

文章编号: 1000-7423(2007)-01-0053-04

【实验研究】

# 三种方法检测福寿螺肺囊内广州管圆线虫效果的比较研究

刘和香, 张仪, 吕山, 朱丹, 王显红, 胡铃, 周晓农\*

**【摘要】** 目的 比较肺检法、匀浆法和酶消化法检测福寿螺肺囊内广州管圆线虫的效果, 以寻找快捷检测方法。方法 将 60 只实验室人工感染广州管圆线虫的福寿螺均分 2 组, 分别解剖成螺肺囊与肌肉两部分。镜检两组螺肺囊广州管圆线虫幼虫结节数, 用匀浆法和酶消化法分别检测螺肺囊中广州管圆线虫幼虫, 比较不同检测方法的效果。酶消化法同时检测福寿螺肌肉内幼虫数, 分析螺肺囊与肌肉内幼虫数的相关关系。结果 肺检法、匀浆法和酶消化法等 3 种方法检测螺肺囊内幼虫的灵敏度依次为 96.7%、93.4% 和 100%, 差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.069$ ,  $P>0.05$ )。肺检法的检测速度明显快于匀浆法与酶消化法, 差异具有统计学意义 ( $Z=4.782$ ,  $P<0.01$ ); 螺肺囊与肌肉组织内的幼虫数呈正相关 ( $r=0.847$ ,  $P<0.01$ )。结论 肺检法的检测效果与匀浆法和酶消化法相似, 但其检测速度更快, 适合现场大规模螺体广州管圆线虫的定性筛查。

**【关键词】** 广州管圆线虫; 福寿螺; 期幼虫; 幼虫结节; 肺囊

中图分类号: R383.19

文献标识码: A

## A Comparative Study of Three Methods in Detecting *Angiostrongylus cantonensis* Larvae in Lung Tissue of *Pomacea canaliculata*

LIU He-xiang, ZHANG Yi, LV Shan, ZHU Dan, WANG Xian-hong, HU Ling, ZHOU Xiao-nong

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】** Objective To compare the efficiency of three methods, lung-microscopy, tissue homogenate and enzyme digestion in the detection of *Angiostrongylus cantonensis* larvae from the lungs of snails. Methods 60 *Pomacea canaliculata* infected by the first-stage larvae of *A. cantonensis* were divided into 2 groups and the lung of each snail from the two groups was separated from the soft body. All the lungs were examined under microscope and larval nodes were counted. Each lung from one group was ground and that from the other was artificially digested by enzyme, the number of larvae in each lung was recorded. The efficiency of three methods was compared. Enzyme digestion was also used to estimate number of larvae in lung and in other body parts. Results By using enzyme digestion as the standard method, the detection rate of lung-microscopy, tissue homogenate and enzyme digestion was 96.7%, 93.4% and 100% respectively ( $\chi^2=2.069$ ,  $P>0.05$ ), while the lung-microscopy was significantly faster ( $Z=4.782$ ,  $P<0.01$ ). The number of larvae in snail lung was positively correlated with that in other part ( $r=0.847$ ,  $P<0.01$ ). Conclusions The lung-microscopy in larvae detection is similarly efficient to the other two methods but faster, which is therefore more suitable for snail screening in the field.

**【Key words】** *Angiostrongylus cantonensis*; *Pomacea canaliculata*; Third-stage larva; Larval node; Lung tissue

Supported by the Key Science-Technology Project of the National Tenth Five-Year-Plan of China (No.2003BA712A09-01)

\* Corresponding author, E-mail: ipdzhouXN@sh163.net

广州管圆线虫感染期幼虫必须在软体动物体内发育完成, 因此软体动物在传播广州管圆线虫中起到极其重要的作用。随着福寿螺的入侵和不断扩散, 我国

广州管圆线虫呈扩散趋势<sup>[1-3]</sup>。目前, 在其众多中间宿主中, 除褐云玛瑙螺外, 福寿螺的广州管圆线虫自然感染率最高 (65%), 在温州地区其自然感染率高达 69%<sup>[4]</sup>。近年来温州与福州地区以及近期北京市广州管圆线虫病的暴发均因食用福寿螺引起<sup>[1,4]</sup>, 福寿螺已成为传播广州管圆线虫的优势种群之一, 是广州管圆线虫的重要中间宿主<sup>[5]</sup>。因此, 寻找快速检测福寿螺

