

隐孢子虫体外培养研究进展*

张素梅 赵金凤 张龙现* 宁长申

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要 隐孢子虫是一种重要的人兽共患寄生性原虫, 可引起儿童和免疫低下人群以及幼龄动物发生严重胃肠道疾病。长期以来围绕建立隐孢子虫体外培养模型国外学者做了大量探索, 国内则在该领域尝试不多。为了研究隐孢子虫详细的内生发育过程, 快速筛选抗隐孢子虫的有效药物、研究功能基因表达和外源基因的有效表达等, 需要建立有效的体外培养模型。本文就 20 多年来国内外隐孢子虫培养概况进行了综述。

关键词 隐孢子虫; 种类; 内生发育; 细胞培养; 鸡胚培养

隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 是一种主要引起人和动物胃肠道疾病的重要寄生性原虫, 具有广泛的宿主范围, 可感染包括人在内的 240 多种动物, 并且可通过水源、食物、空气等多种途径传播, 从而引起儿童和免疫抑制病人严重腹泻, 以及幼龄动物消化道疾病和幼龄禽类呼吸道疾病, 导致其生产性能下降或死亡。目前, 隐孢子虫有效种已达 18 个, 分别为 *C. hominis*、*C. parvum*、*C. canis*、*C. felis*、*C. meleagridis*、*C. muris*、*C. suis*、*C. andersoni*、*C. wrairi*、*C. baileyi*、*C. serpentis*、*C. saurophilum*、*C. galli*、*C. molnari*、*C. bovis*、*C. scophthalmi*、*C. fayeri*、*C. macropodum* (Xiao *et al.*, 2004; Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Xiao and Fayer, 2008)。其中 *C. suis* 是 Ryan 等 (2004) 根据形态学特点、致病性和分子种系发育关系等将 *C. parvum* 猪基因型 I 重新命名的一个独立有效种。*C. bovis* 是 Fayer 等 (2005) 根据新的隐孢子虫种类命名基本规定将 *C. parvum* 牛基因型 B 确立的一个独立有效种。*C. fayeri* 是 Ryan 等 (2008) 从红袋鼠 *Macropus rufus* 粪样中分离并命名的。*C. macropodum* 是 Power 和 Ryan 根据其目前只在袋鼠动物中发现而命名的。在这 18 个有效种中, 有 9 种为人畜共患种类。鉴于隐孢子虫病 (*Cryptosporidiosis*) 对人类健康和畜牧业生产的巨大危害, 自上世纪 80 年代以来隐孢子虫病研究成为全球范围内人兽共患病领域内的一个研究热

点。人们在隐孢子虫分类地位、种类鉴定、分子流行病学、传播机制、免疫机理、检测技术和药物防治等方面做了大量的探索性研究, 取得了丰硕的研究成果 (Arrowood, 2002)。

自 Woodmansee 等 (1983) 首次报道隐孢子虫体外成功完成无性繁殖以来, 在过去的 20 多年中, 人们在建立隐孢子虫体外培养模型方面做了大量的探索性研究, 并取得了巨大成功。有大量文献描述了隐孢子虫体外培养后的形态、数量、方法, 其中包括是否完成完整的发育史, 感染细胞量、卵囊产生量以及用于培养的细胞系、培养基组成、接种方法、培养条件、卵囊计数等。

隐孢子虫体外培养模型的建立对观察其致病机理、细胞病理变化、内生发育详细过程和发育阶段虫体特征等生物学特性研究, 药物筛选和药物疗效评价模型、虫株毒力评价、免疫保护机理、虫体与宿主细胞互作、虫体侵入机制、功能基因鉴别等具有重要意义。

1 隐孢子虫鸡胚培养模型

Current 等 (1983) 利用绒毛尿囊膜 (Chorioallantoic membrane, CAM) 内胚层细胞培养了隐孢子虫人、牛分离株。在绒毛尿囊膜上这 2 种分离株在发育阶段并无形态学差异, 并且从绒毛尿囊膜内收集的卵囊可感染小鼠。但此后并无报告重复此试验。

