



人类微孢子虫检测方法研究进展

莫碧莹^{1,2}, 包佳玲^{1,2*}, 周泽扬^{1,2,3}

¹西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

²西南大学微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715

³重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331

摘要: 微孢子虫(microsporidia)是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物。是引起微孢子虫病的真菌类病原。在已知并被命名的 1500 多种微孢子虫中, 共有 9 个属中的 17 个虫种可以感染人。人类微孢子虫可侵染包括肠道、肝、肺、脑等部位, 引起慢性腹泻、肝炎、角膜炎、脑炎、血液系统性感染等, 严重影响人类健康。研究开发快速高效的人类微孢子虫诊断方法成为当前病原微生物检测领域研究的热点。人类微孢子虫的发现历史实际上是伴随检测方法的不断进步而逐渐进行的。这些检测方法包括, 透射电镜(transmission electron microscopy)、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin stain, HE)、亚甲蓝染色(methylene blue)、吉姆萨染色(giemsa)、革兰氏染色(gram stain)、韦伯氏改良三色染色法(Weber's chromotrope-based staining)、荧光增白剂染色法(calcofluor white staining)、抗原检测、抗体检测、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、DNA 点杂交模型等。随着技术的进步以及更多微孢子虫的检出, 使人类能够更好地认识微孢子虫、并制定微孢子虫准确快速检测方法和防控策略。

关键词: 人类微孢子虫, 检测, 分子生物学检测, 染色镜检, 免疫学方法

微孢子虫是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物, 不但可以寄生于家蚕、虾、蟹和蜜蜂等经济动物, 造成经济损失, 有些微孢子虫还可以感染人, 引起人类微孢子虫病。在已知并被命名的 1500 多种微孢子虫中, 有 9 个属、17 个虫种的微孢子虫可以感染人类^[1]。其中较为常见的四种感

染人的微孢子虫——肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*), 兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*), 毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*)和海伦脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon hellem*), 都是动物源性的微孢子虫。

基金项目: 高校基本业务费(XDJK2020B005); 国家自然科学基金(31802141)

*通信作者。Tel: +86-23-68251088; Fax: +86-23-68251128; E-mail: baojl@swu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-07; 修回日期: 2020-09-28; 网络出版日期: 2020-10-21

由于微孢子虫十分微小, 即使是在光学显微镜最高放大倍数下仍然难以观察和判断。因此, 早期关于人类微孢子虫病及其流行病学的研究和相关知识十分有限。有关微孢子虫感染人的零星报道一直存在, 第一个被报道的人微孢子虫感染是 1927 年, 来自一个当时被认为感染了查氏微孢子虫(*Encephalitozoon chagasi*)的新生儿^[2]。此后, 随着微孢子虫检测技术的发展和进步, 越来越多感染人的微孢子虫在临床中被鉴定出来, 它们的分类和命名也随着科学技术的发展更加精确。1985 年, 研究者们从艾滋病患者的肠道和骨骼肌中发现了毕氏肠微孢子虫和另一种未知的微孢子虫^[3], 关于微孢子虫的研究引起了学界的兴趣。随着研究的发展和深入, 研究者们对于人类微孢子虫病及其流行病学的认识有了长足的进步。关于人类微孢子虫感染的调查主要集中在免疫力低下人群, 如 HIV 感染者。或出现腹泻症状的幼儿、老年人和旅行者等。2018 年, Wang 等对 HIV 感染者中微孢子虫的感染情况进行调查。调查显示, 在全球 HIV 感染者中, 微孢子虫感染的合并患病率约为 11.8%^[4]。关于人类微孢子虫流行病学的调查仍在持续更新中。

人类微孢子虫可侵染包括肠道、肝、肺、脑等部位, 引起慢性腹泻、肝炎、角膜炎、脑炎、血液系统性感染等, 严重影响人类健康。微孢子虫感染常见报道于 HIV 患者、肿瘤患者、移植受者、肺结核患者等免疫力低下人群中^[5]。微孢子虫引起的系统性感染可以在粪便、尿液、呼吸道样品、脑脊液和结膜表面物等样品中检测出来。样品的采集、保存和处理方式, 每一个环节都会影响实验结果。例如, 检测粪便样品中的微孢子虫, 其检测准确性和灵敏度不仅和检测技术相关, 还和微孢子虫的种类有关。使用光学显微镜检测粪便

中的微孢子虫, 其最低检测限度为 5×10^4 孢子/mL, 脑炎微孢子虫属孢子的检测限度则是 10^4 – 10^6 孢子/mL。而使用 PCR 法检测脑炎微孢子虫属的孢子, 其检测限度可达到 10^2 孢子/mL^[6]。及时准确地检测出微孢子虫感染, 对患者的诊断和治疗十分重要。

组织病理学染色和透射电镜观察是早期最常见的微孢子虫鉴定方法。随后, 通过蛋白质印迹分析 (Western blots), 免疫荧光染色 (immunofluorescence) 和聚合酶链式反应 (PCR) 鉴定微孢子虫的方法得到开发和应用。本文主要介绍苏木精-伊红染色、透射电镜、基于微孢子虫核糖体小亚基 RNA (small subunit ribosomal RNA, SSUrRNA) 的编码 DNA 或核糖体 RNA 内转录间隔区 (ITS) 序列的分子生物学检测方法、染色镜检方法以及抗原、抗体检测方法和快速检测方法。随着微孢子虫研究的日益深入和科学技术的发展, 许多方法得到了完善和延伸, 其灵敏度和特异性也得到提高, 还有许多新的人类微孢子虫检测方法被开发出来。如何将 these 方法应用于临床检测中, 将是研究者们需要思考的问题。因此人类微孢子虫临床检测方法的研究和开发具有重大意义。本文通过对人类微孢子虫的常用检测方法进行介绍, 希望能为人类微孢子虫的检测、人类微孢子虫病的临床诊断和防治等工作提供帮助和参考。

