

УСТОЙЧИВОСТЬ МЫШЕЧНЫХ ЛИЧИНОК *TRICHINELLA SPIRALIS* К ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

С. А. Нагорный, Ю. И. Васерин

Рассмотрены вопросы устойчивости мышечных личинок *T. spiralis* к действию низких температур. Показано, что в условиях контролируемого замораживания в жидком азоте 50—60 % мышечных личинок трихинелл сохраняют жизнеспособность по признаку подвижности, а 11—15 % — по способности к воспроизводству. Обсуждается вопрос о криопротекторных свойствах сред и режиме замораживания.

Изучение устойчивости различных биологических объектов к действию низких температур лежит в основе разработки принципов криопрезервации и создания низкотемпературных банков-музеев. В литературе приводятся сведения, что микрофилярии *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Mansonella perstans* (Ham, Townson, 1986; Hongzhang, Huifen, 1986; Cesbron e. a., 1986; Lawrence Dale, 1983), личинки *Toxocara canis* (Ramp e. a., 1987), *Dictyocaulus viviparus* (Sames, Peacock 1986), при использовании соответствующих криопротекторов и режима замораживания и размораживания обладали достаточно высокой устойчивостью к действию низких температур, сохраняя жизнеспособность при хранении в жидком азоте в течение 1—2.5 лет.

Показано также, что новорожденные личинки трихинелл относительно резистентны к воздействию холода при использовании в качестве криопротектора диметилсульфоксида (Ross, Pozio, 1988), что легло в основу создания низкотемпературного банка-музея штаммов новорожденных личинок трихинелл (Pozio e. a., 1989). В то же время немногочисленные попытки замораживания и хранения мышечных (инвазионных) личинок трихинелл при температуре жидкого азота оказались безуспешными (Rossi, Pozio, 1988).

Целью настоящего исследования было изучение резистентности мышечных личинок трихинелл к воздействию низких температур (—196°), отработке режима замораживания и подбору сред, обладающих криопротекторными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали штамм Белорусский *Trichinella spiralis spiralis*, полученный из ВИГИС ВАСХНИЛ СССР, который пассировали на неинbredных белых мышцах. Мышечных личинок трихинелл выделяли методом переваривания мышечной ткани (Владимирова, 1965), отмывали сбалансированным солевым раствором Эрла и помещали в среду с соответствующим криопротектором в концентрации 20 лич/мл.

Замораживание мышечных личинок трихинелл проводили непосредственным погружением в жидкий азот в растворе Эрла с 5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 10 % глицерина (проба 1), медленным опусканием в течение 2 ч в горловине сосуда Дьюара пробирок с личинками трихинелл в растворе Эрла (проба 2), в 5 % БСА на растворе Эрла (проба 3) и в 5 % БСА и 10 % глицерина на растворе Эрла (проба 4). Контролируемое замораживание осуществляли по следующему режиму: снижение температуры до 10° со скоростью 1°/мин, от 100 до —10° — со скоростью 0.5°/мин, от —10 до —30° — со скоростью 1°/мин и от —30 до —100° — со скоростью 10°/мин. Далее пробирки с трихинеллами помещали для хранения в жидкий азот. В качестве криопротекторов использовали 5 % БСА и 10 % глицерина на растворе Эрла (проба 5), 5 % БСА и 20 % глицерина на растворе Эрла (проба 6) и 10 % БСА на растворе Эрла (проба 7).

Пробы размораживали в водяной бане при температуре 37° через 1, 7, 30, 90 сут после погружения в жидкий азот. Жизнеспособность мышечных личинок трихинелл, подвергнутых криопрезервации, оценивалась микроскопически по подвижности; форме личинок — спиралевидная свойственна живым личинкам, серповидная характерна для погибших личинок; целостности кутикулы. Индекс воспроизводства трихинелл определялся путем перорального заражения неинbredных белых мышей массой 20 г в дозе 100 личинок на животное и рассчитывался как отношение общего числа извлеченных из тушек личинок трихинелл к количеству введенных при заражении (Бессонов и др., 1975).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Непосредственное погружение отмытых мышечных личинок трихинелл в жидкий азот, их хранение в течение 24 ч с последующим оттаиванием при температуре 37° приводило к гибели последних (табл. 1). Личинки были неподвижными, имели серповидную форму с поврежденной кутикулой.

