

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.05.002

# 我国西南城市地区人芽囊原虫的流行病学特征

张顺先, 田利光, 卢 艳, 李兰花, 陈家旭, 周晓农

**摘要:**目的 了解我国城市地区人芽囊原虫的流行病学特征和基因型分布, 为人芽囊原虫的防治提供科学参考依据。方法 在云南省昆明市 4 家哨点医院收集腹泻病例粪便样本 1 121 份, 非腹泻人群粪便样本 319 份, 使用结构化问卷收集研究对象基本信息, 提取粪便基因组并采用 PCR 方法进行检查, 对可疑阳性 PCR 产物进行测序, 通过序列比对进行确诊, 并通过进化树构建进行基因分型。结果 人芽囊原虫在全年龄组腹泻病例中检出率为 4.2%; 在女性腹泻人群中的检出率高于男性腹泻人群中的检出率(5.5%, 2.9%;  $P=0.027$ ,  $OR=1.98$ , 95% $CI=1.07-3.67$ ); 在不同年龄组腹泻人群中, 人芽囊原虫的检出率没有差异( $\chi^2=3.933$ ,  $P=0.950$ ); 但具有明显季节分布特征( $\chi^2=11.8$ ,  $P<0.05$ ); 人芽囊原虫的检出率在城区、农村以及城乡结合部的腹泻人群中没有差异( $\chi^2=2.427$ ,  $P=0.297$ )。在腹泻人群和非腹泻人群中, 人芽囊原虫 I 型基因型都占绝对优势。结论 人芽囊原虫依旧是西南城市地区感染人群的常见肠道寄生虫之一, 感染主要以 I 型基因型为主, 其致病性和基因型分布需持续研究和探索。

**关键词:**人芽囊原虫; 基因型; 腹泻病例; 非腹泻研究对象

中图分类号: R382 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2016)05-424-05

## Epidemiological characteristics of *Blastocystis hominis* in urban region, southwestern China

ZHANG Shun-xian, TIAN Li-guang, LU Yan, LI Lan-hua, CHEN Jia-xu, ZHOU Xiao-nong

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention;  
Key Laboratory for Parasitology and Vector Biology, MOH of China;  
WHO Collaborating Center for Tropical Diseases, National Center for International  
Research on Tropical Diseases, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** We investigated the epidemiological characteristics and the genotype distribution of *Blastocystis hominis* in urban region of southwest China, and the study may provide scientific references for the prevention and treatment of *Blastocystis hominis*. A total of 1 121 diarrhea patients and 319 healthy controls were selected from four sentinel hospitals in Kunming of southwest China from June 2014 to July 2015. The stool specimens were collected to detect the *Blastocystis hominis* with PCR. A structured questionnaire was applied to each diarrhea case and healthy control after stool samples collection for their clinical manifestation (e. g. vomiting, fever and dehydration), demographic data (age, sex and residence) and types of the stool samples (watery, mucoid, or bloody and other forms); the phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method with 1 000 bootstrap replicates; reference strains were downloaded from the GenBank. Results showed that the detection rate of *Blastocystis hominis* was 4.2% in diarrhea cases; the prevalence of *Blastocystis hominis* in female was higher than that of in male (5.5%, 2.9%,  $P=0.027$ ,  $OR=1.98$ , 95% $CI=1.07-3.67$ ); no significant difference was found among diarrhea cases with different age groups infected with *Blastocystis hominis* ( $\chi^2=3.933$ ,  $P=0.950$ ); however, there was remarkable seasonal trend for *Blastocystis hominis* ( $\chi^2=11.8$ ,  $P<0.05$ ); the difference in detection rate of *Blastocystis hominis* among diarrhea

cases from rural-urban fringe zone, urban and rural area was not significant difference ( $\chi^2=2.427$ ,  $P=0.297$ ), the *Blastocystis hominis* subtype I was absolute dominant strain in diarrhea cases and healthy controls. In conclusion, *Blastocystis hominis* was still common intestinal parasites in urban population, *Blastocystis hominis* subtype I was the most prevalence in this region, the pathogenicity and subtype distribution of *Blastocystis hominis* need to be continuously

国家科技重大专项(No. 2008ZX10004-011; 2012ZX10004-220)和国家自然科学基金(No. 81473022)联合资助

通讯作者: 陈家旭, chenjiayu1962@163.com;

周晓农, ipdzhoun@sh163.net

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心, 国家级热带病国际联合研究中心, 上海 200025

studied.