收稿日期: 2007-10-08

* 基金项目: 河南省高校创新人才培养工程项目 (豫教高 [2004] 294 号)

** 通讯作者: E-mail: zhanglx8999@yahoo.com.cn

Lindsey 等 (1988) 建立了 *C. baileyi* 的鸡胚体外培养模型, 鸡胚培养 *C. baileyi* 时, 一般选用 10~12 日龄鸡胚, 消毒处理后, 尿囊腔接种 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 个脱囊后的子孢子或完整的卵囊, 然后在 40~41 °C 孵育 6~7 天, 从 CAM 中收集卵囊。

国内赵亚荣等 (1995) 利用从北京鸭分离的 *C. baileyi* 卵囊经尿囊腔接种, 借助微分干涉显微镜 (NIC) 对 *C. baileyi* 在鸡胚 CAM 上的发育过程进行了观察, 整个发育周期约为 96 h。孢子化过程在 CAM 内胚层上皮细胞表面的带虫空泡内完成, 并产生薄壁和厚壁型 2 种卵囊, 提出虫体具有群体寄生现象和同步发育特征; 描述了 *C. baileyi* 的运动期虫体离开母体和发育为滋养体的动态变化; 应用由粪便中纯化的卵囊直接感染鸡胚成功。并用 37 °C 水浴脱囊, 脱囊率达到 60% 左右, 表明温度对隐孢子虫的脱囊具有重要作用, 无需胰酶和牛胆酸钠的参与。动物回归试验表明: *C. baileyi* 不能经胎盘途径造成感染, 在 CAM 上发育的 *C. baileyi* 卵囊对雏鸡具有较强的感染性。

张西臣等 (1990) 用硫酸锌漂浮法收集兔粪中的隐孢子虫, 用蔗糖溶液梯度离心纯化, 卵囊经胰酶和兔胆汁消化脱囊产生子孢子, 由尿囊腔接种 10 日龄鸡胚, 8 天后收获检查, 发现绒毛尿囊膜 (CAM) 上有大量不同发育阶段的隐孢子虫, 并可见到带虫空泡 (Parasitophorous vacuoles), 通过免疫组化确定为隐孢子虫。

2 隐孢子虫细胞培养模型

2.1 国外研究进展

Woodmansee 等 (1983) 首次利用人直肠肿瘤细胞 (HRT) 和 RPMI 1640 培养基培养了隐孢子虫牛分离株。但接种卵囊 3 天后只观察到了该分离株的无性发育阶段, 并未观察到其有性发育阶段, 因当时对隐孢子虫虫种分类尚不清楚, 所以细胞培养种类不明, 仅知道是分离于牛的虫株。

1984 年, 隐孢子虫细胞培养实现开创性突破, 著名寄生虫学家 Current 等 (1984) 用人胎肺细胞 (HFL)、原代鸡肾细胞 (PCK)、猪肾细胞 (PK-10) 和 MEM 培养基成功培养了隐孢子虫人分离株, 并完成了整个发育史, 其中 HFL 培养的产量最高。据多年之后人们对此的分析, 认为

这可能是由于最初来源于 AIDS 病人的分离株或来源于经山羊传代的同样分离株是 *C. parvum* 而不是 *C. hominis*, 分析文章发表的时候, 人们普遍认为 *C. hominis* 只限于感染人。但后来的感染实验表明 *C. hominis* 也可感染儒艮、犏牛和羔羊, 并且经大剂量接种也可实验感染仔猪 (Xiao *et al.*, 2004)。据报道本实验也难以重复。

Naciri 等 (1986) 用幼仓鼠肾细胞 (BHK) 培养了分离自免疫抑制病人的隐孢子虫山羊传代株。当时此分离株鉴定为 *C. muris*, 但更可能是人兽共患传播的 *C. parvum*。此分离株经传代 45 次后 (每周 1 次), 在绒毛尿囊液中发现许多游离的子孢子和裂殖子 (Arrowood, 2002)。

