

人工饲养树鼩皮肤真菌携带的调查

尹博文, 陈玲霞, 李振宇, 李娜, 孙晓梅

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 调查人工饲养条件下树鼩皮肤真菌携带情况, 为实验树鼩的微生物质量控制提供依据。**方法** 刮取 79 只树鼩皮肤表皮碎屑, 包括野生来源的 51 只和人工繁殖的 F1 代 28 只, 采用沙氏青霉素瓶斜面法和沙氏平皿培养法分别进行培养, 对长出的每株真菌进行取样涂片染色, 显微镜镜检观察真菌形态, 用酚氯仿法提取真菌 DNA, PCR 扩增 ITS 基因, 测序后经 BLAST 进行核酸同源性比对, 进一步鉴定分析。**结果** 野生来源树鼩有 9 份样长出真菌, F1 代有 3 份样长出真菌菌落, 携带率分别 15.69% 和 10.71%。所有真菌 DNA 最后进行 BLAST 比对鉴定后发现为 7 个种属的真菌, 但均无致病性。**结论** 人工饲养的树鼩种群中皮肤真菌携带率较低, 并且随繁殖代数增加而下降, 未检测到皮肤病原真菌。

【关键词】 树鼩; 皮肤真菌; ITS 基因扩增; 鉴定

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0013-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.004

The survey of dermatophyte in artificial feeding of tree shrews

YIN Bo-wen, CHEN Ling-xia, LI Zhen-yu, LI Na, SUN Xiao-mei

(Center of Tree shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infection Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To investigate the pathogenic dermal fungi in tree shrews from the center of germplasm resources, to provide the basic data for the experimental tree shrews' microbiological quality control. **Methods** 79 samples obtained from tree shrews were inoculated on Sabouraud's platiculture and slant cultivation, 51 of which are from the wild origin and 28 from artificial feeding F1 generation, and they were subjected to microscope observation. Then extracted DNA with traditional methods. Amplify the ITS gene by PCR. Finally sequencing by blast of nucleotide homology analysis. **Results** 9 samples of the wild tree shrews turned into growing fungus, and so as 3 of the F1 generation. The carrying rate are 15.69% and 10.71% respectively. All fungi were found to be non-pathogenic followed BLAST. **Conclusion** The carrying rate of dermatophyte in artificial feeding of tree shrews is very low, and which decreased with the increasing breeding generation. Pathogenic dermal fungi has not been found.

【Key words】 Tree shrew; Dermatophyte; ITS gene amplification; Identification

树鼩作为灵长类动物的近亲, 被用于建立各种人类疾病模型研究, 越来越受到研究工作者的重要

视^[1]。在树鼩的实验动物化研究过程中建立普通级、清洁级、无特定病原体菌级动物群需要对多种

[基金项目] 国家科技支撑计划(2014BAI01B01); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 尹博文(1990 -), 男, 硕士, 研究方向: 实验动物病原学。E-mail: 464503114@qq.com。

[通讯作者] 孙晓梅(1963 -), 女, 主任技师。E-mail: sxm@imbcams.com.cn。

病原进行检测和控制。其中,皮肤病原真菌(pathogenic dermal fungi)是常见的致病菌^[2-3],可引起人兽共患的皮肤病,主要侵害人和动物的皮肤、毛发等部位,各种实验动物均可感染,但可随着饲养设施和环境条件的改善而得到控制。关于树鼩皮肤病原真菌的调查国外鲜有报道,国内多数是关于家兔的皮肤真菌报道^[4-5],仅邢进等^[6]对 61 只刚从野外捕获的树鼩真菌携带情况进行了调查。本调查研究着重关注于长期饲养的野生树鼩及 F1 代的真菌携带情况,排除饲养环境引起的致病真菌,为动物净化提供依据。本次从树鼩身上分离得到的皮肤真菌仅通过形态观察难以鉴定,而菌种间 ITS 区域存在着变异,研究 ITS 序列为菌种分类鉴定提供了十分可靠的证据,所以本次实验结合纯培养、形态观察及 ITS 序列分析进行综合鉴定^[7-9]。通过本次调查为制定树鼩微生物学等级及监测提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生来源树鼩 51 只已在该设施中人工饲养了一年,F1 代树鼩 28 只由本单位人工繁殖,年龄为 1~2 岁的皮肤样本。饲养环境:温度 22℃~28℃,相对湿度 30%~60%,噪音≤40 dB,光照强度 100~1501 Lx。实验动物来源于医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)K2013-0001】。实验操作在医学生物学研究所树鼩种质资源中心实验设施进行【SYXK(滇)K2013-0001】。

