

文章编号: 1000-7423(2006)-04-0269-04

【论著】

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

刘和香¹, 张仪¹, 周晓农^{1*}, 吕山¹, 朱丹¹, 林金祥², 李莉莎², 李友松²

【摘要】 目的 了解福寿螺处于休眠期对其体内感染的广州管圆线虫幼虫生长发育及其感染性的影响。方法 来自实验室的广州管圆线虫 L1 幼虫感染福寿螺, 感染后第 1 天螺置于 25.0~25.5℃ 恒温室中休眠, 观察体内幼虫生长发育情况, 第 13 天起解剖观察幼虫生长发育情况。感染后第 20 天福寿螺置冬季室内自然变温条件下休眠 2 个月, 每隔 10 d 观察螺体内幼虫活力。检获的 L3 幼虫经口或腹腔注射感染 SD 大鼠, 观察其感染性。同时观察螺的生存与体重变化情况, 并以水族缸饲养螺作平行对照。结果 25.0~25.5℃ 恒温条件下螺休眠不影响体内幼虫发育, 且其幼虫发育历期为 (16.3±0.6) d, 显著快于水族缸饲养螺 (17.6±0.96) d ($t=5.72$, $P<0.01$)。冬季室内自然变温条件下的休眠螺, 生存率高于水族缸饲养螺 ($P<0.05$), 体重下降率为 (33.5±4.3)%, 也高于水族缸饲养螺 [(9.0±2.3)%, $t=10.68$, $P<0.01$]。但随着休眠期的延长其死亡率增高 ($\chi^2=18.31$, $P<0.01$)。从存活螺体内检获的不同活力的 L3 幼虫均可感染 SD 大鼠。结论 25.0~25.5℃ 恒温条件下螺休眠不影响体内幼虫发育, 冬季室内自然变温条件下螺休眠或水族缸饲养, 其体内幼虫均具有感染性。感染的福寿螺越冬方式, 休眠明显优于水族缸饲养。

【关键词】 福寿螺; 休眠; 广州管圆线虫; 幼虫; 生长发育; 感染性

中图分类号: R383.19

文献标识码: A

Studies on the Growth-Development and Infectivity of *Angiostrongylus cantonensis* in Dormant *Pomacea canaliculata*

LIU He-xiang¹, ZHANG Yi¹, ZHOU Xiao-nong^{1*}, LV Shan¹, ZHU Dan¹,
LIN Jin-Xiang², LI Li-sha², LI You-song²

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To study the impact of dormancy of *Pomacea canaliculata* on the growth-development and infectivity of *Angiostrongylus cantonensis*. Methods The intermediate host snails (*P. canaliculata*) were infected with the first stage larvae of *A. cantonensis* from the laboratory. One day after infection the snails were kept dormant under 25.0-25.5℃, and a sample of the snails was selected and dissected to examine the larval growth-development at various interval. Twenty days after infection, they were placed in room with natural winter conditions. Every 10 days a sample of the snails was dissected for larval activity. The third-stage larval infectivity from each group was identified by infecting SD rats. Meanwhile the survival and weight change of snails in the two groups were recorded, and were compared with those snails cultured in water under the corresponding temperature conditions mentioned above. Results The time for first-stage larvae of *A. cantonensis* in dormant snails to develop to third stage was shorter than that in the snails in aquarium. All the third stage larvae at various degree of activity recovered from snails in winter room conditions, including dormant snails and active snails in water, infected rats successfully. The dormant snails in winter room conditions stopped growing with decreased weight, but the survival rate was significantly lower than that of the snails in aquarium with the same condition along with an extending time of dormancy. Conclusion The development of *A. cantonensis* larvae has not been affected when snails are kept dormant under 25.0-25.5℃. The third stage larvae from snails at natural winter room temperature or in aquarium were all infective. As of the overwintering ways, it is better to keep the infected snails dormant than in the aquarium.