**Key words:** *Blastocystis hominis*; genotype; diarrhea cases; non-diarrhea subjects

Supported by the National Science and Technology Major Project (Nos. 2008ZX10004-011 and 2012ZX10004-220) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81473022)

Corresponding authors: Chen Jia-xu, Email: chenjiaxu1962@163.com; Zhou Xiao-nong, Email: ipdzhouxn@sh163.net

人芽囊原虫是人和动物肠道重要的寄生虫之一,于1912年首次从人类粪便中分离出来,并曾经被认为是寄生在人体肠道的一种非致病性酵母菌<sup>[1]</sup>,1967年 Zierdt 等研究者根据其形态学、生理学特征、生长特性及对抗原虫药物有效等特征将其归为原虫,并认为人芽囊原虫可能与消化道疾病有关<sup>[2]</sup>,之后人芽囊原虫逐渐引起重视。人芽囊原虫在世界范围内广泛分布但流行程度在不同地域间有很大差异,在发达国家能达到1.5%~20%,在发展中国家能达到30%~60%<sup>[3]</sup>。人芽囊原虫在热带、亚热带国家及卫生条件较差的地区感染率较高,在菲律宾腹泻人群中人芽囊原虫的检出率高达13%<sup>[4]</sup>。有研究表明人芽囊原虫是一种机会性致病病原体,在免疫缺陷的腹泻人群中感染率可高达73.4%,同时在伴有腹泻症状的艾滋病病人中人芽囊原虫和其他肠道原虫(隐孢子虫、蓝氏贾第鞭毛虫和溶组织阿米巴)的混合感染率高达8.6%<sup>[5]</sup>。但也有研究发现人芽囊原虫在艾滋病病人和非免疫缺陷的人群中检出率没有差异<sup>[6]</sup>。近年来随着旅游的急速增长和食品安全问题的突出,人芽囊原虫对人群健康的威胁持续增加<sup>[7]</sup>。为此本研究试图了解我国西南城市地区人芽囊原虫的感染负担,描述人芽囊原虫病流行病学特征和不同基因型的致病情况,为防治人芽囊原虫病提供科学参考。

## 1 材料与方法

1.1 调查现场 选择云南省昆明市4家医院作为哨点医院,分别为云南省第一人民医院、昆明医科大学第一附属医院、昆明市儿童医院和昆明市普吉社区医院,在这4个哨点医院的门诊选择腹泻病例和非腹泻就诊者作为研究对象。

### 1.2 研究对象

1.2.1 腹泻病例定义 在2014年7月1日到2015年6月30日期间,在这4个哨点医院就诊的患者中,从就诊当天算在过去24 h内腹泻次数 $\geq 3$ 次、且粪便形态异常、就诊前未使用抗生素、且在过去2周内未出现腹泻症状者定义为腹泻病例。

1.2.2 非腹泻研究对象定义 在2014年7月1日

到2015年6月30日期间,在这4个哨点医院就诊的患者中,按就诊当天计在过去24 h内腹泻次数 $< 3$ 次、且粪便形态正常、未患有其他消化道疾病或症状、过去2周内未发生腹泻的研究对象定义为非腹泻人群,且非腹泻研究对象与相应的腹泻病例在年龄上不超过 $\pm 4$ 岁,在就诊日期上和相应的腹泻病例不超过 $\pm 15$  d。

