

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0135-05

【实验研究】

# 牛源隐孢子虫上海分离株的巢式 PCR 鉴定

袁忠英<sup>1</sup>, 沈玉娟<sup>1\*</sup>, 曹建平<sup>1</sup>, 刘晖<sup>1,2</sup>, 陈盛霞<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 用巢式 PCR 鉴定 1 株自然感染的上海牛源隐孢子虫。方法 改良抗酸染色法检查含隐孢子虫卵囊的牛粪, 油镜下观察卵囊形态, 测量大小。以牛粪中的隐孢子虫卵囊 DNA 为模板, 根据隐孢子虫 18S rRNA 序列设计 2 对引物, 巢式 PCR 扩增目的片段, 测序, 同源性比对, 并运用 MEGA4.0 软件构建系统发育树。结果 上海牛源隐孢子虫分离株卵囊呈圆形或椭圆形, 大小为  $(5.6\pm 0.49)$  mm $\times$   $(5.2\pm 0.51)$  mm。扩增出的 18S rRNA 基因片段为 812 bp。上海牛源隐孢子虫分离株的 18S rRNA 与巴西的牛隐孢子虫 (*Cryptosporidium bovis*, GenBank 登录号为 151935628) 序列一致性为 100%, 两者在种系发育树上为同一分支, 亲缘关系最近; 与中国青海、蒙古国、美国、突尼斯等地的牛隐孢子虫序列一致性均为 99%。结论 上海牛源隐孢子虫分离株为牛隐孢子虫 (*C. bovis*)。

**【关键词】** 牛隐孢子虫; 18S rRNA 基因; 巢式 PCR; 系统发育分析

中图分类号: R382.3 文献标识码: A

## Identification of Calf-origin *Cryptosporidium bovis* Shanghai Isolate by Nested PCR

YUAN Zhong-ying<sup>1</sup>, SHEN Yu-juan<sup>1\*</sup>, CAO Jian-ping<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1,2</sup>,  
CHEN Sheng-xia<sup>3</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Department of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 3 School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**【Abstract】** **Objective** To identify a strain of *Cryptosporidium* in the feces of naturally infected calf in Shanghai. **Methods** Stool sample was examined by modified acid-fast staining. The size and morphology of the oocysts were microscopically determined. Genomic DNA was extracted from the oocysts isolated from feces of a naturally *Cryptosporidium*-infected calf. According to the sequence of *Cryptosporidium* 18S rRNA gene, two pairs of primers were designed and synthesized. The PCR products was amplified by nested PCR and sequenced in double directions. Homology searches were done over the Web using the program Blast. Phylogenetic tree was constructed with NJ method by MEGA4.0 software. **Results** Oocysts of the Shanghai isolate were round or elliptical with a size of  $(5.6\pm 0.49)$   $\mu$ m  $\times$   $(5.2\pm 0.51)$   $\mu$ m. Nested PCR resulted in fragments of approximately 810 bp, and the 18S rRNA nucleotide sequence had 100% identity with *C. bovis* from Brazil (GenBank Accession No: 151935628). This isolate was clustered in the same clade with *C. bovis* from Brazil. It showed an identity of 99% with the sequences of *C. bovis* from Qinghai Province of China, Mongolia, USA, and Tunisia. **Conclusion** The calf-origin *Cryptosporidium* derived from Shanghai has been identified as *C. bovis*.

**【Key words】** *Cryptosporidium bovis*; 18S rRNA gene; Nested PCR; Phylogeny

Supported by the Special Program for Scientific Research of Public Health, China (No. 200802012) and the Natural Resources Platform Project from the Ministry of Science and Technology (No. 2005DKA21104)

\* Corresponding author, E-mail: shyj12@yahoo.com.cn

隐孢子虫病(cryptosporidiosis)是由隐孢子虫(*Cryptosporidium*)感染引起的, 以腹泻为主要症状的新发

**基金项目:** 国家卫生行业科研专项 (No. 200802012); 科技部自然资源平台项目 (No. 2005DKA21104)

**作者单位:** 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 遵义医学院寄生虫学教研室, 遵义 563003; 3 江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013

