

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 487—2016

隐孢子虫病的诊断

Diagnosis of cryptosporidiosis

2016-05-20 发布

2016-10-15 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、河南农业大学、华东理工大学。

本标准主要起草人：曹建平、沈玉娟、官亚宜、张龙现、冯耀宇、尹建海、姜岩岩、郑彬。

隐孢子虫病的诊断

1 范围

本标准规定了隐孢子虫病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗机构和疾病预防控制机构对隐孢子虫病的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

隐孢子虫 *cryptosporidium spp*

一类人兽共患寄生原虫,隶属于隐孢子虫属(*Cryptosporidium*),主要寄生于人和动物肠上皮细胞,可引起隐孢子虫病。参见附录 A。

2.2

隐孢子虫感染 *cryptosporidium infection*

人体因摄入被隐孢子虫卵囊污染的饮水、食物和娱乐用水,或与宠物、家畜等动物和野生动物等密切接触而感染。摄入卵囊经裂殖子、滋养体、配子体等阶段,最后卵囊随粪便排出体外具感染性。参见附录 A。

2.3

隐孢子虫病 *cryptosporidiosis*

由隐孢子虫属(*Cryptosporidium*)中的微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)和人隐孢子虫(*Cryptosporidium hominis*)等寄生于人体小肠黏膜上皮细胞内引起的一种寄生虫病。主要临床表现为自限性腹泻,免疫功能低下者尤为严重。参见附录 A。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

近期与隐孢子虫病患者或感染隐孢子虫的猪、牛和羊等动物有接触史,或有饮用、摄入被隐孢子虫卵囊污染的水或食物等暴露史,参见附录 B。

3.2 临床表现

该病潜伏期为 2 d~28 d,一般为 7 d~10 d。典型的临床症状为急性水样或糊样腹泻,一般无脓血便,日排便 2~20 余次。免疫功能缺陷的病人,腹泻程度严重,常表现为持续性霍乱样水泻,一日数次至数十次。严重感染的幼儿可出现喷射性水样腹泻。腹痛、腹胀、恶心、呕吐、口渴、发热、食欲减退或厌食亦较常见。病程一般持续 7 d~14 d,或长至 20 d~2 个月,由急性转为慢性而反复发作常见。肠外器官感染者可表现为与相应器官病变相关的症状与体征,参见附录 C。

3.3 实验室检查

3.3.1 病原学检查

显微镜镜检粪便涂片查见隐孢子虫卵囊,见附录 D。

3.3.2 免疫学检查

粪便隐孢子虫抗原检查呈阳性,见附录 D。

3.3.3 分子生物学检测

粪便核酸 PCR 扩增出特异性目的片段,见附录 D。

4 诊断原则

根据流行病学史、临床表现及实验室检查结果等内容予以诊断。

5 诊断

5.1 隐孢子虫感染

无明显临床表现,且符合 3.3.1、3.3.2、3.3.3 中任一条。

5.2 隐孢子虫病

5.2.1 疑似病例

同时符合 3.1 和 3.2。

5.2.2 临床诊断病例

符合 3.2 并同时符合 3.3.2、3.3.3 中任一条。

5.2.3 确诊病例

同时符合 3.2 和 3.3.1。

6 鉴别诊断

应与以腹泻为主要临床症状的其他疾病,如阿米巴痢疾、贾第虫病、微孢子虫病、环孢子虫病、等孢球虫病、细菌性痢疾、霍乱和轮状病毒腹泻等疾病进行鉴别,参见附录 E。

附录 A

(资料性附录)

病原学

A.1 概述

隐孢子虫病是隐孢子虫感染引起的以腹泻为主要临床表现的一种人兽共患传染病,属新发传染病,被世界卫生组织(WHO)列为世界六大腹泻病之一。自1976年在美国首次发现人体感染隐孢子虫病例以来,目前该病已遍及除南极洲外的90多个国家,300多个地区。发达国家隐孢子虫阳性率为0.6%~20%,发展中国家为4%~32%,AIDS患者和儿童感染率为3%~50%。中国于1987年在南京首次报道2例人体感染病例,此后陆续在江苏、安徽、山东、湖南、云南、黑龙江、河南、上海等省(直辖市、自治区)均有隐孢子虫感染的报道,感染率为1.33%~13.49%。

