

# 藥試所毒理研究之SPF動物房微生物監測系統

## III · 寄生蟲監測系統

蔡三福、廖俊旺、王順成

### 前 言

本所在八十四及八十五年度已相繼建立SPF動物房環境及實驗動物之細菌監測系統、病毒、黴漿菌之病原血清抗體監測系統，內容包括傳統細菌鑑定法、各種快速細菌鑑定套組系統之組合及酵素免疫分析法（ELISA）檢測病原血清抗體等，對相當重要病原已建立完整監測之體系。唯國內的毒理實驗動物微生物檢疫系統尚缺寄生蟲之監測系統，為完整化毒理實驗動物健康監測系統，乃進行寄生蟲監測的探討。國內有關實驗動物寄生蟲感染調查報告方等（1990），發現大鼠（rats）感染大鼠蟯蟲（*Syphacia muris*）及鼯鼠（mice）感染鼯鼠蟯蟲（*Syphacia obvelata*）均甚普遍，范等（1991）調查國內各實驗動物中心，包括大鼠、鼯鼠及兔子腸道內寄生蟲感染情形，曾發現一種或多種腸道蠕蟲或原蟲之感染。而此等病原均可影響毒理實驗正確性，尤其對於長期性或慢毒性的相關試驗研究影響尤大。依規定SPF動物房中是不允許任何內、外寄生蟲存在。本文主要繼細菌、黴漿菌及病毒監測系統後，針對新購實驗動物及進行長期動物毒理試驗時需建立寄生蟲監測流程，包括以塗抹法、浮游法、離心沉澱法及Trichrome染色法進行之內寄生蟲（腸道蠕蟲及原蟲）鑑定，另以解剖顯微鏡及皮膚括取之外寄生蟲等監測流程加以說明，並對實驗大鼠常見的寄生蟲分別介紹，使SPF動物毒理研究及相關設施之微生物監測系統整體化，俾利各種毒理試驗研究之進行。

### 試驗材料與方法

檢疫的實驗動物品系主要以配合本所常用的大鼠為主，用解剖顯微鏡檢查老鼠口、眼、耳後、頸部皮毛有無外寄生蟲，以乙醚將老鼠麻醉後放血，取血液經離心後之血清進行病原血清抗體檢查。從呼吸道系統及消化道系統處吊取細菌培養，再分別使用Rapid-NF、GFB-12電腦密碼細菌鑑定法及API kit鑑定法等鑑別細菌種類。而監測的寄生蟲包括取皮膚毛屑（囊）以光學

顯微鏡及解剖顯微鏡進行外寄生蟲之監測法；取腸內容物利用塗抹法、離心沈澱法、浮游法及Trichrome染色法方式檢查內寄生蟲，檢驗包括阿米巴原蟲（*Entamoeba muris*）、梨形蟲（*Giardia muris*）、鞭毛蟲（*Spirotrichomonas muris*）、鞭毛蟲（*Trtrichomonas muris*）、條蟲（*Hymenolepis nana*）及大鼠蟯蟲等主要病原。鑑定流程則依本所SPF動物房需要做適度修正，若檢出寄生蟲時，立即進行組織病理學觀察，以建立標準檢疫試驗程序。茲將流程步驟說明如下。

## 一、動物之採樣

（一）新購入動物之取樣：新購實驗動物經由無菌盒送達後，以隨機取樣方法取5%之動物或至少雌雄各4隻，進行解剖。

（二）試驗期內動物之取樣：對於長期性的試驗研究每13週，從各飼育室依試驗組分別隨機取樣，至少雌雄各4隻進行解剖。

（三）解剖過程：實驗動物以乙醚麻醉後，於操作台上，以仰臥方式固定於軟木板上，先剪開皮膚至下顎，再剪開腹腔，以採血針插入腹部動脈後放血，取血液2-5mL裝於血球血清分離管內，再置於離心機以775Xg離心15分鐘，取上清液裝於血清瓶中並置於-18°C中備用。

