

·研究综述·

机会致病寄生原虫的系列研究<sup>①</sup>

陈观今 郭小华 韦相才 刘达宏 连德润 郑焕钦

(中山医科大学寄生虫学研究所; 广州, 510089)

**摘要** 本课题包括: ①对机会致病寄生原虫, 包括弓形虫、卡氏肺孢子虫及隐孢子虫动物模型的建立, 虫体的分离及提纯; ②弓形虫感染的循环抗原(CA)和抗体(IgG、IgM), 用竞争抑制酶联免疫吸附试验(I-ELISA)、金葡菌 A 蛋白酶联免疫吸附试验(SPA-ELISA)、直接捕获法酶联免疫吸附试验(D-ELISA)进行检测; ③用地高辛标记探针及聚合酶链反应(PCR)检测核酸, 自由引物 PCR 鉴别弓形虫株以及生物特性; ④用流式细胞仪对卡氏肺孢子虫及弓形虫的 DNA、RNA 及蛋白质含量的动力学进行了分析; ⑤用激光微束系统对含 8 个子孢子成熟包囊施行手术, 切除 4 个或 2 个子孢子后, 包囊仍具有感染力。

**关键词** 机会致病原虫感染/免疫学; 疾病模型, 动物; 弓形虫属; 孢子虫纲; 生物学

**中图分类号** R 382.5

## SERIAL STUDIES ON OPPORTUNISTIC PATHOGENETIC PARASITIC PROTOZOAN

Chen Guanjin Guo Xiaohua Wei Xiangcai Liu Dahong Lian Derun Zheng Huanqin

(Institute of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract** The contents of serial studies involve isolation, purification and animal experimental model built up of opportunistic pathogenetic parasitic protozoan including *Pneumocystis*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma*; detection of circulating antigen (CA) and antibody (IgG, IgM) by I-ELISA, SPA-ELISA, D-ELISA; determination of DNA by PCR and digoxigenin-labeled probe; identification of *Toxoplasma* strain by RP-PCR and biological characters. Dynamics of *Pneumocystis* and *Toxoplasma* DNA, RNA and protein contents were analysed by Laser Flow Cytometry. Microsurgery on *P. carinii* was made with ultrashort pulse laser microbeam system. Cysts being cut off 4 or 2 intrabodies had the ability to re-infect made. It suggested that cyst with 8 intrabodies was mature one, etc.

**Subject headings** opportunistic infections/immunology; disease models, animal; *toxoplasma*; *sporozoa*; biology

有些种群的寄生原虫, 对健康宿主往往呈隐性感染(suppressive infection), 不表现有临床症状, 又不易用常规方法检获病原体。当机体免疫功能低下或受累(immunocompromised host)时, 例如长期应用肾上腺皮质激素、抗癌药物或感染艾滋病毒(HIV), 该类寄生虫的增殖力和致病力显著增强, 可致患者死亡, 如肺孢子虫(*pneumocystis*)、隐孢子虫(*cryptosporidium*)、弓形虫(*toxoplasma*)

等, 被称为机会致病性寄生原虫(opportunistic pathogenetic parasitic protozoan)<sup>[1]</sup>。卡氏肺孢子虫是肺孢子虫肺炎(PCP)的病原体, 也是艾滋病(AIDS)病人的一个最常见和致命的并发症, 长期使用化疗或免疫抑制药而并发肺孢子虫肺炎, 是不少病者死亡的重要原因之一。据报道, 38%的肿瘤病人并发卡氏肺孢子虫肺炎, 艾滋病病人 60%并发卡氏肺孢子虫肺炎。隐孢子虫引起的隐孢子虫

① 国家自然科学基金基金、国家教委博士点科研基金、卫生部及校科研基金资助课题。参与该项研究工作的还有 徐秉锟、伍承英、陈发凯、陈有贵、罗超权、余海昕、郭步平等

病(cryptosporidiosis),不但是动物,而且也是公认的世界性分布的人类腹泻的病原体之一,尤其是儿童腹泻,因隐孢子虫病所致的在美国占5%~16%,在海地和非洲占30%~40%。19%因并发隐孢子虫病加速死亡,主要症状是腹泻。弓形虫感染引起弓形虫病(toxoplasmosis),是一种世界性分布的人兽共患病。人群感染率各地报道不等,有人认为在25%~50%之间,法国则高达90%。孕妇在妊娠期感染可通过胎盘感染胎儿引起流产、死胎、早产、胎儿畸形等不良后果。所以在奥地利、法国和德国等国家通常进行孕妇弓形虫感染的常规检查,一经发现阳性便停止妊娠或作治疗处理。获得性弓形虫病的表现更为复杂,可出现全身性多系统多脏器损害。我们自1979年开始,先后对弓形虫、卡氏肺孢子虫及隐孢子虫进行了一系列研究。

