

斯氏按蚊对约氏疟原虫敏感性的观察*

时云林 王淑芬 郭保忠 高徐生

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

继伦杜和克利柯-肯特力柯 (Landau and Killick-kendrick)^[3] 报道了用斯氏按蚊感染约氏疟原虫 (*Plasmodium berghei yoelii* 即 *P. yoelii yoelii*) 成功后, 韦利 (Wery)^[2]、陈佩惠等^[1] 先后较详细地报道了该虫在斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) 体内发育过程。自 70 年代起, 国内外相继用约氏疟原虫-斯氏按蚊系统作为筛选和评价疟疾病因性预防和根治药的动物模型, 但在抗疟药物的试验中, 需要斯氏按蚊对疟原虫有高而稳定的感染率。为此, 作者等于 1977 年至 1982 年就约氏疟原虫血症出现时间、配子体数量、不同种供血鼠和不同血传代数等因素对斯氏按蚊感染力的影响进行了实验观察, 现将研究结果报告如下。

材料和方法

虫株 约氏疟原虫约氏亚种 (*Plasmodium yoelii yoelii* BY 265, 以下称约氏疟原虫), 1976 年从法国巴黎自然博物馆动物学研究室引进, 在本实验室经斯氏按蚊和血传小鼠交替保种。供血鼠除血传代数对斯氏按蚊敏感性试验外, 其它试验均用蚊传后血传 1、2 代的小鼠。

蚊种 斯氏按蚊, 1973 年由中国医学科学院基础所引进。

鼠种 瑞士种 (Swiss) 小白鼠、LACA/Amms (白色)、ICR-JCL (白色)、C₅₇BL/6Jax (黑色) 三种纯系小鼠, 体重均为 18—22 克; 及 4 周龄的幼年大白鼠。上述鼠种由我院动物处饲养, 雌雄性皆选用。

蚊媒感染 采用 3—5 日龄的斯氏按蚊, 感染前饥饿 24 小时后使之叮咬阳性供血鼠 2—3 小时, 除原虫血症出现时间对斯氏按蚊敏感性试

验外, 其它实验均用血传后第 4 天的小鼠作为供血鼠。喂血第 2 天, 每笼抽样检查蚊虫吸血率在 95% 以上。感染蚊虫饲养在 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $80 \pm 10\%$ 的养蚊室内, 饲以 10% 的葡萄糖水。在血餐后第 3 天和第 7 天各喂正常鼠血一次, 每天光照 12 小时。

观察方法 蚊虫感染后第 7 天解剖蚊胃, 检查卵囊的感染率和感染度; 感染后第 12 天, 抽样解剖蚊虫唾腺, 统计孢子进腺率。

结 果

(一) 供血鼠以不同方式感染疟原虫后, 原虫血症出现时间对斯氏按蚊感染力的影响

1. 血传感染 同批瑞士种小白鼠经血传感染约氏疟原虫后于不同天数 (第 1—7 天) 随机取 3 只阳性小鼠供斯氏按蚊叮咬, 共详细观察三批实验。经解剖蚊胃和唾腺的结果 (见表 1)。第 1—7 日间蚊虫感染率相差非常显著 ($p < 0.01$), 其中, 以血传感染后第 3、4 天的蚊

表 1 血传感染后不同时间原虫血症小鼠对斯氏按蚊感染力的影响

时间(天)	蚊 胃		唾 腺	
	解剖蚊数	感染率 ±SE (%)	解剖蚊数	感染率 ±SE (%)
1	58	3.45±2.4	60	1.67±1.6
2	52	61.5±6.8	58	39.7±6.4
3	66	90.9±3.5	65	70.8±5.6
4	63	95.2±2.6	61	77.0±5.4
5	60	85.0±4.6	56	55.4±6.6
6	54	59.3±6.7	59	42.4±6.3
7	60	40.0±6.3	60	21.7±5.3

* 本文承北京第二医学院寄生虫学教研室陈佩惠副教授审阅, 深表谢意。

虫感染率较高,尤以第4天的蚊虫感染率最高。蚊胃和唾腺的感染率高达95.2%和77.0%,且感染度也最高。此外,从血传1代的原虫血症的不同时间(输血感染后第2、4、6、8、10、12、14天)的小鼠,血传感染正常小鼠作供血鼠。结果表明,原虫血症后不同时间血传小鼠对斯氏按蚊感染力也有一定影响,以第4—6天对供血鼠进行输血感染最为适宜,此期得到蚊媒感染率最高,腺感染率均在70%以上,而原虫血症第8天后取血转种的供血鼠对蚊媒的感染率和感染度开始逐渐下降,第14天取血转种的供血鼠对蚊媒唾腺的感染率仅24%左右。

