DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.05.015

技术与方法

新型隐球菌动物接种实验观察

叶庆衍 唐书谦 钟白玉 （西南医院 皮肤科）

临床为了观察分离出的隐球菌的毒力，以鉴别是否为新型隐球菌（以下简称新隐），或制备动物感染模型以供教学或药物研究，均需进行动物接种，但对接种的某些问题尚无一致意见。现将本科真菌室对小白鼠不同途径接种的实验结果报道如下。

1 材料与方法

将从患者分离鉴定后的新隐，转种于沙博氏琼脂37℃孵育3天，用生理盐水制备成每ml约50万个孢子的悬液。实验动物为本校动物室自繁杂种小白鼠，按接种途径分颅内、尾静脉和腹腔3组，各10只。

颅内接种量为0.05ml菌液（2.5万孢子）；尾静脉接种量为0.2ml（10万孢子）；腹腔接种量为0.5ml（25万孢子）。每日观察，待动物自行死亡或20天～30天后处死尸检。分别取心、肺、肝、脾、肾和脑组织作真菌培养及病理切片，HE和PAS染色。取脑组织方法为头皮消毒后，剪开头皮和两眼间颅骨，将颅顶骨掀开剪除，再用剪刀从脑前部插入脑底，稍分离即可完整地取出脑组织。腹腔接种者尸检时注意腹腔内有无灰白色胶质样结节，可取此结节培养与病理检查。

2 结果及讨论

2.1 颅内接种当天死亡2只未作检查，余下8只在3天～10天内死亡6只，另2只于20天后处死。尾静脉接种10只，4天～12天内死亡7只，另3只于30天后处死。腹腔接种10只，6天～20天内死亡5只，另5只于30天后处死。20天内自行死亡者共18只，占64%。各组不同组织培养及病理检查结果见下表：

表 各组不同组织培养及病理检查结果

接种途径	接种只数	培养阳性只数							病理阳性只数						
		腹膜	心	肺	肝	脾	肾	脑	腹膜	心	肺	肝	脾	肾	脑
颅内	8	0	4	5	5	3	4	8	0	4	4	5	3	4	9
尾静脉	10	0	5	6	6	4	4	10	0	4	4	5	2	4	10
腹腔	10	10	4	3	6	5	4	8	10	4	3	5	5	3	8
合计	28	10	13	11	17	12	12	26	10	12	11	15	10	11	26

2.2 小白鼠对新隐高度敏感，但接种途径、接种量和剖验时间尚不一致。Rippon指出尾静脉接种1万～500万个孢子后，多在7天～10天死亡[1]；Finegold指出腹腔接种约3周发生脑损害，颅内接种则在1周内发生，如不死应在3周末杀死剖检[2]；Kao提出腹腔接种后如不死就在5周后杀死[3]；Hasenclever报道颅内接种300万孢子，如2个月不死才杀死[4]。本文3种途径分别接种2.5万～25万个孢子，均引起感染。但颅内接种有2只到20天仍存活，尾静脉接种的3只和腹腔接种的5只到30天时仍存活，这可能与各小鼠对新隐感染的耐受性不同有关。有报导同一株新隐对不同小鼠的毒力可相差1000倍[4]。当然不同菌株毒力也有很大差异，Emmon[6]指出有些菌株对小鼠毒力很低，甚至接种1亿孢子也不致死。本文64%动物在20天内死亡，为了及早观察实验结果，我们同意Finegold提出的在3周末杀死的意见，而

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

且为了避免小鼠个体差异，每一菌株应同时接种数只小鼠。

2.3 判断小鼠接种后是否致病，最初只根据肝、脾培养结果[3]，以后才根据脑培养结果[4]。本文显示颅内或尾静脉接种后，全部有脑组织感染；腹腔接种者，均可见腹腔脏器表面或肠系膜有感染形成的结节。从本研究结果看出，进行新隐动物试验，3种接种途径均可，但颅内和尾静脉接种感染出现早，而腹腔接种方法简便；然后分别取脑或腹腔结节检查。

参考文献

1. Rippon JW. Medical Mycology. 2nd ed. Philadelphia: unders. 1982:532～558
2. egold SM, et al. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 6th ed. St. Louis: Mosby Co. 1982:438
3. Kao CJ, et al. The isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon nests. Am J Clin Path 1957;27:652
4. Hasenclever HF, et al. The prevalence and mouse virulence of Cryptococcus neoformans strains isolated from urban areas. Am J Hyg 1963;78:227
5. Emmons CW, et al. Medical Mycology. 3rd ed. Philadelphia:Loa & Febiger. 1977:206～229

（收稿：1989.11.14；修回：1990.07.11）

用DEAE纤维素粉柱清除疟原虫感染血中白细胞

庞林华 胡友梅（药理教研室）

随着对疟原虫生化代谢体外研究的日益增多，清除感染血中白细胞以提高结果的可靠性问题已引起越来越广泛的重视。我们通过借鉴同行的报道，摸索出了一种简便有效的方法。

1 方 法

疟原虫（P. yoelii, yoelii, By265株）感染血中白细胞的清除采用纤维素粉柱过滤法[1]加以改进，具体步骤如下：

取一直径为0.5cm之层析柱，将出口用少许脱脂棉堵塞以防漏出，然后将DEAE纤维素粉（DE 11型，英国进口分装）充填于柱内，使成一高约5 cm，内无明显空隙的纤维素粉柱。使用前用pH7.4的PBS（磷酸缓冲盐液）将该柱浸湿并联于负压抽滤装置。

于小白鼠（昆明种，体重18g～24g，雌雄不拘）腹腔接种疟原虫后第5天，选择红细胞感染率达10%以上的小鼠，摘眼球取血于肝素抗凝瓶内，涂片吉氏染色计数白细胞，再按1:4的比例加入PBS稀释，然后将5 ml标本加入1支纤维素粉柱内，在恒定负压下调节流量为1 ml/min进行抽滤。处理后的标本经离心弃上清后再用PBS清洗2次，然后将沉积细胞稀释至原血液量，涂片染色计数白细胞并观察疟原虫形态。为确定该方法对疟原虫感染力的影响，将处理前后的标本按每只小鼠200万个感染红细胞分别接种20只小鼠，并于接种后第24、48和72h分别取血样涂厚、薄片检查感染情况。

2 结 果

2.1 清除白细胞的效果

白细胞清除效果的评价采用对比计数处理前后100个高倍视野（1000个红细胞/高倍视野）中白细胞数目的方法进行。结果可见血液标本经DEAE纤维素粉柱过滤后未见白细胞存在（表1）；用低倍镜观察整个涂片也未发现白细胞。表明该方法能清除血中所有白细胞。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net