

• 综 述 •

人芽囊原虫形态学的研究进展

韩呈武 综述,曹兴午[△] 审校
(中日友好医院检验科,北京 100029)

关键词:人芽囊原虫; 形态学鉴定; 培养; 寄生虫
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.028 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)22-3168-05

人芽囊原虫(B. h.)是一种常见的人与动物肠道寄生虫。于 1849 年首次报告,1912 年从人体粪便中发现,根据其形态特征归属于酵母菌,并命名为人体酵母菌,其后,在哺乳类、鸟类、爬虫类、两栖类及昆虫类都得到检出。B. h. 一直被认为是一种对人体无害的酵母菌,1976 年有学者进一步对形态特征进行了光镜与电镜区别。根据其性质、生理和形态体征发现,B. h. 严格厌氧,采用培养细菌或真菌的培养基不能生长,营养类似原虫,室温培养 3 d 死亡,pH 7 环境生长,无细胞壁,具有伪足和原虫线粒体等特点^[1]。1996 年以后进行分子生物学的研究,人体分离虫株间的遗传性显示了多形态特点。目前,确定 B. h. 分为 9 个遗传子类型,另在鸟类、哺乳类同样亦可检出,确定其为人畜共患病原菌^[2]。为提高 B. h. 检出率,本研究重点就 B. h. 形态学鉴定、方法与 B. h. 病进行综述。

1 流行病学与检出率

B. h. 世界均有报告,高发于热带和亚热带地区^[3]。广西省地处亚热带,气候温暖潮湿,是多种寄生虫病流行的重要地区。近年研究表明,B. h. 感染在广西人群中较常见^[4-5]。但是,临床医师对恶性肿瘤患者 B. h. 感染认识不足,易漏诊或误诊,导致恶性肿瘤患者的病情加重^[6]。

吉川尚男^[2]认为:由于检查方法不同(如直接镜检、染色检查、培养检查),检查对象和鉴定水平存在差异,各地区检出率差异性较大。美国为 22.9%,英国为 6.9%(96/1 390),日本采用粪便碘染色镜检+直接涂片检查+姬姆萨染色检查阳性率为 0.47%(30/6 422)。其采用培养方法,提高阳性率为 2.45%(50/2 037),并强调反复多次检查慢性腹泻的患者粪便检出率高。张峰等^[7]介绍,我国有几十个省市报道有 B. h. 感染。

笔者注意到 20 世纪 70~90 年代一直以 B. h. 无致病性处理。在日常粪便常规寄生虫检查中,以铁苏木素染色,油镜观察,检出率为 45.0%,曾强调腹泻患者更为多见^[8],并指出一般镜检容易与白细胞混淆^[9]。

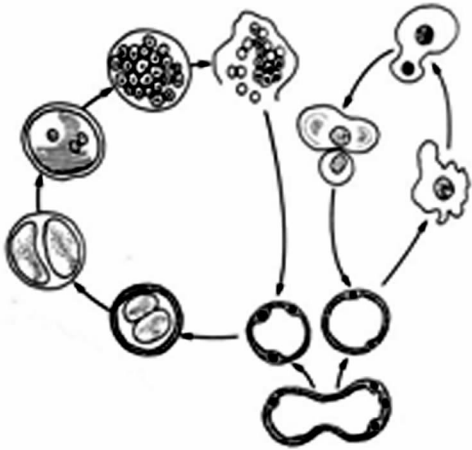
近年胡纛等^[10]对就诊的 1 185 例慢性腹泻患者进行粪便检查,B. h. 感染率为 12.24%,其中有黏液脓血便患者感染率显著高于其他类型腹泻者($P<0.05$);不同性别、年龄腹泻者间感染率差异无统计学意义($P>0.05$);农民感染率最高(为 20.29%)。实验室辅助检查中,69.66%的感染患者中有血红蛋白降低;80.69%的感染患者 IgG、IgM、IgA 均正常;86.90%的感染者 CD3⁺、CD4⁺ 表达水平降低,CD8⁺ 表达水平相对稳定,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降。结论认为,B. h. 感染是慢性腹泻的 1 个重要病原体,其致病作用不容忽视。