## 二、寄生蟲監測

以下乃針對於新進實驗動物進行檢疫，所建立的寄生蟲健康監測方法：

### （一）內寄生蟲（包括原蟲）監測方法：

1. 蓋玻片薄層塗抹法（Coverglass thin smear; 一般稱為直接塗抹法）：滴一滴生理食鹽水或水於載玻片上，以竹棒取一米粒大小之糞材與之攪拌塗抹均勻，蓋上蓋玻片，以強光或增加糞材量以增加蟲卵之檢出率。而原蟲之檢查宜取較少量，當糞材蟲卵數目極少，糞材殘渣太多時均易影響判讀結果。

### 2. 浮游法（Flotation）：

（1）原理：利用溶液的比重大於蟲卵，使蟲卵上浮集中於液面下以利檢查，主要以檢查鉤蟲卵為主，因此法對鉤蟲卵具有濃縮作用，易檢出，唯對吸蟲類、條蟲類及原蟲類較不易監測。常使用的溶液有飽和的食鹽水溶液、硫酸鋅溶液及蔗糖溶液等。

#### （2）飽和食鹽水浮游法：

配製：以蒸餾水加入過量的食鹽，加熱攪拌溶解，待冷卻後有食鹽結晶析出時，食鹽水即為該溫度時之飽和食鹽水，比重約為1.20。

操作步驟：取糞材1g置入盛有10ml之蒸餾水試管中以竹棒攪拌均勻後，以一層濕紗布及漏斗過濾入15ml離心管中，置入離心機以2000rpm，離心2分鐘去上層液，加入飽和食鹽水並以竹棒攪拌均勻，再加入飽和食鹽水，使管口之液面因表面張力而鼓起，靜置30分鐘至1小時後，以蓋玻片（22mm×22mm）沾取鼓起之液面，將蓋玻片直接放在載玻片上鏡檢。

### 3. 離心沈澱法（Centrifugal sedimentation）：

#### (1) 福馬林-乙醚離心沈澱法（formalin-ether）：

操作步驟：以竹棒取約1g糞材置入盛有10ml水之15ml試管中攪拌均勻。以一層濕紗布及漏斗過濾入15ml離心管，以2000rpm，離心2分鐘，去上清液後，加入8ml之10%福馬林，以竹棒攪拌均勻靜置10~20分鐘後，加入4ml乙醚。蓋住管口，上下強力搖動10秒鐘後迅速置入離心機，再以2000rpm，離心2分鐘後，取出離心管，以竹棒緊貼內管壁攪動糞層後將上清液及糞層倒掉（應避免振動，以免管底之沈渣被倒掉）。以吸管取沈渣鏡檢，或將沈渣加上適量碘液或其它染色液後鏡檢。

\* 乙醚之作用：溶解糞材中的油脂類並形成微小顆粒使附著在粗大物體以增加其浮力，減小其比重，使該物體在離心時浮集在糞層中。

#### (2) 汞碘醛離心沈澱法（merthiolate-iodine-formalin；MIF）：

此法最適合用以檢測糞材中的原蟲，而阿米巴的營養體也可以被固定保存檢出。此法因具紅色的背景能襯托出蟲卵，易於發現蟲卵存在，若蠕蟲與原蟲均需檢查時，為常被使用而有效的方法。

配製：

M儲存液：

Merthiolate-----	1g
酒精(96%)-----	500ml
丙酮(acetone)-----	100ml
伊紅(eosin)-----	2g
以上加蒸餾水至	1000ml

MF儲存液：

M儲存液-----	200ml
蒸餾水-----	250ml
福馬林原液-----	25ml
甘油-----	5ml

魯氏碘液 (Lugol's solution) :

結晶碘 (iodine, crystal) -----5g  
碘化鉀 (potassium iodide) -----10g  
蒸餾水 -----100ml

※先將碘化鉀溶於蒸餾水後再加結晶碘，以利碘之溶解；且需每2~3週更新一次。

操作步驟：1g 糞材固定保存於 10ml MIF 溶液中 ( MIF 儲存液 9.4ml 加魯氏碘液 0.6ml ；一般以 MIF 儲存液：魯氏碘液=15 : 1 比例配製，配好後盡速用完)。糞材固定後，以一層濕紗布及漏斗過濾入 15ml 離心管中，再加入 4ml 乙醚，其後步驟與福馬林-乙醚離心沈澱法所述加入乙醚後相同。