1 微孢子虫属 (*Microsporidium*)、肠微孢子虫属 (*Enterocytozoon*)、安卡尼亚孢虫属 (*Anncaliia*) 及气管普孢虫属 (*Trachipleistophora*) 的早期检测方法

在 1973 年, 通过苏木精-伊红染色 (hematoxylin-

eosin stain, HE)、过碘酸-雪夫反应(periodic acid-Schiff, PAS)、革兰氏染色(Gram stain)、吉姆萨染色(Giemsa)和亚甲蓝染色(methylene blue)这几种染色方法, 在人的眼角膜中检出锡兰微孢子虫(*Microsporidium ceylonensis*, 异名 *Nosema* sp.)。这种微孢子虫被苏木精、过碘酸-雪夫反应和革兰氏染色后呈弱阳性, 而被吉姆萨和亚甲蓝染色后呈强阳性。当使用 HE 染色法对感染人类微孢子虫的角膜组织染色时, 可观察到微小的椭圆形折射体, 通过相差显微镜可以清楚地分辨聚集在角膜一侧的微孢子虫的轮廓, 大小约为 2 μm 。而使用亚甲蓝染色时, 除了观察到这种微孢子虫的聚集, 还能清晰地观察到这种微孢子虫的极空泡和厚囊^[7]。

随着电子显微镜技术的发展, 透射电镜逐渐应用于人类微孢子虫的检测。1981年, 通过抗酸染色法和透射电子显微镜技术, 从人的眼部检出了非洲微孢子虫(*Microsporidium africanum*, 异名 *Nosema* sp.)。这种微孢子虫在抗酸染色法染色时呈现强阳性。通过电子显微镜技术, 从超微结构特征将它归类为 *Nosema* 属, 并和脑炎微孢子虫属(*Encephalitozoon*)区别开来^[8]。随着透射电镜技术的进步, 还鉴定到了一种在艾滋病患者和免疫力低下人群中常见的微孢子虫, 毕氏肠微孢子虫。1985年, 通过透射电镜, 在海地艾滋病患者的肠细胞中检出毕氏肠微孢子虫。在此次对毕氏肠微孢子虫的透射电镜观察中, 观察到了双核细胞, 孢子体, 单核孢子体和孢子这几个阶段。这种微孢子虫在与宿主细胞胞质直接接触的发育阶段, 既没有孢子体囊泡(泛胚膜)也没有寄生虫的液泡。极管(5-6个线圈)在胞原质裂变之前进行了分化。成熟孢子的大小为 1.5 μm × 0.5 μm 。孢子壁很薄,

因为缺少内壁或分化不良^[9]。

超微结构特征是微孢子虫鉴定和分类的主要依据之一。光学显微镜的分辨率为 0.2 μm , 其放大倍数不足以观察微孢子虫的超微结构。电子显微镜, 如透射电子显微镜可以在光学显微镜的基础上放大 1000 倍, 达到 0.2 nm 的分辨率^[10], 是观察微孢子虫超微结构的利器。通过戊二醛固定和电镜包埋技术来处理待观察的微孢子虫, 可以清晰观察到微孢子虫的孢子发育周期、宿主与病原体的相互作用、细胞核构型和形态学等微孢子虫的完整生活史。每一种新的微孢子虫的检出, 都离不开电子显微镜对其超微结构特征的鉴定和分辨。这使得电子显微镜成为微孢子虫诊断和种水平鉴定的金标准。1990年, 通过组织病理学检查和透射电子显微镜技术, 从人的角膜中检测出角膜条孢虫(*Vittaforma corneae*, 异名 *Nosema corneum*)。这种微孢子虫通过 HE 染色等组织病理学染色方法可观察到退化的角膜细胞的胞内和胞外有许多孢子。通过透射电镜观察, 发现有长度约为 3.5-4.0 μm , 宽度约为 1.5 μm 的封闭椭圆形结构的成熟孢子, 其具有发达的细胞壁, 其中含有双核和盘绕成 6 圈的极管^[11]。

除了透射电镜观察和上述的染色方法, 还有许多染色方法在临床检测中能够观察到微孢子虫。Weber Rainer 对三色染色法的改良使得在光学显微镜下微孢子虫更容易从其他杂质中被分辨出来。该染色方法将微孢子虫孢子染成红色, 孢壁着色较深, 中空淡染或较苍白, 大小约 1-3 μm 的椭圆形或卵圆形, 其他杂质则被染成绿色, 许多孢子还呈现典型的带状结构^[12]。而对感染组织使用这种染色法时, 组织会被染成紫色, 孢子仍被染成红色。这种方法使得微孢子虫更易与其他细

