

广西凭祥一株食蟹猴疟原虫生物学特性的研究

黄亚铭 傅伟忠 王槐芳 韦海艳 李玉英 唐进洪

广西壮族自治区寄生虫病防治研究所 南宁 530021

提要 目的: 观察 1991 年 10 月在中越边境广西凭祥购买的 1 只野生食蟹猴(M 4) 体内发现的疟原虫。方法: 将疟原虫血传给健康的切脾熊猴(M 6), 在猴体内的疟原虫配子体在 64 个/100WBC 时, 给大劣按蚊叮咬感染, 确定孢子增殖期, 当蚊唾腺发现子孢子时, 阳性蚊叮咬健康的熊猴(M 5) 后第 8 d 开始采血观察, 确定红前期的时间。血内发现疟原虫后开始每 4 h 采血 1 次的定时观察, 确定红内期裂体增殖周期及红内期各期疟原虫形态特征。结果: 该株猴疟原虫的孢子增殖期为 11 d, 红前期为 8 d, 红内期的裂体增殖周期为 48 h。早晚期滋养体与人间日疟原虫形态相似, 被晚期滋养体寄生的红细胞明显胀大, 阿米巴样活动明显, 可见薛氏小点, 成熟的裂殖体内通常可见裂殖子 10—15 个。结论: 试验结果证实, 该株猴疟原虫为食蟹猴疟原虫并定名为 CVH 株(*Plasmodium cynanologi* CVH)。

关键词 食蟹猴疟原虫 大劣按蚊 猴疟食蟹猴

自从 1907 年 Mayer 首次在爪哇的食蟹猴体内发现 1 株与人间日疟十分相似的疟原虫并定名为食蟹猴疟原虫 (*Plasmodium cynanologi*) 以来, 到目前为止全世界先后在 8 个国家和地区发现有食蟹猴疟原虫, 包括我国的台湾省^[1-6]。但我国大陆自然界野生猴体内未见报道食蟹猴疟原虫。70 年代我国从越南引进 1 株猴疟, 经张家坝(1980)等^[7]鉴定后确定为 1 株食蟹猴疟原虫, 但该株猴疟最初发现时的猴种及地理位置等资料不详^[2,6]。1991 年 10 月我室从广西凭祥购买 5 只野生猴, 在其中 1 只猴(M 4) 体内发现疟原虫。该猴当时的疟疾间接荧光抗体试验(IFAT) 抗体滴度为 1:280。经广西野生动物保护所对该猴的鉴定确认为 1 只食蟹猴(*Macaca irus*), 但该猴的具体捕捉地点不详。我们对该株猴疟原虫进行了血传及蚊传试验。

材料和方法

实验动物

熊猴 (*Macaca assamensis*) 2 只 (M 5, M 6) 购自广西凭祥, 体重 3- 4 kg, 试验前反复血检及 IFAT 检查, 证实无孢子虫感染。将熊猴(M 6) 在无菌条件下切除脾脏, 作为血液

传染猴备用。未切脾熊猴(M 5) 用于蚊传备用。

实验蚊种

大劣按蚊 (*Anopheles dirus*) 从海南岛引进, 在温度为 26 ± 1 和相对湿度为 75% ± 5%, 光照时间为 12-12 h 实验室中饲养。

疟原虫红内期形态及孢子增殖期观察方法

从自然感染猴 M 4 静脉取血 5 ml 抗凝, 静脉注射给切脾熊猴(M 6), 血传后 d 3 开始每天采血 2 次, 吉氏染色镜检观察, 于血传后 d 9 当猴 M 6 配子体计数在 64 个/100WBC 时给大劣按蚊叮咬。随后将吸血按蚊捕出单独分笼饲养。蚊吸血后 d 5 开始逐日解剖蚊胃观察, d 10 开始解剖唾腺观察子孢子进腺时间, d 13 解剖一定数量的按蚊唾腺计算腺感染率, 在大劣按蚊吸血后 d 14 叮咬未切脾的健康熊猴(M 5)。

红前期及红内期裂体增殖周期观察方法

子孢子阳性的大劣按蚊叮咬未切脾的健康熊猴(M 5) 后 d 8 开始每天 2 次采血镜检, 以确定红前期的时间。血检发现原虫后即开

* 国家自然科学基金资助项目(39260067)