\* 通讯作者, E-mail: shyj12@yahoo.com.cn

的人兽共患原虫病, 可感染人及 240 多种动物。隐孢子虫是国际公认的引起腹泻的六大病原体之一, 在寄生虫性腹泻中占首位<sup>[1,2]</sup>, 可引起健康人群的自限性腹泻, 艾滋病患者、免疫缺陷或免疫抑制人群及婴幼儿等感染后可引起致死性腹泻, 也是艾滋病等患者死亡的主要病因之一。1976 年 Nime<sup>[3]</sup>首先报道人隐孢子虫病, 随后世界各地隐孢子虫病例的报道显著增

多。迄今,由隐孢子虫感染引起的疾病暴发已达百余起,隐孢子虫病例已遍及 6 大洲(除南极洲外)90 多个国家,且牛、猪等动物感染的报道也越来越多。但目前该病仍无有效的预防和治疗药物。

早期根据隐孢子虫的卵囊形态学差异、宿主特异性和地理分布等进行分类。随着分子生物学技术的发展,PCR 技术应用于隐孢子虫的检测,并结合序列分析可鉴别隐孢子虫的不同虫种、基因型或基因亚型,对隐孢子虫的分类学及分子流行病学具有重要意义<sup>[4,5]</sup>。本实验通过提取经改良抗酸染色法鉴定为隐孢子虫的卵囊基因组 DNA,巢式 PCR 扩增 18S rRNA 片段确定该隐孢子虫虫种/基因型。

## 材料与方法

### 1 虫株(卵囊)来源

含隐孢子虫卵囊(简称 SH-BOV)的牛粪采自上海某养牛场。

### 2 主要试剂和仪器

粪便 DNA 分离+高质纯化试剂盒购自美国 Genmed 公司,2×PCR 预混溶液(2×PCR master mix)购自立陶宛 Fermentas 公司,DNA 标志物购自上海生工生物技术有限公司。小型台式离心机(5417R)为德国 Eppendorf 公司产品,超低温冰箱(MDF-U50V)为日本三洋公司产品,冷冻高速离心机(75005289)为美国 Thermo 公司产品,电热恒温水浴锅(HWS24)为上海一恒科技仪器有限公司产品。

### 3 粪便检查

3.1 改良抗酸染色法 改进韩范等<sup>[6]</sup>的方法,将粪便涂成厚度略厚于直接涂片法的粪膜,自然干燥后甲醇固定 5 min,苯酚复红染色液染 2 min,蒸馏水冲洗;10%硫酸乙醇脱色 2 min,蒸馏水洗;3%孔雀绿液染色 2 min,蒸馏水洗,自然干燥后镜检。

3.2 卵囊形态观察 油镜下观察卵囊形态,并随机测量 50 个卵囊的大小。

### 4 卵囊基因组 DNA 提取

将 0.3 g 牛粪样品置于 15 ml 锥形离心管中,依次放入-80℃低温冰箱和 37℃电热恒温水浴锅中冻融,重复 3 次。按照粪便 DNA 分离+高质纯化试剂盒说明书提取牛粪中隐孢子虫卵囊 DNA,-20℃保存备用。

### 5 巢式 PCR 扩增 18S rRNA 基因

参照 Xiao 等<sup>[7]</sup>的方法,根据隐孢子虫 18S rRNA

序列(GenBank 登录号为 3873244)设计 2 对引物,分别为,18S-1F: 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3',18S-1R: 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3';18S-2F: 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3',18S-2R: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'。引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 2×PCR 预混溶液 25 μl,10 mg/ml 牛血清白蛋白 2 μl,上下游引物各 4 μl,灭菌双蒸水 13 μl,模板 DNA 2 μl。扩增条件为 94℃ 5 min;94℃ 45 s;第 1 次 PCR 55℃ 45 s(第 2 次 PCR 58℃ 45 s),72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 7 min。取 5 ml PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,鉴定为阳性的 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

### 6 系统发育分析

登陆 NCBI Blast 进行同源性比对,利用 Clustal X 软件对测得序列及美国国立信息中心(NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的相关序列进行比对。应用 MEGA4.0 软件中的邻接法(neighbour-joining method, NJ)构建系统发育树,用自展值检验(bootstrap test)估计所建系统发育树的可靠性,重复次数为 1 000。

