

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0161-06

【综述】

微孢子虫检测技术的研究进展

王永宾, 刘吉平*

【提要】 微孢子虫是专性细胞内寄生的真核生物, 其作为人类新发病原越来越受到重视, 故快速、准确的检测技术对于微孢子虫病的防治显得尤为重要。本文简要综述了以染色技术、免疫组化技术和分子生物学技术等为主的微孢子虫识别方法的研究进展, 以期有效防治微孢子虫病提供参考。

【关键词】 微孢子虫; 家蚕微孢子虫; 染色法; 免疫学; 分子生物学

中图分类号: R382.31 文献标识码: A

Research Progress on the Technology of Microsporidian Detection

WANG Yong-bin, LIU Ji-ping*

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

【Abstract】 The microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites. They have been paid more attention as being the emerging pathogen of human, so it is important to control microsporidiosis using fast and precise detecting technology. In order to provide a reference for controlling microsporidian infection effectively, this paper reviews the progress of studying on the detecting technology from the microscopic staining methods, immunological and molecular biology.

【Key words】 Microsporidia; *Nosema bombycis*; Staining method; Immunology; Molecular biology

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30671588)

* Corresponding author, E-mail: liujiping@scau.edu.cn

微孢子虫(microsporidia)是专性细胞内寄生的真核生物, 广泛寄生于昆虫等无脊椎动物及哺乳类、鸟类、鱼类等脊椎动物体内, 至今已发现的微孢子虫分属 150 属、1 200 种以上^[1]。大约 150 年前, 人们首先在胡椒样病症的家蚕体内发现了致病病原——家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*); 而最早报道在人体中发现微孢子虫是在 1959 年, 患者为一名 9 岁日本男孩, 推测可能与食用未煮熟的鲑鱼有关^[2]。目前, 在艾滋病、器官移植和免疫缺陷型患者中相继发现 8 属 13 种微孢子虫^[3]。微孢子虫病作为一种新发传染病(emerging infectious disease, EID), 已引起局部或世界范围的公共卫生问题, 被美国国立过敏和传染性疾病预防研究所(National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIAID)列入第二类具有潜在危险的微生物名单^[4]。

随着环境污染的加剧和生态平衡的破坏, 环境中存在大量微孢子虫, 已有在饮用水中检出微孢子虫的报道^[5]。国内外研究者对微孢子虫的识别和检测方法进行了大量探索研究。本文对国内外以染色识别技术、免疫学和分子生物学等技术检测微孢子虫的研究

进展进行综述, 以期开展微孢子虫流行病学研究和防治微孢子虫病提供参考。

1 微孢子虫染色镜检技术的研究进展

利用特殊功能的显微镜可观察微孢子虫的外观特征(立体显微镜)或其在宿主组织、细胞内的寄生情况(复式显微镜), 也可对纯化或混合的样品进行鉴别和评价。但是在光学显微镜下, 如果技术不熟练, 往往不易识别微孢子虫, 常规染色剂也不易对微孢子虫孢子染色, 因此人们相继开发了一系列基于光学显微镜的微孢子虫染色识别法。

1.1 KMnO_4 -甲基紫法 唐顺明等^[6]应用该法将家蚕微孢子虫染成紫色, 而绿僵孢子、曲霉孢子呈紫褐色、花粉粒呈淡黄色块状, 快速鉴别了家蚕微孢子虫和其他家蚕病原孢子, 相互间区别显著。该法的染色条件、技术工艺极其简易, 如果不需要拍照, 可省去异丙醇洗脱、二甲苯内透明两个步骤, 整个过程可缩短至 5 min。

1.2 抗酸的三色染色法 Ignatius 等^[7]应用该法将微孢子虫染成粉红色, 从而与真菌、细菌及粪样相区别, 整个染色过程仅需 45 min, 与 Didier's 三色染色法耗时 60 min、免疫荧光测定耗时 130 min 相比, 该法更

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30671588)

