

## 犬钩蚴固体培养基滤纸培养法

许正敏<sup>1</sup>, 李智山<sup>2</sup>, 孙莉<sup>1</sup>, 武小樱<sup>1</sup>, 陶永平<sup>1</sup>, 李明华<sup>1</sup>

**【提要】** 作者采用固体培养基滤纸培养法培养的犬钩蚴检出率高, 操作简便、快速, 优于传统的试管滤纸培养法。固体培养基由牛肉膏 (3 g), 蛋白胨 (10 g), 氯化钠 (5 g), 琼脂 (20 g) 及蒸馏水配制。该法可用于快速诊断钩虫病。

**【关键词】** 犬钩口线虫; 体外培养; 固体培养基; 滤纸

中图分类号: R383.13 文献标识码: B

## Solid Medium-Filter Paper Cultivation of *Ancylostoma caninum* Larvae

XU Zheng-min<sup>1</sup>, LI Zhi-shan<sup>2</sup>, SUN Li<sup>1</sup>, WU Xiao-ying<sup>1</sup>, TAO Yong-ping<sup>1</sup>, LI Ming-hua<sup>1</sup>

(1 Department of Pathogenic Biology and Immunology, Medical School, Xiangfan Vocational and Technical College, Xiangfan 441021, China; 2 Xiangfan Central Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Xiangfan 441021, China)

**【Abstract】** Consisted of beef extract (3 grams), peptone (10 grams), sodium chloride (5 grams), agar (20 grams) and distilled water, the solid medium was used with filter paper for cultivation of the larvae of *Ancylostoma caninum*. The method shows higher detection rate and simpler operation than the traditional test tube-filter paper culture technique.

**【Key words】** *Ancylostoma caninum*; *In vitro* culture; Solid medium; Filter paper

钩虫是钩口线虫的统称, 钩虫病是重要的人兽共患病之一, 寄生人体的钩虫主要为十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫。犬钩口线虫 (*Ancylostoma caninum*) 偶尔也寄生于人体<sup>[1]</sup>。传统的试管滤纸培养法培养钩蚴, 检出率高于直接涂片法及饱和盐水浮集法, 可作虫种鉴定。但此法操作较繁琐, 观察周期长<sup>[1]</sup>。本研究采用固体培养基滤纸培养法培养钩蚴, 结果报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 犬钩口线虫** 2006 年 10 月, 从湖北省襄樊市襄阳区竹条镇熊营村, 购买 2 只雄性幼家犬, 每只体重约 4.5 kg, 带回实验室进行粪便检查, 2 只犬均查见典型的钩虫卵, 且虫卵的大小、形态、颜色、卵壳及内含物均相同。遂宰杀 1 只, 见肠黏膜吸附大量乳白色呈“C”型线虫, 长约 1.4 cm。镜下清晰可见犬钩虫特征性的口囊及交合伞。该犬为自然感染的钩口线虫。

**1.2 固体培养基的制备** 取牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 ml, 置于锥形瓶中。加热溶解后校正至 pH 7.4~7.6, 煮沸 3~5 min, 于 103.43 kPa 20 min 高压蒸气灭菌, 倾注 5~7 ml 平铺于直径为 7 cm 圆形平皿, 室温冷却后即成固体培养基, 备用。

**1.3 实验培养粪膜的制备** 制备与培养基等圆的中性滤纸,

用镊子将其贴在上述固体培养基表面。取上述幼犬粪便 5 g 左右, 用镊子捣碎, 均匀平铺于该中性滤纸上, 轻轻按压, 使粪样与滤纸充分紧密接触, 制成实验培养粪膜, 盖上平皿盖。

**1.4 钩蚴培养** 将上述实验培养粪膜的平皿 (加平皿盖) 置于方盘中, 在其上、下各铺垫一条湿毛巾, 置 35℃ 培养箱中培养。24 h 后将毛巾再次浸湿, 以保持一定湿度。培养 12、24、36 及 48 h 后分别取出实验培养粪膜, 置于粪筛中, 用自来水缓缓冲洗于 100 ml 量杯中, 在冲洗过程中用玻棒搅伴, 水洗至量杯口, 沉淀 30 min, 弃去粪浆。再加水至量杯口, 同法操作 2 次。取沉淀物涂片, 显微镜观察钩蚴。