## 结果

### 1 隐孢子虫卵囊的形态学特征

卵囊为圆形或椭圆形,呈玫瑰红色,囊内孢子呈多态状,残留体为暗黑色颗粒状,大小为(5.6±0.49)mm×(5.2±0.51)mm(图 1)。

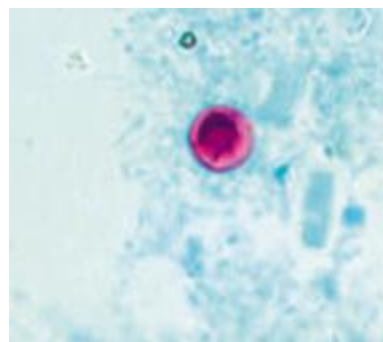
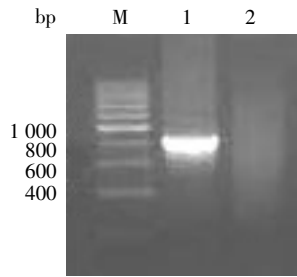


图 1 上海牛源隐孢子虫卵囊(×1000)

Fig.1 Oocyst of *Cryptosporidium* sp. from calf of Shanghai (×1000)

### 2 PCR 扩增与测序结果

经 3 次巢式 PCR 扩增特异性 DNA 片段,均获得约为 810 bp 的扩增产物(图 2)。



M: DNA 标志物, 1: SH-BOV PCR 产物, 2: 阴性对照。

M: DNA marker, 1: SH-BOV PCR product, 2: Negative control.

图 2 18S rRNA 基因巢式 PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of nested PCR product of 18S rRNA gene

### 3 18S rRNA 基因序列分析

3 次 PCR 扩增产物核苷酸测定结果一致, 经序列同源性比对表明, 测得的上海牛源隐孢子虫分离株 18S rRNA 基因序列与巴西牛隐孢子虫 (登录号为 151935628) 序列一致性为 100%, 与青海羊源类牛隐孢子虫 (*C. bovis*-like *Cryptosporidium*) (登录号为 14888557) 的同源性为 99%, 存在 3 处单碱基差异 (第 415 位 T→C, 第 416 位 T→A, 第 590 位 A→G); 与蒙古 (登录号为 157064913)、美国马里兰州 (登录号为 145652726) 和突尼斯 (登录号为 134133962) 等地的牛隐孢子虫同源性均为 99%, 分别有 1 个 (第 148 位 G→A)、1 个 (第 595 位 A→G) 和 3 个 (第 433 位 T→C、

第 434 位 T→A、第 608 位 A→G) 碱基的差异。

基于 18S rRNA 基因序列构建的系统发育树显示 (图 3), 上海牛源隐孢子虫分离株与牛隐孢子虫聚为一支, 亲缘关系最近。以上结果均提示上海牛源隐孢子虫分离株为牛隐孢子虫 (*C. bovis*)。

## 讨 论

隐孢子虫种类多, 感染宿主广泛, 卵囊微小, 形态相似, 应用传统的分类学方法难以鉴定。分子标记是从分子遗传学角度, 研究寄生虫的遗传和进化, 尤其适用于种间和种内遗传变异的鉴定。基于标志分子的序列分析被认为是基因分析的“黄金标准”, 序列分析可以提供最完整和可靠的数据<sup>[8]</sup>。目前用于隐孢子虫分类的标志基因主要是 18S rRNA 和 HSP70 等基因。

小亚基核糖体核糖核酸 (small subunit rRNA, SSU rRNA) 基因在真核生物中具有较高的拷贝数, 存在可用于构建系统进化树的保守区和区别物种的多态性区域, 广泛地应用于真核生物的种株鉴定和基因分型。国内外已有很多研究者以 18S rRNA 基因为分子标志对隐孢子虫进行分子遗传学和分类学研究<sup>[9-12]</sup>, 鉴定隐孢子虫分离株的种类和基因型, 且用于隐孢子虫的检测<sup>[13]</sup>和诊断<sup>[14]</sup>。姚龙泉等<sup>[15]</sup>通过 SSU rRNA 基因的巢式 PCR-RFLP 分析, 对人和牛粪中的微小隐孢子虫

