维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1992年第17卷第3期

隐孢子虫病实验与临床研究*

Ⅱ. 不同动物隐孢子虫感染观察

传染病寄生虫病研究所 陈雅棠 刘约翰 邹 凌
病理解剖教研室 沈际焜
电镜室 唐 宣

提 要 BALb/c小鼠66只、Wistar大鼠38只、豚鼠10只和家兔6只分别给予皮下注射醋酸可的松，每周2只。连续给药3周后开始用金胺—酚染色、改良耐酸染色和沙黄—美蓝染色法检查动物粪便中隐孢子虫卵囊。小鼠隐孢子虫卵囊阳性率为71.21%(47/66)；大鼠则为34.21%(13/38)。小鼠粪便中卵囊数量明显多于大鼠，小鼠粪便中隐孢子虫卵囊可分为大型囊(7.47μ×5.90μ)和小型囊(4.61μ×4.33μ)两种。豚鼠与家兔均未能检出隐孢子虫卵囊。小鼠口服或皮下注射地塞米松均未能诱发隐孢子虫感染。提示小鼠皮下注射醋酸可的松可能是一种较好的建立隐孢子虫感染动物模型的方法

关键词 隐孢子虫；免疫抑制；动物模型
中图分类号 R382.3 R332

免疫抑制病人常合并隐孢子虫感染，导致难治性严重腹泻，危及病人生命。免疫功能正常者隐孢子虫性腹泻颇为常见。该病目前尚无满意的药物治疗方法。此外，有关隐孢子虫生活史、形态分类及致病机理等仍有许多尚待阐明的问题。因而建立一种适合实验研究使用的隐孢子虫病动物模型是一个急待解决的课题。最近，我们观察了免疫抑制状态下的小鼠、大鼠、豚鼠、乳兔及新生小牛的隐孢子虫感染情况，进行初步比较。现将结果报告如下。

材料与方法

1. 实验动物

BALb/c小鼠66只，雌雄各半，体重18—25g，皮下注射醋酸可的松35mg/hg/次，每周2次。

Wistar大鼠38只，雌雄各半，体重250～320g，

*国家教委青年教师研究基金资助项目

THE CHANGE OF NA^+-K^+-ATPase ACTIVITY IN ERYTHROCYTES FROM NIDDM PATIENTS

Deng Huacong, et al

Department of Internal Medicine, The First Hospitanl

Na^+-K^+-ATPase activity of the erythrocyte plasma membrane in noninsulin-de-

(下转178页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

皮下注射醋酸可的松25mg/只/次，每周2次。

豚鼠10只，雌雄各半，体重350～450g。皮下注射醋酸可的松40mg/只/次，每周2次。

乳兔3只，20天龄，均为雄性，体重250～300g。皮下注射醋酸可的松25mg/只/次，每周2次。成年家兔3只，均为雌性，皮下注射醋酸可的松75mg/只/次，每周2次。

另取BALb/c小鼠50只，雌雄各半，体重18～25g。皮下注射地塞米松0.4mg/只/次，每周2次。同时在饮水内加入地塞米松（2mg/L）及四环素（1g/L）。BALb/c大鼠30只，均为雄性，体重同前，不注射地塞米松，仅在饮水内加入地塞米松（2mg/L）。以上2组小鼠均连续给药12周后开始粪便检查隐孢子虫卵囊。

实验过程中设BALb/c小鼠5只，Wistar大鼠5只，在相同条件下饲养，但不给任何免疫抑制药物，为免疫功能正常对照组。

以上各组动物均由本校实验动物中心提供。用药前观察动物一般状况（毛色、活动、摄食、呼吸与大便等）5～7天，并逐一检查粪便中隐孢子虫卵囊，均未见异常，给药后继续并于用药3周时开始粪检查找隐孢子虫卵囊，同时记录动物一般状况及体重变化。

新生小牛（出生1月内）粪便100份，取自重庆市近郊奶牛场及个体户奶牛场。按相同方法（详下）检查隐孢子虫卵囊。

2. 隐孢子虫卵囊染色方法[1,2]