Lindsey 等 (1988) 建立了 *C. baileyi* 的鸡胚体外培养模型, 并且发现有 16 种禽和哺乳动物的原代和传代细胞都不适合 *C. baileyi* 的体外培养。这 16 种细胞是: 鸡胚、鸭胚肾细胞, 2 日龄鸡、鸭、山齿鹑 (白喉鹑)、犬肾细胞, 16 日龄鸡肾细胞、胎鼠脑细胞, 10 日龄棉鼠 (Cotton rat)、16 日龄小鼠肾和睾丸细胞, 人胎肺细胞等。同年 Lumb 等 (1988) 尝试用犬肾细胞 (MDCK) 和 DMEM 培养基培养了分离于腹泻羔羊粪便的隐孢子虫孢子。接种 2 天后观察到多数卵囊处于无性繁殖阶段。

Datry 等 (1989) 用人结肠腺癌 (Caco-2) 细胞和原代鼠肝细胞培养了 AIDS 病人隐孢子虫分离株, 并在原代鼠肝细胞培养时观察到了完整的虫体发育史。而在人结肠腺癌细胞内只清晰看到了卵囊, 并没发现其他发育阶段 (Arrowood, 2002)。

McDonald 等 (1990) 用鼠 L929 成纤维细胞培养隐孢子虫人、牛分离株, 用以测定抗微生物制剂对隐孢子虫的作用效果。卵囊数量在接种子孢子后 48~72 h 达到高峰, 并且无性阶段占优势, 有性阶段在接种 72 h 后不到 10%。同年, Bonnin 等 (1990) 用路易鼠小肠癌细胞 (LGA 细胞) 培养了最初来源于人、牛的隐孢子虫, 并观察到其无性发育阶段。

Flanigan 等 (1991) 报道: 分化和未分化的人结肠腺癌细胞 HT29.74 用于培养 *C. parvum* 牛分离株, 且分化细胞的培养效果优于未分化细胞。实验数据表明, 此次卵囊感染效力较低, 接种 72 h 后卵囊主要处于无性繁殖阶段。本实验模型表明微管在入侵宿主细胞和虫体发育中的重

要性，因为虫体的数量减少与秋水仙素、长春碱处理呈现剂量依赖性。

此外，Gut 等（1991）发现在 15 种细胞中 MDCK 和牛肾细胞（MDBK）最适合培养 *C. parvum*。实验表明 *C. parvum* 牛分离株接种细胞后可观察到明显的有性发育阶段，部分形成到完全形成的卵囊壁结构非常明显，但并未观察到明显的成熟卵囊发育。Doyle 等（1993）报道这种模型可用于评估抗体介导的生活史调节。同年，Kuhls 等（1991）用人胚小肠细胞（ATCC-CCL-6）培养完成了 *C. parvum* 牛分离株的无性发育阶段、并且发现用糖和（或）外源凝集素处理卵囊后影响感染量。

Rasmussen 等（1993）用人子宫内黏膜细胞 RL95-2 培养完成了 *C. parvum* 牛分离株完整发育史。同时 Rosales 等（1993）证明 MDCK 培养 *C. parvum* 牛分离株的效果要优于 Vero、HeLa 和 McCoy 细胞，但该文章没有提供详细的比较数据。

Arrowood 等（1994）采用无血清培养体系 Ultraculture[®] 培养了 *C. parvum* 牛分离株。并且发现效果优于传统的 DMEM 培养体系。后来此模型被用于评价潜在的抗隐孢子虫药物和卵囊消毒效果研究。Adams 等（1994）用结肠上皮细胞（T84）和 Ham's F12 培养基培养了 *C. parvum* 牛分离株。研究结果通过光镜和电镜观察发现：虫体可破坏上皮细胞屏障而不仅仅是简单地打开细胞离子转运通道，并且在培养物中观察到了虫体无性繁殖和有性繁殖阶段。

