

# 弓形體 (*Toxoplasma*) 補體結合反應及 家兔不顯性感染的調查研究

于恩庶 黃家同

(福建省流行病研究所)

弓形體感染動物的調查,除用動物接種法分離病原外,血清學方法佔着很重要的位置。目前常用者有色素試驗 (Sabin-Feldman dye test) 和補體結合反應。致於家兔皮內中和試驗對於動物調查是不太適宜的。此反應係 Sabin 氏<sup>[1]</sup>於 1941 年首先證明受感染猴血清內有此中和抗體,受染的人體內也有存在。但是正常的或實驗感染的動物如家兔、小白鼠、貓、犬等血清內,則未發現<sup>[2]</sup>。此外還有一些缺點,如 Warren 和 Sabin 氏<sup>[11]</sup>所指出,需要經常通過動物保存活的弓形體,要有較長的試驗時間(約一週)以及大量家兔的消耗等,都是不經濟的。

關於色素試驗,自從 Sabin 氏<sup>[3]</sup>提出以來,經過改善<sup>[4]</sup>,現在已被廣泛應用到弓形體病的診斷上。但是近來有人懷疑它的特異性問題,並已經證明色素試驗在弓形體和住肉孢子蟲 (*Sarcosporidia*) 與陰道滴蟲 (*Trichomonas vaginalis*) 間呈交叉反應<sup>[6-8]</sup>。並且在正常人羣中也有發現不同的效價,並隨年齡而增高<sup>[4]</sup>。雖然這個試驗較補體結合反應出現早,消失慢<sup>[9-10]</sup>。但在動物調查上可能不是太適合的。所以我們選擇補體結合反應進行動物不顯性感染的調查。

補體結合反應的抗原,Warren 和 Sabin 氏<sup>[11]</sup>首先用弓形體感染家兔的腦組織製造,獲得成功。同時指出補體結合抗體,在接種 1—4 週後猴血清中出現,有的二個月即行消失。以後 Warren 和 Russ 氏<sup>[12]</sup>改用絨毛尿囊膜製造抗原,通過 Seitz 細菌過濾器或經 14,000 轉 1 小時遠心沉澱,抗原性並不降低。其後 Sabin 氏等<sup>[13]</sup>指出絨毛尿囊膜抗原經 13,000 轉 1 小時沉澱後,可以除去某些非特異性因素。但弓形體特異性抗原仍保留,滴度也不減少。經過這樣處理的抗原,其效價在 1:2, 1:4 也是有意義的。同時指出小白鼠腦亦可供製造抗原,但其量較尿囊膜為少,是其缺點。最近 Morris 氏等<sup>[14]</sup>、常松等<sup>[15]</sup>指出感染雞胚尿囊水和小白鼠腹水均可製出良好抗原。為了防止抗補體作用,後一抗原用加熱 56°C 4 小時處理之。

Morris 等<sup>[14]</sup>最近用補體結合反應檢查了 11 種 426 個動物,發現狗和兔有此抗體。在 180 隻狗中陽性者 45 隻 (25%), 107 隻兔中陽性者 20 隻 (17%), 這些陽性抗體是

從 1:8—1:128。

本省於 1955 年從貓和家兔第一次分離出弓形體<sup>[16]</sup>，爲了進一步瞭解本省動物間的感染狀況，選定補體結合反應進行調查。本文先將補體結合反應的操作技術以及家兔的調查結果報告如下。

## 抗原製備及其滴定

目前抗原的製備有家兔腦法，鷄胚絨毛尿囊膜法，尿囊液法，小白鼠腦法，小白鼠腹水法和豚鼠腹水法。我們選用了第二種和第三種法，現分敘如下：

(一) 弓形體株：1955 年從貓組織內分離的 C<sub>14</sub> 株，其生物性狀已見前文報告<sup>[16]</sup>。在小白鼠體內繼續傳代保存至今。此株在鷄胚絨毛尿囊膜上生長良好，形成典型病灶、混濁、浮腫和壞死。塗片檢查可見大量弓形體。

(二) 免疫血清：取感染小白鼠腹水稀釋爲 1:10 鹽水懸液，以 0.1—0.2 毫升，注射家兔或豚鼠背部皮內，間隔 7—8 天，再進行第二次注射，經過二週後取血，析出血清，在 -18°C 冰箱內保存備用。