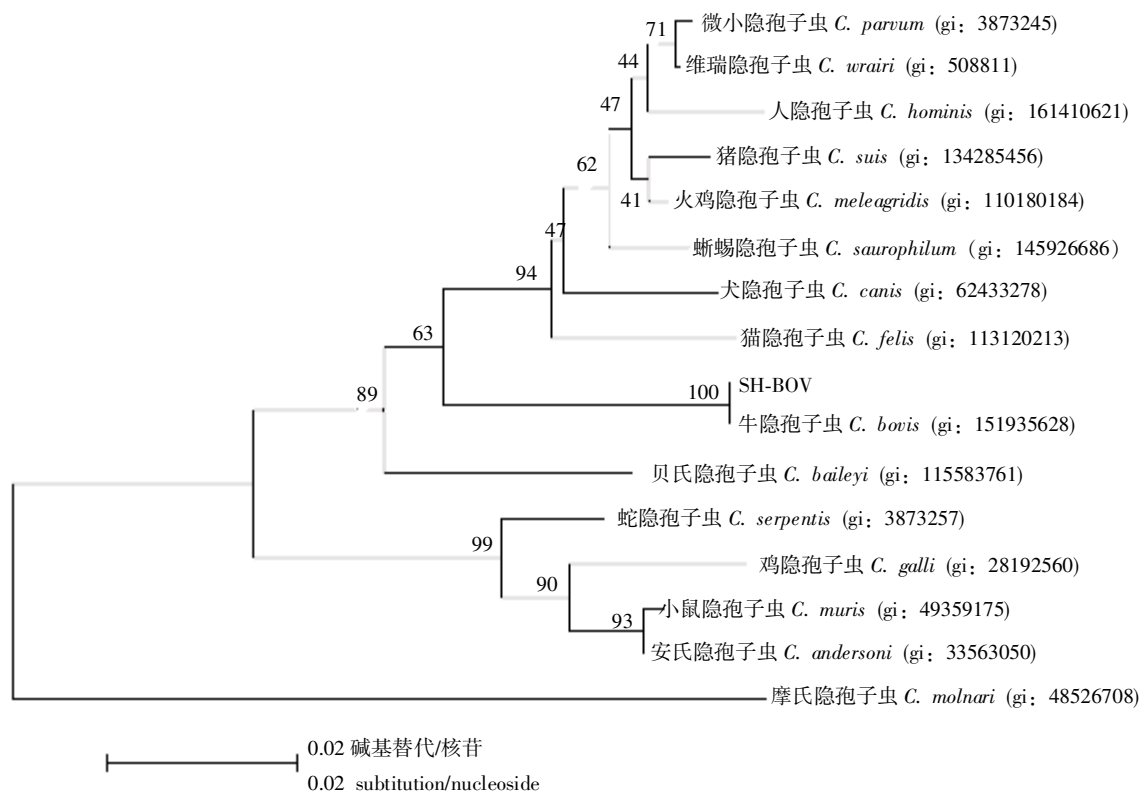


图 3 基于 18S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.3 NJ tree based on 18S rRNA sequence of SH-BOV and other related *Cryptosporidium*

与安氏隐孢子虫进行了检测和鉴别。本实验直接从经改良-抗酸染色确诊感染隐孢子虫的牛粪中提取隐孢子虫 DNA, 较姚龙泉等<sup>[15]</sup>方法省略粪便中卵囊分离、纯化的繁琐步骤, 快速、简便地获得隐孢子虫卵囊 DNA, 用于巢式 PCR 扩增 18S rRNA 特异性 DNA 片段, 检测并鉴定该隐孢子虫虫种, 敏感性高于普通 PCR<sup>[16]</sup>。该方法既可用于牛隐孢子虫的快速检测和诊断, 有利于疾病及时、有效的治疗, 又可用于其他隐孢子虫病的常规监测。