作者单位: 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

* 通讯作者, E-mail: liujiping@scau.edu.cn

易操作且节约时间, 但该方法要求样品新鲜。

1.3 韦伯氏 Chromotrop 染色法 又称为铬变素 2R (Chromotrop 2R) 染色法。牛安欧等^[8]采用该方法将比氏肠微孢子虫(*E. bienersi*)、肠脑炎微孢子虫(*E. intestinals*)、海伦脑炎微孢子虫(*E. hellem*)及兔脑炎微孢子虫(*E. cuiculi*)等孢子染成红色, 细菌和粪渣等染成绿色, 区别显著。但其染色过程较费时, 有研究者在此基础上进行改良以提高染色效率, 如提高染液温度^[9](从室温到 50 ℃)以缩短染色时间(由 90 min 减至 10 min), 改良后孢子染色更深, 背景更清晰。还有一些研究者将该法同其他染色方法相结合, 以提高诊微孢子虫的检出率, 如 Joveeta 等^[10]在对 4 个病例角膜切片进行染色检测时, 认为该法是一个可靠的微孢子虫的诊断方法, 该方法简便、经济, 是检测微孢子虫的理想方法。

1.4 荧光染色剂 Calcofluor M2R 染色法 刘吉平等^[11]用此法在荧光显微镜下可见家蚕微孢子虫发出强烈的青蓝色荧光, 由于 Calcofluor M2R 可穿透微孢子虫的外壳, 染色后荧光相对稳定且较强, 病毒多角体和细菌不被染色, 真菌孢子染色后的荧光相对较弱, 能够有效地从组织碎片、病毒和细菌等形状相似物中鉴别微孢子虫。此外 Joveeta 等^[12]用氢氧化钾加荧光染色剂 Calcofluor M2R 染色(KOH+CFW)对 30 例患者角膜刮取物疑似微孢子虫样品进行染色检测, 结果表明, KOH+CFW 诊断角膜炎微孢子虫的有效率达 96.7%。

1.5 荧光染色剂 Uvitex 2B 染色法 荧光染色剂 Uvitex 2B 对微孢子虫孢子壁中的几丁质有高度的亲和性, 使染上荧光的孢子在黑色背景下发出蓝白色荧光。但该方法无特异性, 粪便中的杂质也可显荧光。因此有研究者将不同的染色技术与其结合起来对微孢子虫进行检测, 以减少鉴别的误差, 许多实验室倾向使用改良的三色染色法与该法相结合检测临床样品。如 Ignatius 等^[13]提出在检测稀释的粪样时, 两种方法并用可提高检测的敏感性, 当样品中孢子量较少时, 该法的优越性更明显。

对光学显微镜下疑似微孢子虫寄生的活标本进行组织学检查或对组织研磨液进行细胞学检查时, 虽可根据孢子形态和大小, 初步检测出微孢子虫孢子及其感染部位, 但无法鉴别微孢子虫具体种属, 对微孢子虫种属的检测和识别须借助电子显微镜、现代免疫学和分子生物学的技术和手段^[14]。

2 微孢子虫免疫学检测技术的进展

微孢子虫免疫学检测技术, 通过抗原抗体的特异性结合反应, 再辅以免疫放大技术, 具有特异性强、灵敏度较高等特点。目前已发展了多种免疫学检测

法, 包括免疫测定法、间接免疫荧光法、酶联免疫吸附试验、对流免疫电泳和蛋白质印迹分析等方法, 来诊断微孢子虫 IgG 和 IgM 抗体^[15]。

近年来, 对家蚕微孢子虫和脑炎微孢子虫属孢子(*Encephalitozoon* spp.)等孢子的单克隆抗体已相继研究成功^[16-17], 针对脑炎微孢子虫属孢子的多克隆抗体已被用于检测临床样品的多种微孢子虫^[18]。刘吉平等^[16]应用抗家蚕微孢子虫的单克隆抗体, 结合免疫金银染色法(IGSS)从光镜水平对家蚕微孢子虫进行检测, 家蚕微孢子虫周边被染成棕黑色, 从而将孢子与其他组织区别开来。Mo 等^[17]制备了 7 种兔脑炎微孢子虫单克隆 IgG 抗体(Mabs), 对临床样品的兔脑炎微孢子虫进行间接免疫荧光和蛋白质印迹检测。这些抗体可与兔脑炎微孢子虫的相对分子质量(Mr)121 000-、56 000-、45 000-、43 000-和 41 000-蛋白表位反应, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)证实这些表位为兔脑炎微孢子虫所特有, 且该兔脑炎微孢子虫的单克隆抗体(Mabs)可成功地将兔脑炎微孢子虫从其他微孢子虫的种群中鉴别出来。Sheoran 等^[19]将纯化的比氏肠微孢子虫免疫小鼠后, 制备了比氏肠微孢子虫的单克隆抗体, 并从该单克隆抗体中得到 8 种 IgM, 其中命名为 2G4 的单克隆抗体可与猴和人粪便中的比氏肠微孢子虫反应, 且无背景荧光, 是理想的诊断材料; 还可识别细胞内孢子, 因此适于确定比氏肠微孢子虫在宿主组织中的分布。该比氏肠微孢子虫的单克隆抗体可简便地诊断人体中的比氏肠微孢子虫感染, 为不同人群及哺乳动物的微孢子虫流行病学及环境中微孢子虫病传染源的调查提供了技术手段。Cisse 等^[20]在马里地区分别用比氏肠微孢子虫、肠脑炎微孢子虫的单克隆抗体对 61 位人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)血清阳性的成年患者和 71 名具有免疫能力的儿童进行了免疫荧光抗体试验。在 8 位 HIV 血清阳性的成年患者粪样中检测到比氏肠微孢子虫, 儿童粪样中未检测出微孢子虫, 该试验的敏感性和特异性均达到 100%。此外, Singh 等^[21]用比氏肠微孢子虫单克隆抗体通过免疫荧光测定法检测猕猴免疫缺陷病毒感染的猕猴粪样中的微孢子虫, 结果在每克粪样中检测到 1.5×10^5 个微孢子虫。