取粪便标本少许，在滴有生理盐水的载玻片上涂成中厚涂片（稀便者可直接涂片）。空气干燥，甲醇固定10min，水洗干燥后进行以下染色检查。

（1） 金胺—酚染色法（auramine-phenol staining）

涂片滴加0.1%金胺—酚染液，15min后水洗。滴加3%盐酸1min后水洗。滴加0.5%高锰酸钾1min后水洗。空气干燥，荧光显微镜下观察。

（2） 改良耐酸染色法（modified fast-acid staining）

涂片滴加石碳酸复红染液，室温下染色10～20min后水洗。用10%硫酸脱色至红色基本褪尽后水洗。再滴加0.2%孔雀绿复染30sec，水洗空气干燥。油镜下观察。

（3） 沙黄-兰蓝染色法（safranin-methylene blue staining）

涂片滴加3%盐酸甲醇5min后水洗，滴加1%沙黄染液，置微火上加热至出现蒸气后2min，冷却后水洗。滴加美蓝复染30sec，水洗并空气干燥。油镜下观察。

结　果

1. 免疫抑制动物一般状况

接受醋酸可的松注射后，小鼠及大鼠全身反应较为明显。普遍出现精神萎靡少动，反应迟钝，摄食减少，体毛稀松呈斑块状脱落、毛色光泽消失。上述反应尤以小鼠为重。用药后2周末小鼠开始死亡，4周末大鼠亦陆续死亡。死亡动物明显消瘦，少数动物有稀便及呼吸困难。

用药后豚鼠反应轻微。除1只出现体毛斑块状脱落外，其他一般状况均无明显改变。用药22、28和30周时各死亡1只。其余7只长期存活，体重并有所增加。

乳兔用药5周后出现稀便、萎靡、活动减少、进食量锐减。6周内3只动物相继死亡。成年家兔在用药11、15周时各有1只因进食明显减少消瘦而死亡。另1只则无明显变化并继续存活至20周。

2. 不同实验动物隐孢子虫感染情况

小鼠与大鼠自用药后2周和4周后开始陆续剖杀（病死动物亦同样剖检）。取盲肠内粪便直接涂片。同时作金胺-酚、改良耐酸及沙黄-美蓝3种染色，检查隐孢子虫卵囊。每张涂片均经2人分别检查。以2人检查结果中2种或3种方法同时阳性者判为阳性。小鼠与大鼠隐孢子虫感染阳性率见表1。小鼠卵囊阳性率为71.21%(47/66)，明显高于大鼠卵囊阳性率34.21%(13/38)。小鼠卵囊从用药后4周阳性率开始升高，但大鼠则晚至用药后10周。小鼠粪便中卵囊数量亦明显多于大鼠。

在小鼠粪便中，可查找到2种大小不同的卵囊。分别测量各100个卵囊的长、短径，其均值依次为：小型囊长径4.605μm（4～

（页码另计）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 小鼠与大鼠皮下注射醋酸可的松诱发隐孢子虫感染粪检卵囊结果

实验动物		用药时间（周）													合计*
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	
BALb/c小鼠	检查数	3	11	3	17	21	8	2	1						66
	阳性数	2	6	3	11	15	7	2	1						47(71.21)
Wistar大鼠	检查数			8			9	8		1	6	3	2	1	38
	阳性数			1			1	0		1	5	3	2	0	13(34.21)

*括弧内数字为阳性率(%)

5.5，SD=0.4622），短径4.330μm(3.5～5.5，SD=0.4507)。大型囊长径7.470μm(5～9，SD=0.9583)，短径5.900μm(4～7，SD=0.6927)。故小型囊长短径相近，卵囊呈圆形。而大型囊则长径大于短径，卵囊呈椭圆形。

豚鼠10只，连续粪检至用药28周，均未能检出隐孢子虫卵囊。

乳兔3只，用药6周内相继死亡。粪检均无隐孢子虫卵囊发现。成年家兔3只，用药11，13周各死亡1只，另1只在用药20周时剖杀。粪检亦未能发现卵囊。

3. 不同用药方法小鼠隐孢子虫感染

口服地塞米松的BALb/c小鼠30只，连续用药12周，粪检均未能检出隐孢子虫卵囊。皮下注射同时口服地塞米松的BALb/c小鼠30只，在用药后12周开始粪检直至16周时亦未能发现隐孢子虫卵囊。

4. 新生小牛隐孢子虫自然感染情况

在100份重庆近郊奶牛场新生小牛粪便中，5份发现少量隐孢子虫卵囊，阳性率为5%。在5份阳性便中，3份为成型便，2份为稀软便。但在成型便与稀软便中，卵囊形态及数量无明显差异。

讨 论

国内隐孢子虫病发病率目前仍无确切资料。除临床医生对本病缺乏认识外，缺少准确可靠的病原学检查方法也是重要原因之一。国内韩范等推荐使用金胺-酚染色法和改良耐酸染色法检查粪便中隐孢子虫卵囊，在卵囊数量较多时已证明有重要价值[1]。但当卵囊数量较少时仍需对粪便标本浓集处理，手续繁琐。国外最近几年提出用单克隆抗体间接荧光试验检查粪便中隐孢子虫卵囊。[3,4]但需大量纯净卵囊作免疫抗原。由于目前隐孢子虫体外培养技术尚未成功，故必须依赖动物模型以获取大量虫体。本文目的即旨在建立一种能较为稳定地排出卵囊的隐孢子虫感染动物模型，以供进一步研究使用。

