

间日疟原虫多核亚种(*Plasmodium vivax multinucleatum*)长潜伏期的实验研究*

江静波 张绍武 程富川 王恒礼 黄建成 梁东昇

一、前 言

江静波等自1961年陆续发现在我国有一株形态特异的间日疟原虫^(1,2),经反复研究至1965年定为一新亚种,并命名为间日疟原虫多核亚种(*Plasmodium vivax multinucleatum*)^(3,4),引起了各方面的重视,此后各地相继有类似本疟原虫的发现(张绍武,1965;四川地区五二三中药三组,1975;宜宾地区卫生防疫站,1976;张奎等;陕西省卫生防疫站,1978;彭德华等,)。但对于本虫的分类地位问题,各家意见不一,尚无定论。

由于该虫已很普遍,在河南省开封地区,所见病例主要是该虫所致,我们认为十分必要从各方面去探讨,以便对该虫得到一明确的结论,并通过这一虫株的研究,丰富我们对寄生人体疟原虫的知识,供我国疟疾防治工作的参考。

文献曾报道间日疟原虫可能出现卵形疟原虫的特征⁽⁵⁾,因此1979年江静波等曾用猕猴换入血的方法,使间日疟原虫多核亚种在猕猴体内转种传代至五代猴,发现其形态特征基本保留不变,说明该虫的特征是相对稳定的;同时又用该虫患者的血感染巴拉巴按蚊(*A. balabacensis*)和中华按蚊(*A. hyrcanus sinensis*),发现其卵囊疟色素粒较间日疟原虫和卵形疟原虫少得多(一般在30粒以下),排列也无一定格式,说明本虫和间日疟原虫及卵形疟原虫是不相同的。

为了进一步对该虫的生物学特征进行研究,本工作参加者的张绍武和程富川自愿接受用阳性媒介按蚊叮咬进行感染实验,借以确定该虫的潜伏期,研究该虫的鉴别特征经过猴体、蚊体期,再到人之后,是否会产生变异。

本次人体感染实验所得的潜伏期是312—323天,说明该虫属于长潜伏期。其中张氏发病后,经用离体吸血方法感染巴拉巴按蚊,至孢子出现时,又以三只按蚊(其中二只唾液腺证明阳性)叮咬本文另一参加者黄建成,至今已过数月,尚未发病。

我们仔细观察了最初的病人朱彦秋的血片标本和张、程二人的血片标本,发现三者

- 本项研究的部分工作在河南医学院寄生虫学教研组、广西医学院寄生虫学教研室和开封地区卫生防疫站协助下进行。本文作者的所在单位:江、黄、梁为中山大学生物学系寄生虫学研究室,张、王为河南省卫生防疫站,程为河南省商邱地区防疫站。

的原虫形态基本上是一致的,可以辨认出它们都属于间日疟原虫多核亚种。

我国学者早就在流行病学上阐明,江苏、河南、山东和辽宁有长潜伏期疟疾的存在。我们从本次人体感染实验中第一次得到了长潜伏期的具体资料。潜伏期长短,直接关系到防治方针和措施的抉择,因此,在这个基础上作进一步深入研究将是非常重要的。

二、实验虫株与寄主

(1) **虫株来源** 取自河南省开封县兴隆公社患者朱彦秋,男,3岁,1980年7月22日就诊时,发现原虫密度甚高,经鉴定属于间日疟原虫多核亚种。

(2) **动物寄主(猕猴)** 编号901,是购自广西并饲养数月的健康雌猴,接受患者血后第二天供巴拉巴按蚊叮咬,实验证明间日疟原虫多核亚种进入猴体一天后,仍可感染巴拉巴按蚊。

(3) **媒介按蚊(巴拉巴按蚊)** 是我们实验室培养的,虫卵由成都四川省寄生虫病防治研究所提供。

(4) **接受感染者** 张,男,42岁,1960年曾发过疟疾一次,以后未再发作;程,男,40岁,1973年发过疟疾一次,经根治后从未再发。

三、实验方法和结果

(1) **人工感染巴拉巴按蚊** 一般采用离体吸血的办法。由于间日疟原虫能在猕猴体内发育和繁殖(江静波等,1979),我们将患者朱彦秋的肝素化血12ml,在离体半小时之内从静脉注入901号猕猴体内,约经1小时采猴血检查,计算猴体原虫密度为0.23%,即1万个红细胞中有23个原虫,其中环状体7个,滋养体8个,裂殖体1个,配子母体7个。次日(接种后16小时)用巴拉巴按蚊叮咬该猴,吸血之后分笼饲养,逐日解剖,检查蚊胃和唾液腺共143只,其中131只为阳性,阳性率达91.6%。子孢子进腺时间为叮咬后的第9天。