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(No.2003BA712A09-01)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, WHO 疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025;

\* 通讯作者, E-mail: ipdzhouXN@sh163.net

体内广州管圆线虫的方法是预防广州管圆线虫病的重要手段。当前检测螺体广州管圆线虫 期幼虫通常采用匀浆法和酶消化法,这 2 种方法虽可靠,但耗时费力,不适合现场大规模普查,也不易快速检测螺体内早期幼虫。分子生物学检测技术虽然敏感,但需与传统方法作对照或联合应用。本实验采用镜下检测螺肺囊广州管圆线虫幼虫结节(以下简称肺检法)并与匀浆法和酶消化法进行对比观察, 以提供快捷的检测方法。

## 材料与方法

### 1 实验动物

SD 大鼠 6 只, 雄性, 90~100 g, 购自复旦大学上海医学院实验动物中心。

### 2 广州管圆线虫 期幼虫

通过现场福寿螺-大鼠实验室传代建立生活史获得。按林金祥等<sup>[9]</sup>方法将现场感染性福寿螺压碎、剔壳、研磨和沉淀数次后,取沉淀物在镜下获取广州管圆线虫 期幼虫(简称 L3),采用经口或腹腔注射感染大鼠(50 条),于感染后 35~39 d 从螺粪或肺中收集 期幼虫。

### 3 实验螺

系实验室繁殖的福建子代福寿螺。将螺置于有充气泵和滤水器的恒温 25.5 ~26 条件下饲养,然后挑选 5.0~8.5 g 活度好、壳完整的福寿螺 60 只,禁食 24 h 后备用。

### 4 福寿螺的人工感染

收集广州管圆线虫阳性大鼠的新鲜粪便,加脱氯水充分调匀,沉淀过滤数遍后,取沉淀液感染已禁食 24 h 的福建子代福寿螺,连续感染 24 h。螺感染后置于(25.5 ~26 )条件下饲养,7~20 d 后用于检测。

### 5 检测方法

5.1 待检螺分组 将 60 只感染性螺平均分成 2 组,第 1 组为肺检法与匀浆法,第 2 组为肺检法与酶消化法。

5.2 肺检法 将福寿螺压碎剔壳,沿外套膜的左侧至后侧的基部剪开,将外套膜向右翻开取外套膜的后半部分的约为 24 mm×16 mm<sup>[10]</sup>椭圆形的囊状结构——“肺囊”。然后剪开囊袋(双层)两边沿,翻开囊袋呈单层后铺平,光镜观察幼虫结节。若囊袋层壁较厚,尽量拉平,或用解剖针拨动等手段观察囊壁组织的幼虫结节。

5.3 匀浆法 研磨或粉碎螺肺囊或肌肉组织成糊液,

置于锥型量筒加脱氯水沉淀(静置悬浊液),倾倒上清液 2~3 次后取沉淀滤液镜检<sup>[4,7]</sup>。

5.4 酶消化法 参考文献 [11] 方法,每 10 g 净重螺研碎后加消化液(1 000 ml 蒸馏水,盐酸 7 ml,胃蛋白酶 5 g) 250 ml,置于 37 消化液中 1~2 h,然后倾入 260 目滤布中过滤,取滤布上的沉渣镜检。

### 6 肌肉组织幼虫的检测

取 30 只螺的肌肉组织(螺肺囊另检测)逐个研磨,按上述酶消化法操作并记录虫数,观察肌肉组织与螺肺囊内幼虫密度的相关性。

### 7 观察指标

(1) 肺检法与匀浆法、肺检法与酶消化法敏感度的比较。(2) 检测速度比较: 记录从螺肺囊检测到首条幼虫所用时间; 检测到全部幼虫所用时间(不同检测方法均从剖杀螺算起(匀浆法与酶消化法的时间需加上肺检法中螺剖杀时间)。观察比较不同发育阶段幼虫结节大小,用测微尺测量螺肺囊不同发育阶段幼虫结节大小。对螺肺囊与肌肉组织幼虫密度(重量/幼虫数)作相关分析。

### 8 统计与分析

统计分析均采用 SAS 8.0 软件完成。不同方法检测螺肺囊幼虫的敏感度分析,采用  $\chi^2$  检验。其检测速度各组先计算中位数(上、下四分位数),然后采用秩和检验来分析;螺肺囊与软体内幼虫密度关系作秩和相关分析。