始每 4 h 采血 1 次的定时观察, 并每天进行白细胞计数。薄血膜计数每 100 白细胞中红内期各期的疟原虫数, 推算出每微升血液中的疟原虫数, 确定红内期裂体增殖周期。

结 果

红细胞内裂体增殖周期

经大劣按蚊叮咬而感染的熊猴(M5)于 d 8 血内查见很少量的疟原虫, 本次试验结果红前期为 d 8(发现原虫的准确时间为 7 d 16 h)。自发现疟原虫起 d 14 内, 血液中的环状体周期性变化不规则, 而在 d 14 后环状体呈规律性的增高和降低。原虫的裂体增殖周期为 48 h(图 1)。

红细胞内期疟原虫形态

环状体的大小为正常红细胞图 2 1 直径的 1/4, 多数为单核。但在切脾猴(M6)的血液内红细胞原虫感染率较高的情况下常见 2—3 个环状体寄生于 1 个红细胞内, 偶见 3 个双核环状体在 1 个红细胞内。随着环状体的增大受感染红细胞也肿大, 在染色偏酸的血片中易见薛氏点。

早期滋养体的原虫细胞浆阿米巴状活动明显。大滋养体核增大, 胞浆明显增多, 受感染的红细胞增大变形, 薛氏小点更为明显。(图 2 2—10)

成熟的裂殖体通常为 10—15 个裂殖子呈不规则排列于红细胞内, 偶见 20 个裂殖子在一个红细胞内, 可见疟色素(图 2 13—18)。

配子体呈圆形或椭圆形, 虫体充满胀大的红细胞, 疟色素多且均匀分布于原虫的胞浆部分(图 2 19—21)。

孢子增殖期

大劣按蚊叮咬经血传感染的猴 M 6, 在吸血后 d 6 解剖 3 只蚊胃观察卵囊, 结果全部为阳性, d 7—d 9 每天解剖 7—8 只按蚊胃, 全部为阳性, 蚊胃的卵囊感染度为 10—100 以上。第 d 10 卵囊开始分化, d 11 解剖

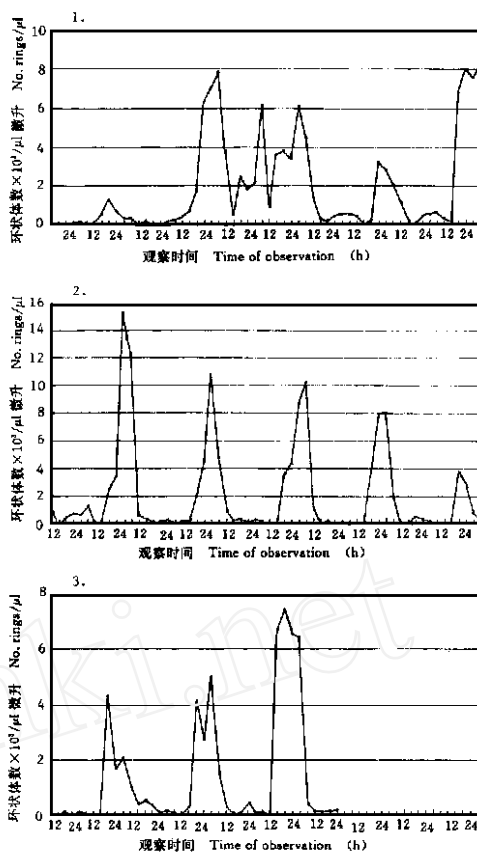


图 1 蚊传感染猴 M5 28 d 连续每 4 h 采血观察曲线, 原虫密度为环状体数/ μl

Fig 1 Parasitemia pattern of assamonsis monkey (M5) infected with *P. cynomolgi* basing on smears taken at 4-hour intervals through 28 days The continuous lines showing the level of parasitemia denote the number of parasites/ μl

蚊胃及唾腺见部分成熟的子孢子仍在胃壁上, 部分蚊的唾腺可见子孢子。d 13 解剖 12 只蚊, 唾腺全部阳性, 且均充满大量子孢子(图 2 22—24)。

讨 论

到目前为止, 全世界所发现的猴疟原虫裂体增殖周期为 48 h 的有 5 种, 即食蟹猴疟原虫, 柯氏疟原虫(*Plasmodium coatneyi*)、费氏疟原虫(*Plasmodium fieldi*)、脆弱疟原虫(*Plasmodium fragile*)及吼猴疟原虫(*Plasmodium simium*)^[7-10]。柯氏疟原虫红内期形态虽然与食蟹猴疟原虫非常相似, 但仍存在

