

旋毛虫成囊前期幼虫的感染性及影响因素的实验观察

杨沛文 陈丹丹 常 远 王子鑫 冯瑞琳 李慧霞 关育栋 陈文辉 王国英[✉]

河南大学 基础医学院 河南 开封 475004

摘 要: (目的)观察旋毛虫成囊前期幼虫的感染性及影响因素。(方法)80 只小鼠随机均分为 8 组,每组 10 只,其中虫种组 4 组(15~18 d 组)、灌胃感染组 4 组(15~18 d 组)。虫种组 4 组小鼠,每鼠经口感染 300 条旋毛虫肌幼虫,感染后 15~18 d 每天剖杀 1 组,剪取每只小鼠的部分腹肌(5 mm×5 mm)制作染色标本,然后将小鼠的剩余肌肉剪碎,人工消化收集成囊前期幼虫;感染灌胃组(15~18 d)组的每只阴性小鼠,每鼠经口感染 300 条旋毛虫成囊前期幼虫,感染 36 d 剖杀,膈肌压片镜检囊包,鼠体肌肉人工消化收集幼虫。(结果)感染 17 d 染色标本显示囊包雏形形成。小鼠感染 36 d 后,17 d 组、18 d 组,膈肌检出囊包;鼠体肌肉人工消化检出幼虫。(结论)旋毛虫感染小鼠后第 17 d 开始具有感染性,旋毛虫的感染性与幼虫及囊包的发育有密切关系。

关键词: 旋毛虫;成囊前期幼虫;感染性

中图分类号:R 383.15

文献标志码: A

DOI:10.15991/j.cnki.41-1361/r.2019.02.008

Experimental observation on the infectivity and influencing factors of *Trichinella spiralis* in pre-encapsulated larvae

YANG Peiwen, CHEN Dandan, CHANG Yuan, WANG Zixin, MA Ruilin, LI Huixia, GUAN Yudong, CHEN Wenhui, WANG Guoying[✉]

School of Basic Medicine Science, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: (Objective) To observe the infectivity and influencing factors of *Trichinella spiralis* in pre-encapsulated larvae. (Methods) Eighty mice were randomly divided into 8 groups: 4 groups of worm species: 15~18 d group; 4 groups of intragastric infection group: 15~18 d group, 10 in each group. In the 4 groups of worm species, 300 *Trichinella spiralis* muscle larvae were orally infected per mouse. Partial abdominal muscles (5 mm×5 mm) of each mouse were cut to prepare stained specimens. Then, the remaining muscles of the mice were cut, and the pre-sac larvae were collected by artificial digestion. Each of the negative mice in the group of 15 d to 18 d in the gavage group was infected with 300 *Trichinella spiralis* larvae. Infected with 36 d, the diaphragm was examined by sacral muscle compression, and the larvae were collected by artificial digestion. (Results) Infected 17d stained specimens showed that the capsular form was formed. After 36 days of infection in mice, in the 17d group and the 18d group, the capsule was detected in the diaphragm; the larva was detected by artificial digestion of the mouse muscle. (Conclusion) *Trichinella* was infected at the 17th day after infection, and the infectivity of *Trichinella* was closely related to the development of larvae and capsular.

Key words: *trichinella spiralis*; pre-encapsulated larvae (PEL); infectivity

旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 简称旋毛虫, 成虫主要寄生在宿主的十二指肠和空肠上段, 幼虫

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 2018 年河南省医学教育研究项目(Wjlx2018300); 2016 年度河南大学大学生创新创业训练计划项目(医学院-1B)

作者简介: 杨沛文(1996 -), 男, 本科四年级学生。

✉通信作者: 王国英(1962-), 女, 高级实验师, 研究方向: 寄生虫病与流行病学, E-mail: medwgy@163.com

则寄生在同一宿主的横纹肌细胞内。分为幼虫和成虫两个阶段,其中幼虫阶段主要包括新生幼虫、移行幼虫、成囊幼虫^[1],如果寄生于人体可引起旋毛虫病,是一种危害严重的人兽共患寄生虫病。主要因生食或半生食含有旋毛虫幼虫囊包的猪肉及其他肉制品所致^[2]。新生幼虫只有侵入横纹肌细胞,才能发育形成幼虫囊包,已形成囊包的幼虫具有感染新宿主的能力。目前,用于肉类旋毛虫检疫的消化法主要是针对成囊幼虫^[3]。但是,还存在动物于感染旋毛虫的早期即被屠宰的情况,其肉类中含有的成囊前期幼虫是否具有感染性,其感染性与囊包的形成是否有关及其影响因素值得探讨。本实验对旋毛虫成囊前期幼虫的感染性及影响因素进行了实验观察,希望为旋毛虫病的检测和预防提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 旋毛虫虫种