## 1 病原体的分离纯化及动物模型的建立

为了对病原体进行系统的生物学特性,获得纯品系的虫株和收集丰富的虫体材料,建立动物模型是非常重要的。为了抗原的制备及进行生物化学和分子生物学等研究,对虫体的纯化,去除宿主细胞和杂质又是不可缺少的环节。

用人源隐孢子虫卵囊,感染免疫抑制和正常N1H小白鼠,结果小鼠全部感染,潜伏期为3~7d,感染后13d小鼠排卵囊最多,直至30d后全部消失,而免疫抑制组排卵囊量仍维持较高水平。过去国内外为了维持动物模型,采取定期皮下注射免疫抑制剂的方法,使实验动物免疫功能下降,但该方法容易损伤皮肤引起感染,而通过饮水中加药的方法(即饮水中地塞米松1mg、四环素1g、白糖50g),较方便地建立起免疫抑制小鼠模型,方法简便,药物慢性摄入使其浓度长期维持在一定水平,延长了模型存在时间。分离纯化是将粪样材料水洗,经细铜网过滤,然后经二层纱布过滤,滤液经1000r/min离心(800型, $r=80\text{ mm}$ )10min收集沉淀,加 $w$ (重铬酸钾)=2.5%4℃保存。预处理的粪样材料进一步纯化通过4种方法,即硫酸锌漂浮—耐酸滤过漏过法、蔗糖梯度离心法、蔗糖漂浮法及淋巴细胞分离液离心法进行比较,结果显示硫酸锌漂浮—耐酸滤过漏斗法,具有操作简便、经济、纯化好的特点,杂质少、回收率高、卵囊形态结构无变化等

优点。该法是将处理粪样材料5mL加入装有45mL  $w$ (ZnSO<sub>4</sub>)=37%的玻璃离心管中混匀,1200r/min 10min离心(800型, $r=80\text{ mm}$ ),吸上层液于G3耐酸滤过漏斗中,用负压器抽滤,滤液用生理盐水离心洗涤3次,收集沉淀。用血细胞计数板计算分离前后之卵囊,计算回收率,镜检纯度<sup>[4]</sup>。任何株别的大白鼠,只要给予考的松类药物都会发生卡氏肺孢子虫肺炎(pneumocystis carinii pneumonia, PCP),而把人或鼠肺组织匀浆内卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*, P. c)接种到裸小鼠可使其发病,无需给予考的松类药物。在鼠诱发PCP基础上,进行了裸小鼠P. c感染实验研究。用醋酸考的松处理的Wistar大鼠,4~5周后所获得的肺部P. c感染,经确证有P. c的肺组织制成匀浆,每只裸小鼠接种含虫肺匀浆0.05mL于肺双侧,包囊数为(4~6)×10<sup>3</sup>个。接种后6周剖检的裸小鼠肺组织外观呈红色,略为肿胀。将肺匀浆用Ficoll-Urografin密度梯度离心法从肺组织分离纯化虫体<sup>[3]</sup>。

分离弓形虫一般都是按常规将作虫体分离的组织加生理盐水磨成匀浆(若为体液则免)后腹腔内接种小白鼠。我们曾在2例患者的后颈淋巴结分离到两株弓形虫(ZS1和ZS2)。以往保种是取含弓形虫的小鼠腹水,每隔4~7d接种未感染的小白鼠,此法麻烦且浪费动物。现多数用小白鼠腹水(含速殖子)加保护液后,置液氮罐内保存,待需作实验时取出复苏,再腹腔内接种小白鼠<sup>[4,5]</sup>。Ficoll-Urografin密度梯度离心是我们用于纯化卡氏肺孢子虫和弓形虫的方法。吸取5mL含虫及杂质的悬液加入离心管内,用弯头吸管从悬浮液底部加入Ficoll-Urografin液5mL,800r/min,8min离心后加速至2000r/min,10min,管中形成3层,上层为细胞碎片,中层为虫体,底层为细胞凝块,用弯头吸管收集中层虫体,收获率可达99.3%,活性和纯度达到99%以上<sup>[6]</sup>。