1.3 样本采集和信息收集 在2014年7月1日到2015年6月30日期间,在4个哨点医院使用无菌采样杯采集符合条件的腹泻病例和非腹泻研究对象粪便样本,粪便量需大于3 g或3 mL。粪便样本采集后在24 h内送到云南省疾病预防控制中心并进行低温冷冻保存,同时使用结构化问卷采集研究对象基本信息和腹泻人群临床表现等信息。

1.4 人芽囊原虫的检测及基因分型 取约0.2 g粪便,按照说明书使用试剂盒(天根,中国)提取粪便样本中人芽囊原虫基因组,得到50  $\mu$ L提取物并保存于 $-70$   $^{\circ}\text{C}$ 。根据参考文献<sup>[8]</sup>,在上海生工合成前引物(5'-CGAATGGCTCATTATATCAGTT-3')和后引物(5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'),并在使用前配成10  $\mu$ mol/L浓度。取DNA模板1  $\mu$ L,各加入10  $\mu$ mol/L前、后引物1  $\mu$ L, TaqMixture 12.5  $\mu$ L(中国,天根), ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L;扩增条件:预变性94  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;变性94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,退火53  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,延伸72  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,40循环;延伸72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;产物4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。取PCR扩增产物5  $\mu$ L,在1.5%琼脂糖凝胶中120 V电泳40 min,之后在凝胶成像系统中进行观察,目标片段260 bp。将疑似阳性的PCR产物送到上海生工进行测序,使用BLAST软件在NCBI上将测序结果与GenBank数据库进行比对以确诊阳性,并在GenBank上下载参考序列,使用Meg5.0软件将确认阳性的序列与参考序列进行分析以确定基因亚型。

1.5 数据的统计学分析 使用SPSS19.0软件(SPSS, IBM)进行数据分析,分类资料的计算采用卡方检验或Fisher法;定量数据根据数据特征选择t检验、方差分析或秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异的标准。

## 2 结果

### 2.1 研究对象基本信息 见表 1。

表 1 1 121 名腹泻病例和 319 名非腹泻研究对象基本特征  
Tab. 1 Essential characteristic of 1 121 diarrhea cases  
and 319 non-diarrhea subjects

特征 Characteristic	腹泻病例(%) Diarrhea cases(%)	非腹泻研究对象(%) Non-diarrhea subjects(%)
研究数量 Number	1 121	319
年龄 Age		
中位数 Median	0.6	2.3
性别比(男/女) Sex ratio (Male/ Female)	1.00	1.01
男性 Male	559 (49.9)	165 (51.7)
女性 Female	562 (50.1)	154 (48.3)
城市 Urban	753 (67.2)	223 (69.9)
城乡结合处 Rural-urban fringe zone	177 (15.8)	69 (21.6)
农村 Rural	191 (17.0)	27 (8.5)
春季(2—4 月) Spring(Feb—Apr)	267 (23.8)	66 (20.7)
夏季(5—7 月) Summer(May— July)	200 (17.8)	65 (20.4)
秋季(8—10 月) Autumn(Aug— Oct)	260 (23.2)	89 (27.9)
冬季(11—1 月) Winter(Nov— Jan)	394 (35.1)	99 (31.0)
发热(>37.3 ℃) Fever(>37.3 ℃)	137 (12.2)	—
呕吐 Vomiting	263 (23.5)	—
脱水 Dehydration	64 (5.7)	—
粪便类型 Stool type—		
水样便 Watery stool	510 (45.5)	—
粘液样便 Mucus stool	540 (48.5)	—
其他粪便类型 Other stool	71 (6.3)	—
腹泻次数 Diarrhea frequency	6	—

如表 1 所示:从 2014 年 7 月到 2015 年 6 月之间,该研究总共招募 1 121 名腹泻病例和 319 名非腹泻研究对象,男、女性别组成在腹泻病例和非腹泻人群中相当,腹泻和非腹泻人群中来自城市地区的研究对象较多( $\chi^2=17.291, P<0.001$ )。呕吐是腹泻病例最常见的症状,其次是发热和脱水。腹泻病例中最常见的粪便类型是粘液样便,其次是水样便。腹泻病例中就诊前 24 h 内腹泻次数中位数为 6 次。