1.2 仪器及试剂

Eclipse 50i Nikon 显微镜,Universal Hood II 凝胶成像系统,CO2 T/C 恒温培养箱,BS100S 电子天平,R-708 水平电泳槽,CT15RE 低温离心机,CU420 恒温水浴锅,TOMY-SS-325 高压灭菌锅,ND1000 紫外分光光度计,TP600 梯度 PCR 仪,NC320 电泳仪,载玻片;PBS(购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司),棉蓝染色液(购自珠海),Buffer AE(购自 QIAGEN),平衡酚(购自北京索莱宝科技有限公司),氯仿(购自西陇化工),异戊醇(购自西陇化工),无水乙醇(购自西陇化工),PCR 扩增试剂盒 R011(购自大连宝生物)CTAB 提取液(NaCl、Tris-HCl、EDTA 配制)

1.3 方法

1.3.1 真菌的分离培养

剔除树鼩背部约 2 cm² 的毛发,露出皮肤,用医用酒精消毒,刮取皮肤表面碎屑,沙氏青霉素瓶斜面三点 28℃ 培养 7 d。将青霉素瓶斜面分离培养得到的菌株接种至沙氏平皿培养基上进行纯培养,28℃ 5 d。

1.3.2 染色法观察

取一清洁载玻片,滴加棉蓝染色液 1 滴,然后挑取培养物或标本少许于其中,用接种针将其摊开,加盖玻片微微加温并稍压盖片除去气泡后镜检,真菌将染成蓝色。

1.3.3 真菌 DNA 提取

长出的菌落取约 1 cm² 用无菌纱布过滤,无菌蒸馏水洗涤 2~3 遍,沥干水分;将菌体放入无菌研钵中,用足量的液氮将其研至粉末状;加入 1~2 倍体积的 65℃ 预热 30 min 的 CTAB 提取液,充分混匀,65℃ 水浴 30~60 min,其间上下轻缓混合 2~3 次,12000 r/min 离心 5 min;取上清,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),上下轻缓混合 10 min,12000 r/min 离心 5 min;重复一抽提一次;小心取上清,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),上下轻缓混合 10 min,12000 r/min 离心 5 min;小心取上清,加入 2 倍体积的无水冰乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 的氯化钠,4℃,12000 r/min 离心 15 min;弃上清,70% 的冰乙醇冲洗 2 遍,自然晾干,溶于 TE buffer 中。

1.3.4 真菌 ITS 基因扩增与分析

真菌 ITS 序列通用引物 ITS 1 和 ITS 4 由昆明硕擎生物科技有限公司合成。上游引物(ITS1)为:5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3'下游引物(ITS4)为:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。将 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳 90V 50 min 检测片段大小,并将阳性结果的 PCR 产物送至昆明硕擎生物科技有限公司测序。登录 NCBI BLAST 进行核酸同源性比较。