另外，Griffiths（1994）在支持性渗透膜上生长的 Caco-2 细胞所作的相关研究中，将人和牛 *C. parvum* 分离株接种到 Caco-2 上，Caco-2 细胞在 37 °C，5% CO₂ 条件下，用添加 20% 胎牛血清（FBS），3.5 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基进行培养。虫体接种之后转运单层膜阻力（膜完整性和渗透性测量的一种方式）以剂量和时间依赖的方式下降。分子量低于 1 kDa 的蛋白可通过单层膜，但 1.8 kDa 或更大分子量的蛋白质则不能透过。细胞乳酸脱氢酶释放进虫体寄生的细胞单层上部的培养基中，而不是基部。感染细胞摄取碘化丙啶（Propidium iodide）作为隐孢子虫感染杀死宿主细胞的解释证据。人和牛分离株数据汇集之后结果会更显著，两者数据单独分析均不显著。

Yang 等（1996）用原代牛输卵管上皮细胞（BFTE）也培养了 *C. parvum* 牛分离株，并且发现单层细胞中含有新生成成熟卵囊，因为细胞单层培养物用乙醇处理后仍可感染小鼠。1997 年，Lawton 等用人非粘附单核细胞系 THP-1（ECACC 88081201）培养了分离自人的 *C. parvum* 牛传代株。通过姬姆萨染色和单抗荧光标记，观察到了虫体的有性和无性发育阶段。尽管有明显的完整发育史，但传代培养并没有取得成功。

Deng 和 Cliver（1998）用非洲绿猴肾细胞（BS-C-1）完成了 *C. parvum* 牛分离株的完整发育史。卵囊经蔗糖和氯化铯溶液密度梯度离心纯化后，用商用次氯酸钠在 0 °C 处理 10 min，然后在烛罐中孵育 3 h 后接种细胞，在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养。结果表明：直接接种卵囊效果优于接种孢子。本实验说明在隐孢子虫体外培养时接种物可以是孢子也可以是卵囊，但具体培养效果需实验加以证明。

Dawson 等（2004）用传代人肺成纤维细胞（MRC-5 cells, ECACC, Salisbury）培养 *C. parvum* 和 *C. hominis*，用于评价其存活力。其中 *C. parvum* 来源于鹿而经羔羊传代，*C. hominis* 则来源于人粪样中。卵囊经饱和氯化钠溶液纯化后接种细胞，并未经次氯酸钠和脱囊液处理。培养物经丙酮固定、金胺染色、荧光显微镜等对卵囊数量和感染力进行了检查，但该文章并未提供照片，也未看到明确的发育史。

除上面提到的 *C. parvum*、*C. hominis*、*C. baileyi* 和 *C. muris* 在体外成功培养以外，Hijawi 等（2002）用 HCT-8 细胞培养完成 *C. andersoni* 的完整发育史。此实验证明该条件下 *C. andersoni* 生长发育迅速并在接种后 72 h 完成了整个发育史。

此外，Hijawi 等（2004）首次用无细胞培养系统体外培养了经鼠传代的 *C. parvum* 牛基因型完整发育史。具体方法是将肠组织匀浆后用醚萃取或用 Ficoll[®] 梯度离心纯化，用胰酶溶液脱囊后接种于含有多种营养成分 pH 7.4 的 RPMI1640 半固体培养基上。100 mL 培养基内含有：0.03 g L-谷胺酰胺、0.3 g 碳酸氢钠、0.02 g 胆汁、0.1 g 葡萄糖、25 mg 叶酸，100 mg 4-氨基苯甲酸、50 mg 泛酸钙、875 mg 抗坏血酸、1% 牛血清、0.36 g HEPES 缓冲盐、10 000 U 青霉素 G 和 0.01 g 链霉素。分别在接种后的 48 h 和 3 天观察到了 I