2.2 人芽囊原虫在腹泻病例中的性别、年龄、季节和城乡分布 人芽囊原虫在女性腹泻病例中检出率为 5.5%(31/562),在男性腹泻人群中为 2.9%(16/559),这表明人芽囊原虫在女性腹泻病例中的检出率高于男性腹泻病例的检出率( $\chi^2=4.913, P=0.027, OR=1.98, 95\%CI=1.07-3.67$ )。尽管人芽囊原虫的检出率在不同年龄段腹泻病例中有所变动,在 1~2 岁腹泻病例中检出率最高(5.6%, 15/269),其次是 5~65 岁(4.9%, 12/244)、6~12 月龄(4.6%, 12/263)、65 岁以上人群(3.7%, 1/27)和 0~6 月龄(2.7%, 5/186),在 2~5 岁腹泻病例中检出率最低(1.6%, 2/132),但人芽囊原虫的检出率在各个年龄组腹泻病例中没有差异( $\chi^2=3.933, P=0.953$ )。人芽囊原虫在 5 岁以下腹泻病例和 5 岁以上腹泻病例中检出率没有差异( $n=34, 4.0\%; n=13, 4.8\%; P=0.571, OR=0.57, 95\%CI=0.43-1.59$ )。人芽囊原虫在腹泻病例中检出率有明显的季节分布趋势( $\chi^2=11.8, P<0.05$ ),在春季腹泻病例中检出率最高(7.5%, 20/267),其次是夏季(5.0%, 10/200)和冬季(2.8%, 11/394),在秋季时最低(2.3%, 6/260)。尽管人芽囊原虫在城区腹泻人群中检出率为 4.8%(36/753),稍高于农村地区腹泻人群中的检出率(3.7%, 7/191)和城乡结合处腹泻病例中的检出率(2.3%, 4/177),但人芽囊原虫在不同居住区的腹泻病例中检出率没有差异( $\chi^2=2.427, P=0.297$ )。

2.3 人芽囊原虫基因型分布 在腹泻病例中分离到的 47 份人芽囊原虫,其中人芽囊原虫 I 型占 97.9%(46/47),II 型占 2.1%(1/47)。从 5 岁以下腹泻病例中分离到的 34 份人芽囊原虫中,人芽囊原虫 I 型占 100%(34/34),无其它基因型。在 5 岁以上腹泻病例中分离到的 13 份人芽囊原虫中,人芽囊原虫 I 型占 92.3%(12/13),II 型占 7.7%(1/13)。在非腹泻人群中检出的 11 份人芽囊原虫中,人芽囊原虫 I 型占 100%(11/11)。

