

# 福建弓形體株生物學性狀的研究

于恩庶 陳黛西

(福建省流行病研究所)

關於在我國發現弓形體 (*Toxoplasma*) 的經過,已於前文報告過<sup>[1]</sup>,爲了進一步闡明我國發現的弓形體特性及其與人類疾病的關係,我們對弓形體的生物學性狀,作了幾方面的研究。

關於弓形體生物學性狀,在文獻上有零星記載<sup>[2-5]</sup>,但不全面,特別在抵抗力及各種理化因素的關係上,更爲少見。爲了實際工作上的需要和對弓形體本態的進一步瞭解,進行了一系列的實驗研究。

本文裏所使用的弓形體株是 C<sub>14</sub> 株,從貓分離後,用小白鼠腹腔法傳代保存,每隔 3—4 天傳代一次;其他性狀見前文報告<sup>[1]</sup>。

## 研究結果及方法

### (一) 雞胚胎培養特性

弓形體在生活的雞胚胎上發育是非常良好的。我們採用 9—10 日齡雞胚,按絨毛尿

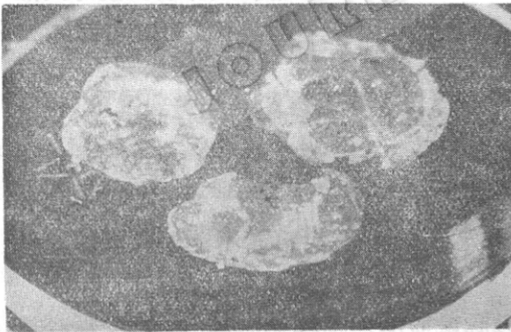


圖 1

囊膜接種方法接種,第一代用小白鼠腹腔滲出液 1:20 鹽水懸液 0.1—0.2 毫升接種,二代後用尿囊膜 1:10 懸液。種完後,置於 35—37°C 孵箱,經過 6—7 天,則見弓形體在雞胚上發育良好(見圖 1)。

圖 1 是接種弓形體 7 天後的雞胚。可以看到絨毛尿囊膜呈瀰漫性的肥厚,水腫,混濁。弓形體在血管的周圍發育最爲良好,形成結節樣的病灶——呈現單個的、圓形的污

灰白色的直徑爲 1—2 毫米的病灶。接種弓形體量過多時,病灶互相融合,形成一片,當中或是呈灰黃色的壞死點。

以絨毛尿囊膜的病變組織或是雞胚的肝、腦做壓印標本,以姬姆薩氏染色,可以檢出大量的弓形體。又經卵黃囊接種時,絨毛尿囊膜同樣出現溷濁、肥厚、水腫等病變和塗片檢有大量弓形體。

由於弓形體在雞胚胎上有高度的適應性,目前已被用來製造補體結合反應和皮膚反應抗原並獲得良好成績。

生長在雞胚上的弓形體,在低溫的狀況下,可以在一個不短的時間內,不喪失其感染

1957 年 3 月 26 日收到。

力。我們把雞胚以上述的方法接種，置於孵箱 7 天後轉移於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。一星期檢查兩次，每次取出雞胚一個，分別把尿囊膜（取病變最嚴重部分），雞胚的腦、肝分別研磨後，和以生理食鹽水製成 10% 混懸液，各注射小白鼠腹腔內兩頭（0.5 毫升）。逐日觀察接種動物之病態，遇有死亡者立即給予解剖，觀察其病理變化，並以腹壁粘膜做抹片，姬姆薩氏法染色後鏡檢，檢查弓形體。

實驗結果發現了在  $4^{\circ}\text{C}$  保存了 14 天的弓形體感染雞胚，對小白鼠尚有明顯的致病性，其中尤以雞胚肝臟，是維持弓形體生活力最好的溫床。比 14 天更長的時間，正在繼續試驗中。

