

直接塗片計卵法的另一設計

陈心陶 陈俊民 江靜波

一、前 言

自从 Stoll 氏在 1923 年开始提出稀釋虫卵計算法^[1,2,8]之后，鈎虫在人体的感染程度的測定才第一次有了可靠的而且比較簡便的方法，这對於鈎虫病的調查與診斷具有非常重大的意义。經過 30 多年來的应用，Stoll 氏稀釋法始終被公認為虫卵計算的標準方法。

但是 Stoll 氏稀釋法存在有一些缺点：首先是它需要大量的吸管和特制的計算瓶，不但在金錢上不經濟，而且所占地方較大，搬運也不方便，在进行野外調查工作时，特別感到不方便。而且在操作上及儀器的洗滌上都要花費不少時間。在操作技術方面，糞便必須經過足夠的時間的 NaOH 处理，还要搖混得十分均匀，然后从中部吸取混懸液，吸取时要迅速而准确（0.15 或 0.075 毫升），吸得太少不行，太多了先滴去管下部多余的液体，則所得的虫卵数必然減少，剩下管上部多余的液体則所得的虫卵数必然增多，因此要求比較熟練的检查人員。最后，因为糞便所含水分多寡不一，所查得虫卵数还得經過糾正，但是采用那一种糾正数值（不同硬度的糞便分別乘以 1，1.5，2，3 或 4），也需要正确的估計，而相差一級的糾正数值就可以使虫卵数相差达 50%。此外，患者糞便排出量的多寡與糞便中纖維等不消化的食物的多少都影响每毫升（或克）糞便中所含虫卵的数目。

上述缺点中除了糞便量及糞便中纖維等影响虫卵計算的因素为其他計卵法所同样難以避免之外，操作技術的較難掌握給开展大規模調查造成了不小的障碍，因此中山大学生物系无脊椎动物学教研組幾年來在鈎虫調查中都不斷希望能找到一种較為簡便的虫卵計算方法。

其它計卵法中最引起我們注意的是 Beaver 氏直接塗片計卵法^[4,6]。在 Beaver 氏將塗片厚度標準化以前，Smillie 氏（1921）^[6]，Cort 氏和 Payne 氏（1922）^[7]

及 Keller 氏 (1934)^[8] 都提出过用直接塗片法來对糞便中的鈎虫卵数目进行粗畧的估計。Hausheer 氏和 Herrick 氏 (1926)^[9] 認為由于鈎虫寄生小腸，虫卵排出前有相当长的時間在腸壁蠕動作用下與糞便充分混勻，他并且証實了熟練技術員就能夠对每克含鈎虫卵300—500个以上的糞便作出有診斷上的准确性的計算。

二、Beaver 氏直接塗片法介紹

Beaver 氏法的原理是应用光電池測量糞便塗片的混濁度，借以獲得標準厚度的塗片。他的原設計簡畧介紹於下：在光電燭光計的直徑40毫米的小圓窗上蓋上一個中心有一直徑16毫米的圓孔的18毫米厚的木板，（避免側面來的光綫），木板和圓孔周圍都染成黑色，一個75—100瓦的電燈正对地挂在光電表的頂上，將電燈作垂直方向的上下移動，使燈泡與光電表之間保持15—25厘米的距離而得出約20燭光的照度。

將一滴水（0.045—0.050毫升）加到一張干净載玻片的中心，以小木簽从糞便各處取糞便在水中調勻，直到塗片厚度接近標準為止。然后把載玻片移到燭光計上，調節光綫使通过載玻片的空白部分的光度適为20燭光呎。然後將塗片部分移至小孔中心，將塗片剛鋪开到小孔（直徑16毫米）的範圍，繼續加上糞便直到通过塗片的光綫減弱为10燭光呎為止。在塗片時必須將种子、砂、粗的纖維和各种較大的渣滓除去，然後測定其厚度。当均匀的塗片的厚度達到標準之后，复上一個22×22毫米的蓋玻片，然後計算整个塗片的虫卵。

为了獲得滿意的結果，原作者強調：（1）光源必須正对燭光計的圓窗；（2）玻片必須洁淨；（3）用小木簽每次僅僅挑取足量的糞便进行塗抹；（4）只用純淨的糞便进行塗片，并且須將糞便打碎使成为均匀的混懸液；（5）調節光源使通过干净載玻片空白部分的光綫正好为20燭光呎；（6）混懸液剛好鋪开到直徑16毫米小孔的範圍，并且通过塗片剛好使光綫減弱到10燭光呎；（7）只接受可靠并且能夠容易計算的塗片。假如塗片變干，因而蓋玻片下有了氣泡以致影响計算時，這一塗片就不能用。