※福馬林-乙醚法及 MIF 法同為離心沈澱法但卻有不同的優點，福馬林-乙醚法對條蟲及線蟲最有效且操作簡單，並可長期保存蟲卵，而 MIF 法具有染色效果，對微小的原蟲類較易於判讀。

#### 4. Trichrome 染色法：

(1) 配製：

Trichrome 染液：

Chromotrope 2R -----0.6g  
Light green SF -----0.3g  
磷鎢酸 (Phosphotungstic acid) -----0.7g

※先取少量蒸餾水攪拌溶解30~60分鐘後，加蒸餾水至100ml。

Schaudinn 氏固定液 (通常含5%冰醋酸)：

飽和氯化汞溶液2份加95%酒精1份。

(2) 操作步驟：

a. 以竹棒將新鮮糞材塗抹於載玻片之三分之一部份。迅速沒入含5% 之冰醋之Schaudinn 氏固定液中30分鐘。固定之糞材如前述方法塗抹後，使之乾燥。

b. 置入含70% 酒精中，15分鐘後水洗。

c. 置入含少量碘之70% 酒精中，3分鐘。

d. 置入含70% 酒精中，1分鐘。

e. 更新70% 酒精，1分鐘。

f. 以 Trichrome 染色液，8~15分鐘。

g. 置入含1% 冰醋酸之90%酒精中，1~2秒。

h. 置入含無水酒精中脫水30秒。

i. 置入二甲苯 (xylene) 中，1分鐘。

j. 取出後蓋上蓋玻片乾燥之封片滴上Permount或balsam等，。

\* 由於離心沈澱法及Trichrome染色法之部份藥劑具有毒性，操作過程應於抽氣櫃中進行，以維護技術人員的安全。

(二) 外寄生蟲之監測方法：外寄生蟲檢查較為方便，以解剖顯微鏡對於大鼠的皮毛進行直接鏡檢觀察後，再括取皮膚的毛屑 (囊) 置於玻片上，滴上2%KOH溶液後以光學顯微鏡針對毛囊蟲及疥癬蟲進行監測。

## 結果與討論

寄生蟲的種類繁多，由於SPF動物房中絕對不容任何內外寄生蟲的存在，因此如何篩選適合健康監測的方法或流程，以針對不同寄生蟲種類進行監測顯得相當重要，快速排除動物房飼養環境生存的寄生蟲，縮短判讀的時間，達到快速而正確檢疫是維護SPF動物之重要程序。本文將針對一般傳統動物房實驗大鼠常見的寄生蟲種類加以探討，如大鼠常罹患之內外寄生蟲種類 (表1.) 詳述如下：

### 一. 內寄生蟲

(一) 原蟲類：腸鞭毛蟲 (Enteric flagellates；例如 *Tritrichomonas* sp. , *Tetratrichomonas* sp. 、 *Pentratrichomonas* sp. 、 *Trichomitis* sp. 、 *Hexamastix* sp. 、 *Enteromonas* sp. 、 *Retortamonas* sp. 、 *Chilomastix* sp. 、 *Monocercomonoides* sp. and *Octomitus* sp.) 在實驗鼠非常普遍，唯無致病性。鼠梨形鞭毛蟲 (*Giardia muris*) 和鼠六鞭毛蟲 (*Spirotrichomonas muris*) 亦常見，其致病力強，嚴重感染時會引起下痢和腸道病變。*Pneumocystis carinii* 一度被認為是酵母菌，現今確認為孢子蟲綱，是一種無所不在，且具高感染率的寄生蟲，它能感染不同種類老鼠的肺臟，在傳統動物房內很常見。病變可見肺臟擴張且富有彈性，肺泡壁增厚及細胞增生，肺泡內充滿蛋白性、嗜伊紅性的泡沫狀物質，並可見巨噬細胞和不同發育時期的蟲體，唯需以特殊染色如methanamine silver or periodic acid-schiff才可觀察到蟲體。其它的孢子蟲綱尚有鼠阿米巴原蟲 (*Entamoeba muris*) 和大腸纖毛蟲 (*Balantidium coli*.) 在大鼠的大腸內可發現，唯無致病性 (Flynn, 1973; Hsu, 1979)。