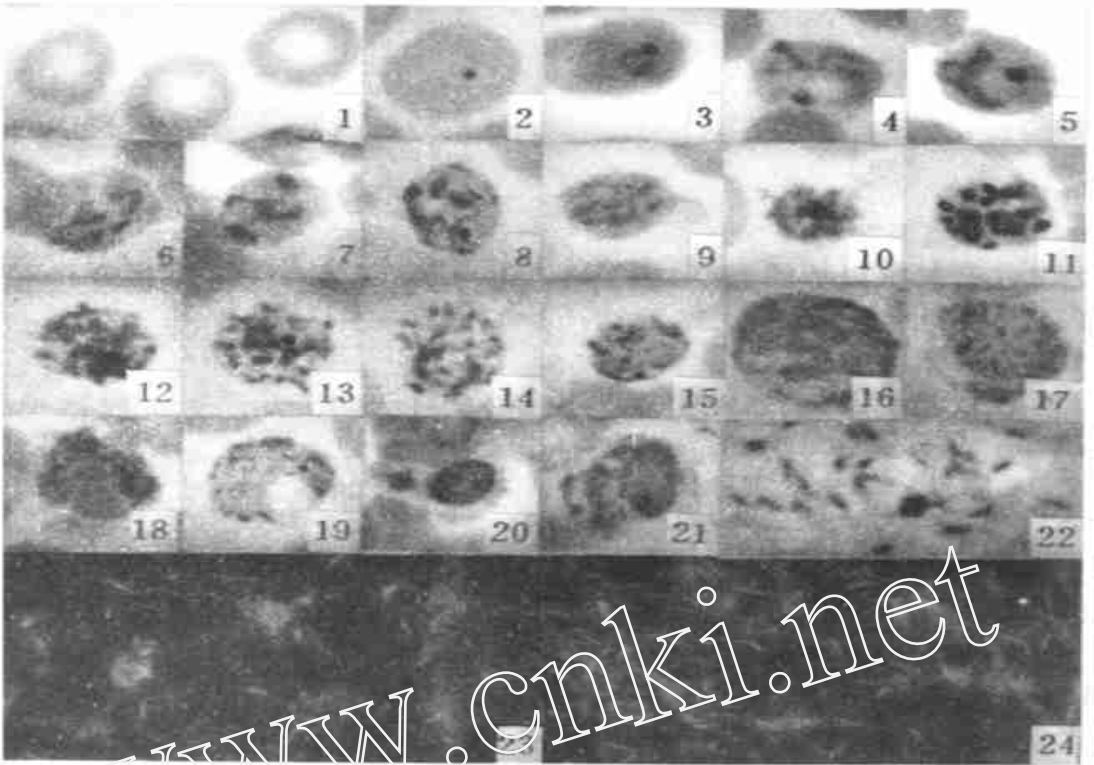


图 2 1 正常的食蟹猴红细胞 2- 3 环状体 4-7 滋养体 8-9 裂殖体前期 10-14 裂殖体 15 配子体前期 16-18 配子体♂ 19- 21 配子体 22 孢子子吉姆萨染色(40×5), 23- 24 孢子子吖啶橙染色(40×5)

Fig 2 1 Normal erythrocytes of irusmonkey 2-3 Young trophozoites (ring forms) 4-7 Trophozoites 8-9 Immature schizonts (Presegmenting stage) 10-14 Schizonts 15 Pregametocyte 16- 18 Gametocytes♂ 19- 21 Gametocytes 22 Sporozoites were stained with Giemsa (40×5) 23- 24 Sporozoites were stained with acridine orange(40×5)

明显的区别,如受感染红细胞一般不肿大,可见茂氏点(Maüer's dot),成熟的裂殖体内裂殖子平均数约 20 个,费氏猴疟原虫的滋养体呈圆形或蛋形,在裂殖体期受感染红细胞变得特别大,似卵型疟原虫。

从本文描述的猴疟原虫(M4)生物学特性来看,与张家坝(1980)^[7]年从越南引进的食蟹猴疟原虫鉴定结果及Bennett^[2-6]报道的东南亚食蟹猴疟原虫生物学特性相比较,其红内期阶段的各期原虫形态及裂体增殖周期等特征基本一致。将张家坝鉴定的食蟹猴疟原虫红内期抗原与这次新发现猴疟抗原做IFA-T比较,同时检测 116 人份间日疟病人血