此外取猴子做免疫血清，經過多次皮內注射後，採血。

(三) 鷄胚絨毛尿囊膜抗原：取孵育 8—10 天鷄胚，選定血管發育旺盛部位，按常法向膜上接種感染的小白鼠腹水 1:10 鹽水懸液 0.1 毫升，然後移於 35°C 孵育 7 天後，在 4°C 冰箱保存過夜，次日取出解剖，選出病變嚴重部位的尿囊膜稱重後按 20% 濃度製成生理鹽水懸液，置 -18°C 低温冰箱冷凍後，取出融化，如此反覆 3 次，然後低速遠心沉澱，除去大塊組織，再移於高速沉澱器，以每分鐘 13,000 速度離心 1 小時，此上清液即爲抗原，並加硫柳汞，使最後濃度爲 1:10,000，最後保存在 -18°C 備用。

(四) 尿囊液抗原：如上法接種弓形體懸液，取去絨毛尿囊膜後，吸出尿囊液，不加

表 1 絨毛尿囊膜抗原的滴定結果

家兔血清	血清稀釋	絨毛尿囊膜陽性抗原						絨毛尿囊膜正常抗原						鹽水	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		
弓形體免疫血清	1:4	4	4	4	4	3	3	±	0	0	0	0	0	0	0
	1:8	4	4	4	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:16	4	4	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:32	4	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:64	4	4	3	±	0	0								0
	1:128	±	0	0	0	0	0								
正常血清	1:4	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	1:8	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	1:16	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
鹽水		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

稀釋,按上述同樣方法冷凍融化 3 次,高速遠心沉澱後的上清為抗原。

(五) 正常抗原: 製法同陽性抗原,惟不接種弓形體。

(六) 抗原的滴定: 按 Casals 微量法滴定。即免疫血清用鹽水稀釋為 1:4—1:128, 抗原亦稀釋至 1:128。各取 0.1 毫升分別混和,最後加二個單位補體 0.2 毫升,置 4°C 作用 18 小時後取出在 37°C 水浴加溫 2, 3 分鐘,然後加 1% 致敏羊血球 0.2 毫升,繼續在 37°C 水浴作用 30 分鐘後取出,記取結果,見上表 1。

又尿囊液抗原用上述免疫血清 (1:16) 滴定,抗原稀釋至 1:32 仍是強陽性,與絨毛尿囊膜抗原效價基本相同或僅稍低。

### 補體結合反應試驗技術及結果判定

抗原按上述的滴定結果,取 1:16 稀釋度做正式試驗,被檢血清稀釋為 1:8,兩者固定。

另取康氏管 9 支,分為 3 列 3 排,每管加稀釋血清 0.1 毫升,第一列 3 管各加弓形體陽性抗原 0.1 毫升,第二列 3 管各加正常抗原 0.1 毫升,第三列 3 管各加鹽水 0.1 毫升,然後第一排 3 管各加 1.5 單位補體,第二排 3 管各加 1.75 單位補體,第三排 3 管各加 2.0 單位補體,均為 0.2 毫升。混和後置 4°C 冰箱經過 18 小時取出,放 37°C 水浴作用 2, 3 分鐘,加致敏羊血球 0.2 毫升,繼續放 37°C 水浴內 30 分鐘後,觀察結果。

按上述方法初步得出陽性的血清,再進行定量試驗,即血清稀釋為不同濃度,補體固定抗原固定,反覆檢查一次,最後確定效價。

### 家兔調查結果

(一) 從平潭和長樂縣農民手中購買家兔,選出 62 隻取血清做補體結合反應。其中平潭兔 20 隻陽性 2 隻;長樂兔 42 隻陽性 5 隻,共計陽性 7 隻,陽性率為 11.3%。其效價為 1:8—1:128。

(二) 弓形體實驗感染家兔 8 隻,猴 1 隻,大白鼠 5 隻,除大白鼠陰性外,餘均呈強

表 2 家兔補體結合抗體調查結果

動 物	來 源	檢 查 數	陽 性 數	補 體 結 合 效 價					
				1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
家兔 (平潭)	從農民手中購買	20	2		1				1
家兔 (長樂)	從農民手中購買	42	5	1					4
對 照									
家 兔	弓形體實驗感染	8	8		1		2	3	
猴	弓形體實驗感染	1	1		1				
大 白 鼠	弓形體實驗感染	5	0						

性補體結合反應。該批大白鼠係在腦內接種後二個月取血檢查者。試驗的目的是作為對家兔試驗的比較對照,見表 2。

### 補體結合反應陽性結果的分析

(一) 平潭家兔 20 隻,在採血後殺死解剖,取肝、脾、腎等製成混懸液,注射小白鼠腹腔內,分離弓形體,結果從補體結合反應陽性的兩隻家兔分離出弓形體和恙蟲熱立克次氏體各 1 株,其餘 18 個陰性血清均未分離出病原體。

