃预变性 7 min,94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,72 ℃总延伸 10 min。所得产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件对所得数据进行分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 弓形虫感染情况

260 例危重患者,弓形虫 IgG 特异性抗体阳性率为 37.31%;女患者阳性率 29.27%,低于男患者阳性率

41.01%;弓形虫感染与危重患者性别( $\chi^2 = 3.3098$ )和年龄( $\chi^2 = 0.2721$ )均无相关性( $P > 0.05$ ),见表 1 和表 2。

表 1 弓形虫感染与性别的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
男	178	73	105	41.01
女	82	24	58	29.27

表 2 弓形虫感染与年龄的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
少年	17	7	10	41.18
青年	22	9	13	40.91
中年	93	34	59	36.56
老年	128	47	81	36.72

### 2.2 弓形虫感染与危重患者患病类型间的相关性

对弓形虫感染与待检危重患者患病类型间的关系进行分析时发现,弓形虫 IgG 抗体检出率与患病类型无相关性( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 弓形虫感染与危重患者患病类型的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
癌症	61	18	43	29.51
糖尿病	36	17	19	47.22
脑病	47	23	24	48.94

### 2.3 弓形虫 Toxo-529 重复序列分析

PCR 产物凝胶电泳图谱上只有弓形虫 RH 株 DNA 标准品有 529 bp 的特异性扩增产物条带,弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品、阴性对照和空白对照均未检测到特异性扩增产物条带,见图 1。

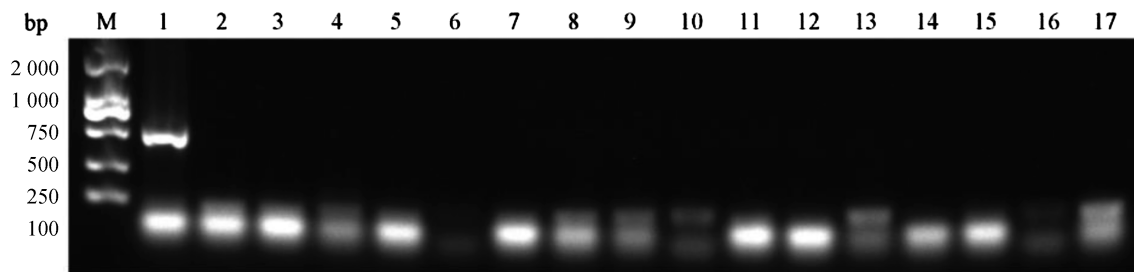


图 1 DL2000 DNA Marker;1.弓形虫 RH 株 DNA 标准品 PCR 扩增产物;2.阴性对照 PCR 扩增产物;3.空白对照 PCR 扩增产物;4~17.弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品 PCR 扩增产物

图 1 弓形虫基因组 Toxo-529 序列 PCR 扩增的凝胶电泳图谱

### 3 讨论

弓形虫是一种人兽共患性病原微生物,感染人和动物的现象十分常见。全球约有 1/3 的人群被弓形虫感染<sup>[11]</sup>,部分国家或地区甚至更高,而我国孕妇的弓形虫感染率则不足 10%<sup>[12]</sup>。人类社会的伴侣动物,尤其是宠物猫,已经成为弓形虫感染人的重要来源<sup>[5]</sup>。

自然界中弓形虫以猫-鼠的互相感染最为常见<sup>[3]</sup>。野猫捕食被感染的野鼠后,虫体经消化道侵入猫的肠道黏膜上皮细胞,产生数以万计的配子,雌、雄配子结合后发育成卵囊,随粪便排出,野鼠一旦摄入即被感染。弓形虫急性感染引起弓形虫性脑炎<sup>[6]</sup>,严重时可导致感染者死亡<sup>[7]</sup>。弓形虫能突破血脑屏障侵入小鼠脑组织,其作用的过程与机制至今尚未完全阐明<sup>[13-15]</sup>。

弓形虫基因型多,分布极其广泛,对孕妇、免疫功能缺陷人群和畜牧业生产危害大,不同毒株的毒力差异很大<sup>[1-2,16]</sup>。除孕妇等特殊人群外<sup>[17]</sup>,弓形虫是否对其他人群比如危重患者人群的感染有影响,值得深入探讨。本研究以广西桂林地区危重患者为观察对象,分析其与危重患者年龄、性别和患病类型间的关系,并用特异性 PCR 技术对弓形虫 IgG 检查阳性血液样品进行 DNA 鉴定。