(二) 線蟲類：大鼠蟯蟲常寄生於盲腸和結腸，在糞材和肛門中均可發現其受精卵，在部份新進大鼠可檢出蟯蟲的蟲體及蟲卵 (圖1.)。大

鼠可藉由食入蟲卵或幼蟲自肛門移行至結腸而感染。大鼠蟯蟲和鼯鼠蟯蟲非常類似。這兩種線蟲均可感染大、鼯鼠，常在同一宿主身上發現。此寄生蟲潛伏期18~23天，通常無致病性，唯大量的寄生對宿主會產生消化道的病變 (Flynn, 1973; Hsu, 1979; Oldstone, 1967)。診斷上由大腸內容物是否有線蟲及糞材是否有蟲卵可知。另外亦可應用透明膠帶貼於肛門處以觀察幼蟲。因為蟲卵對環境因子和消毒藥有抵抗力，且能產生自體性感染，根除非常困難，可藉由剖腹生產和嚴格的健康監測管制等杜絕感染。

(三)條蟲類：實驗用的齧齒類實驗動物常可發現束狀囊蟲 (*Cysticercus fasciolaris*)、短小包膜條蟲 (*Hemenolepis nana*) 和縮小包膜條蟲 (*Hymenolepis diminuta*) 等條蟲類寄生於宿主的小腸。其中以短小包膜條蟲最常見，其寬僅1mm，長約7~100mm，生活史分直接感染和間接感染。蟲卵被食入後形成六鉤幼蟲，穿過腸粘膜形成擬囊尾幼蟲 (*Cysticercoid larva*)，最後寄生在腸道，待成熟後產卵於糞材中，此直接感染從產卵、孵化至完成整個生活史均在單一寄主的腸內進行。而間接感染的生活史需經中間宿主，在中間宿主 (殼類甲蟲或跳蚤) 體內形成擬囊尾幼蟲，等待最終寄主攝入。嚴重感染短小包膜條蟲時會引起腸炎，且短小包膜條蟲亦感染靈長類，包括人類，因可不需經中間宿主，並引起自發性感染，造成公共衛生上很大的問題。其診斷方式為在糞材中可檢出含六鉤幼蟲 (*hexacanth embryos*) 的蟲卵或在腸道內可檢出成蟲 (Hsu, 1979)。

## 二. 外寄生蟲

在具規模實驗動物房的飼養環境並不適合節肢動物和蜘蛛類的生存或完成其生活史，例如昆蟲類的鼠蝨 (*Polyplax spirulosa* 和 *Hoplopleura pacifica*) 和鼠蚤 (*Xenopsylla* sp.、*Leptopsylla* sp. 和 *Nesopsyllus* sp.) 通常只存於野鼠身上，如節肢動物中 *Mesostigmate mites* 對宿主無選擇性，偶可在實驗大鼠身上發現；*Astigmatate mites* 包含癬蝨 (*mange mites*)，對宿主具選擇性且在宿主身上完成其生活史，嚴重的昆蟲類和蜘蛛類感染會導致老鼠的貧血、衰弱、降低生殖率和死亡。昆蟲類和蜘蛛類由於可以媒介傳播各種人畜共通傳染病，因此在公共衛生學上佔了相當重要的地位。藉由實施健康監測進行防範是檢疫工作的最佳方法 (Flynn, 1973; Hsu, 1979; Oldstone, 1967)。

雖然本健康監測的流程方法，以實驗大鼠為監測的主要對象，然設計初期即已考慮涵概各種實驗動物的品系，包括本所可能飼養於SPF動物房的鼯鼠、兔子、天竺鼠及狗在內，此考慮不限於寄生蟲監測系統，而以微生物監