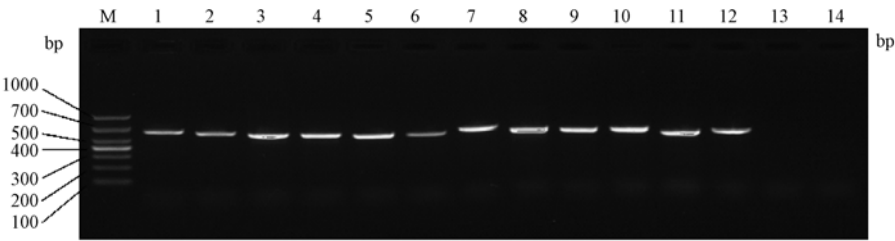
2 结果

3.1 真菌分离培养

将 79 份斜面沙氏培养基长出的 12 株真菌转接于沙氏平皿培养基上进行培养。培养 10 d 后,观察到若干真菌菌落形态。

3.2 真菌分离株电泳结果

真菌提取的 DNA 通过 PCR 后进行电泳,见图 1。M 为 1000 bp DNA marker,1-12 为 12 真菌



注:M: 1000 bp DNA marker; 1-12:12 株真菌 PCR 产物;13:钩端螺旋体爪哇型阴性对照;14:空白对照。

图 1 12 株真菌 DNA 电泳图

Fig. 1 The DNA electrophoresis of the twelve fungus

表 1 树鼩皮肤分离的真菌和携带率

Tab.1 Pathogenic dermal fungi in tree shrews and the carrying rate

树鼩来源	采样数	分离的真菌种类名称	检出数	携带率
Tree shrew resource	Samples	The separated fungus species	Detected number	Carrying rate
野生 Wild origin	n = 51	干朽菌属	2	15. 69%
		<i>Byssomerulius corium</i>		
		Didymellaceae	1	
		<i>leptosphaerulina</i>		
		青霉菌属	4	
		<i>Penicillium commune</i>		
		链格孢属	2	
人工繁育 F1 代 F1 generation	n = 28	<i>Alternaria alternate</i>		10. 71%
		枝孢菌属	1	
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
		局限曲霉属	1	
		<i>Aspergillus restrictus</i>		
		毛壳菌属	1	
		<i>Chaetomium subaffine</i>		

DNA 电泳情况,片段大小在 500 bp ~ 800 bp 之间,13 爪哇型为钩端螺旋体的阴性对照,14 为空白对照。

3.3 体表真菌种类鉴定

本次从饲养的野生树鼩和 F1 代树鼩的体表皮肤结痂碎屑及毛发经沙氏斜面培养和沙氏平皿培养后,分离到真菌。经真菌菌落观察、菌丝染色后镜下形态观察及 ITS 序列分析,鉴定真菌为 7 个属的 7 种真菌。其中饲养的野生树鼩青霉菌 (*Penicillium*)、链格孢(*Alternaria alternate*)和干朽菌(*Byssomerulius corium*)检出率最高。而 F1 代树鼩分离到三株真菌,分别为枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、局限曲霉(*Aspergillus restrictus*)及近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)(表 1)。

4 讨论

树鼩作为一种实验动物新资源,对其自身携带的皮肤病原真菌的研究报道甚缺。本次调查旨在了解树鼩资源种质中心人工饲养的树鼩皮肤真菌的携带情况,特别是是否携带人兽共患致病性较高

的皮肤病原真菌,如石膏样小孢子菌、石膏样毛癣菌、羊毛状小孢子菌以及猴类毛癣菌^[10-11],为其微生物质量控制提供依据。

此次调查采用形态观察结合分子生物学的方法,较传统单纯的形态学观察能更加直接精确地鉴别真菌种类。在分离树鼩皮肤真菌的过程中,参考了实验动物国家标准 GB/T14926. 4 - 2001^[13]实验动物皮肤病原真菌检测要求,沙氏试管斜面三点培养法,并结合周莎桑^[8]等改良的实验动物皮肤病原检测方法,即沙氏平皿培养法,最后确定用沙氏青霉素瓶斜面三点培养法分离真菌并用沙氏平皿法转接获得纯培养。青霉素瓶瓶身较试管短,操作时更方便并且受污染的概率更小。其次,青霉素瓶体积较试管小,培养基需量更少,操作时受到培养基颜色深度的干扰更低。由于有时会存在多种菌混合生长的情况,这种方法能有效地避免漏检,并且能获得菌株的纯培养。