菌真菌区别开来,大大减少了镜检所需的时间,提高了微孢子虫显微镜检测的检出率。因此,这种方法在临床检测微孢子虫上得到广泛的应用。

1996年,通过改良三色染色法(modified trichrome stain)、HE染色、Warthin-Starry银染、甲苯胺蓝染色法(toluidine blue)和透射电镜技术,从人的角膜刮屑,骨骼肌和鼻分泌物中检测出人气管普孢虫(*Trachipleistophora hominis*)。通过透射电镜对其超微结构和发育过程进行观察,确认其区别于其他已知的微孢子虫,并为其建立了新的属和种,即 *Trachipleistophora hominis*。通过改良的三色染色法,可以将孢子染成红色,与被染成紫色的组织明显区别开来。在对被感染的结膜组织的染色中,可以清楚地观察到椭圆形的成熟孢子和上皮细胞中的含有孢子的寄生囊。通过 HE 染色、Warthin-Starry 银染、甲苯胺蓝染色法也可以观察到类似的现象,但不能像改良的三色染色法那样,通过颜色明显地区分组织和孢子。通过透射电镜对这种微孢子虫的形状、褶皱状孢子外壁、极管、锚定盘、原生质体和极管线圈进行观察,最终确认其是一种新的种属的微孢子虫^[13]。除此之外,在2017年,印度一项针对 HIV 患者粪便微孢子虫检测中,评估了韦伯氏改良三色染色法的微孢子虫检出性能,其检出率可达到 61.5%^[14]。这种方法的不足之处在于,会将酵母和一些细菌也染成微红色,需要通过比较人类微孢子虫与这些酵母、细菌的大小、形状和染色区域对他们加以区分。

在后来的微孢子虫检出中,常常将染色观察和电子显微镜技术结合使用,使得检测准确性更高。1998年,通过 HE 染色和透射电镜法,在艾滋病患者的肌肉组织中检测出水泡安卡尼亚孢虫

(*Anncaliia vesicularum*)。使用 HE 染色法,对患者的肌肉组织进行染色,可以观察到肌肉组织中有大小约为 2.5 μm ,椭圆形的孢子。通过透射电镜,观察到孢子具有双核,且靠近孢子外围的两边各有 10 个极管线圈。由此确定该孢子是一种新的微孢子虫种,并对其进行分类和命名^[15]。通过染色观察和电子显微镜结合的方法,在 1996 年,在艾滋病患者的大脑的星形胶质细胞和巨噬细胞中检测出了嗜人气管普孢虫 (*Trachipleistophora anthropoptera*) 孢子,并且在患者死亡后的完全尸检中,发现嗜人气管普孢虫的感染扩散到胰腺、甲状腺、甲状旁腺、肝脏、脾脏、淋巴结和骨髓中,感染了多个器官^[16]; 2007 年,在人的角膜中检测出了微孢子虫属(*Nosema* sp.)微孢子虫的感染,作者认为,人眼温度降低和免疫力降低导致人被原本寄生在冷血昆虫中的寄生虫感染,显示了昆虫微孢子虫感染人的潜力^[17]; 2011 年,在人的骨骼肌中,检测出了管孢虫属(*Tubulinosema* sp.)微孢子虫感染,通过 Warthin-Starry 银染发现在肌肉纤维中有大量微孢子虫聚集,通过透射电镜对切片进行观察,发现这种微孢子虫的极管线圈在靠近外围两侧各有 11 个线圈,排成一列,最后 3-4 个线圈较小^[18]。

通过染色镜检的方法来进行微孢子虫检测,不失为一种快速而简便的方法。十九世纪中期,巴斯德经过大量的研究探索,创立了母蛾镜检法以来,通过显微镜观察来检测微孢子虫的方法不断被后人改进和创新,成为微孢子虫检测的重要方法。然而,由于人类微孢子虫是大小只有 1-3 μm 的椭圆形单细胞真核生物,直接通过显微镜观察,容易将微孢子虫和其他微生物或杂质混淆,降低了微孢子虫检测的准确度。同时,这种方法对操

作人员的技术和经验十分依赖,在镜检时容易出现漏检,且整个检测过程耗时长,工作量大,具有很大的局限性。微孢子虫感染会引起人类的结膜炎、角膜炎,可以通过对拭子擦取得到的非创伤结膜样品或活组织样品进行染色来观察检测。也可以通过对粪便、尿液和呼吸系统分泌物进行染色来观察。染色镜检法的样品制作过程较电子显微镜观察的过程更简单,耗时更短,基本上当天制作,当天就可以观察,且对设备的要求没有这么高,经过长时间的发展和改进,适合用于临床检测。国内外研究者经过大量的研究工作,希望寻找出一种能够将人类微孢子虫和其他微生物和杂质区别开来,极大提高人类微孢子虫检测准确率的染色镜检方法。

除了上面提到的染色方法,还有一些染色方法是针对微生物的几丁质成分,或将孢子与其他杂质染成不同颜色加以区分,如荧光增白剂染色法(calcofluor white staining)和革兰氏铬变素染色法。使用化学荧光试剂染色处理后的孢子,可以被紫外显微镜观察到。常见的几种用于微孢子虫染色的荧光增白剂有卡尔科弗卢尔荧光增白剂 M2R、Uvitex 2B 等。荧光增白剂可以与微生物的几丁质成分结合^[19],使得微生物在荧光下显现亮蓝色。用荧光增白剂对人类微孢子虫进行染色,可将微孢子虫染成亮蓝色一圈的 1–3 μm 椭圆形或卵圆形。荧光增白剂染色更容易将微孢子虫和其他杂质区别开来,使得人类微孢子虫检出率得到提高,可达到 76.92%^[14]。但这种方法也会将其他含有几丁质成分的微生物或杂质染色,只能通过形状和大小对微孢子虫进行分辨。因此,使用这种方法进行人类微孢子虫的检测和鉴定需要检测者有丰富的工作经验。这就限制了该方法的检测