迄今, 已报道隐孢子虫的有效种达 18 种, 基因型 50 余个, 其中 8 种, 3 个基因型可感染人<sup>[17]</sup>, 还不断发现新基因型/亚型, 其中 *C. ryanae* 为 Fayer 等<sup>[18]</sup>于 2008 年报道的来源于牛的隐孢子虫新种。Xiao 等<sup>[8]</sup>曾于 2002 年对两种牛隐孢子虫分离株进行 18S rRNA 基因序列分析, 发现一种微小隐孢子虫新基因型——隐孢子虫牛基因型 B (*Cryptosporidium* genotype bovine B), 随后 Fayer 等<sup>[19]</sup>对 genotype bovine B 进行系统的研究, 确认隐孢子虫牛基因型 B 为隐孢子虫独立种——牛隐孢子虫。牛源隐孢子虫主要有安氏隐孢子虫(*C. andersoni*, 感染人)和牛隐孢子虫。本实验通过 18S rRNA 基因分析, 发现上海牛源隐孢子虫与巴西牛隐孢子虫亲缘关系最近, 序列一致性为 100%, 确定上海牛源隐孢子虫分离株为牛隐孢子虫; 其与蒙古(第 148 位 G→A)、美国(第 595 位 A→G)和突尼斯(第 433 位 T→C、第 434 位 T→A、第 608 位 A→G)等地的牛隐孢子虫仅有几个碱基的差异, 说明牛隐孢子虫的 18S rRNA 基因具有较高的保守性, 受地理分布的影响较小。目前中国牛隐孢子虫的 18S rRNA 基因序列报道较少, Karanis 等<sup>[20]</sup>发现中国青海羊源的类牛隐孢子虫与 Feng 等<sup>[21]</sup>报道的中国牦牛源的类牛隐孢子虫的序列一致性为 100%, 其意义有待进一步探讨。本实验鉴定的上海牛源隐孢子虫分离株为牛隐孢子虫, 提示上海儿童、免疫功能低下者感染隐孢子虫与牛无关, 可在隐孢子虫感染的风险评估及溯源过程中排除。同时, 获得上海分离株牛隐孢子虫 18S rRNA 基因序列丰富了中国牛隐孢子虫的基因信息, 为我国隐孢子虫种株鉴定、诊断和分子流行病学研究提供了实验依据。

### 参 考 文 献

[1] Wu L, Chen SX, Cao JP. Progress on study of prevalence and diagnosis of cryptosporidiosis[J]. Int J Med Parasit Dis, 2006, 33(5): 277-280. (in Chinese)  
(吴亮, 陈盛霞, 曹建平. 隐孢子虫病的流行与诊断研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(5): 277-280.)

[2] Yang XY, Wang GX. Review on epidemic situation of human cryptosporidiosis[J]. Parasit Infect Dis, 2005, 3(3): 135-137. (in

Chinese)  
(杨兴友, 王光西. 人体隐孢子虫病流行状况[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2005, 3(3): 135-137.)

[3] Nime FA, Burek JD, Page DL, et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*[J]. Gastroenterol, 1976, 70(3): 592-598.

[4] Duan LP, Feng YY, Cao JP. Detection methods for waterborne *Cryptosporidium* spp.[J]. Int J Med Parasit Dis, 2008, 35(3): 162-166. (in Chinese)  
(段莉平, 冯耀宇, 曹建平. 水体中隐孢子虫的检测方法[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2008, 35(3): 162-166.)

[5] Feng YY, Cao JP, Zhang LX. Water quality, reclamation and safety: advances in the detection and contamination source tracking of waterborne *Cryptosporidium* [J]. Int J Med Parasit Dis, 2008, 35(4): 169-174. (in English)  
(冯耀宇, 曹建平, 张龙现. 水质、水回用和水安全: 水源性隐孢子虫的检测和污染源追踪进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2008, 35(4): 169-174.)

[6] Han F, Xu S. Etiological diagnosis of cryptosporidiosis[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1989, 7(1): 1-3. (in Chinese)  
(韩范, 许生. 隐孢子虫病的病原诊断[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7(1): 1-3.)

[7] Xiao LH, Morgan UM, Limor J, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3386-3391.