全国人体重点寄生虫病现状调查 SWOT 分析(2015)认为^[11]:寄生于人体且致病的肠道原虫常见有溶组织内阿米巴、蓝氏贾第鞭毛虫和 B. h. 等,上述寄生虫是引起人体腹泻、腹痛

的主要病原体。目前,B. h. 在全世界依然被列为威胁人类健康的 10 种主要寄生虫病之一,其感染潜在危害较大,且易与一般胃肠道感染相混淆,容易漏诊或误诊,严重时可危及生命^[11]。

2 生活史

长期以来,B. h. 生活史尚不清楚,造成对其形态和致病性不明确。近期研究认为,B. h. 通过 3 种方式进行发育与繁殖:颗粒型方式、空泡型方式、阿米巴型方式。见图 1。如何使滋养体形成空泡型,颗粒型营二分裂繁殖及形成包囊型,至今不明^[2]。可从宿主粪便培养中看到,包囊型分化成空泡型与颗粒型。由于作为具有感染性质的包囊型在人体盲肠和大肠内形成与寄居,人工培养不能造成肠道微环境,故在培养基中看不到包囊型。包囊随着粪便排出外界后,经口食入感染,在人体肠腔内脱囊,才能形成空泡型与颗粒型 B. h.,而后,其再进行分裂、繁殖和增生,完成生活史^[2]。因此,包囊型发育成为空泡型与颗粒型只有在宿主肠道内才可看到,体外人工培养不可能完成包囊型 B. h.^[2]。



注:空泡型见于生活史的底部(通常在临床标本中可以看到);颗粒型的发育见于生活史图的左侧部分;阿米巴型见于生活史图的右侧部分。颗粒型与阿米巴型的虫体均可以由空泡型(中心体)产生而来;增殖可通过二分裂(空泡型和颗粒型)、出芽(形成阿米巴型)、裂体生殖(中心体)和孢子形成(空泡型,少见)而发生。

图 1 B. h. 生活史^[12]

3 形态学特征描述

吉川尚男^[2]报告,目前共识有 3 类型 B. h.:空泡型、颗粒型和阿米巴型。空泡型与颗粒型的不同之处在于虫体中心部位有无液泡,空泡型虫体内所呈液泡为无构造和类似细胞液泡样的均匀物质,而颗粒型则可以看到虫体中心部位有颗粒样物质存在,此为区别两者依据^[2]。见图 2、3。阿米巴型最显著特

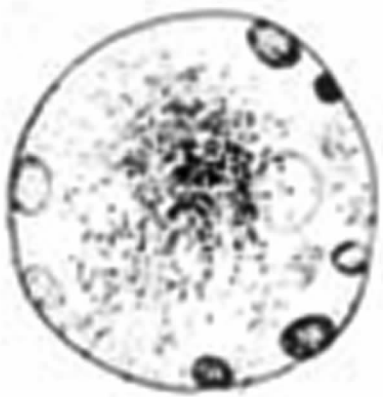
[△] 通讯作者,E-mail:13436368811@163.com。

点为形态不规则,见图 4。其有伪足和伪足运动,但运动相当缓慢,细胞核内含有空泡和颗粒^[1]。颗粒型虫体也能以二分裂方式繁殖^[13]。何妮等^[1]描述,空泡型直径 3~64 μm ,大小差异悬殊,折光性强,虫体透明,活体时细胞核不可见,细胞内有 1 个极大空泡结构。1990 年研究报告 B. h. 还存在包裹型,直径为 2~5 μm ,囊壁厚。不同来源的宿主其包裹形态不同。