Относительно медленное замораживание личинок трихинелл в парах азота с опусканием пробирок с личинками трихинелл в горловину сосуда Дьюара в течение 2 ч, хранение в течение 24 ч в жидком азоте с последующим оттаиванием при температуре 37° также не обеспечивало сохранения их жизнеспособности (табл. 1). Морфологические исследования показали, что среди личинок, замороженных в парах азота, встречалось 22 ± 6 % серповидных неподвижных форм. Спиралевидные формы в 78 ± 5.4 % случаев сохранили слабую подвижность сразу после размораживания, но утрачивали ее в течение 1 ч наблюдения под микроскопом. Через 3 ч 50 ± 9 % спиралевидных форм регистрировали в пробе № 2 и 10 ± 4.3 % в пробе № 3. Заражение белых мышей данными личинками трихинелл не приводило к развитию инвазии. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс замораживания в парах азота, хотя и способствует сохранению частичной жизнеспособности, определяемой по подвижности личинок трихинелл, однако такие личинки полностью теряют свои инвазионные свойства.

Среди утративших подвижность серповидных форм отмечались локальные разрывы кутикулы и всего тела личинок. Вместе с этим полученные данные о частичном сохранении подвижности мышечных личинок трихинелл указывали на перспективность разработки других подходов криопрезервации в жидком азоте.

Контролируемое замораживание трихинелл с точным соблюдением всех параметров замораживания, хранение мышечных личинок трихинелл в жидком азоте в течение 24 ч с последующим быстрым оттаиванием при температуре 37° позволило выявить относительную резистентность трихинелл к воздействию низких температур (табл. 1). При этом было установлено, что подвижность мышечных личинок трихинелл страдала в меньшей степени, чем их способность инвазировать лабораторных мышей. Среди подвижных форм отмечались развернутые и спиралевидные формы, среди неподвижных серповидных форм имелись формы с поврежденной кутикулой.

Сопоставление криопротекторных свойств используемых сред показало, что для сохранения мышечных личинок трихинелл в жидком азоте могут быть использованы все испытанные варианты криопротекторных сред, хотя несколько лучшие результаты дала среда с 5 % БСА и 20 % глицерина.

При изучении длительности хранения мышечных личинок трихинелл в данной среде было отме-

Т а б л и ц а 1
Эффективность различных методов криопрезервации мышечных личинок
Efficiency of different methods of cryopreservation of muscular larvae

Метод криопрезервации	Среда	Проба	Выживаемость личинок, %	
			подвижность через 3 ч	инвазионная активность
Погружение в жидкий азот	5 % БСА и 10 % глицерина на растворе Эрла	1	0	0
Замораживание в парах азота	Раствор Эрла	2	50 ± 9	0
	5 % БСА на растворе Эрла	3	10 ± 4.3	0
	5 % БСА, 10 % глицерина на растворе Эрла	4	0	0
Контролируемое замораживание	5 % БСА, 10 % глицерина на растворе Эрла	5	56 ± 9.3	12 ± 1.3
	5 % БСА, 20 % глицерина на растворе Эрла	6	60 ± 9.5	15 ± 2.0
	10 % БСА на растворе Эрла	7	50 ± 10	11 ± 2.3

Таблица 2

Жизнеспособность мышечных личинок трихинелл при различных сроках хранения в жидком азоте

Viability of muscular larvae of *Trichinella spiralis* at different periods of preservation in liquid nitrogen

Показатель	Срок наблюдения, в сутках			
	1	7	30	90
Подвижность, %	60±9.5	58±8.7	59±9.8	56±9.3
Инвазионная активность, %	15±2.0	14.2±2.3	14.6±2.1	14.1±2.5