**1.5 对照** 以传统的试管滤纸培养法<sup>[1,2]</sup>作为对照。取标本量为 0.2~0.4 g。

### 2 结果

培养前犬钩虫卵为椭圆形, 卵壳薄, 无色透明, 卵细胞与卵壳之间有空隙 (图 1 A)。培养 12 h, 未见犬钩蚴, 见含胚胎的虫卵 (图 1 B)。培养 24 h, 犬钩蚴呈杆状, 头端钝圆, 后端尖细, 有口孔, 不动, 有的犬钩蚴虫尾部偶尔稍动, 运动迟缓 (图 1 C)。培养 36 h, 犬钩蚴长大, 几乎为 24 h 犬钩蚴的 2 倍 (图 1 D)。有的呈蛇形运动, 有的呈不规则、不定向运动, 表现异常活跃。培养 48 h 的犬钩蚴情况同培养 36 h 的 (图 1 E)。培养 72 h 的犬钩蚴长大, 虫体发育明显变粗变长, 运动状态依然活跃 (图 1 F)。对照组培养 12、24、36、48 及 72 h, 肉眼及手持放大镜观察, 试管内未见蛇形运动的钩蚴。培养至第 5 天, 取出滤纸条, 镜下观察沉淀物, 见少量不运动的犬钩蚴 (图 1 G)。

**作者单位:** 1 湖北襄樊职业技术学院医学院病原生物学与免疫学教研室, 襄樊 441021; 2 华中科技大学同济医学院附属医院襄樊中心医院, 襄樊 441021



A: 犬钩虫卵 (×40), B: 培养 12 h 卵细胞分裂形成胚胎 (×40), C: 培养 24 h 杆状蚴 (×10), D: 培养 36 h 犬钩蚴明显长大 (×10), E: 培养 48 h (×10), F: 培养 72 h (×10), G: 对照组传统的试管滤纸培养法培养 5 d 后的犬钩蚴 (×10)。

图 1 犬钩口线虫钩蚴体外培养

### 3 讨论

钩虫病病原检查方法颇多, 目前常用传统试管滤纸培养法来确定钩虫的感染率及确定虫种, 同时以 Kato-Katz 法来确定感染度。传统的试管滤纸培养法检出率高于粪便直接涂片法的 7.2 倍, 也高于饱和盐水浮集法<sup>[2]</sup>。但操作较繁琐, 观察周期长达 5~6 d<sup>[1]</sup>。Kato-Katz 法虽检出率高, 且操作快速, 但制作厚度适宜的粪膜, 以及掌握适宜的透明时间等操作需要一定的技能。若粪膜厚, 透明时间短, 则难以查见虫卵, 透明时间过长则虫卵变形, 不易辨认。或虫卵过分透明镜检时易漏检<sup>[2]</sup>, 亦不宜作虫种鉴定。

文献报道, 钩虫卵孵化及虫体发育与培养温度关系密切, 35℃~40℃ 钩蚴运动活跃, 40℃ 以上存活时间不超过 50 min, 45℃ 数小时孵出的钩蚴即死亡<sup>[3]</sup>。7℃~13℃ 需孵化 7~10 d, 13℃~20℃ 需孵化 2~3 d<sup>[3]</sup>。本研究固体培养基滤纸培养法的优点: ① 采用 35℃ 培养, 仅用 1 d 即获结果, 快速准确。对照组传统的试管滤纸培养法则需 3~5 d; ② 用铺垫的湿毛巾保持湿度, 在培养过程中不用反复加水, 操作简便, 粪样也不会污染培养用水。而对照组传统的试管滤纸培养法, 由于未能很好控制湿度, 滤纸上部分粪样暴露在外面会变为沙粒状干焦粪渣, 操作稍不

慎干焦粪渣极易落于培养水中, 污染培养用水, 不利于虫卵孵化发育, 粪样标本量也损失, 导致漏检和误诊; ③ 检出率高, 对照组常规取标本量较少 (0.2~0.4 g), 本法标本量较多 (为 5~8 g, 相当于对照组的 20 倍以上); ④ 与传统的试管滤纸培养法、Kato-Katz 法相比, 固体培养基滤纸培养法操作简便, 易掌握, 质量易控制, 错检概率低。

### 参 考 文 献

- [1] Zhan XM. Human Parasitology[M]. 5th ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2001. 210. (in Chinese) (詹希美, 主编. 人体寄生虫学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 210.)
- [2] Qiu JB. Parasitological Examination [M]. 2nd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2003. 150. (in Chinese) (仇锦波, 主编. 寄生虫学检验[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 150.)
- [3] Xu JN, Gan YX. Animal Parasitology [M]. Beijing: People's Education Publishing House, 1965. 225. (in Chinese) (徐岌南, 甘运兴, 主编. 动物寄生虫学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1965. 225.)

(收稿日期: 2006-11-27 编辑: 富秀兰)