

旋毛虫南阳猪体分离株的生物学特性研究

肖治军,张改平,邓瑞广,李学伍,杨艳艳,柴书军,赵东,邢广旭,杨继飞

(河南省农业科学院,河南省动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要:观测了旋毛虫南阳猪体分离株的形态大小,测定了其在小鼠和猪体中的繁殖力指数、雌虫体外产新生幼虫的能力和对低温的耐受性。测得该虫株雄成虫、雌成虫和发育充分的肌幼虫的长宽度分别为 $(1.415 \pm 0.164) \text{ mm} \times (0.048 \pm 0.014) \text{ mm}$, $(2.627 \pm 0.246) \text{ mm} \times (0.056 \pm 0.018) \text{ mm}$ 和 $(1.112 \pm 0.185) \text{ mm} \times (0.038 \pm 0.013) \text{ mm}$;其在昆明小白鼠和三元杂交猪体中的繁殖力指数分别为 (112.0 ± 59.65) 和 142.5 ;平均每条雌虫体外产新生幼虫 (56.76 ± 5.13) 条;在猪肉中的感染性肌幼虫置 $-32 \sim 36 \text{ h}$ 或 $-22 \sim 60 \text{ h}$ 即全部死亡。结果表明,该旋毛虫南阳猪体分离株的上述生物学特性与猪旋毛虫(*T. spiralis*)的特性相似。

关键词:猪;旋毛虫;特性;测定

中图分类号:S858.28 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)02-0114-04

Biological Characters of *Trichinella spiralis* Isolate from Swine in Nanyang

XIAO Zhi-jun, ZHANG Gai-ping, DENG Rui-guang, LI Xue-wu, YANG Yan-yan,
CHAI Shu-jun, ZHAO Dong, XING Guang-xu, YANG Ji-fei

(Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The shape and size of the *Trichinella spiralis* isolate from the pigs in Nanyang were observed. Its reproductive capacity index (RCI) in mouse or pig and the new born larvae production of per female worm *in vitro* (NBL) as well as its resistance to low temperature were determined. The results showed that the average length and width of the male or female adult worms and the muscle larvae of the isolate were $(1.415 \pm 0.164) \text{ mm} \times (0.048 \pm 0.014) \text{ mm}$, $(2.627 \pm 0.246) \text{ mm} \times (0.056 \pm 0.018) \text{ mm}$ and $(1.112 \pm 0.185) \text{ mm} \times (0.038 \pm 0.013) \text{ mm}$, respectively. The RCI of the isolate in mouse and pig were (112.0 ± 59.65) and 142.5 , respectively, with a mean NBL of (56.76 ± 5.13) per female. The infective muscle larvae of the isolate became dead after 36 h at -32 or after 60 h at -22 in pig muscles. The results indicated that the biological characters of the isolate were similar to that of *T. spiralis*.

Key words: Swine; *Trichinella*; Biological characters; Determination

毛形线虫属(*Trichinella*)并非只有传统认为的一个旋毛形线虫种(*T. spiralis*),而是由旋毛形线虫(*T. spiralis*)、本地毛形线虫(*T. nativa*)、伪旋毛形线虫(*T. pseudospiralis*)、尼氏毛形线虫(*T. nelsoni*)、布氏毛形线虫(*T. britovi*)5个姊妹种和3个分类地位未定的表现型组成^[1-3]。旋毛虫的形态学、繁殖力指数、雌虫体外产新生幼虫的能力和对低温的耐受性等生物学特性,是毛形线虫属的种株分类的重要参数^[2-5]。为了解旋毛虫南阳猪体分离株的生物学

特性,并为该虫株的分类提供依据,进行了本试验。

1 材料和方法

1.1 旋毛虫分离株

旋毛虫南阳猪体分离株(*T. swine* NY)来自河南省南阳感染猪体内,在Wistar大鼠中传代5次,又在昆明小鼠中传5代。本室保存。

1.2 试验动物

约2月龄昆明小白鼠,雌雄不限,购于郑州大学

收稿日期:2007-07-06

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD06A09);河南省农业科技成果转化资金项目(0636000012)

作者简介:肖治军(1964-),男,湖南郴州人,博士,副研究员,主要从事动物疫病快速诊断与防控研究。

通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,博士,研究员,博士生导师,主要从事动物免疫学研究。

实验动物中心。同品种和月龄的健康三元杂交猪,体重 13 kg 左右,购于郑州市某健康猪场;试验前观察 7 d,临床表现未见异常,用猪旋毛虫单抗快速 ELISA 诊断盒(本室提供)检测血清旋毛虫抗体为阴性。