根据與 Stoll 氏稀釋法多次比較結果，標準塗片每个虫卵代表每毫升成形糞便含虫卵300个，或每个虫卵相当於10條美洲鈎虫。采用这一方法計卵，對於稀的糞便不需要加以糾正。原作者应用这新方法與 Stoll 氏稀釋法进行比较，計算糞便中的

鈎虫卵、蛔虫卵和鞭虫卵，得出了直接塗片法比稀釋法變異系数要來得小的結論。

后来他^[9]还找出含成形糞便 $\frac{1}{200}$ ， $\frac{1}{400}$ ， $\frac{1}{500}$ 及 $\frac{1}{1000}$ 毫升的標準塗片分別能使光線減弱為 7.5，11.5，13 及 16 燭光呎。他建議在一般常規檢查中應用含糞 $\frac{1}{500}$ 毫升的塗片。

因為光電光度計應用前必須加以校正，他又提出用硫酸鋇溶液校正光度計的方法：

用分析化學方法（按：指用分析天平及容量瓶）分別配制 2N Na_2SO_4 及 N/1 CaCl_2 溶液，然後各加半量的純甘油。將兩種混合液用不同量（見表 1）加以配合，就得出相當於各種糞便含量的標準混懸液。配制標準液時，必須將 BaCl_2 混合液慢慢地逐滴加入 Na_2SO_4 混合液中，同時不斷進行攪拌。混懸液配好了，經過幾小時後就可應用。校正時吸 0.05 毫升標準液滴在載玻板上，鋪開成直徑 16 毫米的塗片，測定光電表指針偏轉的讀數，經過幾次測定，求得平均數。假如在某一光度計上相當於 $\frac{1}{500}$ 毫升糞便的標準液（以下簡稱 $\frac{1}{500}$ 標準液，余类推），將 20 燭光呎的光線減弱為 12.5 燭光呎，則將光線減弱同樣數值的糞便塗片含成形糞便量為 $\frac{1}{500}$ 毫升。

表 1. 標準液配制表

BaCl ₂ 混合液份數	Na ₂ SO ₄ 混合液份數	所得 BaSO ₄ 混懸液相當於塗片中含有的糞便量
3	2	1/200 毫升
2	3	1/300 毫升
1	2	1/400 毫升
1	3	1/500 毫升
1	6	1/1000 毫升

Melvin 氏等^[10]將 Beaver 氏直接塗片法（ $\frac{1}{1000}$ 毫升糞便）和 Stoll 氏稀釋法

（ $\frac{1}{100}$ 毫升糞便，則 0.15 毫升稀釋液）進行了比較，認為計算結果的變異程度及對於不同技術員所獲得的結果的變異程度兩種方法差異不大，但是直接塗片法較節省時間（只需一半）、玻璃儀器及實驗室空間，所需要送檢的糞便量也較少。因此他們建

議在野外調查中或在需迅速檢查大批糞便的醫院中，以採用直接塗片法較為適宜。

雖然我們早已在文獻上找到了 Beaver 氏的直接塗片計卵法，可是 Beaver 氏所採用的光電燭光計却是國內所極為罕見和不能買到的，因此，我們還是不能馬上採用它。但是由於今年鈎蟲調查的需要，我們就根據 Beaver 氏法的原理，採用國內較大城市都能買到的照相用的曝光表，設計了一種適合在醫院和在農村調查用的標準塗片儀，這樣直接塗片計卵法才被我們應用於鈎蟲調查中。經過在海南島萬寧縣一國營農場鈎蟲病調查^[11]的初次應用，我們認為效果很好，值得在國內推廣。

三、標準塗片儀的設計

Beaver 氏標準塗片計卵法在我國應用時所遇到的困難，首先是國內買不到光電燭光計，其次是在農村進行調查時電燈有困難。我們曾試用光電池連上電流計以代替光電燭光計，但是光電池還是要國外訂貨才能買到。最後我們改用照相用的曝光表，代替燭光計，並用干電池組和小燈泡代替 75—100 瓦的電燈。