陈祖佩等^[22]比较碳素凝集反应法与显微镜检测技术对家蚕微孢子虫检测的敏感性, 结果显示, 碳素凝集法检出率为 95.45%, 镜检检出率为 22.72%。两者检出率的比值为 4.2, 碳素凝集法阳性反应的样品再用显微镜复检, 符合率达 100%, 证实家蚕微孢子虫致敏碳素凝集法检测母蛾微孢子的可行性。万嘉群^[23]分别用酶标抗体间接法和酶标抗体 PAP 法检测家蚕

微孢子虫孢子,两种方法检测结果一致,有表面抗原的孢子都能和第一抗体发生反应被染成褐色。Yabsley 等^[24]用凝集反应检测美国乔治亚州 St.Catherines 海岛 62 只不同品种狐猴血清中兔脑炎微孢子虫,结果检测到有一只尾巴有色环狐猴(1.9%)的血清为兔脑炎微孢子虫阳性(滴度为 1:400)。Moura 等^[25]用家兔的肠脑炎微孢子虫抗体血清(滴度为 1:400)通过免疫荧光显微技术检测 120 份粪样,其中 24 份检测到肠脑炎微孢子虫,且不与细菌等发生交叉反应,证实了该方法的可行性。Omura 等^[26]将兔脑炎微孢子虫经孢子发芽处理后制备抗体,并与一种特异的染色酶结合后固定于塑料表面,测定其对健康的和感染免疫缺陷病毒的日本人微孢子虫极丝蛋白的敏感性,结果发现微孢子虫极丝 IgM 抗体能够与发芽孢子挤出极丝发生强烈血清学反应。

虽然单克隆抗体和多克隆抗体在诊断和鉴别不同种微孢子虫临床样品效果较好^[27],但其在识别微孢子虫的敏感性方面较光镜染色法为低。因此在应用抗体鉴别不同种的微孢子虫时,人们尝试对抗体进行各种类似光镜染色法的染色标记研究,以期提高免疫学诊断的敏感性和特异性。其中间接免疫荧光法和 ELISA 因操作简便而被普遍使用,但这些方法的敏感性和特异性还有待于进一步研究。此外,当前推广使用免疫学技术识别和诊断微孢子虫还存在一定困难,原因主要有:① 微孢子虫孢子表面具有多抗原决定簇,而导致单抗、多抗血清的交叉反应;② 假阳性反应比例较高。据报道,50%以上无微孢子虫感染史的人血清出现阳性滴度^[28];③ 免疫缺陷患者对抗原刺激的免疫应答反应很弱等。

3 以分子生物学为基础的检测技术的研究进展

随着分子生物学的迅猛发展,应用基于分子生物学技术开展微孢子虫的检测和识别研究成为当前的热点。100 多种微孢子虫核苷酸成功测序,为诊断和识别各种来源的微孢子虫提供了新手段。目前对微孢子虫的检测主要从核糖体 RNA(ribosomal RNA)及相关基因入手,设计了大量引物(表1),进行各种基于 PCR 技术的微孢子虫检测和识别的研究。