和 II 型裂殖体, 接种后 6~7 天观察到了有性发育阶段(即大、小配子), 8 天后看到了孢子化卵囊。

尽管此项研究的意义重大, 但在学术界引起较大争议, 因为一些学者能够重复出本实验, 而另一些学者则不能重复出类似结果。如 Rosales (2005) 等发现了类簇虫的细胞外结构, 该结果 Hijjawi 及其同事曾经描述过。但 Girouard 等 (2006) 则不能重复出 *C. parvum* 的无细胞培养。也许直接将 Hijjawi 及其同事使用过的分离株和其他 *C. parvum* 分离株比较会得到有关隐孢子虫非寄生发育阶段的重要线索。

Perez 等 (2007) 将分离于 21 日龄牛且用 PCR-RFLP 鉴定过的 *C. parvum* 牛基因型孢子接种于 HCT-8 细胞和优化的 RPMI-1640 培养体系后得到大量增殖的虫体并观察到完整的发育史。改良培养体系包括培养基中添加不同浓度灭活牛血清 (2.5%、5%、10%)、添加 1 mmol/L CaCl_2 和 1 mmol/L MgCl_2 、调整不同的 pH 值 (7.4、7.7、8.0、8.5)、培养基连续 7 天不更换。实验结果表明: 使用 HCT-8 细胞和添加 10% 灭活牛血清、1 mmol/L CaCl_2 和 MgCl_2 、pH 7.2 的 RPMI-1640 培养基在接种 48 h 后, 与对照培养基 14.5% 的寄生率相比细胞寄生虫体增加到 71%, 在接种 2 周后仍然高达 47%。在接种 72 h 后出现细胞外发育并在接种 96 h 后达到高峰 (25.3%)。此外, 营养衰竭细胞 (培养基连续 7 天不更换) 更容易被新鲜培养基中的子孢子感染。本实验得到的虫体数量比以往报道的较多, 且观察时间长达 2 周以上。这种 *C. parvum* 的体外培养方法将更利于新的化学治疗药的评价。

Castellanos-Gonzalez 等 (2008) 研究发现, 在 HCT-8 细胞培养中出现 OPG (骨保护素) 蛋白 mRNA 早期峰, 感染细胞用 OPG 配体肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 处理后, 可诱导细胞凋亡并减少虫体数量, 重组 OPG 阻断这些效应。结果揭示了 TRAIL 介导的清除隐孢子虫感染的新途径以及调节宿主反应中 OPG 的作用。Rueda 等 (2008) 首次研究证明: Bobel-24 (2, 4, 6-triiodophenol, 三碘苯酚) 可使体外培养的隐孢子虫数量减少 99.6% 以上。在 SCID 小鼠慢性隐孢子虫病模型中, 每天用 125 mg/kg 治疗动物, 则卵囊排出有显著差异 ($P < 0.05$) Bobel-24 作为治疗隐孢子虫病的化疗药有进一步研究价

值。以上两项研究进一步确证隐孢子虫体外培养模型对研究虫体入侵机制和新型治疗药物评价等方面的重要地位。

2.2 国内研究进展

张西臣等 (1990) 报道: 中国人民解放军兽医大学寄生虫病教研室将鼠粪样中分离的大型隐孢子虫 (*C. muris-like*) 和从兔粪便中分离的小型隐孢子虫 (*C. parvum-like*) 卵囊, 采用梯度离心法纯化, 再经胰酶和兔胆汁消化脱囊产生孢子。然后接种于单层人胚肺细胞 (HFLC) 上, 6 h 后换液并每天观察虫体发育情况, 9 天后收获检查。结果发现, 在不同时间里带虫空泡中出现滋养体、裂殖体并可见到卵囊, 镜检发现培养卵囊形态与接种前相同。

黄克和 (2000) 报道为探讨自由基在隐孢子虫感染和发病过程中的作用, 成功建立能完成隐孢子虫完整发育史的牛输卵管上皮细胞培养系统, 并应用单抗和免疫荧光技术在该系统上研究了过氧化氢 (H_2O_2) 对隐孢子虫体外感染的影响, 以及自由基清除剂的保护作用。结果表明: 与对照组相比, 500 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 可显著地抑制次氯酸处理的隐孢子虫卵囊进一步发育。