(二) 長樂家兔一部,在採血後,於背部拔去皮毛後,皮內注射感染腹水 1:10 鹽水懸液 0.2 毫升。經過一週後觀察局部的皮膚反應程度。結果補體結合反應呈陽性的 3 隻家兔,注射局部形成的紅斑輕微和壞死灶小,甚至沒有壞死。而補體結合反應陰性的

補體結合反應	陰性兔			
	自然感染			
	實驗感染			N

紅斑      壞死      N 無反應

圖 1 家兔補體結合反應和皮膚反應程度的關係

9 隻家兔, 紅斑和壞死都很大, 紅斑多在 15 毫米以上, 壞死在 6 毫米以上。兩者間呈顯明的對照。

又取人工感染的家兔 3 頭, 接種上述同樣的材料後, 其注射局部, 一隻無反應, 兩隻紅斑不顯, 壞死在 5 毫米以下。見圖 1。

(三) 乙型腦炎病毒免疫的豚鼠血清 5 種, 淋巴脈絡膜炎血清一種, 聖路易腦炎血清 1 種, 恙蟲病立克次氏體免疫的豚鼠血清 1 種, 與本抗原不呈交叉補體結合反應。

(四) 傷寒和副傷寒甲、乙、丙免疫血清 (上海生物製品所出品) 與本抗原不呈效補體結合反應。惟副傷寒丙血清呈弱陽性, 其原因留待日後檢查。

從以上結果看來, 補體結合反應和弓形體分離與皮內接種活弓形體所引起的皮膚反應, 基本是相符合的。至於補體結合反應陽性 1 隻兔分離出恙蟲病立克次氏體是可用混和感染來解釋的, 因為我們 1955 年在平潭分離出弓形體的兩隻家兔, 在最初兩次傳代都發現有立克次氏體, 以後因為弓形體的毒力迅速增強, 死亡時間縮短為 4 天, 立克次氏體在顯微鏡下已不能檢見。

### 弓形體補體結合反應的快速操作法

為了改進弓形體補體結合反應的操作過程, 縮短時間, 特比較了低溫長時間 (4°C 18 小時) 和高溫短時間 (37°C 1—4 小時) 對補體結合的影響。

試驗一: 取弓形體陽性, 可疑或陰性的動物血清 10 份, 各做 4 組 (同樣條件), 分別在 37°C 作用 1, 2, 3, 4 小時, 取出加致敏羊血球。結果除兩份血清不明外, 餘 8 份血清結果見表 3。從這裏可以證明弓形體補體結合反應在 37°C 作用 2—4 小時亦可出現陽性結果。但作用 2 小時較差, 3 和 4 小時較好, 1 小時不出現陽性。

表 3 弓形體補體結合反應在 37°C 不同時間的作用結果

動 物	4°C 18 小時補體結合反應檢查結果	37°C 1 小時			37°C 2 小時			37°C 3 小時			37°C 4 小時		
		1:16	1:32	1:64	1:16	1:32	1:64	1:16	1:32	1:64	1:16	1:32	1:64
		(1:4)	1:8	1:16)	(1:4)	1:8	1:16)	(1:4)	1:8	1:16)	(1:4)	1:8	1:16)
家兔(免疫)	陽 性	0	0	0	2	1	±	4	1	1	4	1	±
長樂家兔②	陽 性	0	0	0	2	2	2	3	3	2	4	4	2
長樂家兔③	陰 性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平潭家兔	陽 性	0	0	0	3	2	±	4	2	1	4	2	2
平潭家兔	陰 性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
貓②	陰 性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
豬⑥	可 疑	0	0	0	1	0	0	±	0	0	±	0	0
豬⑩	可 疑	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0

註: 貓血清, 豬血清從 1:4 開始稀釋。  
家兔血清從 1:16 開始稀釋。

試驗二：從試驗一的結果，確定 37°C 3 小時較好後，又與 4°C 18 小時做比較。所得結果如表 4 所示。

表 4 補體結合反應在 4°C 和 37°C 作用下的比較

動物血清	4°C 18 小時					37°C 3 小時				
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
家兔 (長樂)	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2
家兔 (長樂)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
家兔 (長樂)	4	4	4	4	4	4	4	2	1	±
家兔 (長樂)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
家兔⑩(平潭)	4	4	4	4	4	4	4	3	±	±
家兔⑩(平潭)	4	4	1	0	0	3	3	0	0	0