【Key words】 *Pomacea canaliculata*; Dormancy; *Angiostrongylus cantonensis*; Larvae; Development; Infectivity

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

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

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

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、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; 2 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

* 通讯作者, E-mail: ipdzhouXN@sh163.net

广州管圆线虫的中间宿主为软体动物, 多达 56 种^[1,2], 其中福寿螺是我国广州管圆线虫的重要中间宿主^[3,4]。福寿螺属热带淡水螺种的低等变温动物, 水和温度是其重要的生存条件。同时福寿螺对干旱和寒冷具有保护性适应能力^[5,6], 环境不利时, 在洞穴或土壤中紧关角质厣呈抵抗性休眠状态, 以保持肌体

水分和减弱代谢强度来适应多变的环境。广州管圆线虫生活史约 1/3 时间是寄生在螺体内, 因此, 福寿螺的繁殖能力与分布区域直接影响广州管圆线虫病的流行范围与传播强度。休眠 (或冬眠) 是动物对环境变化的一种适应形式^[7], 有关福寿螺休眠现象已有较多报道^[6,8], 但福寿螺感染广州管圆线虫后有关休眠方面的研究国内尚无报道。本研究旨在了解环境变化对螺体内的广州管圆线虫生长发育的影响及冬季感染螺体内幼虫的生存状态。已知广州管圆线虫是寄生性变温动物, 在螺体内发育的起点温度为 15^{°C}^[9], 本实验室冬季室温低于 15^{°C}, 故冬季休眠螺体内幼虫的生长发育本文未作观察。

材料与方法

1 实验动物

雄性 SD 大鼠, 体重 90 ~100 g, 购自复旦大学医学院实验动物中心。

2 福寿螺

2004 年 8 月, 自福建省闽侯县采集福寿螺。将其排出的粉色卵块置于培养皿内, 于 25.5 ~26.0^{°C} 恒温室中孵化出幼螺, 置泥缸饲养, 1 ~2 个月后移入具有换气泵的 50 cm ×35 cm ×60 cm 水族缸饲养, 3 个月后部分螺进入成螺期。挑选体重 5.0 ~8.5 g、活力好、壳完整的子代福寿螺 150 只, 备用。

3 广州管圆线虫 L1 幼虫

按林金祥等^[10]研磨匀浆方法, 将现场采集的福寿螺压碎, 去壳, 研磨, 用锥型量筒沉淀 2 ~3 次, 在显微镜下观察沉淀物并获取广州管圆线虫 L3 幼虫, 经口或腹腔注射感染 SD 大鼠 50 只, 35 ~39 d 从大鼠粪便或肺组织收集 L1 幼虫。

4 人工感染福寿螺

收集阳性大鼠当天新鲜粪便, 加去氯水充分调匀、过滤数次收集 L1 幼虫, 倒入备有禁食 24 h 的福寿螺的容器内使其感染, 24 h 后取出螺用清水洗净, 置 (25.5 ±0.64)^{°C} 恒温室的水族缸饲养, 备用。

5 感染性螺的鉴定

按上述方法 3 镜检或解剖福寿螺肺组织中的幼虫结节, 查见广州管圆线虫 L2 或 L3 幼虫者即为感染性螺。

6 休眠

6.1 恒温休眠 取面盆 (直径 32 cm、深 12 cm) 2 只, 盆底垫一层厚 5 cm、湿度约 20% ~25% 泥沙, 上铺一层半湿的厚草纸, 内投 20 只感染 24 h 后的福寿螺, 于 (25.5 ±0.64)^{°C} 恒温、平均湿度约 60% 条件下休眠。同室水族缸饲养螺作平行对照。13 d 起解剖螺, 观察幼虫生长发育状况。用检获的 L3 幼虫感染 SD 大鼠, 观察其感染性。同时观察螺的死亡率及体重变化。

6.2 室内自然变温条件下的休眠螺 取感染后第 20 天的福寿螺 30 只, 置于冬季室内自然变温条件下休眠 2 个月。分别于休眠第 10、20、30、40、50 与 60 天 (6 个时间段的观察日) 解剖, 观察记录螺体内幼虫活力 (“+++”表示幼虫活力好; “++”表示幼虫活力一般; “+”表示幼虫活力差)。用 6 次观察获得的 L3 幼虫分别感染 SD 大鼠, 观察其感染性。同时观察螺的生存情况及体重变化。水族缸饲养螺作平行对照。

6.3 休眠螺与死亡螺的判断及解眠 休眠状态, 即为不食不动、分泌黏液将壳口紧闭呈闭厣状态, 其呼吸及新陈代谢降至最低水平^[5,6]。解眠, 即将休眠螺置于 20^{°C} 水中, 2 ~6 h 后见其活动与摄食, 即为解眠。鉴别休眠螺与死亡螺方法, 凡符合下述任一条件者即可判为死亡: 螺壳口潮湿并有异味, 呈开厣状态并经针刺无回缩能力, 体重明显下降, 置于 20^{°C} 水中仍无反应或无正常活动与摄食。