I. 曝光表罩的設計：

除了一面對光背面讀數的曝光表裝置困難外，其它種類都可用，但光線強度相差一倍而指針偏轉距離較大的較好。市上最常見的曝光表是一端對光而在上面讀數的。因此，我們設計了一個木盒，它的下半分為兩部分，一部分剛好可以容納一個曝光表，另一部分放一個傾斜度 45° 的小鏡子。木盒的蓋子只能蓋住木盒的一半左右，使曝光表的讀數剛好可以看到。在這蓋子的正對小鏡子的地方開一個直徑 14 毫米的圓孔。木盒里外都漆成黑色，但在盒蓋外邊圓孔周圍畫一個內徑 16 毫米的同心圓圈，或貼上一張剪去一個直徑 16 毫米圓孔的紙。蓋子靠近鏡子的一端用鐵片連結，使能自由打開和蓋上，但蓋上時又能有固定的位置，就是使上面垂直射下的光線通過圓孔後剛好能經過鏡子的反射而為曝光表所接受。蓋子的厚度為 18 毫米。

我們在上述設計中保存了原設計的塗片直徑為 16 毫米的規定，但是將圓孔直徑縮小為 14 毫米。因為我們在試驗時發現由於載片厚度和眼睛位置的關係，要使塗片和同樣大小的圓孔相吻合是很困難的，因此通過同一片 $\frac{1}{500}$ 標準液塗片後光線的讀數甚至可以相差 0.1 至 0.2（參閱後面），不但在曝光表的校正上有困難，糞便塗