黄克和等 (2001) 为探讨在饮水中添加不同浓度的地塞米松对人工感染小鼠排卵囊量的影响, 比较了不同纯化方法的卵囊回收率和回收卵囊纯度, 探讨了来自不同动物、不同纯化方法的卵囊在牛输卵管上皮细胞培养系统的感染情况。

宗祖胜等 (2006 年) 根据活性隐孢子虫感染人结肠癌细胞 (HCT-8) 产生感染斑的特点, 利用体外细胞培养技术和免疫荧光分析技术建立了活性隐孢子虫的检测方法, 并利用最大可能数统计原理对水样中活性隐孢子虫进行了定量检测。

3 结语

(1) 从上述隐孢子虫培养发展历程来看, 已经有 *C. parvum*、*C. hominis*、*C. muris*、*C. andersoni*、*C. baileyi* 等在体外成功培养。而其他隐孢子虫不清楚或没有, 因为早期培养的某些分离株当时并不清楚属于哪一个种或基因型, 如在体外培养的隐孢子虫大多分离于人或牛, 而感染人的隐孢子虫有 *C. hominis*、*C. parvum*、*C.*

canis、*C. felis*、*C. meleagridis*、*C. andersoni* 和 *C. parvum* 鹿基因型; 而感染牛的隐孢子虫有 *C. bovis*、*C. andersoni*、*C. parvum* 和 *C. parvum* 鹿样基因型 (Deer-like genotype) (Fayer *et al.*, 2006), 也有报道牛可感染 *C. muris*、*C. suis*、*C. canis*、*C. felis* (梁楠等, 2006), 所以以往报道的分离于人或牛的虫株体外培养结果有差异 (有的看到完整发育史, 有的则没有) 可能与分离株基因型不同或培养条件有差异有关。因为不同地区隐孢子虫分离株有不同的抗原性、毒力、感染性, 对药物的敏感性也不同。因此, 有必要在体外培养前对隐孢子虫分离株进行分子生物学特征鉴定 (Perez Cordón *et al.*, 2007)。

(2) 体外培养收获的卵囊数量较少或很少, 而在已发表文献中能培养到有性繁殖阶段的则更少, 所以有必要重新考查或改进已有的培养方法。如 Perez Cordón 等 (2007) 按照 Rosales 等 (1993) 报道的培养方法进行改进, 发现有性阶段虫体数量比 Hijjawi 等 (2002, 2004) 观察到的多, 原因在于体外培养过程中使用了不同的脱囊技术、不同的培养基、或相同的培养基 RPMI-1640 而含不同的组分 (Perez Cordón *et al.*, 2007)。所以在不同的报告中培养同一种类动物的分离株培养结果有差异除了可能接种的虫体基因型不同之外, 也与培养技术和培养条件有关。

(3) 隐孢子虫体外培养模型建立的研究之所以成为大家关注的热点之一, 是因为通过建立体外培养模型可更精确地研究相关虫体内发育过程、侵入机制、虫体与宿主细胞互作、功能基因表达以及外源基因转入和表达等, 以及卵囊有效消毒药物筛选和抗隐孢子虫药物快速筛选等。但从目前隐孢子虫体外培养用于观察或筛选药物的文献报道进行综合分析, 发现缺乏统一的评价标准。如缺乏标准化虫株、标准细胞系以及药效判定标准。这可能与现有的体外培养技术不成熟、培养体系不稳定等有关。再者, 隐孢子虫分离株毒力评价系统尚未建立, 目前国内有关单位正在试行寄生虫虫株标准化。相信随着分子生物学和相关技术的发展, 抗寄生虫药物体外筛选系统会拥有一套统一的、严格的评价标准。

总之, 隐孢子虫体外培养是进一步深入研究其生物学特性, 尤其是功能基因表达、外源基因表达的重要途径。当前, *C. hominis* 和 *C. parvum* 全基因组测序已经完成, *C. muris* 的全