3.1 常规 PCR 检测技术

3.1.1 检测几种常见微孢子虫的通用引物 Raynaud 等^[29]设计了一对引物 C1 和 C2 通过扩增微孢子虫的小亚基核糖体 RNA(SSU rRNA)序列保守区来检测比氏肠微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫。PCR 产物长度为 1 200 bp,进一步用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Hinf* I 进行酶切分析,

Hind III 只在比氏肠微孢子虫的扩增产物上有 1 个酶切位点,在其他 3 种的扩增产物上均无酶切位点;脑炎微孢子虫属孢子可通过内切酶 *Hinf* I 区分开来,*Hinf* I 在兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫及肠脑炎微孢子虫分别有 1、2、3 个酶切位点。

Schuitema 等^[30]设计了一对扩增脑炎微孢子虫属孢子的引物: int530f 和 int580r,可扩增海伦脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫的大部分 SSU rRNA 基因序列、基因间隔序列(intergenic spacer, ITS)和小部分的大亚基核糖体 RNA(LSU rRNA)序列,进而将脑炎微孢子虫和比氏肠微孢子虫区分开来,但由于该引物扩增的片段较长,故敏感性较低,且无法扩增比氏肠微孢子虫的相应序列,故在检测应用上有一定局限性。

3.1.2 针对比氏肠微孢子虫的引物 Zhu 等^[31]最先报道了用引物 V1-EB450 和 V1-Mic3 对感染猿免疫缺陷病毒的猕猴进行 PCR 检测,证实其感染了比氏肠微孢子虫,且 PCR 产物经测序及限制性内切酶 *Mnl* I 和 *Dde* I 的限制性片段长度多态性分析,表明 PCR 鉴别技术是特异的。用地高辛标记引物 V1-Mic3,对石蜡包埋的组织切片进行观察未发现感染比氏肠微孢子虫的患者空肠活检标本,以及感染猿猴免疫缺陷病毒猕猴的尸检组织标本进行原位杂交检测,发现空肠的粘膜内绒毛上皮细胞有微孢子虫特征性核染,电子显微镜的观察也证实了该结果。Schuitema 等^[30]为了将比氏肠微孢子虫与临床粪样中的其他微孢子虫鉴别出来,设计了一对比氏肠微孢子虫特异引物和杂交探针,其敏感性和特异性均达到 100%。Kumar 等^[32]用种特异性引物 EBIEF1/EBIER1 对 153 位 HIV 阳性患者(其中久泻者 105 位,无腹泻者 48 位)的粪样进行 PCR 检测,在 10 例久泻的 HIV 阳性患者的粪便中经显微镜检测到比氏肠微孢子虫,未出现假阳性结果,所有感染比氏肠微孢子虫的样品均扩增出 607 bp 特异片段。

3.1.3 针对肠脑炎微孢子虫的引物 Weiss 等^[33]根据肠脑炎微孢子虫 SSU rRNA 序列设计了一对引物 V1 和 SI500,扩增产物序列与已报道的肠脑炎微孢子虫序列同源性为 96%~100%,扩增片段长 375 bp,该引物和 SI60 探针相结合可提高检测的敏感性和特异性。Silva 等^[34]设计的引物对 SINTF1-SINTR 能扩增肠脑炎微孢子虫的 SSU rRNA 基因序列。用这对引物扩增海伦脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、比氏肠微孢子虫,结果均为阴性。但这对引物的特异性尚需进一步证实。

3.1.4 针对兔脑炎微孢子虫和海伦脑炎微孢子虫的引物 Visvesvara 等^[35-36]根据兔脑炎微孢子虫 SSU rRNA 序列的 344~364 bp 和 872~892 bp 的位置设计了对兔