A.2 形态

卵囊呈圆形或椭圆形,直径约4 μm ~6 μm 。成熟的卵囊囊壁光滑,透明,内含4个子孢子和一个结晶状残余体,子孢子为月牙形,大小为1.5 μm ×0.8 μm 。不同隐孢子虫形态相似,大小略有差异,形态学方法难以鉴定虫种。多数虫种寄生于小肠,呈圆形,相对较小;少数寄生于胃呈椭圆形,相对较大。

A.3 生活史

隐孢子虫在同一宿主体内完成生活史,不需要中间宿主。生活史包括无性生殖(裂体增殖和孢子增殖)和有性生殖(配子生殖)两个阶段,成熟卵囊为感染阶段。人摄入卵囊后,在消化液的作用下卵囊内子孢子逸出,附着并侵入肠上皮细胞的微绒毛区(刷状缘层内),形成纳虫泡,虫体在纳虫泡内进行裂体增殖,发育为滋养体,经3次核分裂发育为I型裂殖体。成熟的I型裂殖体含有6个或8个裂殖子;裂殖子被释出后侵入其他上皮细胞,发育为第二代滋养体。第二代滋养体经两次核分裂发育为II型裂殖体;成熟的II型裂殖体含4个裂殖子。裂殖子释出并侵入细胞后发育为雌配子体或雄配子体,进入有性生殖阶段。雌配子体进一步发育为雌配子,雄配子体产生16个雄配子,雌雄配子结合形成合子,合子发育为卵囊,进入孢子增殖阶段。卵囊有薄壁和厚壁两种。薄壁卵囊约占20%,仅有一层单位膜,其子孢子可在肠道内逸出直接侵入宿主肠上皮细胞,造成宿主自身体内重复感染;厚壁卵囊约占80%,在宿主细胞或肠腔内孢子化,随宿主粪便排出,即具感染性。从宿主感染到排出卵囊整个生活史因感染隐孢子虫虫种、感染度、宿主及宿主免疫状态等而各异,一般为5 d~11 d。

附 录 B
(资料性附录)
流 行 病 学

B.1 传染源

隐孢子虫病患者、隐孢子虫感染者以及隐孢子虫感染的动物是主要传染源。

B.2 传播途径

隐孢子虫病主要经水和食物等途径传播,粪-口途径是主要的传播方式。水源污染是引起隐孢子虫病暴发流行的主要原因,人主要因摄入被隐孢子虫卵囊污染的饮水、食物和娱乐用水(如游泳池水、喷泉等),或与宠物(如犬、猫、鸟类等)、家畜(如猪、牛、羊)等动物,尤其是幼畜和野生动物等密切接触而感染。

B.3 易感人群

人对隐孢子虫普遍易感,尤其婴幼儿、免疫功能受损者(如长期使用免疫抑制剂者、抗肿瘤药物治疗者)和免疫功能低下者(如 HIV/AIDS、各种引起免疫功能下降的基础疾病等)。

B.4 地区分布

呈全球性分布,中国各省(直辖市、自治区)均发现有隐孢子虫感染者。农村多于城市,沿海港口多于内地;经济落后、卫生状况差的地区多于发达地区;畜牧区多于非牧区。

B.5 季节分布

通常全年都有发病,温暖潮湿季节发病率较高。

B.6 年龄、性别分布

各年龄组均有发病,一般年龄越小,感染率和发病率越高,且症状越严重,死亡率也越高,多见于2岁以下的婴幼儿。免疫功能受损或低下者症状也较严重。男女间无明显差异。

附录 C

(资料性附录)

临床表现

C.1 潜伏期

本病潜伏期为 2 d~28 d,多数为 7 d~10 d。

C.2 急性期

隐孢子虫病临床症状的严重程度与病程取决于宿主的免疫状态和营养状况。免疫功能正常者症状较轻,主要为急性自限性水样腹泻,一般无脓血,日排便 2~20 余次;具自限性,病程通常 7 d~14 d,最短 1 d~2 d。免疫功能缺陷患者,腹泻程度严重,常表现为霍乱样水泻。重症幼儿为喷射性水样腹泻,排便量多。腹痛、腹胀、恶心、呕吐、食欲减退或厌食、口渴和发热亦较常见。

