

旋毛虫新生幼虫低温保藏的初步研究*

朱兴全 窦兰清 石磊** 史晓红 牛炳亨

(中国农科院兰州兽医研究所)

旋毛虫作为一种危害严重的人兽共患寄生虫病的病原,常需进行虫种保存,常规保存方法是用小鼠或大鼠传代保存,这样不仅费时、费事而且成本很高,特别是在开展分类研究,需要保存较多的虫株时尤为如此。为了克服这些不足,国内外学者尝试用低温冷冻的方法来保藏旋毛虫虫种并已有成功的报道^[1~4]。本文报道我们开展旋毛虫新生幼虫低温冷冻保藏初步研究的结果。

材料与 方法

1. 虫株来源 实验所用旋毛虫虫株是本实验室用大鼠传代保存的长春犬源旋毛虫。

2. 实验动物

① 大白鼠:购自甘肃省肿瘤研究所,为普通成年 Wistar 大鼠,雌雄均有。

② 小白鼠:购自卫生部兰州生物制品研究所,为普通封闭群昆明小鼠,雌雄均有。实验始重约 18 g。

3. 新生幼虫的收集 给每只大鼠经口感染 7000~10000 条肌动虫后 7 d,剖杀大鼠,取出小肠,纵向剖开后剪成 3 cm 左右片段,在生理盐水中浸洗片刻以除去肠道内容物。置生理盐水中于 37℃ 孵育 3.5 h,反复自然沉淀洗涤,收集纯净旋毛虫成虫。

将成虫计数后,于 RPMI-1640 液中(添加 20% 犊牛血清)在 37℃ 培养 17 h,使雌虫体外

产生幼虫。经过滤将成虫与新生幼虫分开,离心沉淀收集新生幼虫。

4. 新生幼虫的冷冻保藏 保护剂为含 10% 犊牛血清及 10% 二甲基亚砷的 RPMI-1640 培养液,先将新生幼虫加适量保护剂后于 37℃ 孵育 15 min,然后置液氮气雾中(液面上 9 cm 左右) 40 min,最后放入液氮中。40 min 后取出,于 37℃ 水浴解冻。解冻后抽样计数观察活力。加入 10 倍量的 RPMI-1640 培养液,于 37℃ 放置 3 h 后离心浓缩,分别经尾静脉注射及股部肌注射感染小鼠 8 只,每只感染 5000 条新生幼虫。并设未冷冻新生幼虫尾静脉注射及股部肌注射感染对照。

实验结果

旋毛虫新生幼虫在液氮中冻存 40 min 后于 37℃ 水浴快速解冻,抽样在光镜下观察计数,80% 的新生幼虫明显运动,说明这些新生幼虫冻后存活。感染后 39 d 剖杀全部小鼠,去头、皮及内脏、脂肪后,取膈肌压片光镜下观察,冷冻新生幼虫尾静脉注射小鼠在膈肌中见到 1 条肌幼虫;股部肌注小鼠膈肌中未见肌幼虫。

用人工胃液将肉尸全部消化,计数全部肌

* 农业部“八五”重点研究项目

** 厦门大学生物系硕士研究生

幼虫。结果,未冷冻新生幼虫尾静脉注射小鼠平均每只回收肌幼虫80条,回收率为1.6%;未冷冻新生幼虫股部肌注射小鼠平均每只回收57条,回收率为1.14%。冷冻新生幼虫尾静脉注射小鼠平均每只回收肌幼虫25条,回收率为0.5%,占相应对照鼠的31.25%。冷冻新生幼虫股部肌注射小鼠每只回收19条,回收率为0.38%,占相应对照鼠的33.33%。结果表明旋毛虫新生幼虫的低温冷藏初获成功。

讨 论

关于旋毛虫的新生幼虫的冷冻保藏,以意大利旋毛虫病学家 Pozio 博士的结果最为理想。他们用能自动控温的“控温冷冻装置”按每分钟降温0.3℃或0.6℃的速度,降温到-80℃或-70℃后放入液氮中保存2~12个月,水浴解冻后新生幼虫存活率达80%,经尾静脉注射感染小鼠后25天剖杀,肌幼虫回收率为9%,对照未冷冻新生幼虫感染后肌幼虫回收率为24%,冷冻新生幼虫感染后回收率占未冷冻对照的38%^[1~2]。他们还采用这一冷冻方法比较了4种毛形线虫对低温的抵抗力,发

现以旋毛虫最耐冷,固有毛形线虫次之,伪旋毛虫更差,而纳氏毛形线虫则冷冻后无活虫。采用液氮低温冷藏技术, Pozio 等已建立毛形线虫虫种(株)库^[1~2]。

国内尚未见到有关旋毛虫新生幼虫冷冻保藏方法的报道,仅见沈静德等(1993)报告了他们采用微机控制降温速率的冷冻装置液氮冻存肌肉包裹幼虫初获成功的研究^[4]。我们在没有自动控温冷冻装置条件下,采用手工操作同样使旋毛虫新生幼虫冷藏成功。我们的结果与 Pozio 等的报告相比,肌幼虫回收率偏低,一则可能是没有逐渐降温,使新生幼虫发育受阻,二则是因为尾静脉注射的技术问题,因为未冷冻正常新生幼虫感染小白鼠后肌幼虫回收率亦很低,有待改进、完善感染方法。

参 考 文 献

- 1 Rossi, P. et al., J Parasitol 1988, 74: 510~511
- 2 Pozio, E. et al., Exp Parasitol 1988, 67: 182~189
- 3 Jackson-Gegan, M. et al., Am J Trop Med Hyg 1988, 38: 558~567
- 4 沈静德等,中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1993, 11: 231

(收稿日期 1995年1月4日)

(上接第46页)

表 1 不同药物驱治羊疥螨的效果

| 畜别 | 药 物 | 剂 量 | 用 药 方 法 | 分 组 | 驱 治 效 果 | |
|-----|----------|----------|---------|-------|---------------|--------------------|
| | | | | | 用 药 5 天 后 | 用 药 15 天 后 |
| 绵 羊 | 20%碘 硝 酚 | 10 mg/kg | 颈部皮下注射 | 碘 A 组 | 临床症状消失,镜检螨虫阴性 | 患部痂皮脱落,皮肤柔软,并长出新绒毛 |
| | | 10 mg/kg | 肌肉注射 | 碘 B 组 | 同上 | 同上 |
| | 1%伊维菌素 | 200μg/kg | 颈部皮下注射 | 伊 组 | 同上 | 同上 |
| | | | | 对照组 | 病势如初,镜检见许多活螨 | 病势加剧 |

其他疾患,甚至造成死亡。改用碘硝酚治疗不仅操作简便、见效快、成本低(仅为伊维菌素价格的1/5),且不受气候条件限制,对孕羊、幼羊均安全。加之该药尚对其它寄生虫病有很好的疗效,确有推广应用价值。

(致谢: 本文承蒙刘辉高级兽医师审阅。参加试验工作的还有李虎军、朱怀贵、焦贵福、张雪峰等同志)。

(收稿日期 1994年11月23日)