

• 基础研究 •

艾滋病患者粪便隐孢子虫染色技术探讨*

华文浩¹, 王慧珠¹, 焦炳欣¹, 赵 辉¹, 李 敏¹, 张 燕¹, 李兴旺^{2△}
(首都医科大学附属北京地坛医院: 1. 检验科; 2. 感染科 100015)

摘 要:目的 选择一种简便的方法检测隐孢子虫, 为艾滋病患者机会性感染引起隐孢子虫病的诊断提供实验室依据。方法 收集 253 份艾滋病患者粪便标本, 采用甲醛-乙酸乙酯沉淀浓集菌加改良抗酸染色法检测隐孢子虫。结果 32 份粪便标本隐孢子虫阳性, 253 份艾滋病患者标本合并隐孢子虫阳性率 12.65%。结论 甲醛-乙酸乙酯沉淀浓集菌加改良抗酸染色法染色效果佳, 对艾滋病患者粪便中隐孢子虫的检测敏感, 适合于基层医院推广使用。

关键词: 获得性免疫缺陷综合征; 粪便; 隐孢子虫属

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0047-02

Research on staining technology for the examination of cryptosporidium in the feces of patients with AIDS*

Hua Wenhao¹, Wang Huizhu¹, Jiao Bingxin¹, Zhao Hui¹, Li Min¹, Zhang Yan¹, Li Xingwang^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: **Objective** To explore the staining technology for the examination of cryptosporidium in order to provide laboratory references for the diagnosis of cryptosporidiosis caused by opportunistic infection in AIDS patients. **Methods** Feces samples of 253 cases of AIDS patients were collected and determined for cryptosporidium by enrich with formalin-ethyl acetate sedimentation and modified acid-fast staining. **Results** 32 samples were detected with positive result, and the positive rate in the 253 cases of AIDS patients was 12.65%. **Conclusion** Staining technology, applying formalin-ethyl acetate sedimentation and modified acid-fast staining were more sensitive and efficient, which could be suitable for the application in elementary hospitals.

Key words: acquired immunodeficiency syndrome; feces; cryptosporidium;

隐孢子虫是机会致病原虫, 也是一种重要的腹泻病原, 近些年逐渐引起人们的注意。隐孢子虫病是艾滋病的主要并发症之一。有调查指出, 艾滋病患者约有 15% 罹患隐孢子虫病^[1]。人体隐孢子虫病发病高峰在每年的初夏至初秋。目前主要以粪便中查到卵囊确诊^[2-3], 现将有关情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2009 年 12 月至 2011 年 1 月全国六省市(北京、河南、广东、广西、新疆、云南)艾滋病慢性腹泻患者观察时取得的粪便标本 253 份, 进行粪便隐孢子虫感染调查。于室温下存放于 10% 福尔马林固定的一次性离心管中。

1.2 材料 离心机、漏斗、粗纱布、棉棒、离心管(15 mL)、0.85% 氯化钠溶液、10% 甲醛溶液、乙酸乙酯、移液管及吸管。

1.3 方法 采用卵囊浓聚法, 将标本混合均匀; 纸漏斗上覆盖浸湿的粗纱布, 取 5 mL 粪便混悬液经粗纱布过滤入锥形离心管(15 mL); 10% 福尔马林加入上述纱布上冲刷粪便残渣, 使离心管的容量达 15 mL; 以 500 g 离心 10 min; 弃去上清液, 加入 10 mL 10% 福尔马林至离心管内, 用木棒搅拌均匀; 加入 4 mL 乙酸乙酯, 离心管紧密加盖, 用力振荡、反转振荡 30 min, 注意防止泄露; 以 500 g 离心 10 min; 打开管塞, 用棉棒去除上层的粪便碎片, 小心移除上清液(由上到下一次分层为乙酸乙酯层、粪便碎屑层、甲醛层、卵囊沉淀层); 用棉棒清除离心管壁上的粪便碎片; 加数滴 10% 福尔马林到管底的沉淀物上。

1.4 染色

1.4.1 改良抗酸染色液配制^[4] 无水甲醇、硫酸乙醇(10 mL 硫酸+90 mL 无水乙醇)、石炭酸品红、3% 孔雀绿(3 g 孔

雀绿溶解于 100 mL 蒸馏水中), 室温储存。

1.4.2 染片 无水甲醇固定 30 s; 石炭酸品红染色 1 min, 蒸馏水清洗并排干水; 硫酸乙醇复染 2 min, 蒸馏水清洗并排干水; 孔雀绿复染 2 min, 蒸馏水清洗并排干水; 玻片 60 °C 烘干约 5 min, 盖上盖玻片且用封固剂封固。