1.3 主要仪器和试剂

电子天平、计数器、倒置显微镜、组织捣碎机、网孔孔径 250 μm 的筛子、磁力搅拌器、电热恒温培养箱、低温冰箱、 CO_2 培养箱、培养板、载玻片、微量加样器、盐酸(含量 36%~38%,比重 1.19)、胃蛋白酶(1 3 000)、RPMI-1640 培养基、犊牛血清、青链霉素等。

1.4 旋毛虫南阳猪体分离株肌幼虫的收集及其长宽度的测量

以肌肉消化法^[6]制备旋毛虫肌幼虫;按文献[4]方法测量旋毛虫肌幼虫的长宽度。

1.5 旋毛虫南阳猪体分离株成虫的收集及其长宽度的测量

按文献[5]方法制备旋毛虫的成虫,辨认雌雄后,分别测量 50 条雌虫和雄虫的长宽度^[4]。

1.6 旋毛虫南阳猪体分离株雌虫体外产新生幼虫能力的测定

依文献[5]方法测定每条旋毛虫南阳分离株雌虫体外产新生幼虫的数量(NBL)。

1.7 旋毛虫南阳猪体分离株在小鼠中的繁殖力指数测定

分别按每只鼠 10, 20, 50, 100, 200 条旋毛虫肌幼虫经口感染小鼠,每个剂量组均用 20 只小鼠。每个剂量组于感染后第 40 天剖杀小鼠,先取感染小鼠的膈肌,观察并测定其中 30 个包裹的长宽度。然后以消化法收集感染小鼠全部肌肉中的旋毛虫肌幼虫,统计计算每克肌肉中含幼虫数(LPG),繁殖力指数(RCI) = 繁殖后所获肌幼虫数/接种肌幼虫数^[2]。

1.8 旋毛虫南阳分离株在猪体中繁殖力指数的估测

选 5 头体重相近的试验猪。其中 3 头,每头投服 10 000 条的旋毛虫肌幼虫;另 2 头作为阴性对照,不感染旋毛虫,并与感染猪严格隔离饲养。以常规方式饲养,密切观察两组猪的临床表现。猪接种旋毛虫肌幼虫后第 40 天称重剖杀,测定猪体各部位肌肉或肌群每克肌组织肌幼虫数。各部位肌肉取样部位是:舌肌、左咬肌、右咬肌、颈肌、左肩胛肌、右肩胛肌、左前腿肌、右前腿肌、膈肌、左肋间肌、右肋间肌、背最长肌、左臀肌、右臀肌、左腓肠肌、右腓肠肌,每头猪计 16 份肉样;每份肉样取 10 g 左右。将样品逐一剔除筋膜、脂肪,称重,用消化法收集肌幼虫并

计数。估算繁殖力指数 = (感染猪宰杀时活重克数 $\times 0.55 \times$ 各肌肉群平均每克肌肉荷虫量 LPG) / 接种肌幼虫数。

1.9 旋毛虫南阳猪体分离株肌幼虫对低温的耐受性测定

随机取含旋毛虫肌幼虫的猪肉样 12 份(每份重约 200 g),6 份样置于 -22 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,6 份置于 -32 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻。每隔 12 h 各取出一份肉样(约 20 g)。取出的肉样于室温下彻底融化后消化并收集幼虫,观察肌幼虫存活状况^[3]。肌幼虫的死活也可用 0.03% 美蓝染色来判断:旋毛虫死幼虫能被 0.03% 美蓝染成蓝色,活幼虫不着色^[7]。

2 结果与分析

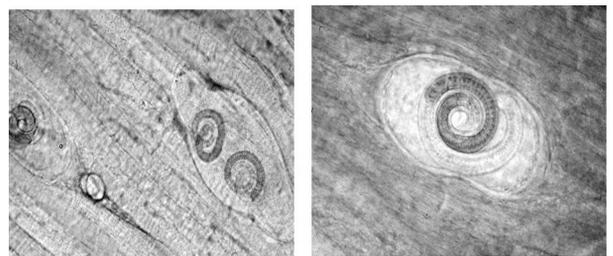
2.1 形态学观测结果

成虫细小,线状,虫体愈向前端愈细,后端较粗。虫体前部为食道部,食道部的前端无食道腺环绕,食道部的后端均为食道腺细胞环绕;较粗的虫体后部包含着肠管和生殖器。雄虫尾端有泄殖孔,雌虫的阴门位于食道部的中央。旋毛虫虫体的形态学参见图 1。



图 1 小鼠肌肉消化后获得的旋毛虫虫体

Fig. 1 *Trichinella spiralis* from the digested mouse muscles



左为猪肌肉中包裹,右为小鼠肌肉中包裹

Left. The cyst in pig muscle; Right. The cyst in mouse muscle

图 2 肌肉中的旋毛虫包裹

Fig. 2 The cyst of the muscle lava

成熟未钙化的肌幼虫包裹呈纺锤形,囊壁为双层结构,包液明亮,包裹内有 1~3 条虫体,呈盘状或螺旋状弯曲,一般有 2 个盘绕(图 2)。往其中盘绕的虫体滴加 37 $^{\circ}\text{C}$ 温水时,可见虫体伸曲活动。