清,其结果基本一致。两者猴疟的裂殖子表面抗原—1(MSA-1)的DNA序列分析初步结果显示,在核酸分子上存在差异。但是否可作为同种疟原虫不同地理株的鉴定依据,有待进一步研究。

关于孢子增殖期按蚊唾腺感染率问题,张家坝曾采用雷氏按蚊(*Anopheles L esterii*)和斯氏按蚊(*Anopheles S tephensi*)对食蟹猴疟原虫进行了感染观察^[7,10],结果唾腺孢子阳性率分别为 19.0%和 85%。王兴相^[11]曾采用雷氏按蚊、斯氏按蚊和大劣按蚊比较对食蟹猴疟原虫的易感性,结果大劣按蚊胃感染率为 100%,提示大劣按蚊对食蟹猴疟

原虫易感性较强,这与本文采用大劣按蚊感染观察结果基本一致。王兴相观察孢子进腺时间为 7.5 d, 我们的试验结果为 10 d 16 h, 此差异是试验条件所致或是株间差异,有待进一步研究。

本文结果提示,1991 年 10 月在广西凭祥购买的野生食蟹猴体内所发现的猴疟原虫初步定为 1 株食蟹猴疟原虫。为了区别于国外历年发现的几株食蟹猴疟原虫,将该猴疟原虫暂定为食蟹猴疟原虫 CVH 株 (*Plasmodium cynomolgi* CVH)。

本课题曾得到中国医学科学院基础医学研究所刘尔翔教授、中国预防医学科学院寄生虫病研究所张家坝教授的指导,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Boyd MF. Laboratory techniques for the study of simian malaria. *Malariaology* 第 1 版. 上海:上海万福书局, 1949. 539-541
- 2 Eyles DE. The species of simian malaria: taxonomy, morphology, life cycle and geographical distribution of the monkey species. *J Parasitol* 1963; 49: 866
- 3 Bennett GF, Warren M cW, Cheong WH. Biology of the simian malarial of Southeast Asia. II the susceptibility of some Malaysian mosquitoes to infection with five strains of *Plasmodium cynomolgi*. *J Parasitol* 1966; 52: 625
- 4 Bennett GF, Warren M cW, Cheong WH. Biology of the simian malarial of Southeast Asia. III Sporogony of the Cambodian strain of *Plasmodium cynomolgi*. *J Parasitol* 1966; 52: 632
- 5 Bennett GF, Warren M cW, Cheong WH. Biology of the simian malarial of Southeast Asia. IV Sporogony of four strains of *Plasmodium cynomolgi*. *J Parasitol* 1966; 52: 639
- 6 黄亚铭. 食蟹猴疟原虫的世界分布及研究进展. *中华预防医学杂志* 1994; 28: 49
- 7 张家坝, 黄在松, 郑善成, 等. 一种猴疟原虫的鉴定报告. *动物学报* 1980; 26: 140
- 8 Bruce-Chwatt L.J. 动物疟原虫. 基础疟疾学. 第 1 版. 成都: 成都科技大学出版社, 1992. 25
- 9 Eyles ED, Fong L Y, Warren M cW, et al. *Plasmodium coatneyi*, a new species of primate malaria from Malaya. *Am J Trop Med Hyg* 1962; 11: 597
- 10 张家坝, 黄文洲, 叶秀玉, 等. 食蟹猴疟原虫——斯氏按蚊系统猴模型的建立及应用于杀组织期抗疟药的实验研究. *中国医学科学院学报* 1982; 4: 119
- 11 王兴相, 胡友梅, 邓保忠. 我国保有的食蟹猴疟原虫的生物学特征及株型探讨. *寄生虫学与寄生虫病杂志* 1984; 2: 234

1994 年 4 月 20 日收稿 1996 年 6 月 6 日修回
(编辑: 任燕芬)

STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A SPECIES OF PLASMODIUM CYNOMOLGI IN PINGXIANG, GUANGXI

Huang Yam ing, Fu Weizhong, Wang Huaifang, Wei Haiyan, Li Yuying, Tang Jinhong
Guangxi Institute of Parasitic Diseases, Nanning 530021