表 1 检测不同种微孢子虫的引物对

引物名称	引物序列	微孢子的种类	目的基因	片段大小(bp)	参考文献
C2	5'-CACCAGGTTGATTCTGCC-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)、	SSU rRNA	1 200	[29]
C1	5'-GTGACGGGCGGTGTGTAC-3'	兔脑炎微孢子虫(<i>E. cuniculi</i>)、 海伦脑炎微孢子虫(<i>E. hellem</i>)、 肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)			
int530f	5'-TGCAGTTAAATGTCCGTAGT-3'	兔修氏脑炎微孢子虫(<i>E. cuniculi</i>)、	SSU rRNA	1 000	[30]
int580r	5'-TTTCACTCGCCGCTACTCAG-3'	海伦脑炎微孢子虫(<i>E. hellem</i>)、 肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)	ITS LSU rRNA		
V1	5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)	SSU rRNA	348	[31]
EB450	5'-ACTCAGGTGTTATACTCAGGTC-3'				
V1	5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)	SSU rRNA	443	[31]
Mic3	5'-CAGCATCCACCATAGACAC-3'				
EBIEF1	5'-GAAACTGTCCACTCCTTACG-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)	SSU rRNA	607	[33]
EBIER1	5'-CCATGCACCACCTCCGCAAT-3'				
V1	5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)	SSU rRNA	375	[34]
SI500	5'-CTCGCTCCTTACACTCGAA-3'				
SINTF1	5'-TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA-3'	肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)	SSU rRNA	520	[35]
SINTR	5'-CCGTCCTCGTCTCCTGC-3'				
ECUN-F	5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCGC-3'	兔脑炎微孢子虫(<i>E. cuniculi</i>)	SSU rRNA	549	[36]
ECUN-R	5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3'				
EHEL-F	5'-TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA-3'	海伦脑炎微孢子虫(<i>E. hellem</i>)	SSU rRNA	547	[37]
EHEL-R	5'-GTA AAAACACTCTCACACTCA-3'				
V1F	5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	家蚕微孢子虫(<i>N. bombycis</i>)	SSU rRNA	450	[39]
530R	5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3'				
N.bombi-SS	5'-CCATGCATGTTTTGAAGATTAT-3'	熊蜂微孢子虫(<i>N. bombi</i>)	SSU rRNA	323	[40]
U-Jf1/Jr1	5'-CATATATTTTTAAAATATGAAAC-3'				
ITS-f2	5'-GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT-3'	熊蜂微孢子虫(<i>N. bombi</i>)	ITS	118、122	[40]
ITS-r2	5'-CATCGTTATGGTATCCTATTGATC-3'				
Mic3U	5'-CCAGGUTGATUCTGCCUGACG-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)、	SSU rRNA	410、419、	[45]
Mic421U	5'-TUACCGCGCCUGCUGGCAC-3'	兔修氏脑炎微孢子虫(<i>E. cuniculi</i>)、 海伦脑炎微孢子虫(<i>E. hellem</i>)、 肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)		421、433	
Mic266	5'-AAGGAGCCTGAGAGATGGCT-3'	比氏肠微孢子虫(<i>E. bienewisi</i>)、	SSU rRNA	132	[45]
Eb379	5'-CAATTGCTTCACCCTAAGGTC-3'	兔脑炎微孢子虫(<i>E. cuniculi</i>)、		113	
Ec378	5'-CACCCCTTGCACCTCGCACAC-3'	海伦脑炎微孢子虫(<i>E. hellem</i>)、		134	
Eh410	5'-TGCCCTCCAGTAAATCACAAC-3'	肠脑炎微孢子虫(<i>E. intestinalis</i>)		128	
Ei395	5'-CCTCCAATCAATCTCGACTC-3'				

脑炎微孢子虫种特异的引物 ECUN-F 和 ECUN-R, 并根据海伦脑炎微孢子虫 SSU rRNA 序列 358~378 bp 和 884~904 bp 的位置设计了海伦脑炎微孢子虫的种特异引物 EHEL-F 和 EHEL-R, 有效区分了兔脑炎微孢子虫和海伦脑炎微孢子虫。此外, Toson 等^[37]对尸检获得的微孢子虫 ITS 基因进行 PCR 扩增、测序分析, 获得具有 4 个 5'-GTTT-3' 重复片段的典型的兔脑炎微孢子虫基因型 III。为了进一步证实该结果, 用引物 5'-GCAGTTCCAGGCTACTAC-3' 和 5'-AGGAACTCCGGA-TGTTCC-3' 对尸检获得的微孢子虫模板 DNA 进行扩增, 得到 285 bp 片段, 与阳性对照的兔脑炎微孢子虫基因型 III 一致, 对照组的兔脑炎微孢子虫基因型 I 和 II 扩增出 363 bp 片段, 该引物能够有效地区分不同基因型的兔脑炎微孢子虫。

3.1.5 针对 *Nosema* 属微孢子虫的引物 刘吉平等^[38] 根据家蚕微孢子虫及其相近种属微孢子虫的 SSU rRNA 保守区段设计了 1 对引物 V1F/530R, 该引物对