## 2 抗原抗体及基因检测

弓形虫感染靠检查病原体诊断不易成功。血清学检查弓形虫特异性抗体及循环抗原对诊断弓形虫感染有重要的参考价值。各种血清学方法都有其特点,应是掌握其特点及弓形虫在宿主内的规律去判断其对诊断的意义。以金葡菌A蛋白酶联免疫吸附试验(SPA-ELISA)和间接血凝试验

(IHA)检测实验感染兔。弓形虫感染兔(腹腔注射速殖子)后第4天,在血清中测到抗体(IgG),以后逐渐升高,至第7天全部兔血清均呈阳性反应,第35天达到高峰,此后抗体水平逐渐下降。而IHA则在感染后第10天出现阳性,至第21天全部阳性,第49天才出现高峰,以后滴度下降。但二种方法在90d后,仍可测出高滴度抗体。应用SPA-ELISA及IHA检测人血清202份,结果SPA-ELISA的阳性率8.42%,IHA的阳性率为6.84%,二法结果,基本相似。实验性腹腔注射弓形虫速殖子感染家兔51只,进行药物治疗。在感染后的第3周,药物治疗后的第2周,用IHA及SPA-ELISA检查血清抗体(IgG)均呈阳性反应。治疗后的第6周,血清抗体呈上升趋势,直至9~10周抗体滴度缓慢下降,治疗后20周直至36周血清抗体基本保持稳定水平,并无阴转迹象出现。从实验结果显示,药物治疗后很长时间内抗体仍保持很高水平,在疗程期间内无出现抗体水平下降的现象,以抗弓形虫治疗后抗体滴度下降或阴转作为判断疗效是不可靠的<sup>[7,8]</sup>。由于IgM抗体是在血清中早期出现,而且停留时间短,所以检测IgM抗体被用于多种疾病的早期诊断。因此,检测IgM对弓形虫感染的早期诊断的价值的有关研究得到重视。国内已有间接荧光试验(IFA)、IHA及ELISA等方法检测IgM,进口试剂盒双夹心法酶联吸附试验(DS-ELISA),该法步骤多,影响因素也多。我们采用直接捕获法酶联免疫吸附试验(D-ELISA),直接用酶标记弓形虫抗原,简化步骤,比DS-ELISA法灵敏度高。用二种方法检测样本1053份,D-ELISA检查DS-ELISA法阴性血清时出现2份阳性,而D-ELISA检查阴性的血清再用DS-ELISA法检测仍为阴性<sup>[9]</sup>。血清抗体在宿主体内的时间长,而IgM抗体持续时间短,且在免疫缺陷病人可能测不到抗体,因此检测循环抗原又是一个被注意的目标。为了探讨检测循环抗原的诊断价值,首先应用竞争抑制酶联免疫吸附试验(I-ELISA)对急性实验感染弓形虫兔作检测循环抗体(CA)消长规律,结果表明,兔受感染后第1天便可测到CA,阳性率为64.7%,第4天达到100%阳性,而且滴度很快升高,第13天达到最高峰,随后很快下降。直到第60天5/7兔转阴,余2只死亡。轻度感染兔CA高峰出现在第10天,并很快下降,直至第90天后则全部阴性。用此法检测血吸虫及旋毛虫感染血清

均无交叉反应。同时使用ELISA法检测弓形虫抗体(Ab)IgG,感染后第4天开始出现阳性,第7天100%阳性,第35天抗体达高峰,此后下降,但在第90天后仍可测到高滴度的抗体。实验表明CA检测对弓形虫早期感染具有高的诊断价值<sup>[10]</sup>。