6.4 体重变化 于实验前、后逐个称重, 观察螺体重变化。

6.5 温、湿度记录 用温度计 (上海医药仪器厂生产, 精确度为 0.1^{°C}) 记录实验室每天最高与最低温度。将湿度计 (天津气象仪器厂生产) 挂于墙上, 每天早、晚各记录 1 次实验室湿度。

7 统计与分析

用 SPSS11.0 软件进行统计分析。日平均温度及总平均温、湿度用算术平均数 ($\bar{x} \pm s$) 统计。计数资料分析采用 χ^2 检验和确切概率法。计量资料分析采用 t 检验。

结 果

1 恒温休眠螺及体内幼虫观察

取 (25.5 ±0.64)^{°C} 恒温休眠螺及同室水族缸饲养螺各 20 只, 其体内广州管圆线虫 L1 幼虫均可顺利发育为 L3, 但幼虫发育历期不同, 前者为 (16.3 ±0.6) d, 后者为 (17.6 ±0.96) d, 两者差异具有统计学意义。L3 幼虫感染大鼠后, 于第 36 ~38 天粪检均获得 L1 幼虫。恒温休眠螺生长停滞、体重下降。水族缸饲养螺体重上升。两组螺的死亡率相当 (各死亡 2 只)。

2 冬季室内自然变温条件下福寿螺及体内幼虫观察

2.1 冬季室内温度自然变化趋势 实验于 1 月 20 日~3 月 21 日进行 (共 60 d)。日温度, 最低为 2.0 , 最高为 14.2 , 平均最低为 4.3 , 最高为 13.0 , 总平均温度为 7.8 (60 d 的最高最低平均温度)。日最低温度, 低于 4.0 15 d, 低于 6 39 d; 日平均温度, 低于 6.0 11 d。水族缸水温, 日最低水温为 1.2 , 最高为 12.7 ; 日平均水温最低为 2.9 , 最高为 11.9 ; 总平均水温为 7.0 , 日最低温度低于 4.0 26 d; 低于 6.0 43 d; 日平均最低温度低于 6.0 22 d。水族缸水温略低于室温 0.5 ~2.0

, 室内平均相对湿度为 50.7% (60 d 平均湿度)。**2.2 幼虫活力及其感染性** 眠螺体内幼虫活力, 大部分幼虫活跃(为“+++”), 少部分幼虫活力较差 (图 1), 如: 第 10 与第 40 天一般 (++) , 第 20 及 30 天 (气温较低) 活力差 (+) 且有死亡, 第 50 及 60 天少数幼虫活力较差或死亡。而水族缸饲养螺体内幼虫活力略差于室温休眠螺, 且各观察日均有幼虫死亡。但两种环境下螺体内活力差的幼虫置 25.0 ~25.5 恒温室中 1 h 后活力均恢复正常。观察期间, 取各时间段两组螺体内活的幼虫感染大鼠 12 只, 于 35 ~39 d 粪检均获 L1 期幼虫 (表 1)。

2.3 螺死亡率及其体重变化 死亡率=累计死亡螺数/总观察螺数。冬季室温 2.0 ~14.2 、湿度 41% ~



图 1 冬季室内自然变温条件下休眠螺体内 L3 幼虫
Fig.1 The third stage larvae recovered from dormant snails in room natural winter temperature

61%, 室温休眠期长短与感染螺死亡率呈平行关系, 即休眠期延长其死亡率呈上升趋势 ($\chi^2=18.31$, $P<0.01$)。同室水族缸饲养螺, 第 40 天及第 60 天死亡率明显高于室温休眠螺 ($P<0.05$)。阴性螺死亡率略低于室温休眠螺 ($P>0.05$) (表 1)。室温休眠与水族缸饲养螺体重下降率分别为 $(33.5 \pm 4.3)\%$ 与 $(9.0 \pm 2.3)\%$, ($t=10.68$, $P<0.01$)。但休眠螺一经解眠, 即能正常活动与摄食, 1 ~2 d 后体重恢复正常。提示, 休眠为其抵抗冬季低温方式, 休眠环境优于水族缸环境。