注:中央有巨大空泡,核紧靠边缘。

图 2 空泡型虫体模式



注:细胞呈泡状结构,内含大量大小不一、功能不详的颗粒,核靠近边缘。

图 3 颗粒型虫体模式



注:形态不规则,有伪足、核边缘化,中央有空泡和颗粒。

图 4 阿米巴型虫体模式

4 显微镜不同倍率检查与形态特征

4.1 低倍镜检查 笔者采用生理盐水直接粪便涂片低倍显微镜观察,B. h. 为无色或浅黄色,圆形或卵圆形,大小不一,数量多时视野可呈“满天星”点状。内含 1 个巨大透明体,其周围围绕以极小细胞质,在细胞质内可看到有少数折光小体(颗粒),遇到普通水或蒸馏水可以迅速破裂而消失^[9],见图 5(仅见虫

图轮廓)。

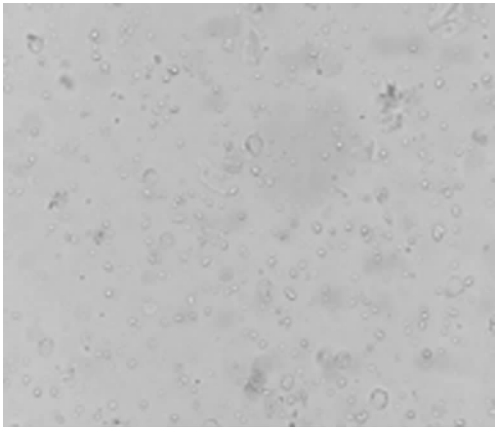
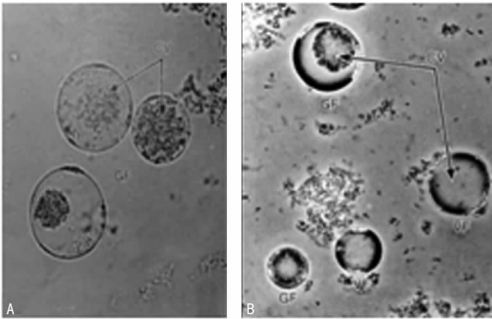


图 5 患者粪便标本低倍观察

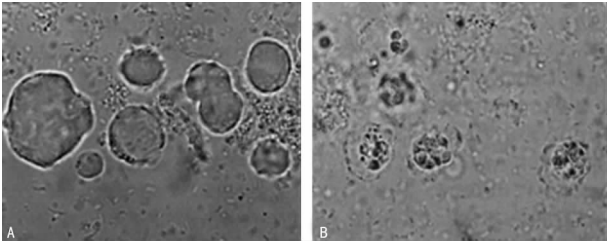
4.2 高倍镜检查 在光镜下(40 $\times$ 10),生理盐水涂片中 B. h. 为圆形、卵圆形,无运动现象,核及其他结构不易辨认,不易与其他肠道原虫包裹区别;可见 3 类型:空泡型、颗粒型和阿米巴型。新鲜粪便标本立即涂片可观察到直径为 5~50 μm 的空泡型和颗粒型虫体,见图 6。此外,还可检出直径为 3~5 μm 的包裹型虫体,通常小型虫体光镜观察比较困难。



注:培养的虫体在中央均有液泡(CV)。具有圆形小颗粒为颗粒型(GF);无颗粒者为空泡型(VF)^[2]。

图 6 B. h. 普通光镜(A)与相差显微镜(B)观察

排出粪便后,放置 4 h 再进行粪便涂片时,空泡型与颗粒型虫体不能维持原来形态,此为 B. h. 严格厌氧性质决定。虫体排出后接触空气,会发生急剧变性和裂解,见图 7。变性的空泡型与颗粒型虫体与原本不固定的阿米巴型虫体很难区分。从粪便标本中检出特殊的阿米巴型就比较困难^[2]。



注:在盖玻片周围的虫体,由于接触空气(氧气)导致虫体裂解,呈形态空化、溶解(A)。再延时后,可以完全变性,细胞膜呈纤维状,其中央呈颗粒聚集现象(B)^[2],完全溶解。

图 7 培养中虫体,呈变化的多态性

空泡型与颗粒型不同点在于依细胞中心位置的液泡,空泡型呈均匀无结构,颗粒型则具有细小颗粒物质。在高倍光镜下仅从中央液泡就可区分两者形态差异,但电镜观察并不显著^[2]。

