

新发感染性寄生虫诊断方法研究进展

伍海英, 游晓星, 刘彦, 吴移谋

(南华大学病原生物学研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 近年来新发寄生虫病作为一种重要的公共卫生问题引起了广泛的重视, 包括隐孢子虫、微孢子目、环孢子虫、阿米巴病和巴贝虫新种等。实验室检测对新发寄生虫病的治疗和公共卫生监督显得尤为重要。逐年发展的分子生物学方法不仅可发现和认识新发寄生虫, 还可进行流行病学分型等研究, 因此显示出了巨大的优势。

关键词: 新发感染性寄生虫; 生物学特征; 检测方法

中图分类号: R38

文献标识码: B

文章编号: 2095-1116(2011)03-0340-03

新发寄生虫病 (Emerging parasitic diseases) 是指新识别的和未确知的寄生虫虫种, 预测在近期或未来 30 年内可造成公共卫生问题的寄生虫病。新发寄生虫病可分为 4 类, 第 1 类是疾病或综合症已被人们所认识, 但未被确认或病原体尚未被确认; 第 2 类是疾病已在人群中存在, 但病原体被重新鉴定或分类, 如在我国境内多次报道、至今仍无定论的间日疟原虫“多核亚种”^[1]; 第 3 类是营自生生活或寄生于动物体内的寄生虫, 现发现它们可以偶然在人体寄生, 如棘阿米巴原虫; 第 4 类是新发现的人体寄生虫, 如我国首次报道的蠓缨滴虫^[2]。

随着世界经济一体化发展的进程中, 环境的改变、人口流动与贸易交流机会频繁, 促使多种新发寄生虫病逐渐成为日益重要的公共卫生问题, 不仅对人民健康和生命安全带来严重威胁, 也给经济建设和国家安全带来重大影响。本文就近 30 年几种比较重要的新发寄生虫隐孢子虫、微孢子目、环孢子虫、阿米巴病和巴贝虫新种的生物学特征和检测方法进行简要综述。

1 隐孢子虫 (Cryptosporidium spp)

隐孢子虫是一类人兽共患原生动动物类寄生虫, 主要通过粪口途径食入感染性卵囊而引起隐孢子病, 表现为水样腹泻, 是发展中国家儿童腹泻流行的原因。本病虽呈自限性, 但在免疫功能低下者 (如艾滋病患者) 可引起严重的持续性腹泻, 也是艾滋病患者死亡的

重要因素之一。新爆发的隐孢子虫属有小球隐孢子虫 (Cryptosporidium parvum)、人隐孢子虫 (Cryptosporidium hominis); 1994 年在美国 Milwaukee 爆发了迄今为止人数最多的隐孢子虫病大流行^[3]。小球隐孢子虫宿主广泛, 包括人和反刍动物, 但在人隐孢子虫中, 人是其唯一宿主。卵囊是隐孢子虫的主要致病阶段, 因此临床上主要针对卵囊进行检测。可采用肠黏膜进行活检或对粪便中的可疑卵囊进行染色检查, 粪便经浓缩后能提高检测敏感度, 主要包括改良的抗酸染色法、金胺一酚改良抗酸复染法、多重过滤染色法、血清混合粘附法, 这些方法快速、简便、对仪器要求不高, 但费时费力、检出率低。并且抗酸染色特异性低, 同时也不能从形态上区分小球隐孢子虫和人隐孢子虫。免疫学方法目前主要用于检测抗原, 而对隐孢子虫抗体的研究还不多, 主要有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、蛋白印迹技术 (Western blotting)、流式细胞术 (FCM) 和电化学发光检测技术 (electro-chemiluminescence assay) 等。近年来迅速发展的分子生物学与免疫学方法相比较, 具有快速、灵敏、特异等优点, 并用于流行病学和隐孢子虫不同种属以及基因型的鉴定^[4]。以 18S RNA 和外膜蛋白基因为靶点的实时 PCR, 敏感性为 95%~97%, 特异性为 100%, 水样便的检测灵敏度估计为 50~500 卵囊/mL。PCR 序列分析中发现多个 SNPs, 具有种特异性, 从而可用来检测不同的亚型^[5]。随着小球隐孢子虫和人隐孢子虫全基因组测序, 利用多位点序列分型 (multilocus sequencotyping, MLST) 进行分型, 并广泛用于群体

收稿日期: 2011-4-20

基金项目: 国家科技重大专项资助 (2008ZX10004)。

通讯作者: 吴移谋, 电话: 0734-8282503, E-mail: yimouwu@sina.com.