该分离株成虫、发育充分的肌幼虫及其包裹的长宽度测定结果,详见表 1。

表1 旋毛虫南阳分离株成虫、肌幼虫及其包裹的长宽度($\bar{X} \pm S$ mm)

Tab.1 The mean length and width of the cyst or muscle lava or adult of *T. swine* NY($\bar{X} \pm S$)

发育阶段(发育天数、样品数) Growth stages(developing days ,sample numbers)	长度/mm Length	宽度/mm Width
包囊(40 d ,n = 30) Cyst(40 d ,n = 30)	0.242 ± 0.048	0.141 ± 0.068
肌幼虫(40 d ,n = 50) Muscle larvae(40 d ,n = 50)	1.112 ± 0.185	0.038 ± 0.013
雄成虫(7 d ,n = 50) Male adult worms(7 d ,n = 50)	1.415 ± 0.164	0.048 ± 0.014
雌成虫(7 d ,n = 50) Female adult worms(7 d ,n = 50)	2.627 ± 0.246	0.056 ± 0.018

2.2 旋毛虫南阳分离株雌虫体外产新生幼虫能力的测定

测得平均每条旋毛虫分离株雌虫体外产新生幼虫的数量(NBL)为(56.76 ± 5.13) (n = 30)条。

2.3 旋毛虫南阳分离株在小鼠中的繁殖力指数测定

接种200条旋毛虫幼虫/只剂量组的小鼠,精神

稍差并在接虫后12 d死亡1只;其余剂量组小鼠均不见明显的临床症状。旋毛虫肌幼虫不同剂量感染小鼠的结果见表2。从表2可见,接虫剂量对RCI值有些影响,过高剂量(200条/只)和过低剂量(10条/只)RCI值均低,而接种适宜剂量(50~100条/只)的小鼠有较高而稳定的RCI值。

表2 小鼠感染不同剂量旋毛虫肌幼虫后的LPG和RCI测定结果

Tab.2 The results of LPG and RCI obtained from the mice inoculated with *T. swine* NY

组别 Groups	昆明小鼠只数 Numbers of Kunming mice	每只口服幼虫数 Oral dosage of muscle larvae/ mouse	每克肌肉荷虫量LPG Larvae per gram muscle (LPG)	繁殖力指数 RCI Reproductive capacity index (RCI)
E	20	10	47.8 ± 45.4 (n = 15)	52.58
D	20	20	172.07 ± 151.3 (n = 15)	94.64
C	20	50	838.2 ± 490 (n = 10)	184.40
B	20	100	1 499.6 ± 703 (n = 5)	164.96
A	20	200	1 154.6 ± 657.4 (n = 5)	63.50
平均 Mean	20	76	748.48	112.0 ± 59.65

2.4 旋毛虫南阳分离株在猪体中的繁殖力指数估测

到接种旋毛虫后第40天剖杀时,3头感染猪的平均活重为32.8 kg,对照组2头猪平均活重为33.6 kg。表3显示旋毛虫南阳分离株肌幼虫在猪肌肉中分布情况可见,P1,P2,P3这3头试验猪均感

染了旋毛虫,旋毛虫在猪各部位肌肉中的寄生密度依次是膈肌、舌肌、咬肌、腓肠肌、颈肌、肋间肌、肩胛肌、前腿肌、臀肌、背最长肌;上述肌肉群平均LPG为79.015条,由此计算该分离虫株在猪体中的RCI约为142.5。

表3 试验猪感染旋毛虫后各肌肉群的平均每克肌肉荷虫量(LPG)

Tab.3 The results of mean LPG of muscles in the pigs inoculated with *T. swine* NY

猪数 Pigs	膈肌 Diaphragmatic	舌肌 Muscles of tongue	咬肌 Masseter muscles	腓肠肌 Gastrocnemius muscle	颈肌 Muscles of neck	肋间肌 Intercostal muscles	肩胛肌 Scapular muscles	前腿肌 Forelimb muscles	臀肌 Guteal muscles	背最长肌 Longest muscle of back
P1	470.2	302.6	78.9	79.6	63.7	48.7	23.7	9.6	5.89	3.58
P2	285.3	96.3	182.5	32.5	42.6	26.3	38.2	13.8	8.63	6.95
P3	207.0	103.3	63.5	63.7	21.2	40.2	29.9	10.2	6.72	5.28
平均 Average	320.8	167.4	108.3	58.6	42.5	38.4	30.6	11.2	7.08	5.27
总平均 Total mean					79.015					
对照猪 Control pigs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5 旋毛虫南阳分离株肌幼虫对低温冷冻的抵抗力测定