4.3 油镜检查 B. h. 低、高倍率显微镜颗粒型,不易与肠道内较小原虫、哈门内阿米巴、脆弱双核阿米巴等区别。用铁苏

木素染色光镜(100×10)观察, B. h. 形态多样, 可见空泡型、颗粒型、阿米巴型及二分裂型^[1]。其中以空泡型多见, 虫体显示出显著囊壁, 中央有清楚和染色较深的区域将核推向虫体边缘, 核染成深蓝色, 多在 3 个以上^[13]。见图 8、9。

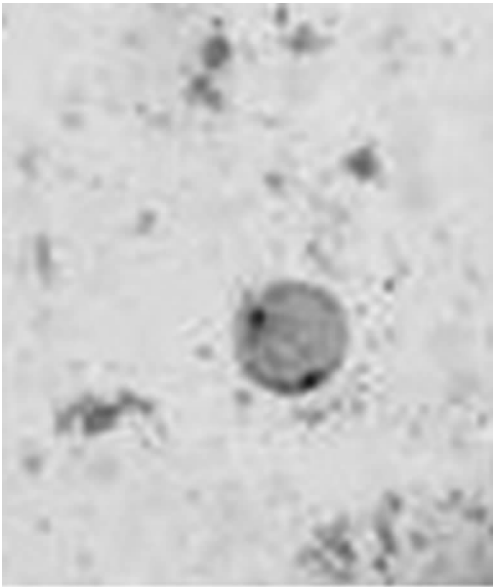


图 8 铁苏木素染色光镜(100×10)观察 B. h. 空泡型, 核边缘化^[13]

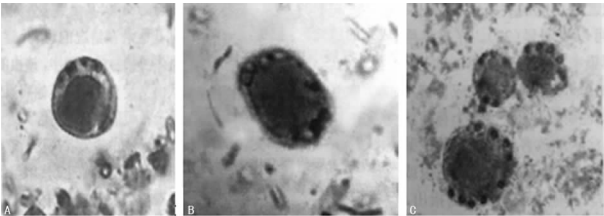


图 9 铁苏木素染色光镜(100×10)观察 B. h. 空泡型, 核边缘化^[12]

4.4 瑞姬方法染色 空泡型虫体, 形态多样化, 中央空化, 核边缘化。见图 10。

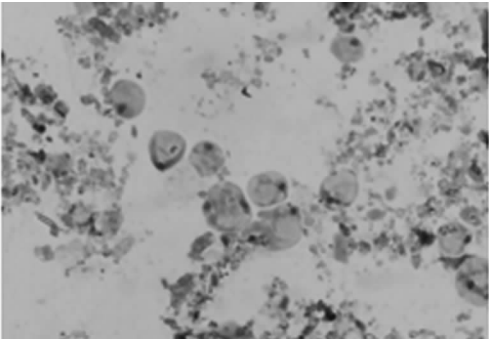


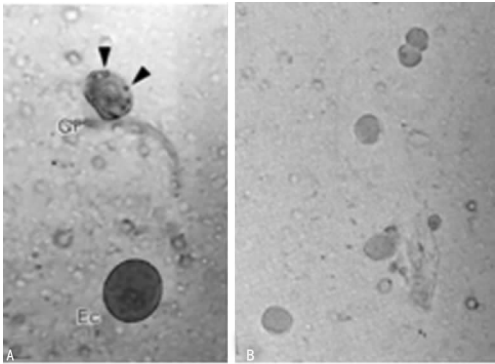
图 10 瑞姬方法染色空泡型虫体

4.5 电镜观察 何妮等^[1]介绍: B. h. 电镜观察可根据包裹有无纤维外衣将其分为纤维包裹型和包裹型 2 种。纤维包裹型能吸附细菌和其他包裹, 导致异体宿主感染。2 种包裹型内部结构大体相同。B. h. 浆内含有粗面和滑面内质网、高尔基体、溶酶体、糖原颗粒等, 细胞核内有异染色体, 线粒体差异变化大, 细胞膜有微吞饮功能, 细胞外可能包被纤维外衣。在培养中发现, B. h. 包裹形成过程中蛋白代谢增强, 细胞核周围及粗面内质网区域管沟样机构增加^[1]。