遗传学研究和地域追踪^[6]。而最新发展起来的传感器技术(Sensor Technology),可对特定核苷酸进行检测,包括生物传感器(Biosensor)、免疫传感器(Immunosensor)和PEMC传感器(millimeter-sized cantilever PEMC sensor)^[7],这些定量的检测方法快速简便、灵敏度高,发展前景好。

2 微孢子目(Microsporidia)

微孢子目虫种是孢子样专性细胞内寄生原虫,可引起肠、肝、肾、大脑和其他组织的感染。人类感染虫种主要有脑炎微孢子虫属(Encephalitozoon)、肠上皮细胞微孢子虫属(Enterocytozoon)、匹里属微孢子虫(Pleistophora)、微粒子微孢子虫属(Nosema)、康氏短粒虫(Brachiola connori)、人气管普孢虫(Trachipleistophora hominis)、角膜条孢虫(Vittaforma corneae)和锡兰微孢子虫(Microsporidium ceylonensis),新发的有比氏肠胞微孢子虫(Enterocytozoon bienewisi)和海伦脑炎微孢子虫(Encephalitozoon hellem),分别引起持续性腹泻、结膜炎及弥漫性疾病。

最简便的方法是韦伯 Chromotrop 染色法检测组织、体液和粪便中的微孢子虫,但其染色过程较耗时。荧光染料 Uvitex 2B 和荧光增白剂(Calcofluor White M2R)对微孢子虫孢子壁中的几丁质有高度的亲和性,故可用于微孢子虫的荧光检测,灵敏度为 50 000 孢子/mL。荧光染色相对较容易,染色过程较快,敏感性也较理想,但特异性差。肠外细胞学和组织学诊断可用改良三色法(modified trichrome stain, MTS)、革兰染色、吉姆萨染色或组织革兰染色(Brown-Hopps 和 chemifluorescent)进行观察。透射电镜可辨别某些孢子虫的形态,但操作过程复杂、耗时、费用较高,不宜作为常规的检查方法。免疫荧光可用来检测体液和组织的微孢子虫,利用多克隆或单克隆抗体直接与孢子抗原和极丝蛋白(PTP)相结合,但敏感性比传统染色方法要低,并需要进一步对其进行鉴定^[8]。

目前尚未出现商品化的分子学检测试剂盒,但可通过 PCR 法检测粪便、肠组织或其他组织中的微孢子 DNA,并进行种的鉴定。微孢子目与真核生物有 5.3 ~ 19.5 Mb 的基因组交叉,它最接近原核生物核,具有小亚基 16S rRNA 和大亚基 23S rRNA 基因,中间被非转录序列间隔,缺 5.8S rRNA 基因。PCR 的靶点常选取 16S rRNA 基因大小亚单位、PTP、转录间隔序列(ITS)。PCR 的总敏感性为 67% (36% ~ 96%),常规染色的光学显微镜镜检的敏感性为 54% (25% ~ 71%),而特异性分别为 98% 和 95%。粪便中显微镜

检出的敏感性为 10^4 和 10^6 孢子/每克粪便,PCR 为 10^2 孢子/每克粪便。

3 环孢子虫(Cyclospora)

卡耶他环孢球虫(Cyclospora cayentanensis)在 1995 年首次被认为是人类致病性寄生虫,主要通过摄取环孢子虫卵囊污染的水或食物致病,引起胃肠炎和慢性腹泻。以动物—人感染为主,人—人感染的发生率较低的原因是孢子在排出的粪便中形成时间长(至少 7 天)。许多病例发生在热带和亚热带国家,临床上呈水样腹泻、痉挛和胃胀气,病程长时伴有体重下降,若不加治疗,腹泻可持续数周,而免疫低下病人可持续数月。

卵囊检测是确诊本病简便而又可靠的方法。对粪便标本进行改良抗酸染色或改良加热番红精染色后进行显微镜镜检,其卵囊形态虽与隐孢子虫相似,但直径是其 2 倍。亦可用新鲜粪便湿片于紫外波长 365 nm 显微镜下,卵囊可显示蓝色自发荧光。与紫外光检测方法相比较,快速抗酸染色的敏感度是 78%。孢子化实验将卵囊孢子化后再进行检测,虽不是常规检测方法,然而可对其进行确诊。PCR 检测粪便、产物和水时^[9],引物靶点一般选择内转录间隔区(ITS)和 18S rRNA SNPs^[10],灵敏度达 10 卵囊/每克粪便。设计 PCR 引物 CCITS2-F 和 CCITS2-R 进行检测,是目前一种快速灵敏简单的检测方法。多重 PCR 可用来同时鉴定水源性腹泻的原虫病原体如隐孢子虫、微孢子虫和环孢子虫^[11]。

4 阿米巴病(Amoebiasis)

在致病性自由生活阿米巴中,棘阿米巴属(Acanthamoeba)和巴拉姆西亚阿米巴(Balamuthia)引起肉芽肿性阿米巴脑炎,福(勒)氏耐格里阿米巴(Naegleria fowleri)主要引起脑膜脑炎,其感染最初可能位于下呼吸道、鼻窦或皮肤,然后扩散到中枢神经系统。另外棘阿米巴属也能引起角膜炎和皮肤损伤,自 1974 年 Nagington 等首次报道棘阿米巴角膜炎以来,全世界已相继有数百例报道。1986 年在患肉芽肿性阿米巴脑炎的狒狒中利用哺乳动物细胞培养分离到巴拉姆西亚阿米巴。脑组织的病理形态学很难鉴别棘阿米巴属和巴拉姆西亚阿米巴,但可用特异性抗体进行免疫学检测。血清学试验 ELISA 和 IFA 有相似的一致性,然而与其他未知病原体有交叉反应的可能。福氏耐格里阿米巴和棘阿米巴可用细菌作为食物进行