基因组测序正在进行, 在寄生虫学研究领域对同一属虫种进行 3 个种的全基因组测序非常罕见, 足以说明隐孢子虫研究在国际上具有的重要地位。因此, 隐孢子虫有效培养体系研究、新的培养方法建立和虫体传代技术、保存方法研究是当前迫切需要研究的问题。

参考文献

- 张西臣, 胡力生, 李得昌. 1990. 兔的隐孢子虫在鸡胚上培养成功. 中国兽医学报, 10 (2): 117.
- 张西臣. 1990. 鼠大型隐孢子虫和兔的隐孢子虫在人胚肺细胞上培养成功. 中国兽医学报, 10 (2): 110.
- 宗祖胜, 胡洪营, 张金松, 等. 2006. 应用细胞感染技术检测水中活性隐孢子虫. 中国给水排水, 22 (4): 84-88.
- 赵亚荣, 宋生贵, 张晋英, 等. 1995. 贝氏隐孢子虫在鸡胚绒毛尿囊膜上发育过程的研究. 中国农业科学, 28 (6): 83-89.
- 梁楠, 晋复春, 宁长申, 等. 2006. 牛隐孢子虫和隐孢子虫病的研究进展. 中国兽医学报, 36 (12): 1 024-1 030.
- 黄克和, 杨世广, 唐建霞. 2001. 从感染小鼠获得微小隐孢子虫卵囊方法的改进. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 19 (6): 360-362.
- 黄克和. 2000. 过氧化氢对隐孢子虫体外感染的影响和自由基清除剂的保护作用. 中国科协 2000 年学术年会文集. 404.
- Adams, R. B., R. L. Guerrant and S. Zu *et al.* 1994 *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: Morphologic and functional studies in an in vitro model. *J. Infect. Dis.*, 169 (1): 170-177.
- Alvarez-Pellitero, P., M. I. Quiroga, A. Sijó-Bobadilla *et al.* 2004 *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.*, 62 (1-2): 133-145.
- Arrowood, M. J. 2002 In Vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 (3): 390-400.
- Arrowood, M. J., L. T. Xie and M. R. Hurd 1994 In vitro assays of maduramicin activity against *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41 (5): 235.
- Bonnin, A., I. Salimbeni, J. F. Dubremetz *et al.* 1990 Mise au point d'un modèle expérimental de culture *in vitro* des stades asexués de *Cryptosporidium* sp. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65: 41-43.
- Castellanos-Gonzalez, A., L. S. Yancey, H. C. Wang *et al.* 2008 *Cryptosporidium* infection of human intestinal epithelial cells increases expression of Osteoprotegerin: A novel mechanism for evasion of host defenses. *J. Infect. Dis.*, 197: 916-923.
- Current, W. L and P. L. Long 1983 Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J. Infect. Dis.*, 148 (6): 1 108-1 113.
- Current, W. L and T. B. Haynes 1984 Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 224 (46-49): 603-605.
- Dawson, D. J., C. M. Samuel, V. Scrannage *et al.* 2004 Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages. *J. Appl. Microbiol.*, 96 (6): 1 222-1 229.