## (二) 對大白鼠致病性試驗

在前文報告裏<sup>[1]</sup>已經證明了我們分離的弓形體對下列動物有致病性：家兔（腦內接種、腹腔接種），豚鼠（腦內、腹腔），地鼠（腦內、腹腔、鼻飼、皮下），雞（腦內、鼻飼），鴿子（腦內、鼻飼、皮下），小白鼠（腹腔、腦內、皮內、皮下、靜脈內、鼻飼、外傷塗擦）。這種對各種不同動物都有高度的致病性，是弓形體的很多主要特徵之一。

但是，當用大量弓形體做腦內接種大白鼠時並不能使其死亡。對於這個問題，我們曾經反覆地進行過三次試驗。

第一次試驗： $C_{14}$  株小白鼠傳代小白鼠腹腔滲出液 1:10 鹽水懸液，0.5 毫升注射大白鼠腹腔 3 頭。

第二次試驗：用同樣鹽水懸液經腦內 0.1 毫升注射大白鼠 3 頭。兩組動物，觀察一個月後，動物仍然生存。

第三次試驗：用同樣懸液 0.2 毫升經腦內注射成年健康的大白鼠 3 頭，接種後每間隔兩週，解剖 1 頭觀察其病變，並採其腦組織，以生理食鹽水製成 10% 懸液，在小白鼠身上進行次代動物接種試驗。

試驗結果證明弓形體雖然不能使大白鼠死亡，但是能在大白鼠腦內保存到 6 週，比這更長的時間，正在繼續做進一步的試驗。

## (三) 生活力試驗

乾燥與滲透壓的變化，可以促成弓形體的迅速死亡。因此，弓形體不能保存於快速冰凍乾燥的狀態。

我們曾用傳代的小白鼠腦組織、肝脾組織，以豚鼠血清為稀釋劑做成的乾種，保存於  $4^{\circ}\text{C}$ ，每隔兩週，取出各一管，加無菌生理食鹽水稀釋後，注射小白鼠腹腔 3 頭。結果證明乾燥冰凍保存下的弓形體對小白鼠已喪失了感染力。

同樣地，我們亦企圖把感染有弓形體的小白鼠肝、脾組織用 50% 中性甘油來保存。實驗結果亦證明保存於 50% 中性甘油裏的弓形體對小白鼠沒有感染力。

上述試驗的結果和文獻上的報告<sup>[3]</sup>是一致的。

此外我們進行了弓形體鹽水懸液在各種不同溫度下保存試驗。我們用  $C_{14}$  株小白鼠腹腔傳代頻死小白鼠腹腔滲出液，用生理食鹽水稀釋成 10% 懸液。把上懸液分裝於華氏管中（每管約 2 毫升），分別保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  及室溫（ $25-28^{\circ}\text{C}$ ），定期檢查，每次各種溫度取出一管，接種小白鼠腹腔 2 頭（0.5 毫升）。

本實驗曾先後進行過兩次，結果大體上是一致的，表 1 係第二次試驗結果。

表1 弓形體生理食鹽水懸液在各種溫度保存比較

接種次數	保存日數 (天)	4°C 保 存			-20°C 保 存			室 溫 保 存		
		平均死亡 日數(天)	病變	抹片	平均死亡 日數(天)	病變	抹片	平均死亡 日數(天)	病變	抹片
1	0	4	典型	+	4	典型	+	4	典型	+
2	3	5.5	典型	+	○			7.5	典型	+
3	6	8.0	典型	+	○			8.5	典型	+
4	11	9.5	典型	+	○			○		
5	16	11.5	典型	+	○			○		
6	21	10.0	典型	+	○			○		
7	26	10.0	典型	+	○*			○*		
8	29	15.0	典型	+						
9	32	16.5	典型	+						
10	35	○								
11	39	○								
12	43	○								
13	46	○*								

註：\* 表示試驗停止進行；

○表示觀察 21 天後動物不發病，處理結果陰性。

文獻上<sup>[3]</sup>曾提到弓形體在生理食鹽水溶液中，在幾個小時內，就喪失傳染性，迅速地死亡，而沒有提及保存狀態下的溫度問題。然而根據我們試驗的結果看來，就是在室溫狀況，弓形體在食鹽水溶液中保存 6 天，還沒有喪失它們的感染力，如果是保存在 4°C，則可以維持到 32 天。在 -20°C 時 3 天內就喪失了傳染力。可能這是由於弓形體對冷凍的高度敏感所致。文獻上<sup>[4]</sup>提到弓形體的懸液，反覆凍結融化 3 次，就可以迅速地喪失了活動性。由此可以推定，弓形體在 4°C 保存是比在 -20°C 為適宜的。