5 采用不同检查方法与形态特征

对 B. h. 而言, 检查方法与检出率密切相关, 不同的染色方法有不同形态特征, 学者曾进行的不同尝试与经验, 现分别介绍如下。

5.1 碘染色方法 此为鉴定粪便阿米巴包裹经常采用的方法, 取一滴碘液在载物片上, 用牙签采取粪便少许, 涂成薄片, 加盖盖玻片镜检, 低倍镜可以看到 B. h. 呈耀眼亮点, 高倍镜可看到 B. h. 当中的空泡, 此可与其他包裹鉴别, 见图 11。如果虫体较少、粪便标本排出时间过长或标本保存不好就难以检出^[2]。

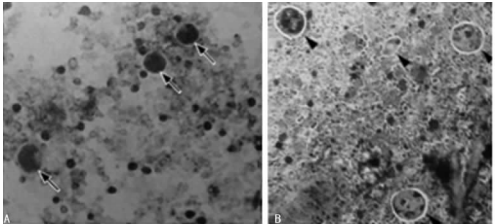


注: A 为结肠阿米巴包裹(下面)和多态性 B. h. 的颗粒型虫体(上面)。B 为可看到二分裂虫体的标本。无论哪一种虫体, 都可以染成黄色, 在细胞质周围可见颗粒状的线粒体样物质和细胞核(B. h.)特征^[2]。

图 11 患者粪便标本碘染色

5.2 Cone 染色液方法^[2] 本方法优点为直接检查与固定标本同时进行。将粪便标本涂成薄片, 在涂片标本处于半干状态, 滴加染色液(见配方), 染色 30 min, 用蒸馏水轻轻冲洗, 加盖片镜检。染色适宜度为酵母菌等浓染。B. h. 呈深蓝色或黑色, 此为染色液特异性的结果, 见图 12a。镜检发现染色不理想时, 仍然可重新再染 1 次。如果想永久保存标本, 可采取蒸馏水冲洗后干燥, 或用乙醇梯度脱水, 用二甲苯透明后, 再用光学树脂封片。在此染色片中, 油镜下可看到虫体周围有一圈空白区(此为 B. h. 周围 1 层纤维状结构不被染色而形成的空白区), 这可与其他原虫进行鉴别^[2], 见图 12b。

染色液配制: 90%乙醇 170 mL; 100%甲醇 160 mL; 醋酸 20 mL; 石炭酸 20 mL; 1%磷酸钨 12 mL。将上述试剂注入 618 mL 的蒸馏水中, 混合均匀, 加入氯碳混合剂(武藤化学和光纯药工业产品)5 g, 混合后备用。

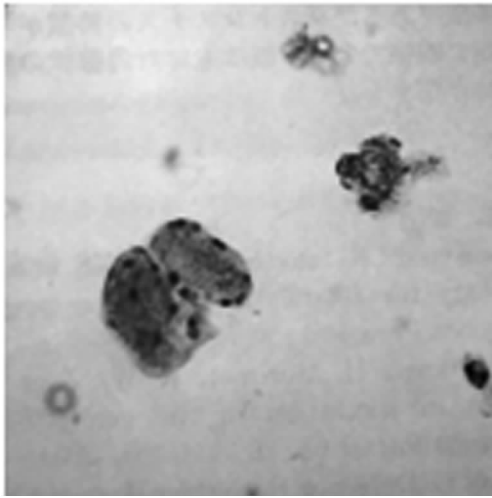


注: A 为 B. h. 浓染时呈深蓝色甚至黑色, 但看不到内部构造; B 为浅染色时, 可以看到中央的空泡和颗粒状的细胞质, 在虫体周围呈 1 个轮廓的“空圈”, 可为鉴别特征。