ABSTRACT

AM: To observe the biological characteristics of a species of *Plasmodium cynomolgi* isolated from a wild-caught, naturally infected monkey *Macaca irus* (M4) at Pingxiang, Guangxi near the border between China and Vietnam in October 1991. **METHODS:** An uninfected splenectomized monkey (*Macaca assamensis*) M6 was inoculated iv with blood from M4. Nine days later, when M6 was found harboring gametocytes at a concentration of 64 per 100 leucocytes, M6 was exposed to the bite of uninfected *Anopheles dirus*. On day 14 after the level of sporozoites in the salivary gland of *An. dirus* reached a high peak, the infected *An. dirus* was allowed to bite M5, a healthy, uninfected monkey (*Macaca assamensis*). On day 8 following infection, blood was taken from M5 twice a day and examined for malaria parasites. **RESULTS:** In terms of the appearance of a few rings in blood, the incubation period is 8 days. At a temperature of about 26 °C and a relative humidity of 75%, oocysts

reached maturity on day 11, and the sporogony was 11 days. The young trophozoites of *Plasmodium cynanolti* were indistinguishable from those of *Plasmodium vivax*. The typical parasites were similar to other simian parasites of *Plasmodium cynanolti*. There were Schöffner's dots in infected erythrocytes. The schizogony occurred every 48 hours. The mature schizonts had a large number of merozoites, the number being 10-15. **CONCLUSION:** The malaria parasite described in the present paper was designated *Plasmodium cynanolti* CVH (China, Vietnam and Huang) strain.

Key words: *Plasmodium cynanolti*, *Anopheles dirus*, simian malaria, *Macaca irus*

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China

基本消灭血吸虫病后连续 10 年的监测结果

江苏省句容市卫生防疫站 句容 212400

蒋锡炳 倪林梅

句容市属山丘型血吸虫病流行区,已于 1978 年达到“基本消灭血吸虫病”。螺情下降 99.7%,人群血吸虫病感染率由 5% 下降到 1.2%。再用粪孵化查病,困难较多。我们于 1984-1993 年应用综合查病法检查血吸虫病。

对象和方法

1 对象

按流行村在册户口,凡年满 5 周岁以上,70 周岁以下的常住居民作为对象。

2 方法

2.1 血吸虫皮内试验(皮试)

按《血防手册》常规操作,新鲜成虫抗原均为江苏省血吸虫病研究所提供(批号:当年制备的有效抗原含蛋白量 200 μg/ml)。

2.2 环卵沉淀试验(环试)

冰冻干虫卵为江苏省血吸虫病研究所提供(批号:当年制备的与重感染兔血清反应的环沉率均在 45% ±),环沉率(COP) 1% 为阳性。

2.3 病史与体检

询问血吸虫病病史,肝剑突下 3.5 cm,为阳性,脾超过左季肋也为阳性。

结 果

10 年中,对全市 14 个乡镇(场)99 行政村和单位进行了查病。被检查村总人口 119 027 人,应检人口 99 290 人,占应查人数 83.4%,实际受检人数 93 927 人,平均受检率为 94.6%,其中无病史人群皮试 78 951 人,皮试阳性 8249 人,阳性率 10.5%,皮试阳性者再作环试,COP 1% 435 人,阳性率 5.3%;过去有病史病人 14 976 人作环试,COP 1% 643 人,阳性率 4.3%;体检结果:无病史皮试阳性者肝脏左叶剑下 3.5 cm 1 025 人;占 12.4% (1 025/8 249),脾脏肿大超过左季肋者 31 人,占 0.4% (31/8 249);有过去病史病人肝脏左叶剑下 3.5 cm 2 920 人,占 19.5% (2 920/14 926),脾脏超过左季肋者 142 人,占 0.9% (142/14 976);左下腹能触及索状肿块者 36 人。基本消灭血吸虫病地区连续 10 年的综合查病,共做环试 23 225 人,查出环试阳性 1 078,阳性率 4.6%,COP 3% 的 515 人,定为血吸虫病病人,占整个实检人群的 0.6% (515/93 927),占普查乡镇总人口的 0.4% (515/11 902),此外,对 COP 1% - 2% 的 563 人进行扩大治疗。

1995 年 10 月 4 日收稿 1996 年 4 月 25 日修回

(编辑:任燕芬)