在我們以後的試驗<sup>[5]</sup>更證明弓形體感染小白鼠腹腔滲出液保存在 -18°C 至 -20°C 條件下，冷凍一時半取出融化後，已經喪失了對小白鼠的傳染力。但是最近 Chandler 氏和 Weinman 氏報告<sup>[6]</sup>，弓形體在 15% 甘油鹽水內置 -70°C 條件下，冷凍保存 184 天，尚保有對小白鼠的致病力。這和其他學者與我們所得的結果是有顯著差別的。其原因可從三方面來分析。第一，保存用溶液不同，一為 15% 甘油鹽水溶液，一為生理鹽水。第二，保存溫度不同，一為在 -15°C 冷凍後，移至 -70°C 保存，一為在 -20°C 冷凍保存。第三，保存前處理方法不同，Chandler 氏等是從感染鼠取出腹腔滲出液後，經過低速遠心沉澱後，吸出上清和 30% 甘油鹽水等量混合，管口用火灼封閉。而我們是把腹水直接配成 10% 鹽水懸液保存，未做弓形體計數。由以上的分析看來，弓形體的保存材料，除弓形體數目有決定性作用外，在保存溶液內，添加適量的甘油成分，對弓形體的長期保存是特別重要的。

#### (四)理化因素對弓形體的影響

材料：下述的全部實驗材料是以 C<sub>14</sub> 株腹腔傳代的小白鼠，頻死時無菌手續解剖，取其腹腔滲出液，加一定量鹽水稀釋的。

##### 方法和結果：

1. 溫度對弓形體影響試驗：以 10% 腹腔滲出液鹽水懸液分裝於 7 個華氏管中，每管 2

毫升。實驗前取 1 管,安置冰壺內,作為對照用。其餘 6 管,分別置於 40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C 水浴鍋中各 15 分鐘,分別取出,置於冰壺中。在實驗過程中,嚴密掌握溫度與時間,俟全部加溫完畢後,開始注射 3 頭小白鼠腹腔,每管均為 0.5 毫升。

實驗結果證明在 40°C 15 分鐘,弓形屬的生活力並不喪失。而在 50°C 15 分鐘後就迅速喪失其感染力。

第二次試驗時,把弓形體的鹽水懸液 5 管,置於 60°C 水浴箱,作用 3 分、5 分、7 分、10 分、12 分鐘後各取出一管於冰壺裏,等全部作用完畢後,各管腹腔注射小白鼠 3 頭 0.5 毫升。

結果除對照動物於接種後 5—6 日死亡外,其他動物觀察至 21 天,均未發病。

文獻上提到弓形屬能在 45°C 15 分鐘生存,這一點和我們的結果基本上是一致的。

2. 太陽光直射綫對弓形體的影響實驗: 把 10% 腹腔滲出液鹽水懸液分置於小平皿,每皿 3 毫升,暴露於強烈的太陽光下(是福州 8 月天早上 9 點到 12 點,當時氣溫 33°C)照射。照射時間分別為 1/2 小時、1 小時、1½ 小時、2 小時。對照皿不照射,置於冰壺中,俟各照射完畢後,分別腹腔感染小白鼠 3 頭。實驗結果,在強烈的太陽光下暴露 1 個半小時,弓形體的感染力是大大地降低或喪失了。

3. 紫外綫對弓形體的影響實驗: 把材料分配於平皿中,每皿 3 毫升,去玻蓋,安排於距離紫外燈下 50 厘米處的水平面上照射。照射時間分別為 10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分,(對照不照射),然後各皿腹腔感染小白鼠 3 頭(0.5 毫升)。