图 12 患者粪便标本 cone 染色

5.3 MIF 固定染色方法 适用于粪便中原虫及蠕虫虫卵的固定、染色和标本保存, 原虫与虫卵标本可长期保存。但 B. h. 不期望长期保存, 只是短时间尽可能将标本处理, 仅存留一部分标本作为长期保存备以后使用。使用甲醛固定的标本不能保持其原来的圆形形态, 空泡型与颗粒型会形成多种多样形

态,见图 13。



注:B. h. 形态不固定,中央空泡染色不均匀,在周围细胞质内有线粒体样结构和核,此点为鉴定特征^[2,14]。

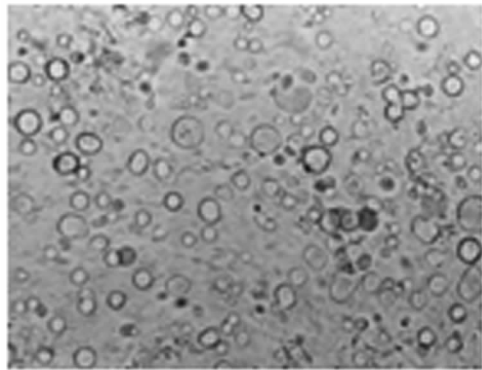
图 13 粪便标本 MIF 固定染色方法

5.4 培养方法^[2] 以下介绍的方法为简单且检出率高的方法,之后还可进行遗传学检查,特别适用于 DNA 测定,很有实用价值。虽然已经报道多种培养基方法,但以液体培养基更为简单方便。液体培养基组成:氯化钠 8.5 g;氯化钙 0.33 g;氯化钾 0.3 g;天门冬酰胺 0.5 g。

培养基制作:用 1 mol/L 的 NaOH 调整蒸馏水 pH 7.0~7.4,加至 1 000 mL。放置 120 ℃,高压灭菌 20 min,灭菌后备用,放入冰箱可保存一年以上。加入无菌马血清,制成液体培养基,放入冰箱可保存 1 个月以上。此外,可分装在 5~15 mL 塑料管中灭菌后备用。培养基装入培养容器 70%容量即可。

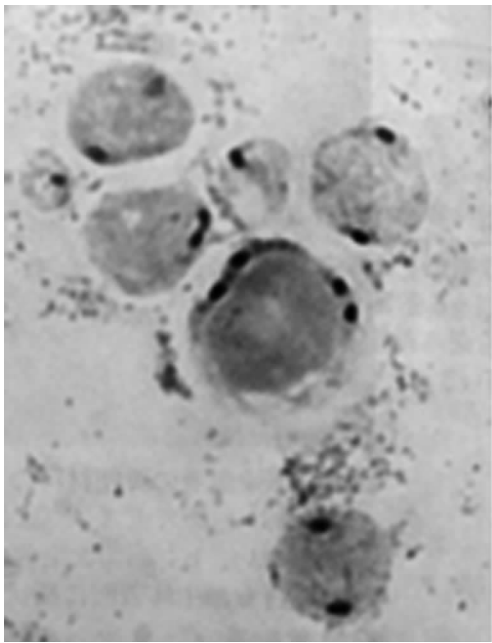
培养基放置冰箱冷藏,接种标本时,必须将培养基置于室温事先预热,将新鲜粪便培养放入培养基,用灭菌棒搅拌均匀。与放入粪便量有关,一般采用 15 mL 的塑料管,放入 1 g 粪便较适宜。如果采用微型管,一般在 5~10 mg(3 倍火柴头大小)为宜。

放入 37 ℃温箱培养,2~5 d,每天以灭菌吸管,吸接管底沉淀物表面,放载物片,盖上盖玻片,在显微镜下进行观察。可见 B. h. 繁殖的虫体。见图 14、15。由于粪便内细菌繁殖,培养管内产生压力,培养管可能发生自然脱落现象。当培养管盖脱落时,内容物可能喷出,污染温箱或环境。另外,培养虫体在 2 d 急剧繁殖,消耗营养多,需要在次日转种 1 次新培养基,保持继代培养。培养基中渣滓较少时,进行 DNA 提取为宜^[2]。