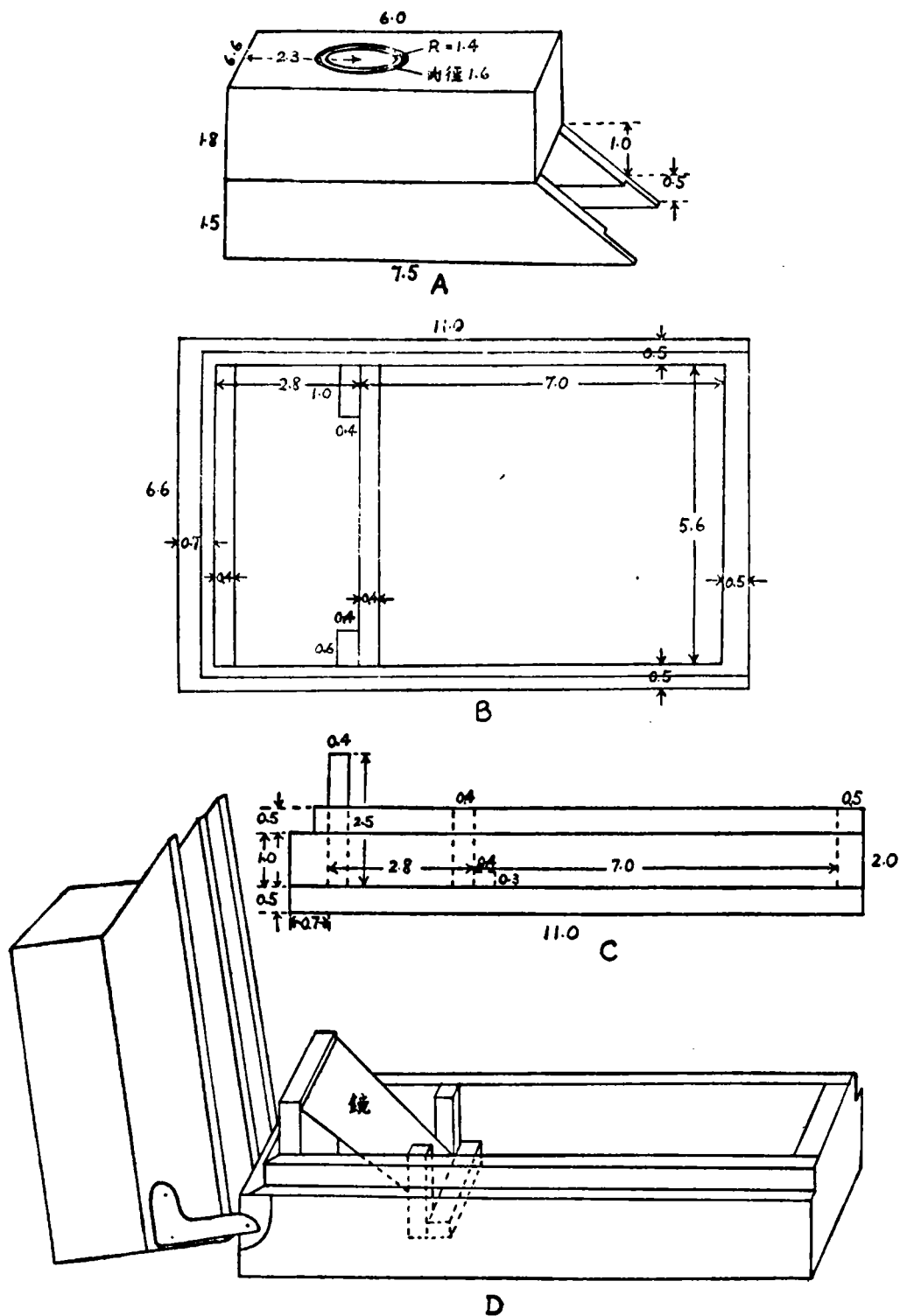


图 1 曝光表盒尺寸(单位厘米)設計图。

A. 盒蓋 B. 盒下半部的頂面觀 C. 盒下半部的側面觀, D. 盒蓋打開后的曝光表盒, 示內部結構。

片的厚度也很難保持一致。經過我們的改進，這一缺點就得到了克服。

我們所用的曝光表是德國制 Sixon 牌，光線強度每增加一倍時讀數相差一格。現在將我們所設計的曝光表盒的圖樣及尺寸附在下面供參考。

II. 光源方面的設計：

為了適應目前農村供電困難的情況，我們用三個大的干電池(甲電)串連起來，作為電源。小電池消耗快，電壓不穩定，不合用。再從裝有三節干電池的手電筒取下前端的反光鏡和燈泡部分，安裝在鐵架上。(購買手電筒時要選射出光線均勻的。據我們的經驗，配有“原子”燈泡的手電筒光線較均勻，安裝也較容易。)然後用電線將它和電池組及一個有斷路的 2 歐姆的滑動可變電阻(可以買 6 歐姆的)

