

改良沉淀集卵法检测固体中蛔虫卵方法研究

张皓, 张小琼, 徐东炯, 张翔
(江苏省环境保护水环境生物监测重点实验室, 常州市环境监测中心, 江苏 常州 213001)

摘要:采用改良后的沉淀集卵法对低(10个/100 g)、中(20个/100 g)、高(40个/100 g)3种不同浓度的加标样品进行蛔虫卵检测, 比较其回收率。结果表明:不同浓度加标样品的回收率为高浓度>中浓度>低浓度。与相关文献实验结果比较表明, 该方法不仅回收率较高、稳定性较好, 且在检测低浓度样品时较漂浮集卵法具有一定优势。

关键词:沉淀集卵法; 蛔虫卵; 加标样品; 回收率

中图分类号:R383.1⁺1 文献标识码:B 文章编号:1674-6732(2015)02-0017-03

Modified Sedimentation Method of Collecting Eggs for Detection of Ascaris Eggs in Various Solid Matrices

ZHANG Hao, ZHANG Xiao-qiong, XU Dong-jiong, ZHANG Xiang
(Jiangsu Environmental Protection Key Laboratory for Aquatic Biomonitoring, Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001, China)

Abstract: Modified sedimentation method was applied for detecting ascaris eggs in low (10 eggs per 100g), medium (20 eggs per 100g) and high (40 eggs per 100g) concentrations. Comparison of the recoveries at these three different spiked levels, high concentration ones had the highest recovery, followed by medium concentration ones, and low concentration ones. Compared with the experimental results in references, the recovery of this method was higher, and the stability was better. Also, this method was more appropriate for detecting samples in low concentration than flotation method.

Key words: Sedimentation method of collecting eggs; Ascaris eggs; Spiked samples; Recovery

蛔虫感染与蛔虫病是中国的严重公共卫生问题^[1]。固体废弃物中的蛔虫卵是人类感染蛔虫病的主要来源之一, 对固体废弃物蛔虫卵污染情况的调查, 不仅是蛔虫种群生态学与流行病学研究的主要内容^[2-4], 也是环境保护固体废弃物管理的重要指标^[5-10]。目前, 国内外无论哪种蛔虫卵检测方法对固体废弃物中蛔虫卵测定的检出率都相对偏低^[11-14]。为配合环境监测工作的开展, 探索出一种能有效提取出固体废弃物中蛔虫卵的检测方法, 在参考国内主要集卵方法的基础上, 借鉴 EPA(美国环保署)相关技术文件中介绍的分离方法^[15], 整理出一套改良的沉淀集卵检测方法, 并通过该方法对不同浓度固体介质中蛔虫卵提取效果进行比较研究, 进一步确认方法的可靠性及实用性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

根据哺乳动物粪便主要组成成分(表1), 采用相应介质替代物按照相同比例充分混合搅拌后制成空白样品。分别向空白样品中添加不同数量的蛔虫卵, 制成低(10个/100 g)、中(20个/100 g)和高(40个/100 g)3种不同浓度的加标样品, 每种浓度的加标样品设6个平行, 然后通过改良的沉淀集卵法对所有加标样品中的蛔虫卵进行测定, 比较各样品的加标回收率。

1.2 实验方法

1.2.1 加标样品的制作

首先, 选取活体雌性蛔虫成虫进行解剖^[16-17], 将卵巢、输卵管及子宫内的蛔虫卵全部收集到离心管内, 向离心管内添加直径1 mm的玻璃珠数颗,

收稿日期:2014-05-27; 修订日期:2014-06-11

基金项目:环境标准制修订专项项目(1130)

作者简介:张皓(1984—), 男, 工程师, 硕士, 主要从事生物多样性 and 生态毒理方面的研究工作。

表 1 实验所用空白样品与哺乳动物粪便成分对比									%
主要成分	哺乳动物粪便				固体介质				
	水	蛋白质	脂肪	死细胞、食物纤维及无机盐	水	脱脂奶粉	食用油	泥炭	
占比	75	5	5	15	75	5	5	15	