注:可以看到呈圆形大小不等的虫体,也可观察到多形态的阿米巴型虫体^[2]。

图 14 培养繁殖的虫体(活体形态)



注:能清楚看到多核虫体,2 个核的端极都以对角线形式存在,形成“双眼”状态^[2]。

图 15 培养的姬姆萨染色虫体

5.5 3 种方法联合检查观察 该方法为阿米巴原虫经典染色方法^[7],众多教科书的阿米巴原虫图谱大都依此法染色。1948~1963 年,笔者在协和医院寄生虫室对粪便寄生虫常规的检查中,每例患者标本均采用粪便直接涂片、碘染色、硫酸锌漂浮法 3 种方法联合显微镜检查,凡遇到原虫且即便是可疑时,必须进行铁苏木素染色方法制作标本,经油镜检查与鉴定^[15-16],共完成 115 834 例寄生虫感染患者的检查与统计^[17],并获得 B. h. 检出率 45%的统计结果^[9]。可见所用检查方法决定检出率高低。

6 临床表现

B. h. 是近 20 年来被人们所重视与腹泻相关的人体寄生虫,其症状无特殊表现,易与肠道一般感染相混淆。一旦粪便检出 B. h. 即可确诊。对于部分慢性腹泻而病因不明的患者应注意该虫感染的可能^[10]。脓血便原因分析可能是红细胞能为 B. h. 提供营养物质,故而 B. h. 感染更易存在于黏液脓血便中;再者慢性腹泻治疗不当易引起肠黏膜损伤和肠道功能紊乱,甚至出现黏液脓血便,上述情况下 B. h. 更容易侵入机体。

胡缨等^[6]报道,在对 683 例恶性肿瘤住院患者进行 B. h. 病原学检查中发现,受感染者 112 例(16.40%),其中黏液脓血便组感染率显著高于其他类型粪便组($P<0.05$);不同性别、年龄间感染率差异无统计学意义($P>0.05$);在不同治疗组中,化疗组感染率最高,为 26.40%;在不同肿瘤类别组中,消化系统组的感染率最高,为 28.51%;低清蛋白组感染率显著高于清蛋白健康组($P<0.05$);免疫功能低下组感染率显著高于免疫功能健康组($P<0.05$)。B. h. 大量繁殖导致感染者不同程度的肠道病变,其临床表现无特异性;大部分感染者主要表现为腹痛、腹泻、腹胀、厌食、恶心、呕吐等症状;部分感染者可出现乏力、发热、全身不适等,易与一般炎症反应相混淆;个别重症患者可导致严重腹泻、低蛋白血症、全身水肿等,甚至危及生命^[18-19]。

7 治疗

治疗本病多采用甲硝唑(灭敌灵),每次口服 250 mg,每日 3 次,5~10 d 为 1 个疗程,可使粪便阴性。部分复发或治疗无

效,可加大剂量为 750 mg。对于不同的虫株,敏感性可能不同。对于耐药患者,可采用复方磺胺甲噁唑、痢特灵、双磺喹啉、黄连素或鸦胆子治疗^[1]。黄道超等^[20]认为,甲硝唑疗效好、不良反应小,廉价安全,使用方便,且具有抗厌氧菌作用,可被作为治疗人和动物阿米巴病的首选药物。

8 小 结

有学者指出,新现和再现感染性疾病已经成为影响人民健康重要的公共卫生问题。作为从事医学教育、研究、临床和预防的卫生工作者,应积极应对,不断学习,充实和扩大专业知识面,同时还要担负起宣传、教育的职责,提高全体民众的卫生防病意识^[16]。

笔者强调,检验医学在临床及卫生领域起到举足轻重的作用,是临床医学不可缺的组成部分。增加新现和再现寄生虫的认识,提高寄生虫感染认识和寄生虫形态鉴别与检出率是当务之急,刻不容缓。

参考文献

[1] 何妮,张月清. 人芽囊原虫的研究进展[J]. 国外医学:寄生虫病分册,2001,28(3):104-108.