(2) **用阳性蚊感染自愿者** 1979年8月4日下午和晚上,张、程先后各用一只饥饿的蚊子,扣入指管之内,其口用纱布罩起,将口扣接在前臂内侧的皮肤上,让蚊直接叮咬,至蚊吸饱血后自动离开为止,随即解剖该蚊的唾液腺借以确定其是否为阳性蚊。

(3) 自愿者的发病经过

① 程于1980年6月11日下午发病,距离蚊叮咬的时间为312天。第一次发作体温为38℃。6月13日第二次发作,血中检出原虫,体温为41.4℃。为了等候感染蚊子作蚊体时期观察,他经受了六次发作,每次发作持续约11—12小时,其体温最高时达41℃以上。高热时病人进入昏睡状态,症状比较严重。程自6月22日起服氯喹三天,随即控制发作。

② 张于1980年6月22日出差至广西南宁时在下午4时第一次发作,距蚊叮咬的时间为323天。第二次发作为24日下午2时,头痛发烧,晚上9时急诊,体温为39.5℃,

24日血检查出疟原虫。第三次发作为26日下午11时，高烧，被送入广西医学院保健科急救，当时其本人处于昏睡状态，情况记忆不清，估计体温可能达41℃以上，病情也比较严重。6月26日起服氯喹三天，其症状消失。

这种发病较重的特点和江静波、马鸿激^[1]以及其他作者的报告（张奎等，张绍武，1965；陕西省卫生防疫站寄生虫病科原虫组，1978）是一致的。

(4) 自愿者对媒介按蚊的感染 程于6月21日在郑州河南医学院的协助下用中华按蚊上海品系245只，郑州品系90只，共335只直接叮咬其手臂进行感染。叮咬之后，在饲养中死亡129只，余206只，解剖得卵囊阳性者19只，阳性率为9.2%。张于6月26日在广西医学院协助下用巴拉巴按蚊和微小按蚊进行离体吸血，感染微小按蚊140只，其卵囊阳性率据广西医学院说是100%，感染巴拉巴按蚊120只，带回郑州80只进行解剖，共解剖45只，阳性者16只，阳性率为30.6%。另于7月4日，用其中巴拉巴按蚊3只叮咬本文参加者之一的黄建成，叮咬后立即解剖唾液腺，其中2只查出孢子。黄被叮咬后至今近300天，尚未见发病。

(5) 原虫形态的研究 我们将病人朱彦秋感染的原虫和二自愿者感染的原虫在形态上作了详细对比，发现除了病人朱彦秋血中原虫对红细胞的重复感染较多外，其形态和二自愿者血中的原虫基本上是一致的。朱彦秋血中重复感染多的原因，和他体内原虫密度较高有关。据我们的经验，多核亚种寄生于小孩时红细胞的原虫重复感染通常较多（可能是由于小孩的幼稚红细胞较多的缘故）。

间日疟原虫多核亚种除重复感染多少与寄主年龄和原虫密度有关之外，它的特征如下：①环状体出现双核；②滋养体核大，不活跃；③成熟裂殖体核的数目18—20个；④雄性配子母体常呈淡红色和褚红色；⑤受寄生的红细胞早期出现薛氏点，到后期薛氏点特别粗大而显著，红细胞常有显著变形；⑥常见游离于红细胞之外的原虫等，不但在猕猴体内用血传反复转种传代至第五代仍保留，即使经巴拉巴按蚊体内进行有性生殖之后再感染人仍旧保留不变。因此这种特征的稳定性，排除了可能因受药物影响或受寄主免疫性影响而产生的变异的解释。但它是否一个独立的种，尚须从各方面再予深入研究。英国学者Garnham建议尚须研究同工酶（isoenzyme）和在夜猴体内的红细胞外期。不过在未有确切证据认为它是独立的种或是间日疟原虫或卵形疟原虫的变异株以前，仍应称之为间日疟原虫多核亚种。