測體系整體性為考量目標。只是建立之初將複雜的實驗動物品系予以簡單化，以免龐大的資料與方法無從篩選及比較，迨體系建立完成後即可對其它實驗動物進行相同監測的工作，如對紐西蘭白兔的檢疫中應用此監測流程可檢出多種的原蟲（圖2.）。本年度毒理研究SPF動物及相關設施之微生物監測系統中寄生蟲監測系統的完成，對建立本所完整之微生物監測GLP準則及長期性的試驗研究之正確性甚為重要。本所毒理實驗在完整化與標準化的微生物監測系統的支援下，對進行呼吸毒性、長期性或慢毒性的相關試驗研究之正確性之提昇，將有實質之助益，同時更可提昇國內外毒理實驗之標準認證。

誌謝：本文之完成，蒙國立中興大學獸醫系王俊秀教授在原蟲類判讀上的悉心指導及國立陽明大學動物中心主任蔡洪又欽博士提供相關資料，謹此誌致謝。

表1. 大鼠常見內寄生蟲其大小及寄生部位之比較

寄生蟲名稱	種類	大小	寄生部位
阿米巴原蟲 ( <i>Entamoeba muris</i> )	原蟲	8-30 $\mu$ m (營養體)	寄生於盲腸及直腸
梨形鞭毛蟲 ( <i>Giardia muris</i> )	原蟲	5-10 x 7-13 $\mu$ m (營養體)	寄生於小腸的絨毛間
六鞭毛蟲 ( <i>Spironucleus muris</i> )	原蟲	2-3 x 7-9 $\mu$ m (營養體)	寄生於小腸的絨毛及腺窩；胃的幽門腺體
腸鞭毛蟲 ( <i>Trtrichomonas muris</i> )	原蟲	10 x 16-26 $\mu$ m (營養體)	寄生於盲腸及直腸
條蟲 ( <i>Hymenolepis nana</i> )	條蟲	25-40x0.75 $\mu$ m (成蟲)	寄生於小腸並侵入黏液層
大鼠蟯蟲 ( <i>Syphacia muris</i> )	線蟲	雌蟲長2.8-4.0mm 雄蟲長1.2-2.3mm	寄生於盲腸及直腸

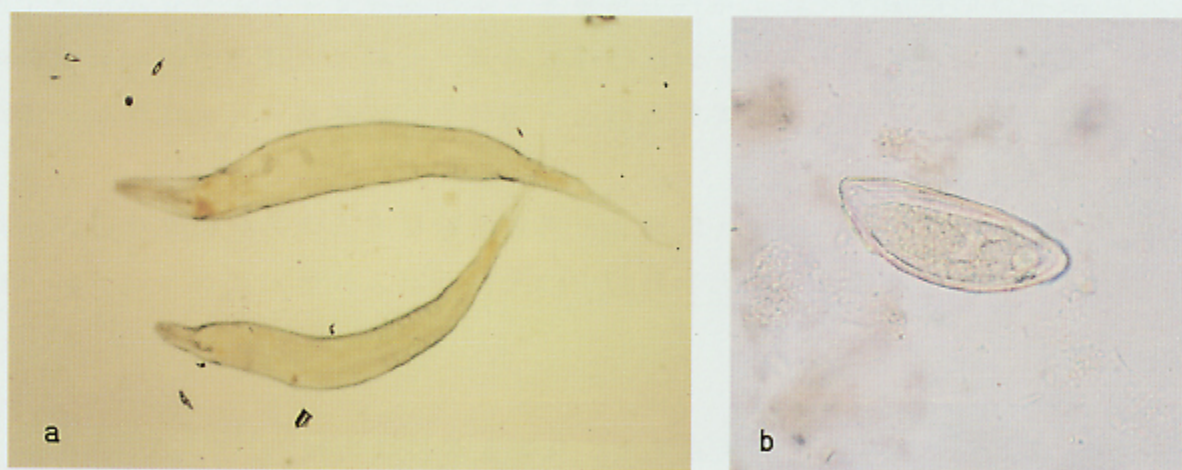


圖1. 部份新進大鼠受到蛻蟲感染檢出圖,(a)雌蟲長約2.8-4.0mm。50x。(b) 蛻蟲蟲卵呈橢圓形且一側扁平。100x。



圖2. 部份紐西蘭白兔受到原蟲感染檢出圖,(a)腸型球蟲 (*Eimeria magna*)。800x。(b)肝型球蟲 (*Eimeria stiedai*)。1600x。