## 结 果

### 1 3 种检测方法的效果

1.1 阳性检出率 肺检法、匀浆法及酶消化法检测螺肺囊幼虫的敏感度分别为 96.7%、93.4%和 100%,差异无统计学意义( $\chi^2=2.069$ ,  $P>0.05$ )。显示 3 种检测方法具有相似的检测效果。

1.2 检测速度 肺检法和匀浆法(第 1 组),肺检法和酶消化法(第 2 组)检测到螺肺囊内首条幼虫所需时间分别为 0.37 和 5.59 min,以及 0.39 和 5.64 min,差异具有统计学意义( $\chi^2=54.897$ ,  $P<0.01$ )。检测肺囊内全部幼虫所需时间依次为 5.36 和 95.36 min, 5.18 和 78.28 min,差异有统计学意义( $\chi^2=58.067$ ,  $P<0.01$ )。数据显示肺检法检测速度明显快于匀浆法和酶消化法。不同方法均表明肺囊幼虫密度越高检测到肺囊内首条幼虫所需时间就越短,检测肺囊内全部幼虫所需时间就越长(表 1)。

表 1 不同方法检测福寿螺肺囊内广州管圆线虫的效果

Table 1 Efficiency of the methods in detecting *Angiostrongylus cantonensis* larvae in lung tissue of *Pomacea canaliculata*

| 组别<br>Group   | 检测螺数(只)<br>No. snails<br>Examined | 检测方法<br>Detection method | 检测时间<br>Detection time<br>(min) |        | 感染螺检出率<br>Detection rate of infected snails<br>(%) |           | 敏感度<br>Sensitivity<br>(%) |
|---------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------|--|-----------|---------------------------|
|               |                                   |                          |                                 |        | 7~15 d (L1~L2)                                     | 20 d (L3) |                           |
| 第 1 组 Group 1 | 30                                | 肺检法 Lung-microscopy      | 0.37*                           | 5.36** | 93.3   | 100       | 96.7(29)                  |
|               |                                   | 匀浆法 Tissue homogenate    | 5.59*                           | 95.4** | 86.7   | 100       | 93.4(28)                  |
| 第 2 组 Group 2 | 30                                | 肺检法 Lung-microscopy      | 0.39*                           | 5.18** | 93.3   | 100       | 96.7(29)                  |
|               |                                   | 酶消化法 Enzyme digestion    | 5.64*                           | 78.3** | 100  | 100       | 100(30)                   |

注: \* 检测肺囊内首条幼虫所需时间, \*\* 检测整只螺肺囊幼虫所需时间。

Note: \* The time for finding out the first larva in lung tissue, \*\* The time for finding out all the larva in lung tissue.

## 2 幼虫结节大小测定

L1~L1 末的结节大小为  $(0.13 \pm 0.12) \text{ mm} \times (0.07 \pm 0.02) \text{ mm}$ , L2~L2 末的结节大小为  $(0.34 \pm 0.05) \text{ mm} \times (0.28 \pm 0.04) \text{ mm}$ , L3 的结节大小为  $(0.265 \pm 0.034) \text{ mm} \times (0.248 \pm 0.0276) \text{ mm}$ ,  $L2 > L3 > L1$ 。

## 3 不同检测法的优缺点

3.1 肺检法 方法简便, 检测速度快; 可根据幼虫结节的形状及大小初步估计幼虫处于的发育阶段, L1 与 L3 幼虫结节形状均似圆形, 结节内幼虫大多呈“O”状, L2 幼虫结节均似椭圆形; 结节中幼虫可保存时间较长。缺点: 幼虫大多呈“C”状, 故幼虫结节较 L3 大, 但虫态与活度不能直观地显示; 具有局限性 (仅适合螺肺囊); 镜检技术要求较高。肺检法适合疫区大体螺类的定性筛查。

3.2 匀浆法 优点: 灵敏度高; 能直观地显示虫态与活度; 可分离幼虫; 幼虫存活时间较长且活力强。缺点: 检测速度较慢; 沉淀物多而幼虫易漏检。此法适合幼虫的分离、收集及动物接种。

3.3 酶消化法 优点: 灵敏度高, 能直观地显示虫态与活度, 可分离幼虫, 螺组织消化后沉淀物少而计数较准确。缺点: 检测速度较慢, 加酶后部分幼虫不活跃易死亡。此法适合幼虫分离、计数与定量筛选。