引自河南省疾病预防控制中心,用昆明小鼠传代保种的旋毛虫(*Trichinella spiralis*),实验前以肌幼虫转种昆明小鼠备用。

1.2 实验分组

35日龄雌性昆明小鼠,体质量18~22g,购自河南省实验动物中心,动物许可证:SYXK(豫)2016-0002;80只小鼠随机均分为8组,每组10只。8组小鼠分别为:虫种组4组(15~18d组)、灌胃感染组4组(15~18d组)。

1.3 旋毛虫感染

虫种组4组小鼠,每鼠经口感染300条旋毛虫肌幼虫,感染后15~18d每天剖杀1组,剪取每只小鼠的部分腹肌(5mm×5mm)制作染色标本;然后将小鼠的剩余肌肉剪碎,加入人工消化液(胃蛋白酶1g,盐酸1mL,蒸馏水100mL),肉样与消化液的比例为1:25,置于恒温磁力加热搅拌器上37℃搅拌消化45min;然后过滤、沉淀,无菌生理盐水漂洗3~4次,收集成囊前期幼虫;将收集的成囊前期幼虫感染灌胃组(15~18d组)的每只阴性小鼠,每鼠经口感染300条旋毛虫成囊前期幼虫。

1.4 虫种组(15~18d组)幼虫观察

1.4.1 染色标本观察 剪取腹肌(5mm×5mm)用生理盐水清洗后剪成小块,置于两张载玻片之间,挤压后两端用线扎紧,制成压片。

1.4.2 染色法 醋酸明矾卡红染色。固定液、染色液的配制采用杨丁等^[4]的制作方法。①固定:将压片置于固定液中30h,解线后流水冲洗10min。②染色与分色:将固定后的压片置于染色液中10h,取

出后蒸馏水冲洗至标本不脱色为止(约5~10min),用体积分数为2%的盐酸乙醇分色液分色2min。

③脱水、透明与封片:将分色后的染色片依次放入体积分数为50%、70%、80%、95%乙醇中脱水各30min,在体积分数为100%乙醇中脱水2次,每次30min;无水乙醇与二甲苯(体积比1:1)混合液中透明30min;在纯二甲苯中透明30s。④在载玻片上滴2滴中性树脂,将染色片放入,加盖玻片,室温阴干。

1.4.3 肌幼虫形态观察 镜检经人工消化法收集的虫种组(15~18d组)幼虫,观察幼虫形态及活动状况。

1.5 旋毛虫成囊前期幼虫的感染性及影响因素

将灌胃感染组小鼠感染36d后剖杀,取每只小鼠完整膈肌,称重,压片镜检,计数囊包;并将鼠体其余部分称重,剪碎后消化90min,过滤,收集幼虫,镜检计数;计算每克膈肌虫荷和每克鼠体肌肉虫荷。

1.6 统计学方法

采用统计分析软件SPSS 22.0进行数据处理和统计分析。灌胃感染组数据若符合正态分布,采用独立样本 t 检验,若不符合,采用K-W检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 虫种组小鼠感染旋毛虫15~18d腹肌染色标本

镜下观察(400×)感染15d染色标本:受侵肌细胞变粗深染,呈长带状延伸,肌细胞内寄生幼虫被染成浅紫色,着色均匀,体态呈长线形。感染16d染色标本:受侵肌细胞变粗深染,长带状两端变细,肌细胞内寄生幼虫被染成深紫色,着色均匀,虫体表皮明显,体态呈长线形。感染17d染色标本:肌细胞受侵部位变粗深染呈长梭形,幼虫寄生部位变宽,长梭形两端逐渐变窄,囊包雏形形成,囊壁薄,与周围肌细胞分界模糊。肌细胞内寄生幼虫被染成深紫色,着色均匀,虫体表皮明显,体态呈弯钩状。感染18d染色标本:囊包雏形明显,囊内深染,囊壁薄,囊包两端的囊角逐渐合拢,幼虫被染成浅紫色,着色均匀,头尾折叠成环状,位于囊包中部。

2.2 虫种组小鼠感染旋毛虫15~18d人工消化收集的幼虫

镜下观察(100×)感染15d幼虫标本:虫体较小,自然舒展呈C字形,未呈现出活动状态(图1A);感染16d幼虫标本:虫体呈弯曲状,表明虫体是活体(图1B);感染17d幼虫标本:图左侧的虫体自然舒展呈C字形,未呈现出活动状态,图中部的

虫体头、尾两端向内卷曲呈双环状,处于活动状态(图1C);感染18d幼虫标本:图中上方的虫体自然舒展呈C字形或直线状,未呈现出活动状态,图中左、右两侧的虫体呈螺旋状,处于活跃状态(图1D)。