2. 孢子感染 每只小鼠腹腔接种 2.5×10^4 个子孢子后,第3天开始涂片血检,第4天开始随机取3只阳性鼠供斯氏按蚊叮咬,二批实验结果均以孢子感染后第7、8天的阳性鼠供蚊叮咬者,感染率最高,蚊胃和唾腺的感染率分别为83.3%、85.7%和60.5%、62.5%,而孢子接种后第16、17天的小鼠,虽在外周血液中也能查见配子体,但已失去其感染性,未能使蚊媒感染。

(二) 不同种供血鼠对斯氏按蚊感染力的影响 不同种供血鼠经输血感染约氏疟原虫后第4天分别供斯氏按蚊叮咬,结果(见表2)。5

种供血鼠对斯氏按蚊的感染率有显著性差异($p < 0.01$),其中,以瑞士种和 ICR-JCL 小白鼠为较理想的种源鼠,两者对蚊媒唾腺的感染率分别达86.2%和85.3%。

(三) 配子体数量对斯氏按蚊感染力的影响

输血感染后第4天,让携带有不同数量约氏疟原虫配子体的瑞士种小白鼠分别供斯氏按蚊叮咬,结果(见表3)。50个白细胞视野内配子体数少于1时,斯氏按蚊的感染率和感染度明显降低,蚊胃和唾腺的感染率仅为23.8%和18.2%;若配子体数超过2时,蚊媒感染率大大提高;配子体数在5—20之间时,蚊媒感染率差异不显著($p > 0.05$),如配子体数在5—10和11—20时,蚊胃和唾腺的感染率分别达87.8%、92.5%和80.9%和83.7%。

(四) 血传代数对斯氏按蚊敏感性的影响

孢子接种瑞士种小白鼠出现原虫血症(原代)后第7天开始输血传代(第1代),其后,每隔7天血传一次,从第1代至第6代,每代感染斯氏按蚊,此后进行不定期感染蚊媒。血传70代之前,均是血传后第4天供蚊媒血餐;第73代是70代对血传给金黄地鼠,待出虫后,又连续经二次血传;第103代是第100代时经4天→4

表2 不同种供血鼠对斯氏按蚊感染力的影响

供血鼠	蚊 胃		唾 腺	
	阳性数/解剖数	感染率 ± SE (%)	阳性数/解剖数	感染率 ± SE (%)
上海株	42/45	93.3 ± 3.7	37/43	86.0 ± 5.3
	32/42	76.2 ± 6.5	23/40	57.5 ± 7.8
	26/40	65.0 ± 7.5	14/43	32.6 ± 7.6
	45/51	88.2 ± 4.5	58/68	85.3 ± 4.3
幼年大白鼠	33/44	75.0 ± 6.5	25/38	65.8 ± 7.7

表3 配子体数量对斯氏按蚊感染力的影响

供血鼠		蚊 胃		唾 腺	
寄生率 (%)	配子体数/50个白细胞	阳性数/解剖数	感染率 ± SE (%)	阳性数/解剖数	感染率 ± SE (%)
0.5—1	0—1	10/42	23.8 ± 6.6	8/44	18.2 ± 5.8
2—5	2—4	31/40	77.5 ± 6.6	30/41	73.2 ± 6.9
3—10	5—10	36/41	87.8 ± 5.1	34/42	80.9 ± 6.1
3—10	11—20	37/40	92.5 ± 4.2	36/43	83.7 ± 5.6

天→3天(103代)的连续短期输血感染的小鼠供斯氏按蚊叮咬;其后均是以相同方式短期血传后的小鼠作供血鼠,结果(见表4)。血传1、2代的蚊胃和唾腺的感染率最高,分别达96.3%、97.1%和72.4%、85.7%。几年来的实践也证明,在其它条件控制的情况下,血传1、2代的供血鼠均能使蚊胃感染率恒定在90%以上,腺感染率一般在70—80%之间,有时更高。输血传代17代后,随着血传代数的增加,感染率和感染度均明显下降,但如第73代和103代分别通过金黄地鼠和连续数次的短期血传,仍能提高蚊媒的感染率和感染度。200代后,即使连续短期血传,斯氏按蚊也仅能获得轻度感染。第236代时,感染的二笼斯氏按蚊,解剖唾腺未发现阳性,但用正常的C₃₇小鼠让蚊媒叮咬时,每笼2只小鼠均获得了感染。