[8] Wang JC, Zhang LX, Ning CS, et al. Identification and phylogenetic analysis of a *Cryptosporidium* isolate from a patient admitted in hospital[J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23(10): 97-100. (in Chinese)  
(王进产, 张龙现, 宁长申, 等. 人源隐孢子虫分离株种类鉴定与种系发育关系分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 97-100.)

[9] Xiao LH, Sulaimana IM, Ryanb UM, et al. Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(14): 1773-1785.

[10] Liu HP, Cao JP, Shen YJ, et al. Isolation and identification of an isolate of cow-origin *Cryptosporidium* sp[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(2): 81-86. (in Chinese)  
(刘海鹏, 曹建平, 沈玉娟, 等. 隐孢子虫牛源分离株的分离和鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 81-86.)

[11] Wen SF, Ding HP, Lu SQ, et al. Molecular phylogeny of *Cryptosporidium parvum* based on 18S rRNA gene sequence[J]. J Pathogen Biol, 2007, 2(1): 22-25. (in Chinese)  
(温少芳, 丁慧萍, 卢思奇, 等. 以 18S rRNA 基因为分子标记的微小隐孢子虫系统发育研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(1): 22-25.)

[12] Wang JC, Jian FC, Zhang LX, et al. Phylogenetic analysis of the *Cryptosporidium* based on 18S rRNA gene and HSP70 gene sequences[J]. Acta Vet Zootech Sin, 2007, 38(9): 947-953. (in Chinese)  
(王进产, 菅复春, 张龙现, 等. 基于 18S rRNA 和 HSP70 基因序列的隐孢子虫种系发育分析[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 947-953.)

[13] Shen YJ, Cao JP, Lu WY, et al. Preparation and detection of DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(4): 228-230. (in Chinese)  
(沈玉娟, 曹建平, 卢滩媛, 等. 微小隐孢子虫卵囊 DNA 提取及用于 PCR 检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 228-230.)

[14] Yang G, Zhou TH, Li YQ, et al. Application of nested-PCR for the diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection[J]. J Trop Med, 2008, 8(11): 1109-1111. (in Chinese)  
(杨光, 周天鸿, 李月琴, 等. 应用巢式 PCR 方法诊断微小隐孢子虫感染的实验研究[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(11): 1109-1111.)

[15] Yao LQ, Zhang XC, Wu T, et al. Analysis of *Cryptosporidium*

SSU rRNA gene by nested PCR-RFLP[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(6): 321-325. (in Chinese)

(姚龙泉, 张西臣, 吴涛, 等. 隐孢子虫 SSU rRNA 基因的巢式 PCR-RFLP 分析[J]. 中国寄生虫防治杂志, 2004, 17(6): 321-325.)

[16] Mayer CL, Palmer CJ. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(6): 2081-2085.

[17] Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission[J]. Int J Parasitol, 2008, 38(11): 1239-1255.

[18] Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp.

(Apicomplexa; Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) [J]. Vet Parasitol, 2008, 156(3-4): 191-198.

[19] Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa; Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) [J]. J Parasitol, 2005, 91(3): 624-629.

[20] Karamis P, Plutzer J, Abdul H, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai Province of China [J]. Parasitol Res, 2007, 101(6): 1575-1580.

[21] Feng Y, Ortega Y, He G, et al. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines [J]. Vet Parasitol, 2007, 144(1-2): 1-9.