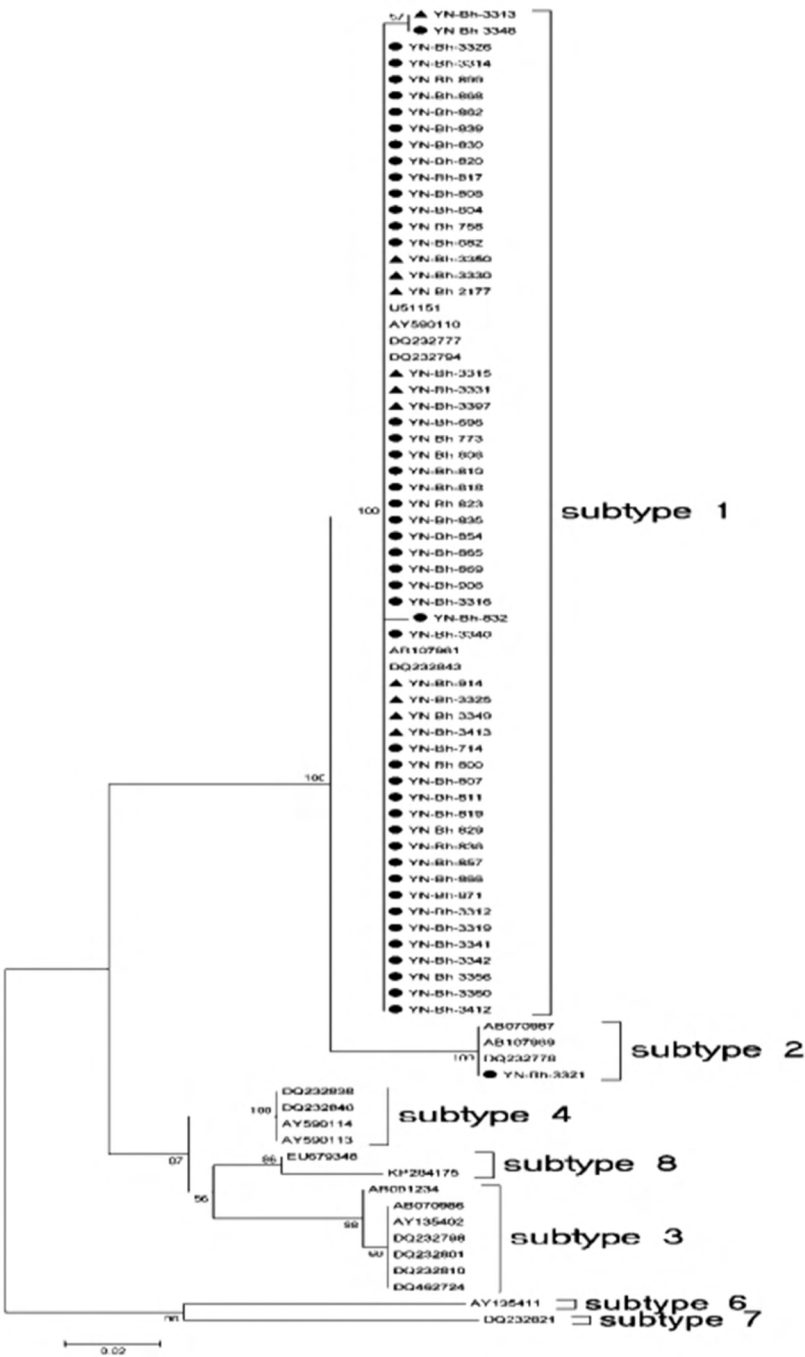


图 1 腹泻人群和非腹泻人群中人芽囊原虫的亚型分布 (●: 腹泻病例;▲: 非腹泻人群)

Fig. 1 Subtype distribution of *Blastocystis hominis* among diarrhea patients and non-diarrhea subjects

3 讨 论

人芽囊原虫是自然界广泛存在的人畜共患寄生虫之一,主要通过粪-口途径传播,饮用水来源、卫生条件、经济发展水平以及气候等因素等都是影响人感染人芽囊原虫的重要因素。该研究发现非腹泻人群中人芽囊原虫感染率为 4.0%,这与部分发达国家非腹泻人群中的感染率相同,同时也和我国上海地区非腹泻人群的感染率相当(2.95%),此与本次调查现场的选择有关,对象来自经济条件较好城

市地区,土地几乎全部硬化,饮水管道化和有效氯的消毒、人群卫生习惯好,这可能是该研究中人芽囊原虫感染率低的原因之一。而在卫生条件差的地区,如我国的西南农村地区人芽囊原虫感染率很高(32.6%)<sup>[9]</sup>,为当地主要的公共卫生问题之一。

该研究发现不同年龄段腹泻病例中人芽囊原虫的感染率无差异,这与其他研究结果相符<sup>[9]</sup>,显示年龄不是影响人芽囊原虫感染的因素,同时也暗示人芽囊原虫在体内不能引发持续的保护性免疫,再次