纯家蚕微孢子虫孢子 DNA 模板的检测灵敏度为 3×10^4 个/ml (弱检测信号可达 $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^3$ 个/ml), 对模拟感染家蚕微孢子虫孢子的蚕蛾 DNA 模板的检测灵敏度为 3×10^5 个/ml, 两者均达到或超过目前生产上用显微镜检测的水平。Julia 等^[39] 根据熊蜂微孢子虫 (*Nosema bombi*) 的 SSU rRNA 基因设计了 2 对引物, 对熊蜂微孢子虫和蜜蜂微孢子虫和东方蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*) 进行 PCR 鉴别研究。结果表明, 引物 *N. bombi*-SSU-Jf1/Jr1 可将熊蜂微孢子虫从其他的蜜蜂孢子中鉴别出来。引物 *N. bombi*-SSU-Jf1/Jr1 和 ITS-f2/r2 对熊蜂微孢子虫检测灵敏度为 $10^8 \sim 10^3$ 个/ml。他们同时提出用 *N. bombi*-SSU-Jf1/Jr1 和 ITS-f2/r2 的混合 PCR 可提高检测熊蜂微孢子虫的特异性和敏感性。

3.2 实时定量 PCR 技术 实时定量 PCR 技术克服了常规 PCR 的平台效应, 且减少了污染; 无需 PCR 后处理, 省时省力, 避免了电泳染色剂溴化乙锭或用于

标记目的产物的放射性同位素对研究人员的伤害, 该技术正逐渐被用于病原微孢子虫的定量检测。如 Phelps 等^[40]用 RQ-PCR 方法检测美鲷微孢子虫 (*Ovipleistophora ovariae*), 在每个反应中可检测到小于 10 个基因组拷贝的美鲷微孢子虫基因, 同时采用超声波裂解法对模板 DNA 进行抽提纯化可以提高检测的敏感性。Samie 等^[41]在南非的范贝地区用 RQ-PCR 和三色染色法验证了 PCR-RFLP 测定的住院患者和学龄儿童的比氏肠微孢子虫感染病例。Verweij 等^[42]利用 RQ-PCR 检测粪样中的比氏肠微孢子虫和脑炎微孢子虫属孢子, 特异性和敏感性均达到 100%。Wolk 等^[43]通过 RQ-PCR 检测粪便中的 3 种脑炎微孢子虫属微孢子虫, 可检测到孢子最低浓度为 $10^2 \sim 10^4$ 个/ml, 显著高于常规染色法检测的最低浓度 1.0×10^6 个/ml。

3.3 巢式 PCR Kock 等^[44]设计一套巢式 PCR 引物用来扩增比氏肠微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫等微孢子虫的 SSU rRNA 序列。在首次 PCR 扩增中采用引物对 Mic3U-Mic421U 扩增的片段长度为 410~433 bp; 在第二次 PCR 反应中, 上游引物为 Mic266, 下游引物为 Eb379、Ec378、Eh410 和 Ei395 分别用于扩增种特异性的 rDNA 片段, 产物长度为 113~134 bp。

3.4 寡聚核苷酸芯片法 (oligonucleotide microarrays) Wang 等^[45]采用该法从种水平上检测并鉴定了 4 个主要微孢子虫种, 分别是比氏肠微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、海伦脑炎微孢子虫和肠脑炎微孢子虫。该法的检测水平可达到 10 个微孢子虫或以上, 同时他们利用该法对 20 份艾滋病患者的粪样进行检测, 其中 12 份检测到微孢子虫, 且在 11 份粪样中检测到一种以上的微孢子虫。该法可作为一种高通量的检测和鉴别微孢子虫物种的诊断工具。

4 结语

近年来, 人们在免疫缺陷患者的粪便、器官移植患者以及正常人的眼角膜等免疫盲区的组织或排泄物中相继发现有微孢子虫寄生的情况, 微孢子虫成为人类新发疾病的病原之一, 开展微孢子虫的检测和鉴定研究意义重大。微孢子虫检测技术的研究方向是实时、高效、快捷、准确和低价。镜检和免疫学技术由于其技术要求低, 操作方便, 结果直观, 已被广泛应用。分子生物学诊断方法的研究已取得较大进展, 但仍有许多问题亟待解决。应用 PCR 技术及 DNA 探针检测微孢子虫较有潜力, 其特点是灵敏、特异, 且可在早期做出诊断, 但操作方法繁琐, 需专门仪器, 因此有待改进和简化。