聚合酶链式反应(PCR)检测DNA在疾病诊断上的应用受到越来越多的重视。作为ToRCH综合症的主要病因弓形虫感染的诊断也得到注意。我们根据Cristina(1991)克隆的RH株TGR片段设计和合成一对引物,长度为20bp的寡核苷酸引物,扩增靶序列长度为778bp,建立了聚合酶链反应技术检测弓形虫核酸的方法。引物I:5'-AT-ACGAGATCGGCACTCTCA-3';引物II:5'-CT-GCAGGCTGTGTCAATGTC-3'。检测7株弓形虫,均出现特异扩增带,而检测恶性疟原虫、卡氏肺孢子虫、杜氏利什曼原虫、日本血吸虫、丝虫、大肠杆菌及巨细胞病毒的DNA均未出现扩增带。扩增产物用地高辛素标记作探针,与以上出现特异扩增条带的DNA模板能斑点杂交,而与无扩增带的模板DNA无斑点杂交。结果表明,该引物具有高度保守性和特异性,可以测到1pg弓形虫DNA<sup>[11]</sup>。卡氏肺孢子虫肺炎,往往是免疫功能低下,特别是AIDS病人死亡的重要原因之一。在国外60%的艾滋病人、38%肿瘤病人并发此病。国内零星报道了一些病例。目前国内外对此病的诊断,主要靠组织活检,辅以免疫荧光查痰、ELISA查痰、血检等方法。为了建立安全、简便的诊断方法,应用PCR方法在实验大鼠肺组织、支气管灌洗液中检出卡氏肺孢子虫DNA,初步探讨PCR诊断的可能性。为此,取自卡氏肺孢子虫线粒体核糖体RNA的大亚基上二段保守序列,合成引物I.PAZ102E:5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3';和引物II.PAZ102H:5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3';引物扩增产物长度为346bp。使用二引物,以PCR扩增技术检测卡氏肺孢子虫感染大鼠的肺组织、支气管灌洗液和外周血病原体DNA,并和肺印片结果比较。共检测实验感染鼠34只及正常大鼠6只,肺印片阳性为18例,PCR检测肺组织样品出现特异性扩增条带为19例,检测支气管灌洗液样品出现特异扩增条带为16例,外周血样品全部阴性。从实验结果表明PCR用于检测卡氏肺孢子虫病原体DNA有好的应用前景<sup>[12]</sup>。隐孢子虫病的诊断普遍采用粪便涂片染色显微镜检查方法,但

因卵囊少而检出率低,易漏检。在广州检查 200 例腹泻婴儿,只查到 4 例隐孢子虫感染<sup>[13]</sup>。PCR 和探针技术是否适合隐孢子虫病检测,对此也进行了探索。采用 Laxer 克隆的 *C. Parvum* 核酸序列片段 (PHC1) 设计、合成:引物 I. 5'-GGAAGTCC-GAGTTTGATCC'-3'; 引物 II. 5'-TCATATGCCT-TATTGAGTAT-3'。进行 PCR 检测,以溶组织阿米巴包囊、蓝氏贾第虫包囊、弓形虫、恶性疟原虫、日本血吸虫、大肠杆菌、痢疾杆菌、人血、牛血、鼠血、隐孢子虫卵囊材料所提 DNA 作模板,隐孢子虫引物作 PCR、地高辛素标记探针及斑点杂交试验。36 份卵囊阳性小鼠粪便进行 PCR 检测,结果全部阳性。核酸探针杂交 33 份阳性,3 份阴性,经 PCR 后再作核酸探针杂交,结果转为阳性。18 份阴性小鼠粪便,用探针检测全部阴性;PCR 检测 17 份阴性,一份阳性。结果显示 PCR 和探针技术具有敏感和特异的诊断价值<sup>[14]</sup>。

### 3 生物学特性

为鉴定我们分离的人株弓形虫提供佐证,进行了一些生物学特性的实验。小白鼠腹腔接种虫株 ZS1 后,54.0% 在 1 周内死亡,死亡高峰在第 5~6 天;小白鼠感染后第 1~5 天内每天灌服乙胺嘧啶 5 mg 可减少死亡,少数成为慢性感染可在脑组织查到包囊。用包囊喂小白鼠,腹腔注射、皮内或肌肉注射速殖子,速殖子囊液滴鼻、眼均可感染;速殖子囊液或急性感染鼠喂猫,在第 18 天的猫粪中可找到卵囊,包囊喂猫在第 4 天粪中出现卵囊。卵囊在室温(28~32 °C)发育迅速,24 h 后便发育为 2 个包囊,每个包囊内含 4 个子孢子。成熟卵囊喂小白鼠,一般在第 7 天的腹腔渗出液中找到速殖子。将感染小猫(粪便中已有卵囊后第 3 天)杀死,在猫小肠绒毛找到裂殖体、大小配子体及早期卵囊。速殖子在体外培养的兔睾丸纤维母细胞等有核细胞单层培养管中发育繁殖,在 37 °C,一星期左右细胞崩溃脱落,温度降低可延长崩溃时间。用组织细胞染色法及酶处理作对照,对细胞进行甲绿-派若宁染色可发现受感染有核细胞质比未感染的细胞质明显增强,甚至出现鲜红色小颗粒,推测是弓形虫侵入后引起宿主细胞代谢的改变。宿主细胞并非简单的提供繁殖场所,也提供所需嘌呤类物质。速殖子用扫描及透射电镜可见类锥体、膜下微管及细