速度和效率。而革兰氏铬变素染色法,结合了革兰氏染色法和铬变素染色法的特点,可以将微孢子虫染成紫色至粉红色,中间带特征性条带,其他杂质染成绿色,使得在绿色背景下的微孢子虫更容易被分辨。有研究者通过改变染料中 chromotrope 2R 的浓度、染色时间和染色温度对该方法进行优化,缩短检测时间,微孢子虫检出率可达到 38.4%^[14]。将样品涂片在较弱火焰上加热 3 次,每次 1 s,或在 60 °C 切片加热器加热 5 min,热处理后再进行染色,可以缩短染色时间,最快可在 5 min 内完成^[20]。染色速度快是此方法的优点,但检出率较低,还有待改进。

2 现代方法检测海伦脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫和按蚊微孢子虫(*Anncaliia algerae*)

随着研究者们对人类微孢子虫认识的加深和科学研究的进步,免疫学检测方法和分子生物学检测方法也得到开发和应用。在人类微孢子虫检测中,常常将几种检测方法结合使用,来判断侵染人体的微孢子虫种类。免疫学和分子生物学检测方法,一个具有抗原抗体的特异性结合,一个直接对微孢子虫的 SSUrRNA 的编码 DNA 或 ITS 序列这些在微孢子虫进化中保守性很强的序列进行扩增和检测。这两种方法对人类微孢子虫的分类具有极大的作用,更极大提高了人类微孢子虫检测的灵敏性和特异性。

1991 年,通过对患有角膜炎的艾滋病患者的结膜拭子或角膜组织进行培养,对分离物进行透射电镜观察、提取总蛋白进行 SDS-PAGE 分析和对患者的血清进行 Western blots 免疫印迹分析这

几种方法,从患者的角膜中检测出海伦脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon hellem*)。通过透射电镜观察到,这种微孢子虫平均为 $1 \times (1.5-2.0) \mu\text{m}$,具有 6-8 个极管线圈,显示单核,并具有相对较厚的内壁和不规则形状的外壁,并且是在寄生囊内发育。通过 SDS-PAGE 分析,发现所有分离物的蛋白质条带是相同的,说明分离培养得到的是同一种微孢子虫。通过对患者的血清进行 Western blots 免疫印迹分析,发现其与几种常见于艾滋病患者中的微孢子虫都发生了反应,也与 *Nosema corneum* 有弱结合反应,因此确定这是一种新的人类微孢子虫,即海伦脑炎微孢子虫^[21]。

兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)和肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*)的发现则主要是基于对微孢子虫 SSUrRNA 的编码 DNA 的分析。1993 年,通过显微镜观察、蛋白质印迹分析和对微孢子虫 SSUrRNA 进行限制性内切酶分析,从免疫缺陷患者和兔子的尿液分离物中检测出兔脑炎微孢子虫^[22]。1995 年,通过同样的方法对人的组织分离物进行培养和分析,从人的脑脓肿中检测出肠脑炎微孢子虫,作者还比较了 *Encephalitozoon spp.*、*Encephalitozoon cuniculi* 和 *Encephalitozoon hellem* 的 SSUrRNA 的编码 DNA 序列,发现其相似性达 90%,远高于不同属之间微孢子虫的相似性,因此将这种微孢子虫归为脑炎微孢子虫属(*Encephalitozoon*)^[23]。

2004 年,在检测出按蚊微孢子虫(*Anncaliia algerae*, 异名 *Nosema algerae*、*Brachiola algerae*)时,除了使用染色镜检、透射电镜和 PCR 法扩增微孢子虫核糖体 RNA 进行分析,还使用了间接免疫荧光染色(IFA),对孢子进行染色。使用感染者的角膜分离物制作抗血清,进行 IFA,在肌肉标本

中发现被荧光标记的孢子。通过透射电镜观察到这种微孢子虫孢子具有排成一排的 9 个极管线圈。结合 PCR 法扩增微孢子虫核糖体 RNA 进行分析,最终确定检出的是按蚊微孢子虫^[24]。

以上人类微孢子虫种的发现,除了应用传统的染色镜检和透射电镜法观察,还使用了免疫学检测方法和分子生物学检测方法。其中免疫学检测方法又分为抗原检测和抗体检测。基于病原体(即抗原)的检测方法有,间接免疫荧光抗体(IFA)、酶联免疫吸附(ELISA)和蛋白质免疫印迹(Western blots)。将病原体直接免疫动物,可从动物血清中获得针对该病原体的多克隆抗体。通过杂交瘤技术可从细胞培养上清中获得该病原体的特异性单克隆抗体。这些抗体都可以应用于 IFA、ELISA 和 WB,对病原进行检测。目前已有多种针对人类微孢子虫的抗体得到开发。包括肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、毕氏肠微孢子虫和海伦脑炎微孢子虫^[25]。其中 IFA,是实验室常用的观察和检测病原的技术。这种技术是以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术。1994 年,美国研究者开发了针对海伦脑炎微孢子虫的多克隆抗体^[26]。该方法是将培养的海伦脑炎微孢子虫注入兔中,使其产生抗体,再用于海伦脑炎微孢子虫的间接免疫荧光染色。随着对微孢子虫研究的深入,许多微孢子虫的孢壁蛋白被鉴定出来。同时也开发了相应的微孢子虫孢壁蛋白抗体用于间接免疫荧光染色。这种结合了免疫学和显微镜技术的方法,特异性非常高,染色后可在荧光下观察到 1-3 μm 椭圆形的人类微孢子虫。