C.3 慢性期

20 d~60 d 者占多数,长者数年。免疫功能异常的感染者症状明显且病情重,持续性霍乱样水泻最为常见,一日数次至数十次;每日水泻便量常见为 3 L~6 L,最多可达 17 L;导致水、电解质紊乱和酸中毒。免疫功能缺损者尤其是 HIV/AIDS 患者,隐孢子虫感染后可导致广泛播散,并发胆道、胰管或呼吸道等肠外器官隐孢子虫病,表现为胆囊炎、胆管炎、胰腺炎和肺炎;当症状消失后数周内仍有卵囊随粪便排出。儿童营养不良以及某些病毒性感染,如麻疹、水痘和巨细胞病毒感染,也会因暂时的免疫功能异常而并发隐孢子虫病,引起严重的慢性腹泻。

C.4 并发症

水电解质紊乱,其他病原体混合感染。部分有腹部痉挛性疼痛、恶心、呕吐、厌食、发热和全身不适等。

附录 D
(规范性附录)
实验室检查

D.1 病原学检查

D.1.1 粪便涂片制备

制备中等厚度粪便涂片,以覆在报纸上时可透过涂片看到字为宜。

将粪便在玻片上涂成直径约为 1.5 cm 大小的圆形或椭圆形粪便涂片,待自然干燥后,用无水甲醇固定 3 min~5 min。

D.1.2 改良抗酸染色法

D.1.2.1 试剂

D.1.2.1.1 苯酚复红染色液

碱性复红 4.0 g,95%酒精 20 mL,苯酚 8 mL,蒸馏水 100 mL。

将碱性复红溶于 95%酒精,在磁力搅拌器上混合直至全部溶解。缓慢添加入苯酚直至混合均匀,蒸馏水定容至 100 mL。用滤纸过滤除去碎渣并贮存于棕色试剂瓶中,室温贮藏。

D.1.2.1.2 硫酸溶液

纯硫酸 10 mL,蒸馏水 90 mL(边搅拌边将硫酸徐徐倾入水中)。转移到棕色试剂瓶中,室温贮藏。

D.1.2.1.3 孔雀绿染色液

孔雀绿原液:孔雀绿 2.0 g,蒸馏水 100 mL,混匀。过滤到棕色试剂瓶中,室温贮藏。

1:10 孔雀绿染色液:孔雀绿 1 mL,蒸馏水 9 mL。

D.1.2.2 染色

滴加苯酚复红染色液于固定的粪膜上,染色 2 min~10 min,自来水漂洗;再滴加 10%硫酸溶液至涂片呈粉红色为止(脱色 1 min~10 min),自来水漂洗;滴加孔雀绿染色液染色 1 min~2 min,自来水漂洗,晾干。

D.1.2.3 显微镜观察

用光学显微镜油镜下检查。背景为蓝绿色,隐孢子虫卵囊为玫瑰红色,呈圆形或椭圆形,直径 4 μm ~6 μm ;子孢子(4 个)颜色较深,呈月牙形。视观察角度不同,卵囊内子孢子排列不规则,呈多态性,残余体为暗红色颗粒。

粪便标本存在非特异的抗酸红色颗粒,大小不等,染色均匀一致,不发亮,无结构,应注意鉴别。

D.1.3 金胺-酚染色法

D.1.3.1 试剂

D.1.3.1.1 金胺-酚染色液

金胺 0.1 g,苯酚 5.0 g,蒸馏水定容至 100 mL。

用蒸馏水溶解苯酚,缓慢加入金胺,用滤纸过滤到棕色试剂瓶中,室温贮藏。

D.1.3.1.2 盐酸酒精溶液

浓盐酸 3 mL,95%酒精 97 mL。

谨慎加盐酸到 95%酒精中并混合。转移到棕色瓶中,室温贮藏。

D.1.3.1.3 高锰酸钾溶液

高锰酸钾 0.5 g,蒸馏水定容至 100 mL。

将高锰酸钾加入到蒸馏水中并用磁力搅拌器混合。过滤到棕色试剂瓶中,室温贮藏。

D.1.3.2 染色

滴加金胺-酚染色液于晾干的粪膜上,染色 10 min~15 min,自来水漂洗;滴加盐酸酒精,脱色 1 min 后水洗;滴加高锰酸钾溶液,染色 1 min 后水洗,晾干,置荧光显微镜下观察。

D.1.3.3 荧光显微镜观察

染色后的隐孢子虫卵囊在低倍荧光显微镜下,可见一圆形小亮点,呈现乳白色荧光;高倍镜下隐孢子虫卵囊呈乳白色或略带绿色荧光,在暗背景下显示出特征性明亮的苹果绿色荧光。卵囊壁薄,多数卵囊周围深染,中央色淡,呈环状,或深染结构偏位,有些卵囊全部为深染。卵囊多时似繁星。