讨 论

研究环境因子变化对福寿螺的扩散及广州管圆线虫病流行的影响具有重要意义。研究表明, 25.0 ~25.5

表 1 冬季室内自然变温条件下休眠螺及同室水族缸饲养螺死亡率及体内幼虫感染性观察

Table 1 Death rate and larvae infectivity between dormant snails and active snails in water under the room natural winter temperature

观察日期 Date	观察螺数 [*] No.snails		平均温/湿度 Average temperature T () /RH(%)	死亡率 Snail death rate (%)		L3 幼虫 L3 larvae	
	感染螺 Infected	阴性螺 Uninfected		感染螺 Infected	阴性螺 Uninfected	活力 Activity	对大鼠感染性 Infectivity
室温休眠 Dormancy in room temperature							
2005-01-30	20	20	6.89/51.1	0	0	++	+
2005-02-09	20	20	6.38/47.0	5(1/20)	5(1/20)	+	+
2005-02-19	19	19	6.62/47.5	20(4/20)	15(3/20)	+	+
2005-03-01	16	17	7.32/52.3	30(6/20)	25(5/20)	++	+
2005-03-11	14	15	9.45/52.9	40(8/20)	30(6/20)	+++	+
2005-03-21	12	14	10.0/53.3	45(9/20)	30(6/20)	+++	+
水族缸饲养 In aquarium							
2005-01-30	20	20	5.79/51.1	10(2/20)	5(1/20)	+	+
2005-02-09	18	19	5.25/47.0	30(6/20)	20(4/20)	+	+
2005-02-19	14	16	5.79/47.5	50(10/20)	40(8/20)	+	+
2005-03-01	10	12	6.45/52.3	70(14/20)	55(11/20)	+	+
2005-03-11	6.0	9	8.43/52.9	80(16/20)	65(13/20)	++	+
2005-03-21	4.0	7	8.96/53.3	85(17/20)	65(13/20)	++	+

* 观察螺数, 因死亡而递减。

* The number of snails observed decreased with increase of the number of dead snails.

为幼虫生长适宜温度,在此恒温条件下,其体内广州管圆线虫幼虫的生长发育不受影响,且体内幼虫发育速度较水族缸饲养螺的快。原因可能是:两组实验虽然在同时、同地、室温条件下进行,但测得水温比气温低 0.5 ~2.0 ,幼虫生长发育受到环境温度的影响。提示自然环境下同时被感染的螺,生存于水中或水外环境,温度的差异对体内幼虫发育速度略有影响。

冬季变温环境,不影响休眠期福寿螺体内广州管圆线虫的生存及感染性。幼虫活力与螺的生存环境温度有关,活力差的幼虫置 25.0 ~25.5 恒温室中很快恢复活力,各时间段任何活力的幼虫均可感染大鼠。提示冬季大鼠吞入含感染期幼虫的福寿螺,螺体活力差的幼虫在恒温的鼠体内会很快恢复活力,仍具有感染性。因此,在低温或干旱条件下,休眠是螺抵抗外环境不利影响的重要方式,这种方式有利于广州管圆线虫的生存,在流行病学上具有重要意义。

在冬季同室变温环境下,水温低于气温。这与气温昼夜变化相对较大,水温昼夜变化较缓和,即使气温升高导致水蒸发和耗热,水温也不会剧增^[11]有关,故休眠螺存活率高于水族缸饲养螺。文献报道,水温低于 6 ,螺出现大量死亡^[5,6]。本研究日最低水温低于 6 有 43 d,低于 4 有 30 d,水族缸饲养螺长时间处于低温,导致死亡率高,这一结果与文献报道基本相似。

休眠螺的死亡与其体重下降幅度有关,而体重下降可能与体能消耗及环境湿度低、导致螺体水分流失有关。文献报道,螺在干燥环境下休眠 30 d,存活率为 50%;在夏季潮湿的环境下休眠 120 d,存活率为 94%^[5]。为证实这一点,作者将 50 只福寿螺置于恒温 25 、湿度 85% ~100% 条件下休眠 3 个月,平均体重下降 21.4%,存活率为 90% 以上,其结果支持了上述说法。另重度感染螺休眠时,其体重下降幅度较大且极易死亡,可能是因为休眠期间营养及能量消耗较大,导致机体能源枯竭,体重迅速下降而死亡。环境湿度是重要因素。本实验证实,冬季福寿螺以休眠方式越冬明显优于水族缸饲养方式。如前所述,由于福寿螺具有很强的适应性与抗逆性,自然环境中感染性福寿螺在干旱与寒冷等不利环境下,可在小环境(洞穴或土壤)中呈休眠状态,在适宜的土壤中休眠 6 个月仍有 31% 存活^[8]。休眠中的感染螺如遇上适温的雨水或沟渠灌溉可迅速解眠,次年仍能大量繁殖、扩散,进而使广州管圆线虫病致病因子增强以及疾病的发生。了解福寿螺休眠现象与恢复能力,可根据其休眠特性建立控制螺扩散和蔓延对策,采用越冬防制、田间与水源管理、药物灭螺、破坏休眠场所等多种防制手段