四 讨 论

(1) 关于自愿者的发病是否为天然感染的问题

张、程在开封疟疾研究现场实验室经人工感染之后，曾分别到过疟疾流行的地区工作，目前虽无法排除他们受自然界疟蚊感染的可能，但这种可能性不会太大。因为：①张、程二人都是疟防人员，熟悉个人防护，虽在疟疾流行地区工作，但都居住在疟疾发病很少的城市，受疟蚊叮咬的机会很少。他们以往长期没有病史（张20年无病史，程7年无病史），而今又在差不多同一时期内相继发病，天然感染偶合的可能性不大。②我们在疟疾研究现场一起工作的有22人，只有他们二人在人工感染后经约10个月之后相

继发病,由此推断张、程二人的发病极可能是成功的人工感染所致。如果黄建成发病,这一问题就能得到进一步的证实。

(2) 长潜伏期疟疾的研究与我国苏、鲁、豫、皖、鄂五省灭疟的关系

间日疟原虫正常的潜伏期原为9—20天,通常称为短潜伏期。本世纪以来,有许多长潜伏期的报告,有在6个月以上至628天的(如北朝鲜株),其形态与短潜伏期没有差别。由于潜伏期的长短在流行病学上至关重要,而且是疟防工作的重要依据,国外在这方面十分重视,曾做了大量的工作。根据联合国卫生组织的建议依照潜伏期的长短以及复发的情况等将间日疟分为三个类型(见Garnham等1975)^[7]:

I. 潜伏期短(12—20天),无较长的潜隐期(latent period)。

II. 潜伏期短,但初发病与第一次复发(或一连串的间隔短的复发)之间有一长的潜隐期(7—13个月)。

III. 潜伏期长(6个月以上),初发之后继之以一连串的间隔短的复发,随后有一较长的潜隐期并再复发。

在发病方面虽然可以分为以上三型,但在原虫株方面则只有两型:一种潜伏期长,属于温带型,见之于北欧等地和北朝鲜,一种潜伏期短,属于热带型,如东欧和东南亚等地的虫株属此。

苏联Nikolaev于1949年曾分离出一个株,只有长潜伏期(253—381天),没有短潜伏期,他认为是一新亚种,并命名为间日疟原虫长潜伏期亚种(*Plasmodium Vivax hibernans*)。这个亚种曾为Garnham(1966)^[8]所接受,但新近为一些学者如Lysenko(1977)^[9]等所反对。

对于潜伏期之所以会有长短,学者们(如Shute et al,1976)^[10]认为是由于蚊唾腺中有两种子孢子的缘故。一种在入人体之后立即发育,一种则于进入人体后经一休眠时期再开始发育。Lysenko(1977)^[9]称前者为早发型子孢子(tachysporozoite),称后者为迟发型子孢子(bradysporozoite)。热带的间日疟原虫如溪桑株(Chesson strain),蚊体中两种型的子孢子比例大致相等,故虽接种小量的子孢子(如10只),也可出现短潜伏期(Ungureanu,1976)^[11]。温带的间日疟原虫如北朝鲜株(North Korean strain)则不同,其蚊体中的迟发型子孢子的数量大大超过了早发型。因此,若接种小量子孢子(如10只或100只)就不出现短潜伏期,如接种特大量的子孢子(如100,000个)则被接种者全部皆出现短潜伏期(Shute等,1976)^[10]。但是Sergiev和Tiburskaja(见Garnham等,1975)^[7]的早期试验则认为用以叮咬蚊子的只数多少来计算子孢子的数量的话,则接种子孢子的数量与潜伏的长短无关,潜伏期是一种遗传学上的特性。前面提到Nikolaev也曾认为,他分离出的*P. v. hibernans*中并无发现短潜伏期者(该虫株已无留存)。上述现象,目前的解释只是认为某一分离株(isolate)中,可能只有迟发型的子孢子的缘故Lysenko(1977)^[9]。这种说法若正确,则温带地区各地的所有的长潜伏期原虫株,除个别分离株外,必然要携带小量的早发型子孢子。因此,如接种子孢子量大就必然要出现短潜伏疟疾。