胞核等<sup>[15~19]</sup>。针对弓形虫株间毒性差异的存在能否在分子水平上得到反映问题,我们曾试用限制性内切酶谱分析法,探讨限制性片段长度差异(RFLDs)。弓形虫株基因组 DNA 酶切后电泳呈涂布状。按 10 U/ $\mu$ g DNA 用 *EcoR* I 分别切 1  $\mu$ g、2  $\mu$ g、5  $\mu$ g, RH 株弓形虫基因组 DNA,显示 3 种含量的 DNA 酶切所观察到带的清晰度基本一致。*EcoR* I 酶切图谱上可见 1 条带;*Bam* HI 酶切可见 4 条强弱不同的带;*Hind* III 酶切可见 3 条较淡的带;*Sal* I、*Hinf* I 及 *Hae* II 酶切未见明显带型。4 株弓形虫基因组 DNA 用 3 种酶切,未能反映出各虫株特异差别<sup>[20]</sup>。在分析弓形虫限制性内切酶图谱基础上,又试用随机引物聚合酶链反应,鉴别弓形虫株间差异。实验根据 M13 噬菌体已知部分核酸序列,设计和合成了 3 条引物,在一定条件下扩增 RH、ZS1、ZS2 和 SH-14 株弓形虫基因组 DNA,扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分带,结果显示 4 株受检的弓形虫株有株间带型差异。各株扩增带型数目及拷贝数存在差别<sup>[21]</sup>。但由于抗原多肽在各株间并不十分规律,目前尚难确定哪些多肽可作为定型标准。

试用激光流式细胞仪对 RH 株弓形虫速殖子群体(10 000 个)DNA、蛋白质进行分析,结果显示 DNA、蛋白质呈现相同分布规律有两个群体,两个峰值,表明速殖子群体在小白鼠腹腔内以两个时相存在。用显微图象系统对其形态特征(虫体投影面积、投影图长、长轴径、宽径及核面积、核周长、最大径、最小径)进行定量测定。结果显示在样本 1 000 个条件下,只能反映出虫体各项形态特征参数离散程度大,说明虫体大小不均匀,变化范围大,但不反映群体形态学特征<sup>[22]</sup>。经梯度离心得到纯净活体 P. c 包囊,证明包囊能发育为滋养体阶段。用激光微束系统对含 8 个子孢子的包囊施行显微外科手术,切除包囊内的 4 个或 2 个子孢子,再把术后包囊接种裸小鼠,表明术后包囊仍具有感染力,仍能发育为滋养体及含 8 个子孢子的包囊,认为 8 个子孢子的包囊为成熟包囊。为了研究 P. c 在鼠体内生长发育动态,选择大鼠感染后 3 个时间组(第 30、46、58 天)追踪,所获 DNA、RNA、蛋白质含量无论直方图,还是散点图都是一致的,无随时间变化的规律。这一实验结果表明,3 个时间组的 P. c 包囊蛋白质、RNA、DNA 含量和虫体内孢子数均稳定,包囊大小均匀,结合光镜观察,两者结果吻

合。结果说明包囊处于相对静止状态,无任何增殖及DNA、RNA复制。包囊参与生活史循环时,孢子从包囊逸出后,发育为滋养体。包囊前期至成熟包囊,这一时间极短。因此,光镜下所见均为含8个子孢子包囊。随着时间的延长,组织内包囊将越来越多,有再积累现象,也说明成熟包囊只有极少数参与生活史发育的滋养体到包囊的循环。估计大部分包囊除部分经呼吸道排出外,部分处于静止或自行消亡,从种群动态上看P. c与两种酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, S. c和*Schizosaccharomyces octosporus*, S. o)差别较大<sup>[23]</sup>。