而抗体检测则具有较大的争议。人体遭到病原体侵入后,在抗原刺激下会分泌抗体,产生免疫反应。血清学试验是利用抗原抗体在适宜条件

下的体外特异反应, 可用于检测抗体。血清学检测抗体的方法有 ELISA、免疫印迹和凝集实验等。但这些血清学方法的缺陷较多。首先这些血清学方法只能检测分泌的抗体, 且免疫缺陷患者可能表达变异抗体, 使得血清学方法检测失去作用; 第二, 无法区分急性感染和已发感染; 第三, 针对不同种微孢子虫的抗体具有交叉反应, 因而无法作为诊断依据^[2]。例如, ELISA 是将已知的抗体吸附在固相载体表面, 使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行, 用洗涤法将液相中的游离成分洗除。滴加底物后, 底物可在酶的作用下发生反应, 此时可以通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应, 颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正比。这种方法对人类微孢子虫检测有一定作用。在一些针对 HIV 感染者微孢子虫感染的研究中, 至少有一半没有微孢子虫感染史的人的血清标本具有阳性滴度^[27]。因此, 目前尚未有较好的针对抗体的检测方法被开发出来。

3 基于 SSUrRNA 编码 DNA 的聚合酶链式反应(PCR)检测微孢子虫

分子生物学检测方法是随着分子生物学的发展和基因组测序工作的开展而逐渐应用于微孢子虫的检测。2001 年兔脑炎微孢子虫基因组测序工作完成, 2012 年, 美国国家生物技术中心(NCBI)分类系统将微孢子虫归为: 细胞型生物体(cellular organisms)/真核生物(eukaryote)/真菌(fungi)/微孢子虫(microsporidia)^[28], 微孢子虫研究进入基因组时代。由于微孢子虫的 SSUrRNA 在进化过程中具有保守性强的特点, 且其序列中含有保守区和可变区, 既可以用于设计微孢子虫检测通用引物,

又可以用于进行微孢子虫种间的鉴别, 在微孢子虫的检测和分类上将起到重要作用^[29]。微孢子虫核糖体 RNA 内转录间隔区亦有相似特点。通过基于 SSUrRNA 的编码 DNA 的聚合酶链式反应(PCR)可以快速准确地检测出人类微孢子虫感染, 其灵敏度和特异性极高, 因此引起了研究者的广泛关注。目前已有许多针对人类微孢子虫基因组开发的检测方法在国内外发表。对人类微孢子虫的种类进行鉴别, 可以基于微孢子虫的 SSUrRNA 或 ITS 序列设计特异引物。例如, *E. cuniculi* 的特异引物是 5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3', 5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3', 扩增片段长度为 549 bp; *E. hellem* 的特异引物是: 5'-TGA GAAGTAAGATGTTTAGCA-3', 5'-GTAAAAAGACTCTCACACTCA-3', 扩增片段长度为 547 bp; *E. intestinalis* 的特异引物是: 5'-TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA-3', 5'-CCGTCCTCGTTCTCCTGCCG-3', 扩增片段长度为 520 bp^[30]。通过 PCR 法得到特异性扩增产物后, 对扩增产物进行测序, 并将测序结果放到 NCBI 和 MicrosporidiaDB 等数据库进行 BLAST, 得到人类微孢子虫种类的检测结果。

巢式 PCR 法。在人类微孢子虫感染情况的调查研究中, 多用从人类微孢子虫 SSUrRNA 的编码 DNA 来设计引物的巢式 PCR 法进行检测。巢式 PCR 的扩增非常特异。扩增后, 通过对目的片段大小的判读, 或者对扩增产物进行测序, 可确定样本中感染的是哪种人类微孢子虫。在 2015 年伊朗 HIV 患者微孢子虫感染情况调查中作为主要检测手段进行使用^[31]。

实时荧光定量 PCR。近年来, 实时荧光定量 PCR 法越来越多地应用于人类胃肠道寄生虫的检

测。该方法除了能特异地识别病原体，还能计算样品中初始模板 DNA 的拷贝数，从而达到定量的效果。其检测过程在一个相对封闭和独立的系统中完成，避免了样品和环境的交叉污染。2018 年，法国研究者基于肠脑炎微孢子虫和毕氏肠微孢子虫 SSUrRNA 的编码 DNA 序列，设计了 qPCR 引物，对这两种人类微孢子虫进行检测。该研究认为 qPCR 具有快速、灵敏度高、特异性好和可同时检测多个样本的优点，优于传统显微镜诊断^[32]。

多重 PCR，是在同一 PCR 反应体系里加上 2 对以上引物，同时扩增出多个目的片段的 PCR 反应。其原理、方法与一般 PCR 相同。将多重 PCR 应用于人类胃肠道寄生虫检测，可同时检测出多种病原。也可以同时检测几种不同的人类微孢子虫。2018 年，荷兰研究者在马拉维针对进行抗逆转录治疗的 HIV 感染儿童的肠道寄生虫的研究中，使用多重 PCR，对毕氏肠微孢子虫和肠脑炎微孢子虫属(*Encephalitozoon spp.*)等多种寄生虫进行调查。证明该方法具有准确性高，可同时检测多种病原的特点^[33]。

环介导等温扩增法自发表以来，研究者们开发出许多不同的 LAMP 方法对病毒、细菌、真菌和寄生虫进行鉴定。该方法的特点是，针对目标 DNA 链上的 6 个区段设计 4 个不同的引物，再使用链置换型 DNA 合成酶在一定温度下反应。反应只需要在一个温度下经过一个步骤即可完成。其扩增效率和特异性极高。2015 年，马来西亚研究者将 LAMP 法应用于一种人类微孢子虫，毕氏肠微孢子虫的检测。在该研究中，LAMP 法的敏感性和特异性都与 PCR 法呈现一致。由于它的操作和反应都很简单，可以为一种简便、快速、灵敏且特异的替代性分子筛选工具用于检测人类微孢子虫^[34]。