(收稿日期: 2008-09-16 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0139-01

## 【病例报告】

# 淋巴细胞白血病合并粪类圆线虫感染 1 例

鲁由金, 邹玖明

中图分类号: R532.19 文献标识码: D

患者, 女, 38 岁, 发热伴全身乏力半月, 于 2008 年 4 月 29 日在襄樊市中心医院血液科住院治疗。5 月 1 日做骨髓细胞学检查, 确诊为急性淋巴细胞白血病、嗜酸粒细胞增多症, 并行 VDCP 方案 (长春新碱, 柔红霉素, 环磷酰胺泼尼松治疗) 化疗 3 个疗程, 化疗间期患者在家休养。2008 年 10 月 1 日患者入院行第 4 次化疗, 入院时伴恶心、呕吐、纳差乏力, 轻微咳嗽, 反复腹泻, 脐周有烧灼感, 肛周、腹股沟等处皮肤瘙痒等症状。体检: 体温 37.6℃, 心肺无异常, 肝肋下未触及, 下肢无水肿, 见肛周及大腿内侧有小出血点。血常规检查示: 红细胞  $3.9 \times 10^{12}/L$ , 血红蛋白 114 g/L, 血小板  $490 \times 10^9/L$ , 白细胞  $2.35 \times 10^9/L$ , 其中中性粒细胞 77.3%, 淋巴细胞 6.0%, 单核粒细胞 8.9%, 嗜酸粒细胞 7.3%。粪常规检查: 呈黄褐色稀便, 隐血试验弱阳性, 镜下见幼虫 2~7 条 (低倍视野  $\times 100$ ), 体长  $500 \sim 1\ 000 \mu m$ , 体宽  $20 \sim 27 \mu m$ , 运动较活泼, 虫体半透明, 细长, 体表有细横纹, 头端钝圆, 口腔短, 咽管细长, 尾部细, 有部分幼虫尾部变钝甚至蜕皮 (图 1)。呕吐物中每低倍视野可见 0~2 条幼虫, 形态特征与粪便中幼虫一致。尿液中每低倍视野可见 0~1 条幼虫, 滴加卢氏碘液, 幼虫呈棕黄色, 虫体较短而粗, 食道较长。经襄樊职业技术学院病原生物与免疫学基础教研室许正敏教授鉴定, 粪便及呕吐物中的幼虫为粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*) 丝状蚴间期幼虫, 尿液中的幼虫为杆状蚴。

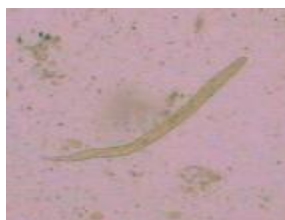


图 1 粪便中见粪类圆线虫丝状蚴 ( $\times 100$ )

## 讨论

粪类圆线虫是一种兼性寄生虫, 生活史复杂, 包括自生世代和寄生世代。成虫在温暖、潮湿的土壤中产卵, 数小时内虫卵孵出杆状蚴, 杆状蚴蜕皮 2 次, 发育为具有感染性的丝状蚴。人体可因丝状蚴侵入皮肤而感染, 也可通过消化道摄入虫卵感染。本例患者来自农村, 可能在干农活时接触疫土或误食虫卵污染的蔬菜而感染。

在机体免疫力降低的情况下, 粪类圆线虫杆状蚴在肠腔内迅速发育为丝状蚴, 再自小肠下段或结肠的粘膜侵入血液循环, 引起感染。排出的丝状蚴附在肛周, 可钻入皮肤, 引起局部瘙痒, 出现皮疹, 抓破后致继发性感染。本例患者本身成熟淋巴细胞少, 体液免疫功能减低, 化疗后体内具有正常免疫功能的白细胞消耗殆尽, 抗病能力低, 不排除自体内感染的可能; 患者肛周瘙痒, 伴出血点, 可能是自体外感染的表现。国内有报道称, 1 例粪类圆线虫重度感染患者每克粪便含幼虫 8 126 条<sup>[1]</sup>。本病例每克粪便内含幼虫约 2 149 条, 数量之多在鄂西北地区少见。在粪便常规检查中, 粪类圆线虫的丝状蚴与钩虫极为相似, 容易混淆。但钩虫幼虫体表覆有鞘膜, 口腔封闭, 在与咽管连接处有 2 个角质状的矛状结构, 粪类圆线虫幼虫则无此结构; 另外肠道中钩虫因钩齿或板齿咬附在肠黏膜上, 可造成散在出血, 隐血试验多为强阳性, 粪类圆线虫丝状蚴在侵入肠粘膜时不会引起明显出血, 粪便隐血试验多为弱阳性, 也可以此区别。临床医生要结合临床症状及虫体形态来鉴别肠道寄生虫, 提高诊断的准确性。

## 参 考 文 献

[1] Li YL. Human Parasitology[M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 187. (in Chinese)  
(李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 187.)

(收稿日期: 2008-10-28 编辑: 高石)