我国对间日疟原虫潜伏期的研究做得很少,而且全都是流行病学上调查的结果。张

继铭等于1963年报告江苏省东沟地区有长潜伏期间日疟原虫出现。他们调查了1959年11月至1960年8月出生的婴儿,于1960年7—12月间每月血检均为阴性者40人,在1961年3至5月间再作血检,结果发现40人中疟原虫阳性者为7人,其阳性率为17.5%,这7例应属于长潜伏期。王运章等^[5]于1964年报告了河南省开封地区的长潜伏期间日疟,他们选择研究的对象是在流行季节后,即1962年11月以后出生的婴儿,经过1963年一个传播季节,在传播季节中无发热而血检阴性者有63人,至非传播季节时发现4例为阳性,也应属于长潜伏期。另外在2岁以上无病史的(1963年6—9月无发热史,10、11、12月份连续检查为阴性者)48人,有5例在元月之后非传播季节中出现原虫,这5例可能也是属长潜伏期。合计111人中,有9人出现长潜伏期疟疾,占8.10%。青岛医学院疟疾防治研究组(关于长潜伏期型间日疟疾的初步探讨,1974)于1972年非流行季节1—7月15日以前调查了山东即墨县兰村公社现症病370人,其中两年内(70—71)无病史者为325例,占全部病人的87.8%,他们可能都属于长潜伏期者。孟祥瑞(间日疟原虫长潜伏期虫株流行病学观察,1977)于1974年在山东休止期检查了间日疟发病者19例,其中有18例(94.5%)在传播期均未患过疟疾,因此他认为这18例都属长潜伏期间日疟。辽宁省卫生防疫站(辽宁省长潜伏期间日疟流行特点及其防治效果的观察,1978)对1962年出生的婴儿57名作为1964年长潜伏期的观察对象,发现有一例无疑是长潜伏期疟疾。此外他们又对1963年7月29日—8月29日期间(流行季节),由沈阳医学院(非疟区)到东沟县(疟区)支援抗疟工作的200名学生回校后进行检查,1964年5月6日到8月2日期间有6人发病,均被确诊为疟疾,同校2000名其他同学均无一疟疾病例的报告。这6人之中,只1人在十年前得过疟疾,从无复发过,而其他五人则从未有过疟史,因此这6例都属长潜伏期;据推算所得,其潜伏期的长度为9个月至12个月。辽宁省卫生防疫站还分析了五年间疟疾流行与中华按蚊密度的关系,发现按蚊与患者不是当年的关系,而是隔年的关系,这样看来在辽宁流行的疟原虫,显然是以长潜伏期疟原虫株为主。

上述的研究,在流行病学的角度上都阐明了间日疟原虫长潜伏期株确实存在于江苏、河南、山东、辽宁等地区,而其中一些地区所流行的主要还是长潜伏期株间日疟。但是到目前为止,尚未从实验的角度上证明我国长期潜伏虫株的存在,也未曾在我国分离出一个长潜伏期虫株,因此我们也无从在实验的角度上去探讨其生物学特性作为防治措施的依据。我们以阳性蚊感染自愿者倘能连续感染成功,则将会分离出我国第一个长潜伏期虫株,并获得准确的潜伏期以及其他的重要资料。

我国疟疾防治工作虽取得巨大的成绩,但长期以来对基础理论研究重视得不够。在与防治工作息息相关的长、短潜伏期问题上,例如在广大的黄淮地区,到底是短潜伏期为主或长潜伏期为主?我们是心中无数的。又由于对我国长潜伏期株不够了解,同时也不够重视,我们过去的抗疟措施如治疗现症病人,抗复发治疗等主要都是针对消灭短潜伏期间日疟。这些措施无法打击长潜伏期间日疟,而使每年有大批长潜伏期间日疟原虫漏网。这一传染源的逐年积累,很可能造成又一次的爆发性的流行。这样一个事关重大的问题,应该使我们严重注意。此外,我国在苏、鲁、皖、豫、鄂五省大力开展抗疟防疟工作已二十年,疟疾并未得到根除,常有反复回升的情形,这一现象的产生,

其主要原因之一,可能就是由于这些地区流行着长潜伏期间日疟原虫的缘故。

国外所报告的间日疟原虫长潜伏期株,其形态并无特异之处。即便是 Nikolaev 所报告的一新亚种“间日疟原虫长潜伏期亚种”(Plasmodium vivax hibernans)在形态上也与典型的间日疟原虫无异^[8]。江静波等^[3,4]报告的流行我国的间日疟原虫多核亚种,在形态上介在间日疟原虫和卵形疟原虫之间,此外也还有它本身的特点;其致病力似比间日疟原虫强^[1],复发率也高。因此对这一长潜伏期间日疟原虫的研究不只是虫株的问题,也牵涉到间日疟原虫多核亚种是否一个独立的种的问题。