培养,但巴拉姆西阿阿米巴由于生长缓慢,因此不推荐此法。PCR 能实现快速特异的诊断,利用对脑组织或脑脊液标本,靶点扩增线粒体 16S rRNA 和 18S rRNA,灵敏度能达到 0.2 阿米巴/反应混合物。实时多重 PCR 利用 TaqMan 探针能区分这三种阿米巴^[12],灵敏度达 1 阿米巴/反应混合物。

5 巴贝虫新种(New species of Babesia)

巴贝虫新种是巴贝虫属(*Babesia*)原生动物,我国在云南、内蒙古、浙江、台湾等地偶有报道,大陆感染的巴贝虫直径均为 $<2.5 \mu\text{m}$ 的小型巴贝虫,但未经血清学和分子生物学确证^[13]。中国台湾病例经血清学检测,与微小贝巴虫有关,但又不同于微小贝巴虫,故命名为 TW1。巴贝虫传染源主要是带虫啮齿类动物,经蜱媒传播,人—人间也可通过输血造成感染,引起非典型巴贝西虫病。本病临床症状轻重不一,轻者可无症状,重者可有类似疟疾样的发热和急性溶血性贫血等,脾切除和免疫低下的患者感染往往比较严重。病原学检查主要是血涂片吉姆萨染色后在红细胞内找虫体,也可选血沉棕黄层做定量分析。虫体为细小圆形或卵圆形环,胞质蓝白色,可见一个或两个微小红点,或呈多形性,形态与恶性疟原虫相似。免疫学检查可区分这两种寄生虫,最常用的是 IFA,敏感度高,特异性强,重复性好,是慢性感性的首选方法。用新鲜血液接种金色仓鼠可进行确诊。利用特异性引物进行 PCR 或巢式 PCR,靶向 18S rRNA 进行扩增^[14],实现了快速灵敏的检测。

展 望

人群寄生虫感染谱的变化,机会致病原虫病、旅游者疾病、宠物热引起的人兽共患寄生虫病等不断出现,对突发公共卫生事件和原因不明疾病的应急反应提出了更高的要求,因此需要加强对新发感染性寄生虫的发现、研究、预防和控制,分子生物学方法在此过程中发挥了重要的作用,因此成为了最具前景的技术,其特异性好、灵敏度高、快速准确,并实现了自动化、标准化和高通量检测,但是需进一步进行研究,以减少实验室污染、提高其特异性,并努力使检测仪器小型化、发展即刻检验^[1],从而得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] Divis PC, Shokoples SE, Singh BA, et al. TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi* [J]. *Malar J*, 2010, 9(1): 344-351.
- [2] 卢潍媛, 常正山, 曹建平. 一种新发机会性感染致病病原——糠缨滴虫[J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2010, 37(1): 39-42.
- [3] MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(15): 161-167.
- [4] Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, et al. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 72-77.
- [5] Bouzid M, Tyler KM, Christen R, et al. Multi-locus analysis of human infective *Cryptosporidium* species and subtypes using ten novel genetic loci [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 213.
- [6] Lihua Xiao. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update [J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124(1): 80-89.
- [7] Sen Xu. Sensitive measurement of waterborne parasites and cell culture mycoplasma with cantilever sensor [D]. Drexel University, 2010: 69-91.
- [8] Al-Mekhlafi MA, Fatmah MS, Anisah N, et al. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2011, 42(1): 19-24.
- [9] Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayentanensis* oocysts [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(14): 4354-4358.
- [10] Hussein EM. Molecular identification of *Cyclospora* spp. using multiplex PCR from diarrheic children compared to others conventional methods [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2007, 37(2): 585-598.
- [11] Lee SH, Joung M, Yoon S, et al. Multiplex PCR detection of waterborne intestinal protozoa: microsporidia, *Cyclospora*, and *Cryptosporidium* [J]. *Korean J Parasitol*, 2010, 48(4): 297-301.
- [12] Schuster FL, Yagi S, Wilkins PP, et al. *Balamuthia mandril-laris*, agent of amebic encephalitis: detection of serum antibodies and antigenic similarity of isolates by enzyme immunoassay [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2008, 5(4): 313-320.
- [13] 张进顺, 高兴政. 临床寄生虫检验学 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2009. 358-367.
- [14] Welc-Faleciak R, Bajer A, Bednarska M, et al. Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14(2): 287-290.

(此文编辑 蒋湘莲)