机会致病寄生原虫,国内外都做了大量的研究,我们也参与了该项工作。在病原体分离纯化、生物学特性、抗原抗体及基因检测,从基础至应用研究方面均取得一些进展。但仍有很多问题需要作进一步的深入。如弓形虫存在株间毒性差异的分子基础,国内分离株与国际标准株是否同源性及疫苗的研制。弓形虫速殖子入侵宿主细胞受很多因素的影响,特别是速殖子分泌物的作用起着决定性作用,分泌产物的分子分析及其功能,对阐明弓形虫的入侵的机理、致病机理及防治都有积极的意义。卡氏肺孢子虫的传播途径,在免疫功能低下时的大白鼠等宿主产生肺孢子虫的机理,为何没有免疫功能的裸小鼠不产生肺孢子虫,肺孢子虫是否真正属寄生虫等,都是值得探讨的课题。此外,3种原虫的实验室诊断试验都是成功的,但因各种条件因素的影响,真正的广泛使用上尚需进一步完善,在现场实践检验仍要做更多的工作<sup>[24]</sup>。

#### 参 考 文 献

- 1 徐秉锟. 人体寄生虫学. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 1989. 5
- 2 郭步平, 连德润. 隐孢子虫卵囊分离提纯方法研究. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(1): 34
- 3 陈发凯, 徐秉锟. 卡氏肺孢子虫感染裸小鼠实验研究. 中国人兽共患病杂志, 1992, 8(5): 20
- 4 徐秉锟, 刘达宏, 伍承英, 等. 广东弓形虫病一例初报. 广东寄生虫学会年报, 1979, 1: 86
- 5 陈观今, 徐秉锟, 刘达宏, 等. 我国人体弓形虫感染. 新医学, 1983, 14(12): 657
- 6 郑焕钦, 陈发凯, 陈观今, 等. 一种新的弓形虫速殖子

- 纯化方法. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6(2): 146
- 7 陈观今, 郭小华, 郑焕钦, 等. 弓形虫感染抗体检测的研究. 广东寄生虫学会年报, 1993, 14~15: 39
- 8 陈有贵, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫感染家兔的药物治疗及其血清抗体动态变化. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(6): 88
- 9 郭小华, 林 勇, 陈观今, 等. 弓形虫IgM抗体检测方法的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 1994, 1(3): 21
- 10 郭小华, 陈观今, 徐秉锟, 等. 弓形虫感染的循环抗原检测的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9(3): 128
- 11 韦相才, 陈观今, 罗超权, 等. PCR检测弓形虫核酸的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 1994, 1(2): 10
- 12 余海昕, 邝丽贤, 刘启文, 等. PCR扩增技术检测卡氏肺孢子虫DNA. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(4): 8
- 13 连德润, 徐秉锟, 陈发凯, 等. 广州地区婴幼儿隐孢子虫病. 广东寄生虫学会年报, 1991, 11~13: 22
- 14 郭步平, 连德润. 聚合酶链反应和核酸探针技术应用于隐孢子虫检测的研究. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(2): 33
- 15 陈观今, 刘达宏, 伍承英, 等. 人体弓形虫动物感染试验. 广东寄生虫学会年报, 1980, 2: 112
- 16 刘达宏, 陈观今, 伍承英, 等. 人体弓形虫在猫肠内发育的实验观察. 广东寄生虫学会年报, 1980, 2: 116
- 17 陈观今, 徐秉锟, 刘达宏, 等. 弓形虫感染的宿主细胞组织化学改变的初步探讨. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 1983, 1(4): 12
- 18 陈观今, 刘达宏, 伍承英, 等. 弓形虫速殖子感染中间宿主途径. 广东寄生虫学会年报, 1985, 7: 44
- 19 徐秉锟, 陈观今, 刘达宏, 等. 我国人体弓形虫株型及生物学特性. 中国第三届原生动物学会学术讨论会论文汇编, 武汉: 中国原生动物学会编, 1985. 45
- 20 陈观今, 徐秉锟, 刘达宏, 等. 四株弓形虫基因组DNA限制性内切酶图谱分析. 广东寄生虫学会年报, 1991, 11~13: 5
- 21 陈观今, 韦相才, 罗超权, 等. 随机引物PCR鉴别弓形虫株的研究. 寄生虫与医学昆虫学报, 1994, 1(2): 6
- 22 陈观今, 陈发凯, 郑焕钦, 等. 弓形虫DNA蛋白质含量及形态特征测定的生物学意义. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(1): 5
- 23 陈发凯, 徐秉锟. 卡氏肺孢子虫个体发育与种群动力学研究. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9(3): 21
- 24 陈观今. 弓形虫研究十六年. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(6): 65

(1998-06-26 收稿 1998-07-06 修回)