表4 血传代数对斯氏按蚊感染力的影响

血传代数	蚊 胃		唾 腺	
	阳性数/ 解剖数	感染率 (%)	阳性数/ 解剖数	感染率 (%)
1	61/63	96.8	42/58	72.4
2	34/35	97.1	36/42	85.7
3	42/45	93.3	17/20	65.4
5	33/40	82.5	23/31	72.0
6	19/31	61.3	13/28	46.4
17	11/20	55.0	7/26	26.9
30	10/35	28.6	8/36	22.2
50	8/20	40.0	5/22	22.7
70	7/30	23.3	4/30	13.3
73	24/32	75.0	17/31	54.8
101	8/25	32.0	3/30	10.0
103	30/40	75.0	13/24	54.2
150	20/40	50.0	12/38	31.6
202	11/40	27.5 [*]	6/40	15.0
236	3/40	7.5	0/30	0

讨 论

前人研究表明^[2,6],媒介按蚊感染鼠疟原虫的过程中,早期原虫血症,其配子体对蚊媒的感染力强,随着原虫血症高峰的出现和原虫血症的延长,配子体对蚊媒的感染力降低,甚至消失。本实验结果也证明,小鼠血传感染约氏疟

原虫之后第3、4天,可使斯氏按蚊的蚊胃感染率达90—95%,腺感染率达70—77%,与韦利报道基本一致。子孢子腹腔接种后第7、8天,也可使蚊胃感染率达85%左右,腺感染率达60%左右。本实验观察到,在原虫血症早期,血内配子体数量和斯氏按蚊感染率成正比。若在50个白细胞的视野中,配子体数少于1时,蚊媒一般不能获得好的感染;若配子体数在5—20个之间,均能获得比较高的感染。一般情况,配子体数量愈多,对蚊媒的感染力愈强,但若为原虫血症后期,即使配子体数量很多,仍难使蚊媒感染,这可能与配子体的衰老有关。此外,输血传代的间隔时间也影响约氏疟原虫配子体的活力,以第4—6天原虫血症进行输血传代,可使斯氏按蚊感染力大大提高,随着间隔时间的延长,蚊媒的感染率和感染度也随之降低。这说明某种因素不但影响本身体内配子体的活力,甚至影响血传后另一宿主体内配子体的活力,何种因素有待进一步的探索。

虽然用输血感染方法几乎可使各种小鼠感染鼠疟原虫,但是,配子体在各种小鼠体内的发育是有较大差异的。本实验选用的5种供血鼠中,瑞士种和ICR-JCL小白鼠是较敏感的,而且这种小鼠来源方便,是个理想的动物模型。

据文献报道^[2,4,5],鼠疟原虫连续数次血传后,配子体便失去活力,使蚊媒不能获得感染。然而,本实验观察到,约氏疟原虫血传至73代和103代分别通过金黄地鼠和连续数次的短期血传,仍能使蚊媒获得75%的胃感染率和54%的腺感染率,血传至236代时叮咬C₃₇小鼠,蚊传亦成功。但是,约氏疟原虫在血传1—5代和原虫接种后的第3—5天,均能获得斯氏按蚊较高的感染率,说明这期间配子体的活力较强,随着血传代数的增加,蚊媒的感染率和感染度随之降低。但在配子体活力降低时,经血传金黄地鼠或连续数次短期血传,仍能提高蚊媒的感染率和感染度,这可能是由于降低了宿主免疫力对疟原虫配子体的影响,但有待进一步的研究。

总之,影响获得媒介按蚊感染疟原虫高而

稳定的感染率的因素很多,有待进一步的研究。对约氏疟原虫来说,我们认为,以蚊传后血传1、2代和接种原虫后第3、4天的供血鼠感染蚊媒为宜,对感染斯氏按蚊应选择原虫血症在5—10%以及50个白细胞视野中配子体数在5—20个的小鼠作供血鼠较好。

参 考 文 献

- [1] 陈佩惠等,1983,约氏疟原虫约氏亚种在斯氏按蚊体内发育及三种按蚊敏感性的观察 畜牧兽医学报 14(3): 146—151。
- [2] Garnham, PCC. 1966 Malaria Parasites and other haemosporidia. Blackwell Oxford. 431—475.
- [3] Landau, I. and R. Killick-kendrick 1966 Rodent

plasmodia of the Republique Centrafricaine: the sporogony and tissue stage of *Plasmodium chandi* and *P. berghei yoelii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 633—640.

- [4] Vanderberg, J. P. and M. Yoeli 1965. Some physiological and metabolic problems related to maintenance of the *P. berghei* cycle in *Anopheles quadrimaculatus*. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* 45: 419—426.
- [5] Wery, M. 1966 Etude du cycle de *Plasmodium berghei yoelii* en vue de la production massive de sporozoites viables et de formes exo-erythrocytaires. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* 46(6): 755—788.
- [6] Wery, M. 1968 Studies on the sporogony of rodent malaria parasites. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* 48: 1—137.