D.1.4 金胺酚——改良抗酸染色法

D.1.4.1 试剂

试剂同 D.1.2.1 和 D.1.3.1。

D.1.4.2 染色方法

先进行金胺-酚染色后,再用改良抗酸染色法复染。

D.1.4.3 荧光显微镜观察

复染后卵囊同抗酸染色法所见,但非特异性颗粒被染成蓝黑色,极易鉴别。

D.2 免疫学检查

采用基于单克隆抗体的快速免疫层析检测试条或者间接荧光抗体试验。前者检测粪便样本中隐孢子虫抗原,快捷简便,易操作;后者检测卵囊,需在荧光显微镜下观察。

采集粪便样本,按商品化试剂盒产品说明书要求操作和在规定时间内判读结果。

D.3 核酸检测

D.3.1 核酸提取

新鲜粪便样本或-20℃保存样本,均可直接用于核酸提取;如贮存在 2.5% 高锰酸钾溶液中的卵囊阳性粪便样本,核酸提取之前用去离子水洗涤除去残留的高锰酸钾,3 000 g 离心 10 min,重复 3 次,去上清并用去离子水重悬沉淀物。核酸提取采用粪样或土壤中微生物的核酸提取试剂盒,并按试剂盒说明书要求操作,-20℃保存,作为聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)DNA 模板。

D.3.2 核酸检测

D.3.2.1 PCR

D.3.2.1.1 引物序列

采用隐孢子虫 18S rRNA 基因,引物序列为:

——正向引物 1:5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3';

——反向引物 1:5'-CCCATTCCTTCGAAACAGGA-3';

——正向引物 2:5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3';

——反向引物 2:5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'。

D.3.2.1.2 PCR 体系

Taq 酶 PCR 预混液(2×)12.5 μL ,正向引物(10 mmol/L)和反向引物(10 mmol/L)各 1 μL ,DNA 模板 1 μL ,无菌去离子水 9.5 μL ,共 25 μL 。

D.3.2.2 巢式 PCR 扩增

D.3.2.2.1 加样

按照上述 PCR 反应体系,依次加入各个成分混合后瞬时离心,上机,进行两轮巢式 PCR 反应。第一轮设立阳性对照、阴性对照和空白对照,使用正、反向引物 1;第二轮增设一个空白对照,使用正、反向引物 2。第二轮 PCR 扩增重新换一个 PCR 管,模板为第一轮 PCR 扩增产物,PCR 条件同第一轮 PCR。

D.3.2.2.2 PCR 条件

预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 35 循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D.3.2.3 电泳检测

2%琼脂糖电泳凝胶检测,取第二轮巢式 PCR 扩增产物 5 μL 加样,100 bp DNA 标志物。紫外线或凝胶电泳成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。

D.3.2.4 结果判读

PCR 扩增目的片段大小约 830 bp。阴性对照和空白对照未出现目的片段,阳性对照出现目的片段,若待测样本出现目的片段为“隐孢子虫核酸检测阳性”,否则为“隐孢子虫核酸检测阴性”。

附录 E

(资料性附录)

鉴别诊断

E.1 阿米巴痢疾

由溶组织内阿米巴感染引起。潜伏期长短不一,自1周至数月不等。起病往往缓慢,以腹痛、腹泻开始,排便次数逐渐增加,一般每日数次,严重时达10次~15次,甚至20次以上,便后有里急后重感。典型的阿米巴痢疾粪便为酱红色粘液样,有特殊的腥臭味,镜检可见粘液中含较多凝集成团的红细胞和较少的白细胞,有夏科-雷登结晶。粪便生理盐水直接涂片可查见滋养体;碘液染色可查见包囊,圆形,直径 $10\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ 。

E.2 贾第虫病

由蓝氏贾第鞭毛虫感染引起,流行世界各地。由于旅游业的发展,在旅游者中发病率较高。潜伏期多在2w左右,有时可达数月不等。急性期典型症状为暴发性腹泻,水样腹泻并有恶臭,可有少量黏液,但多无脓血。患者常伴有恶心、呕吐、腹胀、暖气。腹痛常见,多在中上腹,绞痛。部分患者有低热、发冷、头痛、乏力、食欲减退等全身症状。若未及时治疗可发展为慢性。寄生胆道可发生胆囊炎、胆管炎或累及肝脏肿大、阑尾炎等。粪便生理盐水涂片可查见贾第虫滋养体;碘液染色可查见包囊,椭圆形,大小为 $(8\sim 14)\ \mu\text{m}\times(7\sim 10)\ \mu\text{m}$ 。