1.4.3 镜检 40× 或更高物镜检查 200~300 个视野, 应用 100× 油镜进行内部形态的观察和鉴定。

1.5 质控 每轮染色均应用 10% 福尔马林保存标本的隐孢子虫对照标本进行平行对照。隐孢子虫被染成桃红色至红色, 背景被染成均一的绿色。

2 结 果

2.1 研究结果显示, 有的隐孢子虫标本(100× 油镜)卵囊呈亮红色, 圆形或椭圆形, 直径 4~5 μm, 内部孢子清晰可见; 有的隐孢子虫标本(100× 油镜)镜下背景绿色, 囊合子染成深红色, 壁厚, 囊内有四个呈月牙形的孢子, 染成玫瑰红色, 孢子子在囊内排列多不规则, 导致囊合子呈多形性, 有环状、心状、玫瑰花状、空壳状或不定型块状; 红绿相间, 易于分辨。

2.2 艾滋病患者合并粪便隐孢子虫阳性结果显示, 粪便标本隐孢子虫阳性 32 份, 艾滋病患者合并隐孢子虫阳性率 12.65%。

3 讨 论

隐孢子虫是细胞内的专性寄生虫, 主要感染小肠上皮细胞。虫体的所有发育过程, 包括有性发育与无性发育过程, 都在宿主的上皮细胞内进行^[5]。隐孢子虫的感染阶段是卵囊, 卵囊随宿主粪便(可能还通过呼吸道分泌物)排出, 人由于食入

* 基金项目: 国家科技重大专项: 艾滋病机会性感染及减少 HAART 毒副作用的中医药治疗方案/方法研究(2008ZX10005-003); 中医药防治艾滋病临床科研基地建设(2009ZX10005-014)。△ 通讯作者, E-mail: ditanlsw@yahoo.com.cn。

(可能还有吸入)卵囊污染的水或食物而被感染。进入人体后,卵囊内的子孢子逸出并寄生于胃肠道或其他组织(如呼吸道)上皮细胞,经裂体增殖及配子增殖发育为卵囊。卵囊在宿主体内形成孢子排出。卵囊有两种,一种是通常从宿主排泄的厚壁卵囊,一种是与自体感染有关的薄壁卵囊^[6]。隐孢子虫的生活史仅需 5~11 d 即可完成。由于卵囊排出体外时已具有感染性,使直接和即刻的粪-口传播成为可能^[7]。

隐孢子虫感染是引起艾滋病患者腹泻的最常见原因。严重的腹泻多发生于 CD⁺4 细胞显著减少(<200/ μ L)的艾滋病患者^[8],感染起始于空、回肠,可播散至大部分的胃肠道黏膜。临床特征为频繁水泻,一天有数次至数十次,患者可出现严重脱水和电解质紊乱,一些患者可进展为慢性腹泻。人对隐孢子虫的易感性与年龄显著相关,5 岁以下婴幼儿易感染,先天及后天免疫功能低下者及接受免疫抑制剂治疗的患者感染率高,也可发生严重的隐孢子虫感染^[9-12]。由药物造成免疫功能低下的患者,停药后隐孢子虫病即可痊愈。

目前,诊断隐孢子虫病的方法有多种,如病原学检查法、免疫学方法和核酸分子生物学方法^[13]。免疫荧光法及 PCR 方法在国内外都已有所应用,但由于其成本较高及标准化等原因,不易于普及^[14]。病原学检查目前仍是隐孢子虫病确诊的金标准。病原学诊断方法包括碘染色、沙黄-美蓝染色、金胺-酚染色、改良抗酸染色等,从粪便中检查隐孢子虫卵囊^[15]。其中,改良抗酸染色是临床实验室最常使用的可靠方法,抗酸染色镜下卵囊呈亮红色,圆形或椭圆形,直径 4~5 μ m,内部子孢子清晰可见。为提高卵囊的检出率,涂片染色前应先浓集卵囊,甲醛-乙酸乙酯沉淀法是推荐使用的临床实验室粪便浓集方法。

参考文献

- [1] Certad G, Arenas-Pinte A, Pocater L, et al. Cryptosporidiosis in HIV-infected venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(1): 54-57.
- [2] 杜学利. 免疫缺陷病人隐孢子虫感染流行病学特征研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(9): 699-702.