感染在其一生中可不断发生,从另一个侧面提示我们改善环境卫生、关注食品安全及防止食源性污染可能是降低人芽囊原虫感染的有效途径。

在我国人芽囊原虫一般采用直接涂片观察法、体外培养法及甲醛-乙醚沉淀法等,相比 PCR 而言,这几种方法检测成本低但敏感性也低,同时漏检率较高,从而使得人芽囊原虫疾病负担严重低估;加之近年来我国人力成本不断增加,现场流调费用持续攀升,传统检测方法在一定程度上受限,而 PCR 方法可有效减少流调工作的天数和人力资源成本,同时与基因测序的联合运用可提高人芽囊原虫检出率<sup>[8]</sup>,从而更加准确的评估人芽囊原虫感染负担,并可进一步进行基因分型以便研究人芽囊原虫亚型分布特征,为其防治提供科学的参考依据。

人芽囊原虫的基因型与其致病性可能有关,有研究显示其不同基因型致病力可能不同,其中人芽囊原虫 III 型可引起腹泻<sup>[10]</sup>。该研究发现人芽囊原虫 I 型不是引起腹泻的亚型之一,这可能与入芽囊原虫不同亚型的致病机制不同有关,也可能由于我们调查的范围和样本数量的差异造成的,另有研究表明人芽囊原虫 I 型 (57.7%, 90/156) 是腹泻病例和非腹泻人群中检出比例最高的亚型,其次是 III 型 (22.4%, 35/156) 和 II 型 (12.8%, 20/156)<sup>[11]</sup>;但也有研究表明人芽囊原虫 III 型 (61.90%) 是腹泻人群中最主要的亚型,其次是 I 型 (19.05%) 和 II 型 (19.05%)<sup>[7]</sup>,而该研究发现人芽囊原虫 I 型在腹泻病例和非腹泻人群中都是占绝对优势的亚型,同时未发现人芽囊原虫 III 型,这可能与入芽囊原虫亚型的地理分布有关,也可能与不同基因型与不同宿主和寄存环境等因素有关<sup>[9]</sup>。该研究结论由于抽样误差等因素的影响,在外推时受到一定限制。扩大样本量,在不同地域、不同温带和经纬度地区选取代表性人群进行研究人芽囊原虫感染负担、基因型分布及与腹泻之间的关联,可为人芽囊原虫的预防和控制提供更科学的参考依据。

#### 参考文献:

- [1] Zierdt CH. *Blastocystis hominis*—past and future[J]. Clin Microbiol Rev, 1991, 4(1): 61-79.
- [2] Babb RR, Wagener S. *Blastocystis hominis*—a potential intestinal pathogen[J]. West J Med, 1989, 151(5): 518-519.
- [3] Meloni D, Sanciu G, Poirier P, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy[J]. Parasitol Res, 2011, 109(3): 613-619. DOI: 10.1007/s00436-011-2294-7
- [4] Belleza ML, Cadacio JL, Borja MP, et al. Epidemiologic study of *Blastocystis* infection in an urban community in the Philippines[J]. J Environ Public Health, 2015, 2015: 894297. DOI: 10.1155/2015/894297
- [5] Kurniawan A, Karyadi T, Dwintarsi SW, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009, 103(9): 892-898. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.02.017
- [6] Tian LG, Chen JX, Wang TP, et al. Co-infection of HIV and intestinal parasites in rural area of China[J]. Parasit Vectors, 2012, 5: 36. DOI: 10.1186/1756-3305-5-36
- [7] Souppart L, Moussa H, Cian A, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt[J]. Parasitol Res, 2010, 106(2): 505-511. DOI: 10.1007/s00436-009-1693-5
- [8] Menounos PG, Spanakos GG, Tegos N, et al. Direct detection of *Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing[J]. Mol Cell Probes, 2008, 22(1): 24-29.
- [9] Li LH, Zhou XN, Du ZW, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China[J]. Parasitol Int, 2007, 56(4): 281-286.
- [10] Tan TC, Suresh KG, Smith HV. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential[J]. Parasitol Res, 2008, 104(1): 85-93. DOI: 10.1007/s00436-008-1163-5
- [11] Bohm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA[J]. Trop Med Int Health, 1997, 2(8): 771-778.

收稿日期: 2015-11-20 修回日期: 2016-01-17