Current最近指出，不同实验室常用动物如小鼠、大鼠、豚鼠对隐孢子虫感染的抵抗力有明显差异[5]。我们的结果也表明，在国内目前常用的4种实验室动物中，小鼠与大鼠均可以通过持续皮下注射醋酸可的松抑制动物免疫功能的方法诱发隐孢子虫感染。用药后4周与10周，在小鼠和大鼠粪便中分别检出卵囊。但在豚鼠与家兔中则始终未能成功地诱发隐孢子虫感染。Iseki等将家鼠粪便分离出的鼠隐孢子虫(Cryptosporidium muris，RN66)卵囊经口接种于小鼠、豚鼠、家兔、狗和猫等5种动物，结果发现小鼠与猫对隐孢子虫高度敏感，而豚鼠、家兔和狗则不敏感[6]。Brasseur等也采用皮下注射醋酸可的松8周后再经口接种隐孢子

维普资讯 http://www.cqvip.com

虫卵囊的方法，在Sprague-Dawley大鼠成功地建立了人隐孢子虫感染，认为可作为筛选治疗药物使用[7]。本文结果与Iseki及Brasseur的结果相似。小鼠卵囊阳性率高于大鼠，排出的卵囊数量也多于大鼠，但小鼠死亡率也明显为高。因此，如何调整醋酸可的松用量，使之既维持动物长期排出卵囊又可存活仍是继续研究内容之一。

本组隐孢子虫感染小鼠粪便中可见2种大小不同的卵囊。小型囊大小为4.605×4.330μm，几近圆形；大型囊则为7.470×5.900μm，呈椭圆形。Iseki曾报告从自然感染隐孢子虫的家鼠粪便中分离出两种隐孢子虫卵囊。其中小型囊为5.3×4.8μm；大型囊为8.4×6.3μm[9]。Tyzzer及Upton分别认为大型囊为鼠隐孢子虫（Cryptosporidium muris）卵囊，小型囊为微小隐孢子虫（Cryptosporidium parvum）卵囊。本文2种卵囊大小接近于Iseki的数据，提示可能分属微小隐孢子虫和鼠隐孢子虫。该两种卵囊可共存于同一小鼠粪便之中，但小型囊数量常多于大型囊。是否在实验诱发感染情况下，小鼠以微小隐孢子虫感染为主尚待进一步研究。

我们注意到，实验诱发的小鼠或大鼠隐孢子虫感染与自然感染的人或小牛隐孢子虫病有一个比较明显区别，即前者发生稀便罕见。本组47只隐孢子虫卵囊阳性和13只卵囊阳性的小鼠或大鼠中，无1例呈稀便。Wagner在其工作中也注意到，15只实验诱发的小鼠隐孢子虫感染均无稀便[8]。Sherwood等也曾报告类似结果[10]，其原因可能与宿主动物种属有关。

参 考 文 献

[1] 韩范，等．中国寄生虫病防治杂志 1990；3(3)：252

[2] 陈雅棠，等．中国寄生虫病防治杂志 1991，4(3)：198

[3] Rusnak J, et al. J Clin Microbiol 1989;27(5):1135

[4] Arrowood MJ,et al.J Clin Microbiol 1989;27(7):1490

[5] Current W,et al.Clin Microbiol Rev 1991;4(3):325

[6] Iseki M, et al. Parasitol Res 1989; 75:218

[7] Brasseur P, et al. J Clin Microbiol 1988; 26(5):1037

[8] Wagner ED, et al. Jpn J Parasitol 1986; 35(4):273

[9] Iseki M, et al. Jpn J Parasitol 1986; 35(6):521

[10] Sherwood D,et al.Intect Immun 1982; 38:471

（收稿日期 1991-08-02）

EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDY ON CRYPTOSPORIDIOSIS II. CRYPTOSPORIDIUM IN DIFFERENT IMMUNOSUPPRESSIVE ANIMALS

Chen Yatang, et al

Research Institute of Infectious and Parasitic Diseases

66 BALb/c mice,38 Wistar rats,10 guinea-pigs and 6 rabbits were injected by hydrocortisone acetate subcutaneously twice a week, respectively. Their feces were examined for Cryptosporidium oocysts by auramine-phenol stain,modified fast-acid stain and safranin-methylene stain simultaneously.

The Cryptosporidium oocyst positive rate in the immunosuppressive mice was 71.21%(47/66), but in the immunosuppressive rats the positive rate was 34.21%(13/