## 4 螺肺囊与软体部分的幼虫密度及相关关系

实验结果表明, 螺肺囊内的幼虫数与螺肌肉组织内幼虫数呈正相关 (秩和相关分析)。30 只螺去壳后总重量为 275.45 g, 幼虫数为 11 235 条。螺肺囊与肌肉组织分别重 21.67 g 与 253.78 g, 平均分别占总螺重的 7.9% 与 92.1% (重量之比 1:11.65); 幼虫数分别为 2 478 与 8 757 条, 分别占总幼虫数的 22.1% 与

77.9%。可见螺肌肉部分的幼虫总数要多于肺囊部, 但幼虫寄生于螺肺囊的密度远大于肌肉组织 (螺肺囊为 114.4 条/g, 肌肉组织为 34.5 条/g)。

## 讨 论

福寿螺是我国首批 16 种外来生物入侵名单之一<sup>[12]</sup>。近年来, 由福寿螺引起的广州管圆线虫病的暴发时有发生, 对人群健康已构成一定威胁, 重者引起死亡<sup>[1,13]</sup>, 2004 年 8 月卫生部已将此病列为我国新发传染病。随着福寿螺的入侵与不断扩散, 其传播广州管圆线虫的作用有超出当年占主导地位褐云玛瑙螺的趋势<sup>[8,14]</sup>。因此, 寻找快捷检测福寿螺体内幼虫是预防广州管圆线病的一项重要措施。

目前常用的匀浆法和酶消化法是检测、分离收集幼虫比较理想的方法, 且具有检测幼虫直观的特点, 但由于其检测耗时费力, 故不太适合现场大规模螺的普查。本实验观察表明, 肺检法不但简便、经济、快捷省力 (剖开螺肺囊后直接镜检), 并具有匀浆法和酶消化法相似的检测效果, 且检测速度明显快于酶消化法与匀浆法 ( $P < 0.01$ ), 还可根据幼虫结节的大小快速估出幼虫所处的发育阶段。一般情况下, 当肺囊布满幼虫结节时, 螺软体组织中含虫密度就相对较高; 反之, 肺囊幼虫结节仅见个别存在时, 软体组织内幼虫也较少, 若此时应用酶消化法或匀浆法检测, 获取幼虫既费时又困难。

本实验结果显示, 尽管螺肌肉组织中的幼虫总数多于螺肺囊内的, 但螺肺囊内的幼虫分布密度要远高于螺肌肉组织, 两者的幼虫数呈正相关。表明螺肺囊幼虫数的多寡基本决定了肌肉组织内幼虫密度的高低, 该现象提高了肺检法在检测方法中可采用的价值。当然, 肺检法检测广州管圆线虫幼虫虽简便、快捷, 但还存在检测虫体不直观、易与其他线虫结节混



淆及不适合分离幼虫等缺陷。这些缺陷可采用以下方法解决：前者经抽样解剖部分幼虫结节确认为广州管圆线虫幼虫即可，后者在收集 L3 过程中可选择 2 种方法联合应用 [肺检法与酶消化法（或匀浆法）相结合]，即先取肺脏检测，然后选择含虫结节密度较高的螺进行酶消化法（或匀浆法），这样可有针对性地选用高度感染螺，以达到收集较多幼虫的效果。

值得注意的是，肺检法仅限于具有肺脏器的福寿螺与褐云玛瑙螺等，其方法具有局限性。因此，肺检法较适合现场大规模定性筛查螺体感染情况。对于其他较小的病原螺种的检测，关键是要熟悉螺类的解剖结构等技术问题。作者建议，当要检测众多病原螺种时，则要借助分子生物学检测技术<sup>[15]</sup>或采用联合应用的方法来解决。