结果显示,260 份危重患者待检血液样品中,73 名男患者和 24 名女患者的血清呈现弓形虫 IgG 抗体阳性,检出率为 37.31%,较世界平均水平明显增高<sup>[11]</sup>。此外,男患者的弓形虫检出率较女患者高,弓形虫血清阳性检出率随待检危重患者的年龄增大

变化不明显,也与患者患病类型无相关,与文献报道相符<sup>[18]</sup>。

Toxo-529 序列在众多弓形虫基因组中普遍存在且高度重复,是鉴定宿主弓形虫感染的重要参数<sup>[10]</sup>。本研究以弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品提取的 DNA 为模板,进行特异性 PCR 扩增,发现除弓形虫 RH 株 DNA 标准品外,其余检测样品包括阴性对照和空白对照在内,均未能扩增出目的片段,即大小为 529 bp 的 Toxo-529 序列,这给桂林地区危重患者弓形虫感染的分型带来了困难,这个问题也值得深入研究。本研究为桂林地区弓形虫感染的情况提供了重要实验室数据。

### 参考文献:

- [1] GARNAUD C, FRICKER-HIDALGO H, EVENGÅRD B, et al. *Toxoplasma gondii*-specific IgG avidity testing in pregnant women[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(9):1155-1160.
- [2] MILNE G, WEBSTER J P, WALKER M. *Toxoplasma gondii*: an underestimated threat? [J]. Trends Parasitol, 2020, 36(12):959-969.
- [3] ATTIAS M, TEIXEIRA D E, BENCHIMOL M, et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations [J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1):588.
- [4] SZABO E K, FINNEY C A M. *Toxoplasma gondii*: one organism, multiple models [J]. Trends Parasitol, 2017, 33(2):113-127.
- [5] MAREZE M, BENITEZ A D N, BRANDÃO A P D, et al. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil [J]. PLoS One, 2019, 14(2):e0212375.

- [6] XIAO J C, BHONDOEKHAN F, SEABERG E C, et al. Serological responses to *Toxoplasma gondii* and matrix antigen 1 predict the risk of subsequent toxoplasmic encephalitis in people living with human immunodeficiency virus (HIV)[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(7): e2270-e2277.
- [7] MUKHOPADHYAY D, ARRANZ-SOLÍS D, SAEIJ J P J. Influence of the host and parasite strain on the immune response during *Toxoplasma* infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 580425.
- [8] POSTOLACHE T T, WADHAWAN A, RUJESCU D, et al. *Toxoplasma gondii*, suicidal behavior, and intermediate phenotypes for suicidal behavior [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 665682.
- [9] SAFARPOUR H, CEVIK M, ZAREAN M, et al. Global status of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in people living with HIV [J]. AIDS, 2020, 34(3): 469-474.
- [10] HOMAN W L, VERCAMMEN M, DE BRAEKELEER J, et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR [J]. Int J Parasitol, 2000, 30(1): 69-75.
- [11] SAADATNIA G, GOLKAR M. A review on human toxoplasmosis [J]. Scand J Infect Dis, 2012, 44(11): 805-814.
- [12] GAO X J, ZHAO Z J, HE Z H, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China [J]. Parasitology, 2012, 139(2): 139-147.
- [13] FLEGR J. Does *Toxoplasma* infection increase sexual masochism and submissiveness? Yes and no [J]. Commun Integr Biol, 2017, 10(5-6): e1303590.
- [14] ABDULAI-SAIKU S, TONG W H, VYAS A. Behavioral manipulation by *Toxoplasma gondii*: does brain residence matter? [J]. Trends Parasitol, 2021, 37(5): 381-390.
- [15] ROSS E C, OLIVERA G C, BARRAGAN A. Early passage of *Toxoplasma gondii* across the blood-brain barrier [J]. Trends Parasitol, 2022, 38(6): 450-461.
- [16] MCGOVERN K E, CABRAL C M, MORRISON H W, et al. Aging with *Toxoplasma gondii* results in pathogen clearance, resolution of inflammation, and minimal consequences to learning and memory [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7979.
- [17] 牛丽丽, 刘红丽. 孕产妇弓形虫感染影响因素及对妊娠结局的影响 [J]. 实用预防医学, 2022, 29(7): 869-871.
- [18] MATTA S K, RINKENBERGER N, DUNAY I R, et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(7): 467-480.

[收稿日期: 2022-10-09]

[责任编辑: 涂 剑, 向 秋 英文编辑: 阳雨君]