旋紧瓶盖后放在振荡器上振荡 30 min,然后将管内所有物质通过 60 目筛网过滤,滤去残渣。其次,将剩余物质转移至另一离心管,再次添加玻璃珠振荡 30 min,再将管内物质通过 250 目筛网过滤,滤去残渣,剩余物质转移入收集蛔虫卵的玻璃容器内。为了实验安全起见,将收集有蛔虫卵的玻璃容器放置于 80 ℃的水浴锅内 1~2 h,对蛔虫卵进行灭活处理,然后按照体积比加入适量的福尔马林溶液固定保存。最后,将收集好蛔虫卵的玻璃容器摇匀后,吸出 1 mL 放入计数框中,根据实验设计的浓度要求在显微镜或高倍体视镜下逐个吸出蛔虫卵,加入空白样品中,混匀,完成加标试样的制备^[18]。

1.2.2 过滤离心

向加标样品中加入 500 mL 去离子水,充分混匀后通过 60 目和 250 目的金属筛网滤去样品中大颗粒杂质,再沉淀离心(1 000 g 离心力离心 15 min)收集以蛔虫卵为主的固体沉淀物,然后依次向加标样品中加入 4 mL 乙酸乙酯和 4 mL 乙酰乙酸(该步骤用以吸收样品中的脂类物质),再次离心后分层,弃去上层和中层杂质,剩下底层沉淀物留作镜检使用^[18]。

1.2.3 镜检

向处理好的样品管内缓慢加入饱和硝酸钠溶液(加入量不得少于沉淀物的 20 倍),用移液枪将离心管内的沉淀物与饱和硝酸钠溶液充分混匀,吸取混悬液加入到 5 mL 或者 1 mL 的生物技术框内,静置 5~10 min 后(让蛔虫卵充分漂浮),再在显微镜或高倍体视镜下记录蛔虫卵数量^[18]。

1.2.4 数据处理

采用 EXCEL 统计分析软件对各组样品的回收结果进行统计,计算各平行样间的标准偏差,和各样品的加标回收率。

2 结果与讨论

实验结果显示:低、中、高 3 种浓度的平行样间标准偏差分别是 0.75、1.72 和 1.47 个/10² g,相对标准偏差分别为 34.7%、29.5% 和 12.1%;而 3 种

浓度加标样品的加标回收率分别是 21.7%、29.2% 和 30.4%。可以看出,改良的沉淀集卵法对 3 种浓度中蛔虫卵提取的效果依次是高浓度>中浓度>低浓度,不同浓度加标样品蛔虫卵检测结果见表 2。

表 2 不同浓度加标样品蛔虫卵检测结果

项目	加标样品		
	低浓度	中浓度	高浓度
测试结果/ (个·10 ⁻² g ⁻¹)	1	2	5
	2	1	4
	3	3	4
	4	2	7
	5	2	8
	6	3	7
平均值 $\bar{x}/(\text{个} \cdot 10^{-2} \text{g}^{-1})$	2.17	5.83	12.17
标准偏差 $S/(\text{个} \cdot 10^2 \text{g}^{-1})$	0.75	1.72	1.47
相对标准偏差 RSD/%	34.70	29.50	12.10
加标回收率 $P_i/\%$	21.70	29.20	30.40

将检出结果与现有文献记载的结果进行比较:1994 年,南昌寄生虫教研室崔晓明和周宪明^[19]向干净的土壤样品中添加不同数量(4~400 个/5 g)的蛔虫卵,并通过漂浮集卵法对蛔虫卵的检出率进行测定。结果显示,各浓度组蛔虫卵的平均回收范围在 5.5%~42.6%,且浓度越高的样品,其蛔虫卵回收率越高,这一结果与实验结果相符。而由于实验中所用加标样品量为 100 g,远高于前者实验中的样品量(5 g),这在一定程度上增加了实验过程中蛔虫卵损失的可能性,增加了检出难度。从实验最终结果来看,该实验的回收率为 21.7%~30.4%,相对于前者的实验结果,虽然最高回收率低于前者,但各浓度回收率间差异不大,回收率波动范围较小,方法稳定性较高。此外,钱颖骏等^[20]也曾对传统漂浮集卵法进行改良探索,比较了 4 种不同的漂浮试剂对土壤中蛔虫卵的分离效果,蛔虫卵的检出率范围为 0.19%~25.49%,相比之下,该实验的蛔虫卵回收效果更好。1995 年,AJA-LA^[21]用盐水漂浮集卵法对不同浓度的土壤样品(500~10 000 个/25 g)进行蛔虫卵检出率测定比较,最大检出率也仅为 25.04%,与之相比,本实验