E.3 微孢子虫病

由毕氏微孢子虫感染引起,起病缓慢。症状因感染部位而异。肠道微孢子虫病主要症状为消瘦及慢性间歇性水样腹泻,无黏液、脓血,每天4次~8次。部分患者可伴有恶心、食欲减退和腹部痉挛等。粪便直接涂片用改良三色液染色,孢子壁呈鲜樱红色或粉红色,大小为 $(3\sim 5)\ \mu\text{m}\times(4\sim 8)\ \mu\text{m}$ 。

E.4 环孢子虫病

由环孢子虫感染引起,腹泻等症状与隐孢子虫病相似。粪便标本经改良抗酸染色后,环孢子虫卵囊大小为 $8\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$,圆盘形,粉红色,内部结构不清楚,隐约可见玫瑰红色团块。

E.5 等孢子虫病

由等孢子球虫感染引起。主要症状为水样腹泻,可由发热,不适和腹痛突然起病,常伴有恶心、呕吐、食欲减退等消化道症状,多为持续性腹泻。粪便标本经改良抗酸染色,卵囊长椭圆形,深红色或玫瑰红色,长 $10\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m}$,宽 $10\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m}$,前段较窄,似短瓶颈状,含颗粒状合子或两个孢子囊。

E.6 细菌性痢疾(菌痢)

由志贺菌属感染引起。常年散发,夏秋多见,是我国的常见病、多发病。该病抗菌药治疗,治愈率

高。潜伏期一般为 1 d~3 d(数小时至 7 d),临床表现主要有发冷、发热(39 ℃以上)、腹痛、腹泻、里急后重、排黏液脓血便。本病发病急,进展迅猛,且易并发休克。重型菌痢起病更急,有高热,每日排便次数可达 20 次~30 次,粪便呈脓血样,量少,无臭味。腹痛剧烈,里急后重更严重。粪便镜检有大量脓细胞、红细胞与巨噬细胞。粪便培养可检出志贺菌。婴幼儿中毒型菌痢或不典型菌痢应通过病原学诊断鉴别。

E.7 霍乱

霍乱由霍乱弧菌感染引起。病发高峰期在夏季,能在数小时内造成腹泻脱水甚至死亡。该病潜伏期短者数小时,长者 3 d~6 d,一般为 1 d~3 d。典型患者由于剧烈的腹泻和呕吐,可引起脱水、肌肉痉挛,严重者导致外周循环衰竭和急性肾衰竭。粪便检查可见黏液和少许红细胞、白细胞,涂片染色革兰阴性弯曲弧菌。

E.8 轮状病毒腹泻

由轮状病毒感染引起。潜伏期 1 d~3 d。普通轮状病毒主要侵犯婴幼儿,而成人轮状病毒腹泻则可引起青壮年胃肠炎的暴发流行,多无发热或仅有低热,以腹泻、腹痛、腹胀为主要症状。粪便镜检大多无特殊发现,少数可见少量白细胞。取粪便作直接或免疫电镜检查发现轮状病毒颗粒、酶联免疫吸附试验检测粪病毒抗原或患者血清特异性 IgM 抗体、粪病毒 RNA 电泳等方法有助于本病诊断。

参 考 文 献

- [1] 吴观陵.人体寄生虫学.4版.北京:人民卫生出版社,2013:182-188
- [2] 白功懋.医学寄生虫学与寄生虫检验.1版.北京:中国医药科技出版社,1994:180-181
- [3] 朱欣平,苏川.人体寄生虫学.8版.北京:人民卫生出版社,2013:71-75
- [4] Casemore DP.Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis.Broadsheet 128.J Clin Pathol 1991,44: 445-451
- [5] OIE (Office International des Epizooties).Cryptosporidiosis.In Manual of Standards for Laboratory Tests and Vaccines.5th edition,Paris,2004.online edition available at,http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm
- [6] Ryan U,Fayer R,Xiao L.*Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs.Parasitology.2014,11:1-19
- [7] Xiao LH,Fayer R.*Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis.2nd edition,CRC Press,2007
-