测定结果见表4。结果显示,旋毛虫南阳分离株肌幼虫不耐低温冷冻。

表4 旋毛虫南阳分离株对低温的耐受性测定结果(肌幼虫死亡率)

Tab.4 The result of freeze resistance of *T. swine* NY(the death rate of muscle larvae)

冷冻温度/ Freeze temperature	冷冻时间与肌幼虫死亡率/ % Freeze time (hours) and the death rate of the muscle larvae					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
- 32	89	97	100	100	100	100
- 22	67	79	89	98	100	100

3 讨论

本试验测得旋毛虫南阳分离株肌幼虫、雄成虫、雌成虫的长宽度分别为 $(1.112 \pm 0.185) \text{ mm} \times (0.038 \pm 0.013) \text{ mm}$, $(1.415 \pm 0.164) \text{ mm} \times (0.048 \pm 0.014) \text{ mm}$ 和 $(2.627 \pm 0.246) \text{ mm} \times (0.056 \pm 0.018) \text{ mm}$, 其形态大小与文献[1, 4, 8]描述的旋毛虫大小相似。本试验测得该旋毛虫在昆明小鼠中的繁殖力指数(RCI)平均为 (112.0 ± 59.65) , 与文献[2, 9]报道的猪旋毛虫的小鼠 RCI 值相近, 表明旋毛虫南阳分离株对小鼠有较高的感染性。接种高剂量旋毛虫肌幼虫的小鼠 RCI 值较低, 是否与过高剂量引起鼠肠道排虫有关, 有待进一步研究。本试验测得旋毛虫南阳分离株雌虫体外产新生幼虫的能力为 (56.76 ± 5.13) 条, 比文献[5]报道值小些, 但比文献[1]报道值要大些。

本试验测得旋毛虫南阳猪体分离株对三元杂交商品猪的感染率为 100%, 该旋毛虫在该商品猪各部位肌肉中的寄生密度依次是膈肌、舌肌、咬肌、腓肠肌、颈肌、肋间肌、肩胛肌、前腿肌、臀肌、背最长肌, 上述肌肉群平均每克肌肉荷虫量(LPG)约为 79 条, 这与文献描述的黑龙江省哈尔滨猪体分离株的特性相似^[10]。本试验测得旋毛虫南阳分离株在猪体中的繁殖力指数约 142.5, 测出旋毛虫南阳分离株肌幼虫不耐低温冷冻, 在猪肉中 - 32 ~ 36 h 或 - 22 ~ 60 h 处理即全部死亡, 这些结果均与黑龙江省海伦县猪体分离株以及国际标准株 (*T. spiralis*) 的特性相似, 而与国际标准本地株 (*T. nativa*) 的特性

有差异^[3]。综合上述试验结果认为, 旋毛虫南阳猪体分离株的相关生物学特性与猪旋毛虫 (*T. spiralis*) 相似。该虫株的基因水平特性有待研究。

参考文献:

- [1] 朱兴全, 龚兰清, 石 磊, 等. 七株旋毛虫几项生物学特性的比较研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 1995, 3(1): 10 - 12.
- [2] 徐克成, 刘明远, 姚春雨, 等. 中国八地区旋毛虫繁殖力指数测定的比较[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(3): 62 - 63.
- [3] 宋铭忻, 张桂红, 路义鑫. 旋毛虫各隔离种对猪的感染性和低温耐受性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(2): 191 - 196.
- [4] 徐克成, 刘明远, 王 嵘, 等. 中国旋毛虫形态度量学分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 363 - 366.
- [5] 宋铭忻, 张桂红, 路义鑫. 旋毛虫各隔离种雌虫体外产新生幼虫能力的研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2001, 9(4): 10 - 12.
- [6] 许威光, 袁文甫, 王家祥, 等. 旋毛虫肌幼虫排泄 - 分泌抗原诊断猪旋毛虫病的研究与应用[J]. 华北农学报, 1989, 4(4): 133 - 139.
- [7] 沈玉娟, 常正山, 张永年. 旋毛虫死活快速鉴别的实验研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2003, 11(4): 21 - 22.
- [8] 北京农业大学. 家畜寄生虫学[M]. 北京: 农业出版社, 1981: 252 - 256.
- [9] 孙庆显, 周源昌, 李淑声. 哈尔滨地区猪狗旋毛虫对大小鼠的感染性研究[J]. 中国兽医杂志, 1992, 18(11): 3 - 5.
- [10] 王洪法, 李继民, 周源昌, 等. 猪旋毛幼虫在猪和犬体内的分布[J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(12): 27.