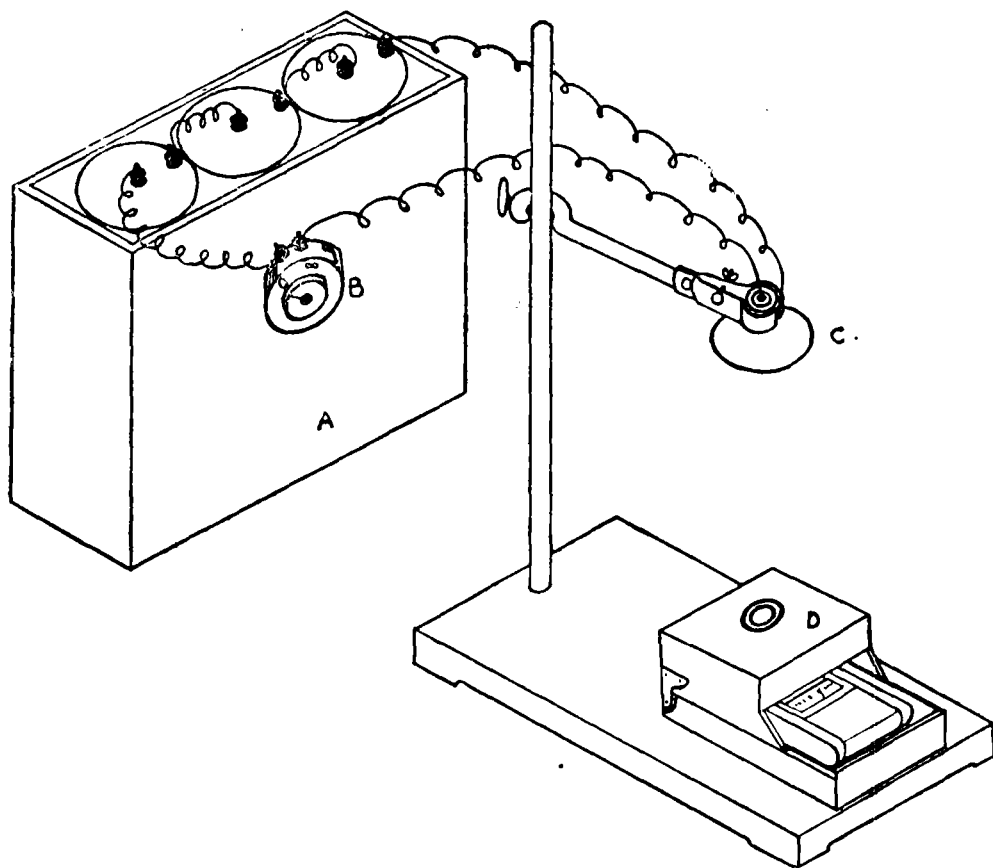


图 2 标准塗片儀的全套裝置

A. 電池組 B. 滑動可變電阻 C. 電燈 D. 曝光表盒及曝光表

貨或買電阻線自己繞制)串連起來,則光線的調節十分方便。如果沒有可變電阻則以一個普通開關代替。

光源準備好之後,就將曝光表盒放在燈光下,使照射下來的燈光(儘量選光線最均勻的部分)直射通過木盒的圓孔,經小鏡子反射給曝光表。在曝光表盒的圓孔上放一塊潔淨的載玻片,開亮燈光,並調節燈光高度,使通過載玻片的光線正好使曝光表的指針偏轉到7(不同曝光表可用不同數值,下同)。如果有可變電阻,則先使電阻為0,調節燈光位置使指針偏轉到比7稍高一些,然後轉動電阻,使指針正好指在7。這樣當應用時間較久電壓下降時,只要將電阻向0歐姆方向轉動就可使光線回到7。

如果一時買不到大的干電池或光源裝置有困難時,可以用一支手電筒夾在鐵架上作為光源。但是因為干電池太小,電壓容易波動,這樣除了要常常調節手電筒的高度以保持7(或6)的光強度外,塗片後將載玻片在空白處和塗片處來回移動對光線的強度進行複檢是很必要的。

III. 曝光表的校正與塗片標準的確定:

因為每個曝光表所得出的數值不一致,同一曝光表用久了之後可能也發生差異,同時光源和盒子的設計等也都會影響讀數,因此不能按 Beaver 氏 1949^[4]所指出的光線減弱一半等於1/300的標準計算(實際上我們測得為1/500),因此應用前應先按 Beaver 氏 1950^[6]所提出的方法進行校正,先依照第二章所述的方法配好1/200,1/300,1/400,及1/500標準液,並且準備幾支每滴0.05毫升的滴管。校正時先加一滴0.05毫升的1/500標準液到載片上,用牙簽將它鋪開成為直徑16毫米的均勻的塗片,然後調整好光源,使光線通過載玻片的空白處後的強度剛好是7,最後把塗片移到正對盒蓋的圓圈和圓孔,記下指針所指的數值。經過多份標準液塗片的測定,將降低後的數值平均,則得含糞便1/500毫升的糞便塗片所應引起的曝光表指針的偏轉值。根據我們的設計1/500標準液剛好使指針從7降到6。

因為曝光表的讀數不夠細,5,6與7之間只有5.5和6.5兩條線,如果通過1/500標準液塗片後減弱的光線強度介於5.5及6之間,則以後做糞便塗片時很難掌握指針的正確位置。遇到這種情形時可以用下面方法補救。假定1/500標準液塗片使指針從7偏轉至6與6.5之間,而1/400標準液塗片使指針從7偏轉至6以下,則塗片時應使1/400標準液鋪開的範圍略大於直徑16毫米,直到使指針偏轉至6

为止，然后将塗片拿开，放温箱中干燥，最后测量塗片的直径。取10个这种塗片的直径平方的平均数，按下面公式计算出指针从7偏转到6时所代表的粪便量。

塗片直径平方的平均数 × 含粪量 = 标准塗片直径平方 × 标准液所代表 粪 便 量

假定在1/400标准液塗片使指针从7偏转至6的情况下，塗片直径平方的平均为300，则依公式计算使指针从7偏转至的塗片含粪量就等於1/469毫升。

$$300 \cdot X = 16^2 \cdot \frac{1}{400}$$

$$X = \frac{256}{300 \times 400} = \frac{1}{469}$$

但这一公式有一定的局限性，就是只有当塗片範圍不太大时才是准确的。因此在确定这一标准时必须选用引起指针偏转至6以下而最接近6的第一个标准液。

我们还考虑到光线强度不同时指针的偏转是否有不同的问题。根据我们所用的曝光表，每差一格光线的强度相差一倍，因此光线从7降到6和从6降到5所获得塗片的厚度应该是一致的。我们以1/500标准液塗片测量两种情况下指针的偏转，证明通过载片空白部分的光线的强度只要不太弱都可以应用，而不需要固定于20燭光呎的标准。但是曝光表的刻度可能不够标准，为了使不同强度的光线（例如7.6.5及6）都可以应用，校正时可以测定标准塗片对各种强度的光线通过时所减弱的数值。