相结合的方法^[8],对控制螺的发生、扩散与广州管圆线虫病的防治具有现实意义。

本实验感染螺均为中低度感染,系在人工休眠和室内变温环境进行。现场环境影响因素多,情况复杂,感染螺在现场环境休眠体内幼虫生长发育情况,有待进一步研究验证。

参 考 文 献

- [1] Zhao WX. Human Parasitology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1983. 668-674. (in Chinese)
(赵慰先,主编.人体寄生虫学[M].第1版,北京:人民卫生出版社,1983. 668-674.)
- [2] Yang FZ, Zhang YZ, Huang XH, et al. Morphology and experimental infection of *Angiostrongylus cantonensis* in Fujian Province [J]. J Pract Parasit Dis, 1999, 7: 145-148. (in Chinese)
(杨发柱,张莹珍,黄晓红,等.福建广州管圆性线虫形态及实验感染的观察[J].实用寄生虫病杂志,1999, 7: 145-148.)
- [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性线虫病爆发流行[J].海峡预防医学杂志,2004, 10: 44-45.)
- [4] Yang FZ, Zhang YZ, Huang XH, et al. A study on *Angiostrongylus cantonensis* in Fujian[J]. Strait J Prev Med, 2001, 7: 11-14. (in Chinese)
(张莹珍,杨发柱,黄晓红,等.福建省广州管圆性线虫的研究[J].海峡预防医学杂志,2001, 7: 11-14.)
- [5] Fu XY, Wang HQ. Effects of temperature on growth and development of *Ampullaria gigas*[J]. J Fish Chin, 1999, 23: 21-26. (in Chinese)
(傅先源,王洪全.温度对福寿螺生长发育的影响[J].水产学报,1999, 23: 21-26.)
- [6] Yin SW, Yan HM, Wang HQ, et al. Study on the biology of *Ampullaria gigas*[J]. Acta Sci Nat Univ Norm Hunan, 2000, 23: 76-82. (in Chinese)
(尹绍武,颜亨梅,王洪全,等.福寿螺生物学研究[J].湖南师范大学自然科学学报,2000, 23: 76-82.)
- [7] Hong QB, Zhou XN, Hang DB, et al. Observation on the amount of oxygen consumption by *Oncomelania hupensis* under low temperature[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis 2003, 21: 31-33. (in Chinese)
(洪青标,周晓农,杭德标,等.钉螺在低温条件下耗氧量的观察[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2003, 21: 31-33.)
- [8] Wu ZP, Cheng KL, Qing YW, et al. The primary study on the occurrence and prevention of *Ampullaria canaliculata* in Sichuan province [J]. Plant Quarantine, 1995, 21: 266-269. (in Chinese)
(吴志平,程开禄,卿雨文,等.四川福寿螺的发生及防除初步研究[J].植物检疫,1995, 21: 266-269.)
- [9] Lv S, Zhou XN, Zhang Y, et al. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822)[J]. Parasitol Res, 2006, DOI: 10.1007/s00436-006-0198-8. (in Chinese)
(吕山,周晓农,张仪,等.温度对福寿螺体内的广州管圆线虫生长发育的影响[J].寄生虫学研究,2006, DOI: 10.1007/s00436-006-0198-8.)
- [10] 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.铜锈环螺作为广州管圆性线虫中间宿主的发现[J].中国人兽共患病杂志,2005, 21: 24-26.)
- [11] Li ZJ, Chen XL, Zheng HL, et al. Ecology [M]. Beijing: Science Publishing House, 2000. 35-47. (in Chinese)
(李振基,陈小麟,郑海雷,等.生态学(北京高等学校教材)[M].北京:科学出版社,2000. 35-47.)

(收稿日期:2005-12-19 编辑:富秀兰)