註：補體用 1.75 單位。

### 貓株弓形體和兔株弓形體的交叉血清學反應

分別用貓株和兔株弓形體製造抗原與免疫血清，然後做交叉補體結合反應，結果兩株間呈相等程度的交叉反應。如表 5 所示。

表 5

弓形體抗原	弓形體免疫血清	
	貓 14 株	兔 18 株
貓 14 株	1:64	1:64
兔 18 株	1:32	1:32

然後用“貓 14 株”抗原，檢查“兔 18 株”免疫的家兔 4 頭，均呈強陽性反應。

### 討 論

弓形體補體結合反應和色素試驗一樣，已廣泛應用到臨床診斷和動物感染情況的調查。在臨床上又根據這兩個反應出現與消失的早晚，對於理解一個病例的感染過程有很大幫助<sup>[7,10]</sup>。色素試驗的特異性問題，前面已經引述，在補體結合反應方面也有人注意。Sabin 氏等<sup>[13]</sup>曾經指出粗製抗原，經過 13,000 轉高速離心沉澱後，可以除去非特異性因素。又 Awad 氏<sup>[7]</sup>指出 Sabin-Feldman 色素試驗不能鑑別弓形體和住肉孢子蟲。但弓形體補體結合反應抗原與住肉孢子蟲免疫血清是陰性反應。最近 Woods 氏等<sup>[17]</sup>用弓形體檢查 573 份血清中，有住肉孢子蟲 *Sarcosporidia* 感染徵候的牛 36 隻中，有 3 隻呈陽性補體結合反應。但認為這不能就排出受弓形體的感染。又 Засухин, A. H. 氏<sup>[18]</sup>曾提到在某些情況下，弓形體抗原和傷寒，副傷寒乙病人血清呈陽性補體結合

反應 (Шолга 1954), 這是值得注意的。

關於我們自己製造的抗原特異性問題, 做了不多的試驗, 還難提出肯定性的意見。不過我們在任意選出的 20 隻家兔, 採血做弓形體補體結合反應的同時, 又取肝、脾、腎、腦等組織接種小白鼠分離弓形體, 結果在補體結合反應陽性的兩隻兔中, 就分離出一株弓形體, 陰性的 18 隻兔亦陰性。分離出的弓形體定名為兔 18 株, 此株經過生物學和血清學 (補體結合反應) 鑑定, 確定為弓形體。

另選家兔 12 隻, 補體結合反應檢查陽性 3 隻, 陰性 9 隻。又有受弓形體免疫的家兔 3 隻, 補體結合反應亦陽性。以上 15 隻家兔, 在背部皮內各注射弓形體感染腹水懸液。結果各兔形成的紅斑和壞死, 在補體結合反應陽性兔和陰性兔間有顯著差別。陽性兔形成的紅斑和壞死都較小, 或雖有較大紅斑但無壞死灶。

此外更取已知的乙型腦炎病毒、聖路易腦炎病毒、淋巴脈絡膜炎病毒、恙蟲熱立克次氏體、傷寒桿菌和副傷寒甲、乙、丙等動物免疫血清檢查, 未發現陽性反應, 惜手邊無 *Sarcosporidia* 株和血清, 未能進行交叉試驗, 引為遺憾。

Nicolle 和 Manceuax 氏於 1908 年從非洲一種齧齒動物 *Ctenodactylus gondii* 發現弓形體同時, Splendore 氏也從兔子發現弓形體<sup>[5]</sup>。到現在為止已經證明家兔和野兔受弓形體感染是很廣泛的。例如在丹麥野兔有 9.4%, 在瑞典有 6.7% 受弓形體感染<sup>[18]</sup>。Morris 氏調查 107 隻家兔中有 20 隻是陽性補體結合反應, 但從強陽性的兩隻家兔中則未分離出弓形體。我們於 1955 年從 64 隻家兔分離出 2 株弓形體, 這次在 20 隻中又分離 1 株。補體結合反應調查 62 隻家兔, 陽性者 7 隻, 陽性率為 11.3%, 這個初步結果已可說明本省家兔受弓形體感染是相當嚴重的。

在本省除家兔外, 從貓和豬也分離出弓形體, 這些動物與人接觸很密切, 它們對人羣的傳播關係如何, 急待研究解決。

補體結合抗原經 56°C 4 小時加溫仍不破壞<sup>[15]</sup>。我們這次證明抗原、抗體和補體三者 37°C 作用 3 小時, 以代替過去常用的 4°C 作用 18 小時, 仍呈陽性反應, 僅在個別例子, 抗體滴度較低。對弱陽性血清的檢查, 是較差的。