DNA 点杂交模型是一种基于核酸分子杂交技术的分子诊断方法。该方法通过将基于人类微孢子虫的 SSUrRNA 设计的探针引物固定，用以检测样品是否含人类微孢子虫。2017 年，中国研究者对其进行棘阿米巴原虫(*Acanthamoeba*)和微孢子虫的检测实验，证明其敏感性和特异性达到 100%。但作者也同时提出，这种方法尚不成熟，在常规临床实践中采用该模型之前，可能需要进行前瞻性临床研究^[35]。

寡核苷酸阵列是一种最初由全基因组分析表达芯片发展而来的微阵列芯片。这种微阵列技术通常将靶基因互补的寡核苷酸标记在“芯片”上，然后和样品中被荧光标记的核酸杂交；最后测定样品 DNA 相关的荧光强度。近几年来，这种技术在分子诊断方面得到应用。2005 年，中国研究者将这种技术应用于人类微孢子虫检测。研究者们选择 18S rRNA 基因作为扩增目标，用荧光染料标记，并与固定在微芯片上的一系列物种特异性寡核苷酸探针杂交，达到检测目的。微阵列的特异性通过被测试的微孢子虫的每种物种表现出的独特杂交图谱得到证明。这种方法的最低检测限度是 10 个孢子，说明它的灵敏度也很高。因为这种阵列的形式和自然荧光的强度，使得这种技术可以进行高通量和定量检测，大大提高了检测效率和检测灵敏度。但这种方法仍然存在假阳性的问题，因此开发时需要谨慎筛选作为扩增目标的目的基因，提高检测特异性和准确性^[36]。

4 针对人类微孢子虫的快速检测方法

近年来，随着人类微孢子虫研究成果的日益丰富，人类微孢子虫的检测方法也得到长足的发展，几种基于核酸扩增技术的针对人类微孢子虫

的快速检测方法得到开发和应用。

2019年,法国研究者开发了首个用于检测隐孢子虫(*Cryptosporidium*)、毕氏肠微孢子虫和肠脑炎微孢子虫的商用试剂盒^[37]。该试剂盒基于多重实时荧光 PCR 法,通过商用 DNA 提取试剂盒从患者粪便中提取总 DNA 用于检测。引物序列是针对微孢子虫 SSUrRNA 的编码 DNA 设计,使其能够特异性检测毕氏肠微孢子虫和肠脑炎微孢子虫。这个试剂盒可以同时检测隐孢子虫、毕氏肠微孢子虫和肠脑炎微孢子虫,提高了检测效率,操作简单,特异性也非常高,在临床样本检测中,毕氏肠微孢子虫检测的敏感性和特异性分别为 97.3%和 98.7%。不足的是,其他两种常见的人类微孢子虫尚不能检测。

西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室建立了一种检测家蚕微孢子虫的核酸侧向层析试纸条(NALFS),该试纸条具有特异性强、灵敏度高和操作简单的优点。核酸侧向层析试纸条法,是将核酸扩增技术和免疫层析试纸条结合的检测技术。利用核酸扩增技术在体外将核酸信号放大,结合免疫层析试纸条技术使结果更直观快速地呈现,提高检测灵敏度和检测效率。该方法的检测原理是,将引物上下游分别标记不同修饰基团,使扩增产物带有这两种修饰基团。在免疫层析试纸条的固相膜上喷上与这两种修饰基团特异性结合的配基,当扩增产物在试纸条的渗滤浓缩和毛细管作用下到达喷涂了配基的区域,配基与相应的修饰基团相结合后聚集,产生颜色变化,从而达到检测的目的^[38]。该实验室正在研究如何将这种方法应用到人类微孢子虫的检测中,成功开发了一种能够同时检测肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、毕氏肠微孢子虫和海伦脑炎微孢子虫的核酸侧向层析试纸条,并且已申请专利。后续的

临床实验正在开展,相信将对人类微孢子虫临床检测方法具有极大的推进作用。

5 小结

随着人类对微孢子虫认识和研究的逐步深入,免疫缺陷患者和移植受者等免疫力低下的人群中出现的不明原因持续性腹泻、炎症和血液系统性感染等,被证实有很多是由人类微孢子虫感染造成的。且微孢子虫具有传染性,许多微孢子虫都是人畜共患的,这使得微孢子虫成为人类新发疾病的病原微生物之一。因此,针对人类微孢子虫的临床检测和鉴定的研究具有重大意义。

在早期临床检测人类微孢子虫时,主要使用透射电镜来观察微孢子虫的超微结构特征。因为超微结构特征是微孢子虫鉴定和分类的主要依据之一,且通过透射电镜来观察微孢子虫孢子的不同发育时期是微孢子虫分类和鉴定的重要依据,所以透射电镜法是微孢子虫检测的金标准。同时使用苏 HE 染色、亚甲蓝染色、甲苯胺蓝染色法、Warthin-Starry 银染、革兰氏染色、吉姆萨染色等染色方法观察感染组织中的人类微孢子虫。后来 Weber Rainer 对三色染色法进行改良,使得微孢子虫在光学显微镜下更容易从其他杂质中被分辨出来。接着,研究者们还将荧光增白剂染色法和革兰氏铬变素染色法应用于人类微孢子虫染色。包括抗原检测和抗体检测的免疫学方法也被应用于检测中。