的检出率更好。综上说明,本次实验采用的改良沉淀集卵法稳定性要较漂浮集卵法高,尤其对于低浓度样品的检测,具有一定的优势。

3 结语

通过实验可以发现,改良的沉淀集卵法对低、中、高 3 种浓度加标样品中蛔虫卵的分离效果依次为高浓度 > 中浓度 > 低浓度,其中最高回收率达到 30.4%,且不同浓度间回收率波动较小。该结果与现有文献记载的各种固体蛔虫卵检测方法的回收率比较,具有一定优势,而随着蛔虫卵数量的增多,漏检率会进一步下降,回收率有可能进一步上升,有待后续论证。改良后的沉淀集卵法不仅精简了原 EPA 分离方法的实验步骤,缩短了实验时间,而且选择了更加通用的实验器材和设备,降低了实验成本,使该方法更便于在国内推广。就实验结果来看,改良后的沉淀集卵法回收效果并没有下降,且方法的稳定性较高,尤其在低浓度样品的检测中表现较漂浮集卵法更为出色。

[参考文献]

[1] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23 (增刊): 332-334.

[2] 詹希美编. 人体寄生虫学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[3] 孔繁瑶编. 家畜寄生虫学[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.

[4] 许隆祺, 蒋则孝, 余森海, 等. 人体常见三种土源性线虫感染与土壤污染调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(3): 171-173.

[5] 国家环境保护总局. GB 7959-1987 粪便无害化卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.

[6] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 18466-2005 医疗机构水污染物排放标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

出版社, 2005.

[7] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 18596-2001 畜禽养殖业污染物排放标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.

[8] 国家环境保护总局. GB 8172-1987 城镇垃圾农用控制标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.

[9] 俞梁敏, 徐燕, 王婷. 典型外向型经济地区农村固体废弃物污染处置状况与管理对策[J]. 环境监控与预警, 2014, 6(2): 55-58.

[10] 杜敏敏, 黄卫. 以污染源普查结果议环境问题与对策建议[J]. 环境监控与预警, 2010, 2(3): 52-56.

[11] 朱俊勇, 张明华, 郭枫. 寄生虫卵饱和盐溶液浮聚法的比较研究[J]. 数理医药学杂志, 2002, 15(2): 173.

[12] GEENEN P L, BRESCIANI J, BOES J, et al. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg[J]. Parasitol, 1996, 85(4): 616-622.

[13] 李鹏. 出口泡菜中人畜共患寄生虫卵的检测与处理[J]. 卫生检验, 2007(1): 33.

[14] MAYA C, JIMENEZ B, SCHWARTZBROD J. Comparison of Techniques for the Detection of Helminth Ova in Drinking Water and Wastewater[J]. Water Environment Research, 2006, 78(2): 118-124.

[15] EPA. EPA/625/R-92/013 Environmental Regulations and Technology, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge[S]. 2003.

[16] 陈佩惠编. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1988.

[17] 白功懋. 寄生虫与寄生虫检验学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1989.

[18] 张皓, 张小琼, 张翔, 等. 改良的沉淀集卵法分离四种不同固体介质中蛔虫卵效果的比较研究[C]//中国环境科学学会学术年会论文集, 2013.

[19] 崔晓明, 周宪民. 大量土壤样本中蛔虫卵的检测方法初探[J]. 江西医学院学报, 1994, 34(3): 20.

[20] 钱颖骏, 诸廷俊, 王聚君, 等. 4 种漂浮法分离土壤中蛔虫卵的效果比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 305-306.

[21] AJALA M. The separation results of *Ascaris* eggs with Floating in the soil salt[J]. Helminthol, 1995, 69(1): 1-6.

(上接第 16 页)

[12] 郑和辉, 张静, 李洁, 等. 超高效液相色谱串联质谱法直接进样测定水中的草甘膦和咪唑丹[J]. 分析试验室, 2008, 27(12): 68-70.

[13] 支建梁, 牟仁祥, 陈铭学, 等. 柱后衍生液相色谱法测定粮食中草甘膦和氨基磷酸残留量[J]. 分析试验室, 2008, 27(增刊): 170-172.

[14] 张伟, 王进军, 高立明, 等. 草甘膦在水-土壤系统中的环境

行为及研究进展[J]. 农药, 2006, 45(10): 649-654.

[15] 卢信, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 除草剂草甘膦的性质及环境行为综述[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 785-790.

[16] 王玉军, 周东美, 孙瑞娟, 等. 除草剂草甘膦在几种土壤和矿物上的吸附研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(5): 780-785.

[17] 杨宏伟, 郭博书, 嘎尔迪. 除草剂草甘膦在土壤中的吸附行为[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 158-162.