本文試驗的補體結合反應, 分為初步和最後判定兩個步驟, 先用不同補體法, 初步確定陽性或可疑的血清, 然後再用不同稀釋度的血清 (補體抗原固定) 最後確定效價。我們相信這種方法在大量血清的檢查上, 是有採用價值的。

## 結 論

利用弓形體感染的雞胚絨毛尿囊膜和尿囊液製造抗原, 經過高速遠心沉澱後, 可得特異性抗原, 其效價為 1:16—1:32。

使用這種抗原在福建調查家兔 62 隻, 陽性 7 隻, 效價為 1:8—1:128, 陽性率為

11.3%。並從其中一頭分離出弓形體。

從貓分離“C<sub>14</sub>株”和從兔分離的“兔 18 株”間，呈相等程度的陽性補體結合交叉反應。

此外就我們製備的抗原特異性，進行了實驗和分析。

最後應向曾協助本試驗的陳黛西醫師、林師敬同志、歐陽利國同志致謝。

### 參 考 文 獻

- [1] Sabin, A. B.: *J. A. M. A.*, **116** (9): 801—807, 1941.
- [2] Sabin, A. B. and Ruchman, I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **51**: 1—6, 1942.
- [3] Sabin, A. B. and Feldman, H. A.: *Science*, **106**: 660—663, 1948.
- [4] Beverley, J. K. A. and Beattie, C. P.: *J. Clin. Path.*, **5**: 350—353, 1952.
- [5] Pinkerton, H. and Weinman, D.: *Arch. Path.*, **30**: 374, 1940.
- [6] Awad, F. I.: *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **48** (4): July, 1954.
- [7] Awad, F. I. and Lainson, R.: *A note of the serology*, **7**: 152, 1954.
- [8] Awad, F. I.: *Lancet*, **2**: 1055, 1954.
- [9] Sabin, A. B.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **2**: 360—364, 1953.
- [10] Sabin, A. B. et al.: *J. A. M. A.* **150**: 1063—1069, 1952.
- [11] Warren, J. and Sabin, A. B.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **51**: 11, 1942.
- [12] Warren J. and Russ, S. B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**: 85—89, 1948.
- [13] Sabin, A. B. Cincinnati, Ohio.: *Pediatrics*, **4**: 443, 1949.
- [14] Morris, J. A. Aulisis, C. G. and Mccown, J. M.: *J. Inf. Dis.*, **76** (1): 52—54, 1956.
- [15] 常松之典等五人: 日本細菌學雜誌, 10 卷, 7 號, 622, 昭和 30 年。見醫學中央雜誌, 1 卷 6 號, 第 1252 號, 17—18, 1956。
- [16] 子恩庶、陳黛西、林師敬: 福建貓及兔體內弓形體的發現, 微生物學報, 第 5 卷第 1 期, 101—110 頁, 1957 年 2 月。
- [17] Woods, A. C. Jacobs, L. Wood, R. M. Cook, M. K.: *Amer. J. Ophth.*, **37**: 163—177, 1954.
- [18] Засухин, Д. Н., Васина, С. Г.: *Токсоплазмоз, Природная очаговость болезней человека и краевая эпидемиология*, 1955.
- [19] Pinkerton, H. and Weinman, D.: *Arch. Path.*, **30**: 374, 1940.



## COMPLEMENT FIXATION TEST FOR THE DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS, AND DETECTION OF INAPPARENT INFECTIONS WITH *TOXOPLASMA GONDII* IN RABBITS

YU EN-SHU and WHAN GA-TUNG

In 1955, from domestic rabbits and cats in Fukien Province, we had isolated 4 strains of *Toxoplasma gondii*, which were identified morphologically, biologically, and serologically. This discovery reveals the presence of toxoplasmosis in our country. In order to further study the inapparent infections among animals in the endemic area, we used the complement fixation test for a survey in rabbit population bred by the local farmers.

The antigen used for the complement fixation test was prepared from the infected chorio-allantoic membranes and from allantois fluid, which were ground together, centrifuged at 13,000 r.p.m., and the supernatant, is the antigen. It is highly specific, and used at a titer of 1:16—1:32 dilution. Sera of 62 rabbits have been examined with this antigen, and seven were found to be positive. One strain of *toxoplasma* was also isolated from one of the rabbits that gave positive reaction.

Besides, skin test with the antigen was also carried out, and 3 rabbits, the sera of which yielded positive result in complement fixation test showed redness at the site of injection with little or no necrosis, while nine rabbits, giving negative reactions, showed an intense redness and large area of necrosis. Such result justifies the specificity of our antigen.

Lastly, cross complement fixation test between the strain from cat and that from rabbit was made and the result gave evidence of similarity in antigenicity of the two strains.