[2] 吉川尚男. 肠管寄生原虫ブラストシスとその検査法[J]. 検査と技術,2011,39(1):11-17.

[3] El-Shazly AM, Abdel-Magied AA, El-Beshbishy SN, et al. Blastocystis hominis among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2005, 35(2):653-666.

[4] 杨彦,刘晓泉,唐莉莉,等. 广西南部沿海地区居民人芽囊原虫感染情况调查[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(2):142-143.

[5] 胡纓,黎学铭,张鸿满,等. 南宁市城区人群人芽囊原虫感染情况调查[J]. 中国病原生物学杂志,2013,8(6):547-548.

[6] 胡纓,宋向群,李艳文,等. 恶性肿瘤患者人芽囊原虫感染情况研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(12):1962-1964.

[7] 张峰,崔巍. 北京协和医院寄生虫彩色图谱[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:107-111.

[8] 祝海如,李芳. 人体寄生虫实验手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1958:21-23.

[9] 李影林. 中华医学检验全书[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:496-505.

[10] 胡纓,李艳文,卢作超. 慢性腹泻患者 1 185 例感染人芽囊原虫的临床分析[J]. 中国热带医学,2012,12(6):713-715.

[11] 朱慧慧,周长海,陈颖丹,等. 全国人体重点寄生虫病现状调查 SWOT 分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2015,33(5):377-381.

[12] Lynne SG. 诊断医学寄生虫学[M]. 张进顺,李薇,孙新,等,译. 北京:人民卫生出版社,2010:21-23.

[13] 何建国,江静波,周宏,等. 人类芽囊原虫光镜与超微结构研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),1990,29(3):122-128.

[14] 张旭,乔继英,李影,等. 人芽囊原虫的形态观察及与腹泻的关系[J]. 西安医科大学学报,2001,22(6):588.

[15] 王建中. 临床检验诊断学图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:846.

[16] 曹兴午,阿学静. 肠道寄生虫临床检查方法的探讨(附北京协和医院 13 年肠道寄生虫感染率)[J]. 中华医学杂志,1964,50(3):158-163.

[17] 曹兴午. 我是协和人——65 年践行转化医学的轨迹[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(5):1-22.

[18] Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, et al. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2000, 31(1):112-117.

[19] Nassir E, Awad J, Abel AB, et al. Blastocystis hominis as a cause of hypoalbuminemia and anasarca[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004, 23(5):399-402.

[20] 黄道超,杨光友,王强,等. 人和动物阿米巴原虫病研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(5):51-55.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-06-07)

• 综 述 •

血小板输注无效的原因分析

郭志海,赵江花,王东红 综述,李利燕[△]审校
(河北省邯郸市中心医院输血科 056001)

关键词:血小板输注无效; 人类白细胞抗原抗体; 血小板特异性抗体; 感染
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 22. 029 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)22-3172-03

血小板输注无效(PTR)是指患者在连续 2 次输注 ABO 血型相合且足够剂量的血小板悬液后仍处于无反应状态,即血小板计数(PLT)未见显著升高、有时反而下降;输入的血小板在体内存活期很短;CCI 和 PPR 不能达标;临床出血倾向未见减轻等。从而未能防治由于血小板数量不足或功能缺陷导致的出血^[1]。引起 PTR 的原因较多,主要原因可概括为 2 大类,免疫性因素和非免疫性因素。

1 免疫性因素

临床血小板的输注属于同种异体细胞移植,在重复输注后会产生血小板抗体,主要包括抗人类白细胞抗原(HLA)抗体、血小板特异性抗体(HPA)和抗 ABH 抗体等。

1.1 抗 HLA 抗体 血小板表面具有 ABO、Le、Ii 等红细胞抗原和 HLA-Ⅰ类抗原,而 HLA-Ⅰ类抗原是血小板表面的固有成分,其Ⅰ类抗原中的 A 抗原和 B 抗原起主要作用^[2]。引起

[△] 通讯作者, E-mail:363532354@qq. com。