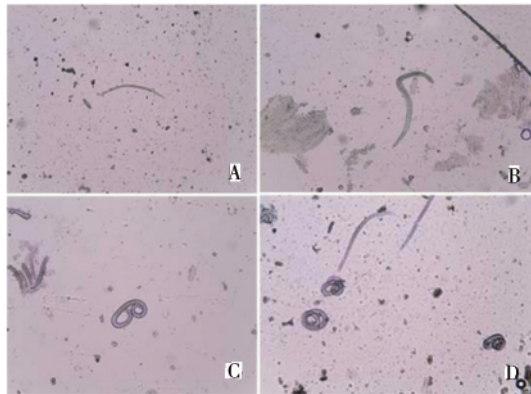


图1 虫种组小鼠感染旋毛虫15~18d人工消化收集的幼虫

2.3 膈肌压片镜检

小鼠感染36d后,膈肌压片镜检,灌胃感染的15d组、16d组均未检出幼虫;17d组、18d组检出率分别为80%、100%。17d组、18d组的每克膈肌虫荷均数分别为 20.82 ± 12.95 、 323.25 ± 112.82 ,两者之间差异有统计学意义($\chi^2 = 9.15, P < 0.01$)。

2.4 人工消化鼠体肌肉镜检

小鼠感染36d后,去除膈肌,取全部肌肉,人工消化后镜检,灌胃感染的15d组、16d组均未检出幼虫;17d组、18d组检出率分别为80%、100%。17d组与18d组的每克鼠体肌肉虫荷均数分别为 5.10 ± 3.95 、 13.94 ± 5.36 ,两者之间差异有统计学意义($\chi^2 = 6.22, P < 0.05$)。

2.5 膈肌压片与鼠体肌肉人工消化结果比较

灌胃感染的17d组,膈肌压片与鼠体肌肉人工消化之间,每克虫荷均数差异有统计学意义($\chi^2 = 8.48, P < 0.01$);灌胃感染18d组,膈肌压片与鼠体肌肉人工消化之间,每克虫荷均数差异有统计学意义($\chi^2 = 14.29, P < 0.01$)。

3 讨论

本实验用感染小鼠15、16、17、18d的旋毛虫肌幼虫,采用灌胃方法感染阴性小鼠,结果显示,旋毛虫感染小鼠后第17d开始具有感染性,与文献^[5]报道一致。

染色标本显示,旋毛虫感染小鼠后15、16d的旋毛虫虫体在低倍镜(100)下,幼虫的特征已较明显,高倍镜(400)下,虫体形态非常清晰,极易辨别^[6]。旋毛虫感染小鼠后,人工消化收集15~18d的旋毛虫幼虫,镜

下观察还显示,感染15d幼虫未表现出活动状态,感染16d幼虫活动状态不明显,感染17d幼虫活动状态明显,感染18d幼虫活动状态突出。这些结果说明旋毛虫感染小鼠第17d后,幼虫体态、活动状态以及囊包的发育较前有一个明显的变化,旋毛虫的感染性与幼虫及囊包的发育有密切关系。

镜检结果显示,灌胃感染的18d组,膈肌压片和人工消化鼠体肌肉,每克虫荷均数均高于17d组。说明18d组的幼虫感染性较17d组的幼虫感染性强。

旋毛虫肌幼虫在宿主不同感染部位的感染密度不同。本实验结果显示,灌胃感染的17d组、18d组,膈肌压片与鼠体肌肉人工消化之间,每克虫荷均数差异均有统计学意义,数据表明膈肌幼虫密度高于鼠体其他部位,与文献^[7]报道一致。

本实验的目的是观察旋毛虫成囊前期幼虫的感染性及影响因素。结果显示,旋毛虫幼虫感染小鼠后第17d开始具有感染性,旋毛虫的感染性与幼虫及囊包的发育有密切关系。

参考文献:

- [1] 向征,周本江.影响旋毛虫感染性的因素[J].国际医学寄生虫病杂志,2006,33(3):143-145.
- [2] 张雅兰,朱岩昆,陈伟奇,等.2016年南阳市社旗县旋毛虫感染现状[J].热带医学杂志,2017,17(11):1541-1543.
- [3] 吴秀萍,王迪,李庶东,等.消化法检验旋毛虫病最适条件的筛选[J].中国动物检疫,2015,32(3):62-65.
- [4] 杨丁,皮本伟,牛利娜,等.一种旋毛虫肌幼虫囊包标本的单染制作方法[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2012,30(6):498-499.
- [5] 吴观陵主编.人体寄生虫学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2013:555-568.
- [6] 樊航,闫钰鑫,蔡欢,等.镜检法与染色法对旋毛虫成囊前幼虫的检查效果比较[J].河南大学学报(医学版),2016,35(1):32-35.
- [7] 王国英.旋毛虫肌幼虫在感染小鼠体内的分布[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(3):212-213.

[责任编辑 时红]