實驗結果說明了紫外綫照射 10 分鐘後,弓形體的感染力逐漸地降低,表現在感染動物平均死亡日數的不斷增長和致病鼠數的逐漸減少。照射 50—60 分鐘後,其活動力基本上已消失了。

4. 氫離子濃度對弓形體的影響試驗: 我們採用各種不同的氫離子濃度的生理食鹽水溶液來稀釋小白鼠腹腔滲出液,使其成為 1:10 濃度,然後將這些稀釋後的不同氫離子濃度的弓形體懸液保存於 4°C 冰箱裏。在保存後的 48 小時和 96 小時,各個不同氫離子濃度分別腹腔感染小白鼠 3 頭。

表 2 氫離子濃度對弓形體的影響

保存時間 pH	48 小 時				96 小 時			
	平均死亡 日數(天)	死亡數/接種數	病 變	抹片	平均死亡 日數(天)	死亡數/接種數	病 變	抹片
4.0	0	0/3	—	—	0	0/3	—	—
4.5	3.6	3/3	典 型	+	6.6	3/3	典 型	+
5.0	4.0	3/3	典 型	+	6.3	3/3	典 型	+
5.5	3.4	3/3	典 型	+	6.3	3/3	典 型	+
6.0	4.0	3/3	典 型	+	6.4	3/3	典 型	+
6.5	4.0	3/3	典 型	+	7.0	3/3	典 型	+
7.0	4.0	3/3	典 型	+	7.3	3/3	典 型	+
7.5	4.0	3/3	典 型	+	6.3	3/3	典 型	+
8.0	3.6	3/3	典 型	+	6.3	3/3	典 型	+
8.5	4.0	3/3	典 型	+	5.3	3/3	典 型	+
9.0	4.3	3/3	典 型	+	6.0	3/3	典 型	+

從表 2 可以看出弓形體在 pH 9.0 的鹼性溶液中尚能很好地生活着,但在酸性溶液裏,却表現出比較不穩定。文獻上<sup>[2]</sup>提到當 pH 3.1—1.1 時 20 分鐘死亡, pH 3.7 時二個半小時死亡,而我們的試驗 pH 4.0 時 48 小時內它們就喪失了感染力。由於這種情況,有的學者認為弓形體在人類或動物的胃裏,不能維持很久的生活力,因此推測到經口感染不一定是可能的。

雖然如此,我們認為弓形體是能够適應比較大範圍的氫離子濃度的變動,由 pH 4.5—9.0 它們所表現出的生活現象是一樣地良好的。

5. 各種消毒劑對弓形體的影響實驗: 我們觀察了弓形體對各種化學消毒劑——來素兒、石碳酸、昇汞、75% 酒精、3.5% 碘酒、硫柳汞的抵抗力。實驗結果認為來素兒對弓形體的作用最為敏感,可以在消毒上廣泛地應用。

取頻死小白鼠腹腔滲出液用各種不同濃度的消毒劑稀釋成 1:10 懸液,在室溫經過一定作用時間後,用鹽水將其稀釋成 1:1000 濃度溶液,然後將此懸液 0.5 毫升感染小白鼠腹腔 3 頭。各種消毒劑對弓形體的作用效果綜合於表 3,在 1% 石碳酸 5 分鐘,在 3% 石碳酸 1 分鐘,在 1% 來素兒 1 分鐘就能够使弓形體迅速死亡。

表 3 各種消毒劑對弓形體的作用效果比較

作用時間 消毒劑名稱	1 分 鐘			3 分 鐘			5 分 鐘			10 分 鐘			15 分 鐘		
	平均 死亡 日數	死亡鼠數/ 接種鼠數	抹片	平均 死亡 日數	死亡鼠數/ 接種鼠數	抹片	平均 死亡 日數	死亡鼠數/ 接種鼠數	抹片	平均 死亡 日數	死亡鼠數/ 接種鼠數	抹片	平均 死亡 日數	死亡鼠數/ 接種鼠數	抹片
1%石碳酸	11天	3/3	+	11天	3/3	+	○	0/3	—						
3%石碳酸	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—						
5%石碳酸	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—						
1%來素兒	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—						
3%來素兒	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—						
5%來素兒	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—						
75%酒 精							12天	1/3	+	○	0/3	—	○	0/3	—
3.5%碘 酒	*			○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—
0.1%昇 汞				○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—
0.1%硫柳汞				○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—	○	0/3	—