- Deng, M. Q. and D. O. Cliver 1998 *Cryptosporidium parvum* development in the BS-C-1 cell line. *J. Parasitol.*, **84** (1): 8-15.
- Doyle, P. S., J. Crabb and C. Petersen 1993 Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.*, **61** (10): 4 079-4 084.
- Fayer, R., M. Santín, J. M. Trout *et al.* 2006 Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.*, **135** (2): 105-112.
- Fayer, R., M. Santín and L. Xiao 2005 *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.*, **91** (3): 624-629.
- Flanigan, T. P., T. Aji, R. Marshall *et al.* 1991 Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infect. Immun.*, **59** (1): 234-239.
- Girouard, D., J. Gallant, D. E. Akiyoshi *et al.* 2006 Failure to propagate *Cryptosporidium* in cell-free culture. *J. Parasitol.*, **92** (2): 399-400.
- Griffiths, J. K., R. Moore, S. Dooley *et al.* 1994 *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. *Infect. Immun.*, **62** (10): 4 506-4 514.
- Gut, J., C. Petersen, R. Nelson *et al.* 1991 *Cryptosporidium parvum*: *in vitro* cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Protozool.*, **38** (6): S72-S73.
- Hijawi, N. S., B. P. Meloni, M. Ng'anzo *et al.* 2004 Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *In. J. Parasitol.*, **34** (7): 769-777.
- Hijawi, N. S., B. P. Meloni, U. M. Ryan *et al.* 2002 Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *In. J. Parasitol.*, **32** (14): 1 719-1 726.
- Kuhls, T. L., D. A. Mosier and D. L. Crawford 1991 Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. *J. Protozool.*, **38** (6): S74-S76.
- Lawton, P., M. Naciri, R. Mancassola *et al.* 1997 *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium parvum* in the non-adherent human monocytic THP-1 cell line. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44** (6): 66S.
- Lindsay, D. S., C. A. Sundermann and B. L. Blagburn 1988 Cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos, and pathogenicity of chicken embryo-passaged oocysts. *J. Parasitol.*, **74** (2): 288-293.
- Lumb, R., K. Smith, P. J. O'Donoghue *et al.* 1988 Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.*, **74** (6): 531-536.
- McDonald, V., R. Stables, D. C. Warhurst *et al.* 1990 *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34** (8): 1 498-1 500.
- Naciri, M., P. Yvone, C. de Boissieu *et al.* 1986 Multiplication de *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907) *in vitro* entretien d'une souche sur oeufs embryonnés. *Rec. Méd. Vet.*, **162**: 51-56.
- Perez Cordon, G., C. Marin, D. Romero *et al.* 2007 More productive *in vitro* culture of *Cryptosporidium parvum* for better study of the intra and extracellular phases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **102** (5): 567-571.
- Power, M. L. and U. M. Ryan 2008 A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.*, **94** (5): 1 114-1 117.
- Rasmussen, K. R., N. C. Larsen and M. C. Healey 1993 Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infect. Immun.*, **61** (4): 1 482-1 485.
- Rosales, M. J., J. Cifuentes and C. Mascaró 1993 *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Exp. Parasitol.*, **76** (2): 209-212.
- Rosales, M. J., G. P. Cordon, M. S. Moreno *et al.* 2005 Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop.*, **95** (1): 74-78.
- Rueda, C., S. Fenoy, F. Simón *et al.* 2008 Bobel-24 activity against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in a SCID mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52** (3): 1 150-1 152.
- Ryan, U. M., P. Monis, H. L. Enemark *et al.* 2004 *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.*, **90** (4): 769-773.
- Ryan, U. M., M. Power and L. Xiao 2008 *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55** (1): 22-26.
- Woodmansee, D. B. and J. F. L. Pohlenz 1983 Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line, in Proc. 4th Int. Symp. on Neonatal Diarrhea. *Vet. Infec. Dis. Org. (VIDO)*, 306-319.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan *et al.* 2004 *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17** (1): 72-97.
- Xiao, L. and R. Fayer 2008 Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.*, **38** (11): 1 239-1 255.
- Yang, S., M. C. Healey, C. Du *et al.* 1996 Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. *Infect. Immun.*, **64** (1): 349-354.

ADVANCE ON *IN VITRO* CULTIVATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

ZHANG Su-Mei ZHAO Jin-Feng ZHANG Long-Xian* NING Chang-Shen

(*College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*)

Abstract *Cryptosporidium* is an intracellular parasitic protozoan that can cause severe disease in a wide variety of young animals, children and immunocompromised persons. *In vitro* cultivation is sufficient to support a variety of studies, including characterizing life cycle stage, assessing potential drug therapies, evaluating oocyst disinfection methods, and gene expression. The attempts and significant progress made in the past over 20 years, were reviewed in present paper for making great strides in producing *in vitro* culture models for *Cryptosporidium* parasites.

Key words *Cryptosporidium*; Species; Endogenous development; Cell cultivation; Chicken embryo cultivation

* Author for correspondence