此外, 随着蛋白质组学的发展, 质谱技术已被用于经双向电泳 (2d-PAGE) 获得的微孢子虫单个蛋白点的分析, 从而区分不同种属的微孢子虫^[46]。最近兴起的整合基因探针技术、生物信息学和系统生物学等技术为一体的微生物自动检测系统, 可能从根本上改变微生物的检测方法, 传统的微孢子虫检测和识别技术可能逐渐被新型微孢子虫快速诊断技术所取代。

参 考 文 献

- [1] Liu JP, Zeng L. An overview of research on the microsporidian biodiversity[J]. Chin Bull Entomol, 2006, 43(2): 153-158. (in Chinese)
(刘吉平, 曾玲. 微孢子虫生物多样性研究的述评[J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 153-158.)
- [2] Matsubayashi H, Koike T, Mikata I, et al. A case of *Encephalitozoon*-like infection in man[J]. Arch Pathol, 1959, 67(2): 181-187.
- [3] Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, et al. First detection and genotyping of human associated microsporidia in pigeons from urban parks[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(6): 3153-3157.
- [4] <http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/research/CatA.htm>
- [5] Coupe S, Delabre K, Pouillot R, et al. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: an one year prospective study[J]. Immunol Med Microbiol, 2006, 47(3): 351-359.
- [6] Tang SM, Zhang ZF, Li YR, et al. A fast stains method for diagnosis of *Nosema bombycis* spores[J]. Chin Sericul, 2002, 23(2): 27-28. (in Chinese)
(唐顺明, 张志芳, 李奕仁, 等. 一种家蚕微孢子虫孢子快速染色鉴定的方法[J]. 中国蚕业, 2002, 23(2): 27-28.)
- [7] Ignatius R, Michael L, Klaus M, et al. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(2): 446-449.
- [8] Niu AO, Liu HY, Zhou M, et al. Detection of microsporidia with chromotrop-farbung nach weber[J]. Chin J Zoonoses, 2000, 16(4): 94. (in Chinese)
(牛安欧, 刘红云, 周敏, 等. 检测微孢子虫韦伯氏 Chromotrop 染色法[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(4): 94.)
- [9] Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A, et al. Modified technique for efficient detection of microsporidia[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(4): 1074-1075.
- [10] Joveeta J, Geeta KV, Prashant G, et al. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains[J]. Clin Pathol, 2006, 6(1): 6.
- [11] Liu JP, Zeng L. Stain and discrimination of *Nosema bombycis* spores with Calcofluor White M2R[J]. Acta Entomol Sin, 2007, 50(11): 1185-1186. (in Chinese)
(刘吉平, 曾玲. Calcofluor White M2R 荧光染色法识别家蚕微孢子虫[J]. 昆虫学报, 2007, 50(11): 1185-1186.)
- [12] Joveeta J, Somasheila M, Prashant G, et al. Use of different stains for microscopic evaluation of corneal scrapings for diagnosis of microsporidial keratitis[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2): 583-585.
- [13] Ignatius R, Henschel S, Liesenfeld O, et al. Comparative evaluation of modified trichrome and uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(9): 266-2269.
- [14] Corcoran GD, Tovey DG, Moody AH, et al. Detection and identification of gastrointestinal microsporidia using noninvasive tech-