参 考 文 献

- [1] 江静波、马鸿激:广东一例人体寄生疟原虫的特异形态的研究,中山大学学报(自然科学版),(1961)2, 7—12.
- [2] 江静波、陈俊民,一株流行广东的间日疟原虫的特异形态,中国动物学会动物生态及分类区系专业学术讨论会论文摘要汇编,(1962),19.
- [3] 江静波、余锡尧、陈俊民,流行我国的间日疟原虫一新亚种,中山大学学报(自然科学版),(1965), 1, 131—132.
- [4] 江静波、余锡尧,间日疟原虫多核亚种与相近两种疟原虫的比较,寄生虫学报, 2(1965), 4, 333—346.
- [5] 王运章、崔祖让、杨青嫻、丁筱春、苏寿诤,开封地区间日疟原虫长潜伏期的初步观察,河南医学院学报,(1964),18.
- [6] Young, M. D. and Eyles D. E., Parasites resembling *Plasmodium ovale* in strains of *Plasmodium vivax*, *Journal of National Malaria Society*, 8 (1949), 3, 219-223.
- [7] Garnham P.C.C., Bray. R. S., Bruce-Chwatt L. J., Draper, C.C., Killick-Kendrick, R., Sergiev, P. G., Tiburskaja. N.A., Shute, P. G., and Maryon M., A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: Morphological biological characteristics, *Bulletin of WHO*, 52 (1975), 1, 21-32.
- [8] Garnham P.C.C., *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1966.
- [9] Lysenko A. TA. Beljaev, A. E. and Rybalka, V. M., Population studies of *Plasmodium vivax*. 1. The theory of polymorphism of sporozoites and epidemiological phenomena of tertian malaria, *Bulletin of WHO*, 55(1977), 5, 541-549.
- [10] Shute, P. B., Lupascu, GH., Branzei P., Maryon, M., Constantinescu, P., Bruce-Chwatt, L. J., Draper, C.C., Killick-Kendrick R., Garnham P. C.C., A strain of *Plasmodium vivax* Characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the of the prepatent period, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70 (1976), 474-481.
- [11] Ungureanu, E., Killick-Kendrick, R., Garnham, P. C. C., Branzei P., Romanescu, C., and Shute, J. G., Prepatent periods of a tropical strain of *Plasmodium Vivax* after inoculations of tenfold dilutions of sporozoites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70 (1976), 482-482.

The Long Incubation Period of Two Experimental Human Cases of *Plasmodium Vivax multinucleatum*

Jiang Jingbo Zhang Shaowu Cheng Fenchuan
Wang Hengli Huang Jiancheng Liang Dongsheng

Abstract

A new subspecies of human *Plasmodium*, namely, *P. vivax multinucleatum* was reported by Jiang, Yu and Chen in 1965 which appeared to be closely related but different from *P. vivax* and *P. ovale*. Since then reports of this parasite by various investigators in this country show that it is a common parasite in the North and Central China. Our recent investigations indicated that five successive passages among the splenectomized rhesus monkeys the blood of which had been partly replaced by human blood would not change the diagnostic characteristics of this parasite, and the oocysts of it in *Anopheles balabacensis* and *A. hyrcanus sinensis* differed from both *P. vivax* and *P. ovale* in having much fewer pigment granules (usually below 30 in number) which were not arranged in any definite patterns like that in the latter two well known species (unpublished papers).

The present paper reports the experimental infections on two of our collaborators, Mr. Cheng and Mr. Zhang, via the bites of infected mosquitoes, *A. balabacensis*. The parasite was isolated from a three years old child of the Kaifeng County, Henan province. 91.6% of *A. balabacensis* became infected after feeding on a rhesus monkey (weighing 2kg) to which 12 ml. blood of this child had been transfused a day before feeding (therefore, the gametocytes of this parasite must survive very well in this experimental host and did not lose their infectivity at least for a day). Each of our two collaborators, Mr. Cheng and Mr. Zhang allowed himself to be bitten by one of the infected mosquitoes on 4th of August, 1979. Mr. Cheng experienced the first malaria attack on 11th of June, 1980, while Mr. Zhang on 22nd of the same month. Thus, the incubation period of the former case was 312 days and of the latter 323 days. In both cases the symptoms were very severe and prolonged (lasting for 11-12 hours) with the highest temperature of 41°C or more and both experienced a state like coma.

Occasional visits of both Mr. Zhang and Mr. Cheng to malaria endemic regions made it impossible to exclude the possibility of natural infection, though very unlikely it was. Thus three *A. balabacensis*, two of which were proved positive for sporozoites after feeding the infected blood of Mr. Zhang, were allowed to bite Mr. Huang, another collaborator of us. Nine months have now past, and Mr. Huang apparently remains healthy. We believe that Mr. Huang will have a malaria attack later which will re-confirm the long incubation period of this parasite.