随着分子生物学的发展和对人类微孢子虫基因组研究的深入,基于微孢子虫 SSUrRNA 或 ITS 序列的 PCR 法逐渐在人类微孢子虫检测中占有一席之地。由于其检测具有快速、灵敏度高和特异性强的特点,受到越来越多研究者的关

注。市面上已有的人类微孢子虫检测试剂盒，正是基于微孢子虫 SSUrRNA 的编码 DNA 设计的引物，进行实时荧光定量检测人类微孢子虫。西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室建立的检测家蚕微孢子虫的核酸侧向层析试纸条，成功地将核酸侧向层析试纸条应用于家蚕微孢子虫的检测。该方法具有特异性强、灵敏度高和操作简单等特点，使得它非常适宜用于人类微孢子虫的临床检测。开发出检测效果更好、检测成本更低、检测时间更短的人类微孢子虫检测方法，并将其应用于临床检测中，将是研究者们关注的重点。

在鉴定新的人类微孢子虫种类的时候，透射电镜仍然作为“金标准”使用，结合分子生物学检测方法和免疫学检测方法，即对人类微孢子虫的基因组进行分析，和 IFA、Western blots 等方法结合最终鉴定出微孢子虫的种类。而在人类微孢子虫的临床检测中，多采用染色法和 PCR 法结合的方法来检测微孢子虫的存在。其中 HE 染色、革兰氏染色、吉姆萨染色和改良三色染色法在临床检测中得到较为广泛的应用，而亚甲蓝染色、甲苯胺蓝染色法、Warthin-Starry 银染则由于操作复杂、准确性较低而不常用。实验室则常用荧光增白剂对培养纯化的微孢子虫进行染色分辨。目前基于微孢子虫 SSUrRNA 或 ITS 序列的 PCR 法和快速检测方法以及 IFA、Western blots 等免疫学方法还在研究和发展的。建议在微孢子虫的临床检测中，使用染色和 PCR 法结合来进行检测。如果需要对微孢子虫的种类进行检测，则应使用透射电镜观察，对其基因组进行测序，并结合染色观察和 IFA、Western blots 等免疫学方法，以得到准确结果。

参考文献

- [1] Araniy F, Faisal, Abdullah A, Bokhari. *Microsporidium*. StatPearls, StatPearls Publishing, 2020.
- [2] Weiss LM, Becnel JJ. *Microsporidia: pathogens of opportunity*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2014.
- [3] Cali A, Weiss LM, Takvorian PM. A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Folia Parasitologica*, 2005, 52(1-2): 51–61.
- [4] Wang ZD, Liu Q, Liu HH, Li S, Zhang L, Zhao YK, Zhu X Q. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 2018, 11(1): 28.
- [5] Han B, Weiss LM. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(2): FUNK-0018-2016.
- [6] Pan GQ, Bao JL, Ma ZG, Song Y, Han B, Ran MS, Li CF, Zhou ZY. Invertebrate host responses to microsporidia infections. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 83: 104–113.
- [7] Ashton N, Wirasinha PA. Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea. *The British Journal of Ophthalmology*, 1973, 57(9): 669–674.
- [8] Pinnolis M, Egbert PR, Font RL, Winter FC. Nosematosis of the cornea: case report, including electron microscopic studies. *Archives of Ophthalmology*, 1981, 99(6): 1044–1047.
- [9] Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand - Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *The Journal of Protozoology*, 1985, 32(2): 250–254.
- [10] Li Y, Huang HP, Zhang XC, Cui YM, Deng R, Lin PQ. Current application of transmission electron microscope in biology. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2019, 39(12): 58–67. (in Chinese)
李叶, 黄华平, 张新春, 崔艳梅, 邓睿, 林培群. 浅析透射电子显微镜在生物学科中的应用. *热带农业科学*, 2019, 39(12): 58–67.

- [11] Davis RM, Font RL, Keisler MS, Shadduck JA. Corneal microsporidiosis: a case report including ultrastructural observations. *Ophthalmology*, 1990, 97(7): 953–957.
- [12] Wang YB, Liu JP. Research progress on the technology of microsporidian detection. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2009, 27(2): 161–166. (in Chinese) 王永宾, 刘吉平. 微孢子虫检测技术的研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(2): 161–166.
- [13] Field AS, Marriott DJ, Milliken ST, Brew BJ, Canning EU, Kench JG, Darveniza P, Harkness JL. Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(11): 2803–2811.
- [14] Kaushik S, Saha R, Das S, Ramachandran VG, Goel A. Pragmatic combination of available diagnostic tools for optimal detection of intestinal microsporidia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1057: 85–94.
- [15] Call A, Takvorian PM, Lewin S, Rendel M, Sian CS, Wittner M, Tanowitz HB, Keohane E, Weiss LM. *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998, 45(3): 240–251.
- [16] Yachnis AT, Berg J, Martinez-Salazar A, Bender BS, Diaz L, Rojiani AM, Eskin TA, Orenstein JM. Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *American Journal of Clinical Pathology*, 1996, 106(4): 535–543.
- [17] Curry A, Mudhar HS, Dewan S, Canning EU, Wagner BE. A case of bilateral microsporidial keratitis from bangladesh—infection by an insect parasite from the genus *Nosema*. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(9): 1250–1252.
- [18] Choudhary MM, Metcalfe MG, Arrambide K, Bern C, Visvesvara GS, Pieniazek NJ, Bandea RD, Deleon-Carnes M, Adem P, Choudhary MM, Zaki SR, Saeed MU. *Tubulinosema* sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(9): 1727–1730.
- [19] Peterson TS, Spitsbergen JM, Feist SW, Kent ML. Luna stain, an improved selective stain for detection of microsporidian spores in histologic sections. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 95(2): 175–180.
- [20] Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, Sodré F, Wallace S, Visvesvara GS. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1997, 121(8): 888–893.
- [21] Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW, Tio FO, Davis RM, Vossbrinck C, Millichamp N. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1991, 163(3): 617–621.
- [22] Deplazes P, Mathis A, Baumgartner R, Tanner I, Weber R. Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases*, 1996, 22(3): 557–559.
- [23] Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema ARJ, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, 1995, 110(3): 277–285.
- [24] Coyle CM, Weiss LM, Rhodes III LV, Cali A, Takvorian PM, Brown DF, Visvesvara GS, Xiao LH, Naktin J, Young E, Gareca M, Colasante G, Wittner M. Fatal myositis due to the microsporidian *Brachiola algerae*, a mosquito pathogen. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 351(1): 42–47.
- [25] Izquierdo F, Moura H, Bornay-Llinares FJ, Sriram R, Hurtado C, Magnet Á, Fenoy S, Visvesvara G, Del Aguila C. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Encephalitozoon intestinalis* and *Encephalitozoon* sp. spores and their developmental stages. *Parasites & Vectors*, 2017, 10(1): 560.
- [26] Malčková B, Halánová M, Sulínová Z, Molnár L, Ravaszová P, Adam J, Halán M, Valocký I, Baranovič M. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89(3): 358–361.
- [27] Fedorko DP, Hijazi YM. Application of molecular

- techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerging Infectious Diseases*, 1996, 2(3): 183–191.
- [28] Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarès CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 2001, 414(6862): 450–453.
- [29] Cui YJ. On the application progress of molecular diagnostic techniques in the pathogenic microorganism examination. *Journal of Tianshui Normal University*, 2017, 37(5): 24–29. (in Chinese)
崔玉娟. 分子诊断技术在病原微生物检测中的应用进展. *天水师范学院学报*, 2017, 37(5): 24–29.
- [30] Han B, Moretto M, Weiss LM. *Encephalitozoon*: tissue culture, cryopreservation, and murine infection. *Current Protocols in Microbiology*, 2019, 52(1): e72.
- [31] Tabatabaie F, Tafreshi ZA, Shahmohammad N, Pirestani M. Molecular detection of microsporidiosis in various samples of Iranian immunocompromised patients. *Journal of Parasitic Diseases*, 2015, 39(4): 634–638.
- [32] Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F. A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology & Infection*, 2019, 147: e100.
- [33] Huibers MHW, Moons P, Maseko N, Gushu MB, Iwajomo OH, Heyderman RS, Van Hensbroek MB, Brienens EA, Van Lieshout LM, Calis JCJ. Multiplex real-time PCR detection of intestinal protozoa in HIV-infected children in Malawi: *Enterocytozoon bienewisi* is common and associated with gastrointestinal complaints and may delay BMI (nutritional status) recovery. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2018, 37(9): 910–915.
- [34] Nur Su'aidah Nasarudin S, Zainudin NS, Bernadus M, Nawi AM, Hanafiah A, Osman E. Loop-mediated isothermal amplification for rapid molecular detection of *Enterocytozoon bienewisi* in faecal specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(11): 1329–1334.
- [35] Huang FC, Hsieh HY, Chang TC, Su SL, Tseng SL, Lai YH, Kuo MT. A DNA dot hybridization model for molecular diagnosis of parasitic keratitis. *Molecular Vision*, 2017, 23: 614–623.
- [36] Wang Z, Orlandi PA, Stenger DA. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(8): 4121–4128.
- [37] Morio F, Poirier P, Le Govic Y, Laude A, Valot S, Desoubreux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Leterrier M, Beser J, Lavergne RA, Le Pape P. Assessment of the first commercial multiplex PCR kit (ParaGENIE Crypto-Micro real-time PCR) for the detection of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienewisi*, and *Encephalitozoon intestinalis* from fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2019, 95(1): 34–37.
- [38] 倪琪. 家蚕微孢子虫核酸侧向层析试纸条检测方法的建立. 西南大学硕士学位论文, 2016.

Research progress in detection methods of human microsporidia

Biying Mo^{1,2}, Jialing Bao^{1,2*}, Zeyang Zhou^{1,2,3}

¹ State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Southwest University, Chongqing 400715, China

³ College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: Microsporidia is a type of obligate intracellular parasitic single-cell eukaryote. It is a fungal pathogen causing by microsporidiosis. More than 1500 microsporidians have been identified. Among them, 17 species in 9 genera can infect humans. Human microsporidia can infect the intestine, liver, lungs, brain and other parts, causing chronic diarrhea, hepatitis, keratitis, encephalitis and systemic infections. Exploration and development of rapid and efficient human microsporidia diagnostic methods are thus important for pathogenic microorganism detection. Conventional detection methods include transmission Hematoxylin-eosin stain (EM), Hematoxylin-eosin stain, Methylene blue, Giemsa, Gram stain, Weber's Chromotrope-based staining, Calcofluor White staining, microsporidian antigen, antibody detections, quantitative real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification and DNA dot hybridization model. The development of detection methods would greatly aid the research of microsporidia infection and control.

Keywords: human microsporidia, detection, molecular biology detection, staining microscopy, immunological methods

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B005) and by the National Natural Science Foundation of China (31802141)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251088; Fax: +86-23-68251128; E-mail: baojl@swu.edu.cn

Received: 7 May 2020; Revised: 28 September 2020; Published online: 21 October 2020