IV. 粪便塗片的标准化與虫卵的計算：

將光源和曝光表盒放在預先測定好的固定位置上，使光源发出的光线的均匀部分正好对准盒盖的圓孔。在盒上放一塊潔淨的載玻片，調節好光源，使通过載玻片时曝光表指针正好指在7。然后在載玻片上加一滴0.05毫升的水（用自制的每滴0.05毫升滴管），用牙簽在糞便各处挑取少量糞便在水中調勻，使塗片的範圍剛好達到盒蓋上所畫圓圈的內側（則直径为16毫米），繼續加糞便，直到通过糞便塗片的光线使指针偏转到6为止。

將載片取出，复上一塊22×22毫米蓋玻片，在顯微鏡下計算全片的虫卵数。取5片的平均值，除使光线从7降到6时所表示的含粪量（例如1/500毫升），就

得到每毫升糞便所含的虫卵数。

光源和曝光表盒的位置固定了就不必每次重新对过。所用载玻片必须是比較透明而且厚度一致的，这样可以减少每片涂片前的光源調节所耗費的时间。载玻片的厚度以較薄为佳，因为这样比較容易对准下面的盆盖的圓圈，而获得較准确的涂片範圍。

四、摘 要

1. 本文介紹了 Beaver 氏直接涂片計卵法，并分析比較这方法与 Stoll 氏稀釋法的優缺点。

2. 本文介紹了一种根据 Beaver 氏直接涂片計卵法原理，結合我国农村日前供電有困難的具体情况，采用国内較大城市市場上容易買到的照相用的曝光表以代替光電燭光計，并且在光源的調节与涂片範圍兩方面作了一些改进，設計的一种適合在农村及矿区进行鉤虫調查用的标准涂片儀（医院进行虫卵計算时也可采用）。采用这种方法进行鉤虫卵的計算所得結果与用 Stoll 氏稀釋法的結果頗为接近，可以代替后一方法，并且操作簡易，还可以节省大量时间。这一設計也适用于虫卵能与糞便充分混和其它蠕虫（蛔虫、鞭虫、華枝睾吸虫等）的虫卵計算（日本血吸虫不適用）。

參 考 文 獻

- (1) Stoll, N. R. 1923a Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *Am. J. Hyg.*, 3:59-70.
- (2) Stoll, N. R. 1923b Investigations on the control of hookworm disease. XVIII. On the relation between the number of eggs found in human feces and the number of hookworms in the host. *Am. J. Hyg.*, 3:156-179.
- (3) Stoll, N. R., and Hausheer, W. C. 1926 Concerning two options in dilution egg counting: small drop and displacement. *Am. J. Hyg.*, 6: March Suppl. 134-145.
- (4) Beaver, P. C. 1949 Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. *J. Parasit.*, 35: 125-135.
- (5) Beaver, P. C. 1950 The standardization of fecal smears for estimating egg production and worm burden. *J. Parasit.*, 36: 451-456.
- (6) Smillie, W. G. 1921 A comparison of the number of hookworm ova in the stool with the actual number of hookworm harbored by the individual. *Am. J. Trop. Med.*, 1: 389-395.
- (7) Cort, W. W., and Payne, G. C. 1922 Investigations on the control of hookworm disease. VI. A study of the effect of hookworm control measures on soil pollution and infestation in a sugar estate. *Am. J. Hyg.*, 2: 107-148.
- (8) Keller, A. E. 1934 A comparison of the efficiency of the Stoll egg-counting technique with the simple smear method in the diagnosis of hookworm. *Am. J. Hyg.*, 20:307-316.
- (9) Hausheer, W. C., and Herrick, C. A. 1926 The place of the smear in hookworm diagnosis. *Am. J. Hyg.* 6: July suppl., 136-148.
- (10) Melvin, D. M., Sadun E. H., and Heimlich, C. R. 1956 Comparison of the direct smear and dilution egg counts in the quantitative determination of hookworm infections. *Am. J. Hyg.* 64:139-148.
- (11) 江靜波、陳俊民、李定華. 1957 海南島興隆縣一國營農場鈎虫病的調查, 中山大學學報自然科學版 1957 年第2期 96-128 頁

A MODIFIED DIRECT SMEAR EGG-COUNT TECHNIC

H. T. Chen, T. M. Chen and C. P. Chiang

Beaver's original direct smear egg-count technic which involves the use of photoelectric foot-candle meter for measuring the turbidity of the fecal smear is modified with reference to greater accuracy as well as to simpler manipulation. The modified technic has been extensively used in agriculture areas.