# 参 考 文 献

- [1] Lin JX, Li YS, Zu K, et al. Epidemiological study on group infection of *Angiostrongylus cantonensis* in Changle City [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002,21:110-112. (in Chinese)  
(林金祥, 李友松, 朱凯, 等. 长乐市广州管圆线虫集体感染的流行病学研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002,21:110-112.)
- [2] Lv S, Zhou XN. The potential impact of global warming on the epidemiology of *angiostrongyliasis cantonensis*[J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2005,32(5):195-199. (in Chinese)  
(吕山, 周晓农. 全球气候变暖对广州管圆线虫病流行的潜在影响[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2005,32:195-199.)
- [3] Yang FZ, Zhang YZ, Tu SP, et al. An outbreak of *angiostrongyliasis* probably associated with eating snails [J]. Strait J Prev Med, 2004, 10:44-45. (in Chinese)  
(杨发柱, 张莹珍, 屠邵平, 等. 一起疑为食用螺肉引起的广州管圆线虫病爆发流行[J]. 海峡预防医学杂志, 2004,10:44-45.)
- [4] Xue DY, Ruan YZ, Lin BC, et al. Epidemiological investigation on an outbreak of *angiostrongyliasis cantonensis* in Wenzhou [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000,18:176-177. (in Chinese)  
(薛大燕, 阮云洲, 林宝楚, 等. 温州市一起广州管圆线虫病暴发流行的调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000,18:176-177.)
- [5] Lv S, Zhang Y, Wang XH, et al. Experimental study on compatibility of three species of freshwater snails with *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006,24:277-280. (in Chinese)  
(吕山, 张仪, 王显红, 等. 三种淡水螺与广州管圆线虫相容性的实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006,24:277-280.)
- [6] Liu HX, Zhang Y, Zhou XN, et al. Studies on susceptibility of *Pomacea canaliculata* of different developmental stages to infection with *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis,

- 2005,23:262-266. (in Chinese)  
(刘和香, 张仪, 周晓农, 等. 不同发育期福寿螺对广州管圆线虫易感性的实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005,23:262-264.)
- [7] Liu HX, Zhang Y, Zhou XN, et al. Studies on growth-development and infectivity of *Angiostrongylus cantonensis* in dormant *Pomacea canaliculata*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006,24:269-272. (in Chinese)  
(刘和香, 张仪, 周晓农, 等. 福寿螺休眠期体内广州管圆线虫生长发育及其感染性的观察研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006,24:269-272.)
- [8] Yan L. *Angiostrongyliasis* in China [J]. J Clin Exp Med, 2003, 2:5-7. (in Chinese)  
(严笠. 国内广州管圆线虫病[J]. 临床和实验医学杂志, 2003,2:5-7)
- [9] Lin JX, Zhou XN, Li LS, et al. *Bellamya aeruginosa* acts as the intermediate host for *Angiostrongylus cantonensis* [J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21:24-26. (in Chinese)  
(林金祥, 周晓农, 李莉莎, 等. 铜锈环棱螺作为广州管圆线虫中间宿主的发现[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005,21:24-26.)
- [10] Hu ZQ, Hu YJ. The morphology and structure of *Ampullaria gigas* [J]. J Zool, 1991, 26: 4-6. (in Chinese)  
(胡自强, 胡运瑾. 福寿螺的形态构造[J]. 动物学杂志, 1991,26:4-6.)
- [11] He JZ, Ding BL, Luo YZ. Observation on the morphology and specific morphology of adult *Angiostrongylus cantonensis* [J]. Acad J Guangzhou Med Coll, 1983,2:1-11. (in Chinese)  
(何竟智, 丁布兰, 罗勇生. 广州管圆线虫成虫形态及特异形态的观察[J]. 广州医学院学报, 1983,2:1-11.)
- [12] State Environmental Protection Administration of China and Chinese Academy of Sciences. Circular on publishing the list of the first batch of alien invasive species in China [R]. State Council Bulletin of the People's Republic of China, 2003,23:41-46. (in Chinese)  
(中国环境保护总局、中国科学院. 中国第一批外来入侵物种名单[R]. 国务院公报, 2003,23:41-46.)
- [13] Pien FD, Pien BC. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis[J]. Int J Infect Dis, 1999,3:161-163.
- [14] Meng JX, Li ZY, Zhan XM, et al. Immunoscreening of the specific antigen genes from the adult worm cDNA library of *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Chin J Zoonoses, 2004,20:934-937. (in Chinese)  
(孟锦绣, 李卓雅, 詹希美, 等. 广州管圆线虫成虫 cDNA 文库抗原基因的筛选[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004,20:934-937.)
- [15] Zhang Y, Zhou XN, Liu HX, et al. Development of PCR assay for detection of *Angiostrongylus cantonensis* in *Pomacea canaliculata* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24: 353-355. (in Chinese)  
(张仪, 周晓农, 刘和香, 等. PCR 检测大瓶螺体内广州管圆线虫幼虫方法的建立 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006,24:353-355.)

(收稿日期: 2006-08-29 编辑: 伯韦)