- nique[J]. J Clin Pathol, 1995, 48(8): 725-727.
- [15] Garcia SL. Laboratory identification of the microsporidia[J]. J Clin Microbiol, 2002, (40)6: 1892-1901.
- [16] Liu JP, Lu KM, Xu XY, *et al.* Study on the use of the monoclonal antibodies immunogold and silver staining technique as a method for diagnosis of *Nosema bombycis* spores[J]. Guangdong Sericult, 1995, 29(3): 30-35. (in Chinese)
(刘吉平, 卢铿明, 徐兴耀, 等. 单抗免疫金银染色法诊断家蚕微孢子虫的研究[J]. 广东蚕业, 1995, 29(3): 30-35.)
- [17] Mo L, Drancourt M. Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*[J]. Clin Diagn Lab Immun, 2004, 11(6): 1060-1063.
- [18] Visvesvara GS, Leitch GJ, Silva AJ, *et al.* Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(11): 2760-2768.
- [19] Sheoran AS, Feng XC, Singh I, *et al.* Monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* of human origin [J]. Clin Diagn Lab Immun, 2005, 12(9): 1109-1113.
- [20] Cisse OA, Ouattara A, Thellier M, *et al.* Evaluation of an immunofluorescent antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali)[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(5): 1715-1718.
- [21] Singh I, Sheoran AS, Zhang Q, *et al.* Sensitivity and specificity of a monoclonal antibody-based fluorescence assay for detecting *Enterocytozoon bieneusi* spores in feces of simian immunodeficiency virus-infected macaques[J]. Clin Diagn Lab Immun, 2005, 2(10): 1141-1144.
- [22] Chen ZP, Feng LC, Pan MH, *et al.* Serological testing technique of the silkworms pebrine disease study III-C-contrast test of carbon agglutination reaction and microscope detection microsporidian[J]. Newsletter Sericult Sci, 1994, 14(3): 2-6. (in Chinese)
(陈祖佩, 冯丽春, 潘敏慧, 等. 家蚕微孢子虫血清学检测技术研究 III-炭素凝集反应法与常规镜检法对比试验[J]. 蚕业通讯, 1994, 14(3): 2-6.)
- [23] Wan JQ. Detection *Nosema bombycis* spores with enzyme labelling antibody[J]. Chin Animal Hlth Inspect, 1998, 15(1): 6-7. (in Chinese)
(万嘉群. 用酶标抗体法检测蚕微孢子孢子[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(1): 6-7.)
- [24] Yabsley MJ, Jordan CN, Mitchell SM, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona*, and *Encephalitozoon cuniculi* in three species of lemurs from St. Catherines island, GA, USA[J]. Vet Parasit, 2007, 144(1-2): 28-32.
- [25] Moura H, Sodre FC, Bornay-Llinares FJ, *et al.* Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(7): 2317-2322.
- [26] Omura M, Furuya K, Kudo S, *et al.* Detecting immunoglobulin M antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and human immunodeficiency virus-infected persons in Japan[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(2): 158-172.
- [27] Schwartz DA, Bryan RT, Visvesvara GS. Diagnostic approaches for *Encephalitozoon* infections in patients with AIDS[J]. J Eukaryot Microbiol, 1994, 41(5): 59-60.
- [28] Franzen C, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia[J]. Clin Microbiol Reviews, 1999, 12(2): 243-285
- [29] Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, *et al.* Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(1): 37-40.
- [30] Schuitema ARJ, Hartskeerl RA, Gool T, *et al.* Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of microsporidiosis [J]. AIDS, 1993, 7(3): S62-S63.
- [31] Zhu X, Wittner M, Tanowitz HB, *et al.* Small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bieneusi* and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction[J]. J Infect Dis, 1993, 168(6): 1570-1575.
- [32] Kumar SS, Ananthan S, Joyee AG. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primer in stool samples of HIV patients[J]. Indian J Medical Research, 2005, 121(4): 215-219.
- [33] Weiss LM, Zhu X, Cali A, *et al.* Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review[J]. Folia Parasitol, 1994, 41(2): 81-90.
- [34] DA Silva J, Slemenda SB, Visvesvara GS, *et al.* Detection of *Septata intestinalis* (microsporidia) cali *et al.* 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region[J]. Mol Diagn, 1997, 2(1): 47-52.
- [35] Visvesvara GS, Leitch GJ, Silva AJ, *et al.* Polyclonal and monoclonal antibody and PCR amplified small subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(11): 2760-2768.
- [36] Visvesvara GS, Silva AJ, Croppo GP, *et al.* *In vitro* culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(4): 930-936.
- [37] Toson A, Nebuloni M, Ferri A, *et al.* Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (Dog Type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study[J]. Mod Pathol, 2002, 15(5): 77-583.
- [38] Liu JP, Cao Y, Smith JE, *et al.* Studies on the application of PCR molecular diagnosis to silkworms with simulated pebrine disease[J]. Scientia Agricult Sinica, 2004, 37(12): 1925-1931. (in Chinese)
(刘吉平, 曹阳, Smith JE, 等. 模拟感染家蚕微孢子病的 PCR 分子诊断技术研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 1925-1931.)
- [39] Julia K, Wee TT, Robert JP. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi*(Microsporidia: *Nosematidae*) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene Real-Time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 3922-3928.
- [40] Kock NP, Petersen H, Fenner T, *et al.* Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1997, 16(5): 369-379.
- [45] Wang Zh, Orlandi PA, Stenger DA. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4121-4128.
- [46] Moura H, Ospina M, Woolfitt AR, *et al.* An analysis of four human microsporidian isolates by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Eukaryot Microbiol, 2003, 50(3): 156-163.

(收稿日期: 2008-09-02 编辑: 高石)