чено, что показатели их жизнеспособности (подвижность и инвазионная активность) существенно не изменяются в течение 3-месячного срока хранения в жидком азоте (срок наблюдения) (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о возможности хранения трихинелл в жидком азоте при использовании контролируемого режима замораживания и среды с 20%-ным глицерином и 5%-ным БСА. Однако данная среда, по-видимому, не является оптимальной. Росси и Поцио (Rossi, Pozio, 1988) не удалось сохранить инвазионность мышечных личинок трихинелл после замораживания в азоте, но авторы показали, что для новорожденных личинок трихинелл хорошие результаты дает среда, в состав которой входит 10 % диметилсульфоксида и 10 % эмбриональной сыворотки теленка. Таким образом, криоконсервации могут быть подвергнуты как новорожденные, так и мышечные личинки трихинелл. С одной стороны, для проведения исследований по изучению биологических свойств различных изолятов использование новорожденных личинок представляет определенные преимущества из-за простоты стандартизации условий опыта при парентеральном введении личинок. С другой, имеющиеся трудности выделения новорожденных личинок из половозрелых трихинелл делают более перспективным проведение криопрезервации мышечных личинок как легкодоступных форм.

Список литературы

- Бессонов А. С., Пенькова Р. А., Успенский А. В. Изучение видовой самостоятельности трихинелл и эпизоотологическая роль природных штаммов // Тр. ВИГИС. 1975. Т. 22. С. 15—26.
- Бритов В. А. Возбудители трихинеллеза. М., 1982. 271 с.
- Владимирова П. А. Ускоренный метод диагностики трихинеллеза // Ветеринария. 1965. № 10. С. 95—96.
- Cesbron J., Taelman H., Didier H., Myella L., Carpon A. Extended cryopreservation of *Loa loa* and *Mansonella perstans* microfilariae from Human peripheral blood // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 1986. Vol. 30, N 4. P. 563.
- Ham P., Townson S. Improved development of *Brugia microfilariae* following nique suitable for field conditions // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 1986. Vol. 80, N 1. P. 150.
- Hongzhang T., Huifen H. Презервация микрофилярий *Brugia malayi* и последующее их развитие в комарах *Anopheles hyrcanus sinensis* // Дунчу сюэбао, Acta zool. sin. 1986. Vol. 32, N 4. P. 383—384.
- Lawrence Dale N. Criopreservacion prolongada da microfilariae de *Mansonella ozzardi* em concentrado de sangue periferico humano // Acta Amason. 1983. Vol. 13, N 1. P. 95—101.
- Pozio E., La Rosa G., Rossi P. *Trichinella* Reference centre // Parasitology Today. 1989. Vol. 5, N 6. 169—170.
- Ramp T., Eckert J., Gottstein B. Cryopreservation of *Trichinella* and long-term in vitro maintenance of second-stage larvae of *Toxocara canis* // J. Parasitol. 1987. Vol. 73, N 2. P. 165—170.
- Rossi P., Pozio E. Criopreservacion of *Trichinella* newborn larvae // J. Parasitol. 1988. Vol. 74, N 9. P. 510—511.
- Sames E., Pecosck R. Studies on the cryopreservation of *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda) third-stage larvae // J. Helminthol. 1986. Vol. 60, N 1. P. 65—73.

Ростовский НИИ Эпидемиологии,
Микробиологии, Паразитологии
и гигиены МЗ РСФСР

Поступила 25.07.1989
после доработки 25.10.1990

RESISTANCE OF MUSCULAR LARVAE OF TRICHINELLA SPIRALIS TO THE EFFECT OF LOW
TEMPERATURES

S. A. Nagorny, Ju. I. Vaserin

Key words: *Trichinella spiralis*, resistance, low temperatures, cryopreservation

S U M M A R Y

It has been shown that the resistance of muscular larvae of *Trichinella spiralis* to the effect of low temperatures depends on the conditions of freezing and composition of media possessing cryoprotective properties. It has been established that under optimal conditions (medium of microenvironment, conditions of freezing) during the storage in liquid nitrogen muscular larvae of *T. spiralis* preserve 50 to 60 % of their resistance by the character of mobility and 11 to 15 % by their capacity for reproduction. The question of creation of low-temperature bank for trichinells is discussed.