从已报道的文献来看,从啮齿类、兔、犬、猴等实验动物中均能分离到上述的皮肤病原真菌,但这些病原菌是可以随着饲养设施和环境条件的改善

来得以控制的。至今针对实验树鼩皮肤病原真菌的报道仅有一篇,即邢进等从树鼩中共分离到 11 种真菌,归于 10 个属,其中 1 株为致病菌即石膏样毛癣菌^[6]。本次对树鼩种质资源中心饲养的野生树鼩和 F1 代的皮肤病原真菌调查,并没有分离到致病真菌。所分离得到的菌株有青霉菌、曲霉菌等,与邢进等分离到的真菌结果一致,但携带率偏低。分析表明这可能是与树鼩长期的饲养卫生、环境、饲料、温湿度控制和单独小笼饲养等的方式相关。室内环境洁净度高于野外,从根本上切断树鼩皮肤病原真菌的感染途径。在室内环境中,致病菌也有可能是在人工饲养的条件下,携带率慢慢降低,最终控制在很低的水平。从实验结果可以发现野生树鼩分离到的真菌株多于 F1 代动物群,表明随着人工饲养时间的增加,其微生物的携带率会逐步的下降。对于树鼩携带真菌的调查,今后还将进一步扩大采样量,筛查真菌,以确保树鼩真菌携带率的重复性与其携带真菌的具体情况提供参考依据。

另外,从邢进等的研究和本次调查结合来看,树鼩皮肤病原真菌的携带率非常低。除了上文叙述的可能性因素外,也存在树鼩对上述的皮肤病原真菌不易感的可能性。后期将加大样本量的采集,若能得到相同的结果,那么说明本单位树鼩种质资源中心饲养繁殖树鼩的微生物皮肤病原真菌即得到了控制。

已有研究显示动物与不同微生物群落共生可能会导致宿主的不同结局,影响宿主的健康。如巴拿马金蛙的不同共生微生物群落可能会导致宿主的不同结局,影响宿主的健康^[12]。所以,我们将在今后研究中针对树鼩皮肤真菌的调查与筛选范围进一步扩大微生物群落,如细菌、真菌等及群落之间的联系,更系统地阐明皮肤致病性的多因素原因,而非单一因素。

参考文献:

- [1] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. 实验动物科学, 2013, 30(2):59-63.
- [2] 温海. 医学真菌学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:14-19.
- [3] Ainsworth G C. Fungus diseases of animals. [J]. Nature, 1950, 166(4222):547-549.
- [4] 李明勇,牟特,刘曼,等. 兔皮肤病原真菌的分离及其 ITS 序列的分析鉴定[C]// 第四届(2014)中国业发展大会会刊 2014.
- [5] 崔丽娜,姜文学,杨丽萍,等. 家兔皮肤真菌通用引物 PCR 检测和培养鉴定的比较研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24:2389-2391.
- [6] 邢进,冯芳芳,付瑞,等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]. 实验动物科学, 2012, 29(3):34-38.
- [7] 陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发, 2007, 21:5-7.
- [8] 周莎桑,戴方伟,宋晓明,等. 实验动物皮肤病原真菌检测方法的改良[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20:58-60.
- [9] Rittenour W R, Ciaccio C E, Barnes C S, et al. Internal transcribed spacer rRNA gene sequencing analysis of fungal diversity in Kansas City indoor environments[J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2013, 16:33-43.
- [10] 吴绍熙. 人畜共患真菌病原菌的分类[J]. 中国人兽共患病学报, 1986, 2(1):34-36.
- [11] Khaled J M, Golah H A, Khalel A S, et al. Dermatophyte and non dermatophyte fungi in Riyadh City, Saudi Arabia[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, (47):604-609.
- [12] Becker M H, Walke J B, Cikanek S, et al. Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs infected with a lethal fungus[J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 2015, 282(1805):1-9.
- [13] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:141-149.

[修回日期]2015-10-10