(上接第 46 页)

菌药物的可靠来源。

本研究显示,楠竹叶提取液浓度在 50% 时与水煮液浓度在 100% 时的抑菌效果差距不大,而水煮液浓度在 100% 和 50% 时的抑菌效果均比较稳定。因此,提取液的抑菌效果还是比相同稀释度水煮液的抑菌效果要好。但是考虑到中国人口众多,特别是偏僻山区,医源条件不齐,同时,水煮液比提取液制作更加方便、经济,需要的仪器条件更为简单,因此对于一些常见的皮肤化脓性感染的日常家庭治疗,水煮液更为方便实用。辅以饮用、外用、预防、保健都具有良好的抑制细菌生长的作用^[13-14]。

参考文献

- [1] 陶文亮,吴玉娟. 竹叶黄酮提取分析方法的研究及其新进展[J]. 贵州化工, 2009, 34(3): 15-17.
- [2] 张英. 竹叶黄酮的生理和药理活性[J]. 世界竹藤通讯, 2004, 2(2): 1-11.
- [3] 荆文静. 竹叶黄酮类化合物研究进展[J]. 科技情报开发与经济, 2009, 19(20): 139.
- [4] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 2002-11-15.

- [3] Xiao L, Fayer R, Ryan U, et al. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(1): 72-97.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 308.
- [5] Pantenburg B, Dann SM, Wang HC. Intestinal immune response to human Cryptosporidium sp. Infection[J]. Infect Immun, 2008, 76(1): 23-29.
- [6] 赵杰,张龙现,李逐波. 隐孢子虫病研究进展[J]. 河南畜牧兽医, 2008, 29(5): 8-9.
- [7] 吴亮,陈盛霞,曹建平,等. 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): 277-281.
- [8] 张艳梅,潘自铁,高永刚. 人类免疫缺陷病毒感染及艾滋病患者免疫功能与病毒载量之间的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(6): 563-564.
- [9] 王珺,刘泉波,许红梅. 儿童迁延性慢性腹泻的病因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 236-238.
- [10] Ford A, Duke T, Campbell H. Evidence behind the WHO guide lines: hospital care for children: what is the aetiology and treatment of chronic diarrhoea in children with HIV[J]. J Trop Pediatr, 2009, 55(6): 349-355.
- [11] Sandhu SK, Priest JW, Lammie PJ, et al. The natural history of antibody response to Cryptosporidium parasites in men at high risk of HIV infection[J]. Infect Dis, 2006, 194(10): 1428-1437.
- [12] Ud giri N, Minz M, Kashyap R, et al. Intestinal cryptosporidiosis in living related renal transplant recipients[J]. Transplant Proc, 2004, 36(7): 2128-2129.
- [13] 田利光,周晓农. 艾滋病患者几种易被忽视的肠道寄生虫感染[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(5): 376-381.
- [14] 陈盛霞,吴亮,沈玉娟,等. 采用实时 PCR 技术比较不同方法提纯隐孢子虫卵囊 DNA 效果[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(2): 130-134.
- [15] 卢良安,张文生,李碧波. 隐孢子虫病的病原学诊断及病例对照研究[J]. 当代医学, 2009, 15(13): 150-151.

(收稿日期: 2011-09-20)

- [5] 谭瑶,赵清. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290-2291.
- [6] 黄占旺,邹双双,熊水波,等. 毛竹叶提取物抑菌作用的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 961.
- [7] 陈奇. 中药药理实验[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1998: 8-10.
- [8] 萧力争,郭维,刘素纯,等. 茶叶提取物与二氢杨梅素抑菌活性比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(2): 239-242.
- [9] 李桂兰,芮成. 3 种香兔耳提取物抑菌活性的研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(7): 45-47.
- [10] 贾桂云,邹润英,郭飞燕,等. 竹叶提取物抑菌效果研究[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 23(4): 420-422.
- [11] 姚志蕊,曹光群,杨成,等. 毛竹叶抑菌活性成分提取工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 51-54.
- [12] 姚旌旗,覃金红,孙剑刚,等. 病原学与免疫学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 67-68.
- [13] 阳东青,赵美丽,余德润,等. 从竹叶中提取叶绿素[J]. 江西化工, 2008(1): 33-35.
- [14] 孙长花,张素华,张凌云,等. 竹叶黄酮的生理活性与应用研究[J]. 四川食品与发酵, 2006(1): 13-16.

(收稿日期: 2011-07-09)