○ 表示接種動物不發病,觀察 21 天後給予解剖,結果陰性;

\* 表示 3.5% 碘酒加入後,滲出物立即凝固,低速離心後去上清,使沉渣在乳鉢研磨,並加無菌生理鹽水稀釋,混懸液注射小白鼠 3 頭,結果均未發病,處理陰性。

3.5% 碘酒對弓形體的作用效果是很好的,而酒精的作用效果則遠不及之。

我們認為來素兒對弓形體是比較好的一種消毒劑,因它的作用效果好,價錢較便宜,應用上亦方便,可以在實驗室裏以及各種污物處理上廣泛應用。

## 結 語

1. 弓形體在發育的雞胚上生長良好,可以廣泛地應用於毒株的保存和抗原的製造。
2. 弓形體對大白鼠雖然不能致死,然而弓形體至少可以在大白鼠腦內保持六週而不降低其毒力。
3. 弓形體的鹽水懸液在 4°C 可以維持對小白鼠的感染力 32 天,在室溫 6 天,而在冰

凍狀態下,僅一次溶解,就使其喪失了感染力。

4. 在 40°C 溫度下 15 分鐘,弓形體還能發生感染,在 50°C 15 分鐘、60°C 3 分鐘,弓形體喪失其活動性。

5. 弓形體能適應較大的氫離子濃度變動,在 pH 4.5—9.0 間,它們都能很好的生存,毒性不受影響。

6. 各種化學消毒劑——石碳酸、來素兒、碘酒、酒精、昇汞、硫柳汞等對弓形體有致死作用,其中以來素兒作用效果最好,在 1% 溶液中,1 分鐘就能夠使弓形體死亡,且其價錢便宜,可以廣泛應用。

### 參 考 文 獻

- [1] 于恩庶、陳黛西、林師敬: 微生物學報 5 (1): 101—110, 1957.
- [2] Засухин, Д. Н. и Васина, С. Г.: Токсоплазмоз, природная очаговость болезней человека и краевая эпидемиология, Медгиз, 299—317, 1955.
- [3] Jacobs, J.: Amer. J. Trop. Med. Hyg., 2: 365, 1953.
- [4] Sabin, A. B.: Pediatrics, 4: 443, 1949.
- [5] Sabin, A. B.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 41: 75—80, 1939.
- [6] 于恩庶: 立克次氏體和弓形體混合感染時兩純株分離法的研究, 尚未發表。
- [7] Chandler, A. H. and Weinman, D.: Amer. J. Clin. Path., 26: 323, 1956.

## STUDY ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TWO STRAINS OF *TOXOPLASMA GONDII* ISOLATED AT FUKIEN

YU EN-SHU, CHEN TAI-SY

*Fukien Provincial Research Institute for Epidemiological Diseases, Foochow*

The biological characteristics of two strains of *Toxoplasma gondii*, designated as C<sub>14</sub> and C<sub>17</sub>, which had been isolated at Pin-Tang, were thoroughly studied. The result is as follows:

1. The strains multiply abundantly in the well developed chick embryos, and produce many well-defined and large focal lesions of the chorio-allantoic membrane.

2. Though white rat is not very susceptible to *Toxoplasma*, the latter can grow within the body of the former for 6 weeks, and maintains its virulence for mice.

3. At 4°C, they remain viable for as long as 32 days, but at room temperature, they can not live longer than 6 days.

4. They are less resistant to heat, being inactivated, by heating at 50°C for 15 minutes and at 60°C for 3 minutes.

5. The optimal range of pH for their activity is between 4.5 to 9.0 but at pH 4.0, they lose their infectivity after 48 hours.

6. A number of disinfectants, such as carbolic acid, lysol, tincture iodine, alcohol, sublimate effectively destroy *Toxoplasma*. Lysol is most effective; 1% solution kills them within one minute.