

低温对中国河南株旋毛虫肌幼虫生存能力和感染力的影响

李江艳^{1,2,3}, 朱伟^{2,4}, 李倩^{1,2}, 王小莉^{1,2}, 杨小迪^{1,2}, 夏惠^{1,2}, 方强^{1,2}

[摘要] **目的:** 了解低温(-18℃、-72℃)冻存对中国河南株旋毛虫肌幼虫(肌幼虫)生存能力和感染力的影响。**方法:** 将含有肌幼虫的小鼠骨骼肌肌肉经-18℃、-72℃冻存处理不同时间后观察肌幼虫活力;55只小鼠分别经口感染300条经过-18℃、-72℃处理不同时间的肌幼虫,感染小鼠35d后收集肌幼虫,测定生殖力指数(RCI)。**结果:** 肌幼虫经-18℃冻存0、6、12、24、36、48h的死亡率分别为0.00%、6.30%、18.23%、35.81%、74.60%及100.00%;经-72℃冻存0、15、30、45、60min的死亡率分别为0.00%、21.21%、57.11%、86.24%及100.00%;肌幼虫死亡率随-18℃、-72℃冻存处理时间的延长而升高($P < 0.01$)。经过-18℃冻存处理6、12、24、36h后感染小鼠的肌幼虫 RCI 分别为(126.38 ± 6.90)、(68.58 ± 4.83)、(12.58 ± 1.77)、(5.77 ± 0.77),与未冻存(0h)组肌幼虫的 RCI(163.70 ± 10.70)差异均有统计学意义($P < 0.01$);通过-72℃冻存处理15、30、45min后感染小鼠的 RCI 分别为(18.19 ± 2.15)、(8.83 ± 1.39)、(3.10 ± 0.26),与未冻存(0min)组肌幼虫的 RCI(163.70 ± 10.70)差异均有统计学意义($P < 0.01$);肌幼虫的 RCI 均随-18℃、-72℃冻存处理时间延长而下降($P < 0.01$)。**结论:** 低温冻存可导致中国河南株肌幼虫存活能力和感染能力下降,-18℃冻存48h或-72℃冻存60min可完全灭活小鼠肌肉内的中国河南株肌幼虫。

[关键词] 线虫病;旋毛虫;肌幼虫;低温;生存能力;感染力

[中图分类号] R 532.1

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.10.001

Influence of the low temperature on the viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae

LI Jiang-yan^{1,2,3}, ZHU Wei^{2,4}, LI Qian^{1,2}, WANG Xiao-li^{1,2}, YANG Xiao-di^{1,2}, XIA Hui^{1,2}, FANG Qiang^{1,2}

(1. Department of Microbiology and Parasitology, 2. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, 3. Research Center, 4. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of the low temperature(-18℃ and -72℃) on the viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae. **Methods:** The viability of the *Trichinella spiralis* muscle larvae in mice skeletal muscle were observed after -18 and -72℃ of freezing. Fifty-five mice were infected with 300 muscle larvae treated with low temperature(-18 and -72℃) by oral. The muscle larvae in mice was collected after 35 d of infection, the reproductive capacity index(RCI) of which was determined. **Results:** The death rate of the muscle larvae stored at the -18℃ for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h were 0.00%, 6.30%, 18.23%, 35.81%, 74.60% and 100.00%. The death rate of the muscle larvae stored at the -72℃ for 0 min, 15 min, 45 min and 60 min were 0.00%, 21.21%, 57.11%, 86.24% and 100.00%, respectively. The death rate of the muscle larva stored at -18℃ and -72℃ increased with the prolonging of the storing time($P < 0.01$). The RCI of the muscle larvae stored at -18℃ for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 36 h were(163.70 ± 10.70), (126.38 ± 6.90), (68.58 ± 4.83), (12.58 ± 1.77) and(5.77 ± 0.77), respectively, and the difference of which was statistically significant($P < 0.01$). The RCI of the muscle larva stored at -72℃ for 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, were(163.70 ± 10.70), (18.19 ± 2.15), (8.83 ± 1.39) and(3.10 ± 0.26), respectively, and the difference of which was statistically significant($P < 0.01$). The RCI of the muscle larva stored at the -18℃ or -72℃ decreased with the prolonging of the storing time($P < 0.01$). **Conclusions:** Cryopreservation can lead to the decreasing of viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in Henan. The muscle larvae stored at the 18℃ for 48h or -72℃ for 60 min can be completely inactivated.

[Key words] nematelmintiasis; *Trichinella spiralis*; muscle larvae; low temperature; viability; infectivity

[收稿日期] 2016-01-15

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530000);蚌埠医学院科技发展基金重点项目(BYKF13A02);安徽省科研平台创新团队项目(2016-40)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 病原生物学教研室, 2. 安徽省感染与免疫重点实验室, 3. 科研中心, 4. 免疫学教研室, 安徽蚌埠 233030

[作者简介] 李江艳(1986-),女,硕士,助教。

[通信作者] 方强,硕士研究生导师,教授。E-mail: fq333@sohu.com

旋毛虫病是一种严重的人兽共患病,也是一种食源性寄生虫病,主要因生食或半生食含有活旋毛虫幼虫囊包的肉类所致。目前在世界范围内有66个国家和地区存在旋毛虫分布^[1]。我国大陆地区1964-2011年共15个省、市、自治区报道发生人体

旋毛虫病例,共计 38 797 例,发病年龄 9 个月至 90 岁,死亡 336 例^[2]。食入含有活的旋毛虫肌幼虫(肌幼虫)的旋毛虫囊包是旋毛虫感染人体引发旋毛虫病的关键。尽管当肉的内部温度达到 62.2 °C 时,可瞬时杀灭猪肉中的旋毛虫^[3],但现实生活中部分地区和民族生食或半生食肉类的习惯难以彻底改变,部分食品(如过桥米线 and 麻辣烫等)在烹调加工时也存在加工温度偏低与时间较短的问题。肉类冻存是消费者保存鲜肉的常用方法,在生产领域冻鲜肉也是西方国家在流通领域较多采用的肉类销售方式。很多消费者也已经认识到冷冻可以作为一种杀死寄生虫、保证肉类食用安全的方法。利用低温冻存杀死肌幼虫也是一种值得关注的防治旋毛虫病的方案。但肌幼虫对低温的耐受性受很多因素影响,特别是不同种类的旋毛虫对低温的耐受性有明显差异。本研究选用旋毛虫中国河南株在实验室进行肌幼虫低温冻存处理,分别通过体外染色观察是否存活和感染小鼠后计算生殖力指数(RCI)了解低温对肌幼虫生存能力、感染力的影响,为肉类食品安全处理提供相关实验数据支持。

1 材料与方 法

1.1 材料 旋毛虫虫种:河南省猪源旋毛虫虫株由天津医科大学寄生虫学教研室馈赠,由本教研室昆明小鼠传代保种。实验动物:健康雄性 4~5 周龄昆明种小鼠,体质量 18~20 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 肌幼虫收集 小鼠经口感染 300 条旋毛虫 35 d 后引颈处死,取全身骨骼肌肌肉备用。

1.2.2 -18 °C 与 -72 °C 冻存对肌幼虫活力的影响

取旋毛虫感染小鼠模型骨骼肌研磨后分别于 -18 °C 冻存 0、6、12、24、36、48 h, -72 °C 冻存 0、15、30、45、60 min,取出,放入人工消化液中消化,消化液的配制为 200 mL 水中加入胃蛋白酶 2 g、HCl 1.5 mL,37 °C 温箱放置,4 h 后加入 NaCl 1.7 g 阻断反应,收集、纯化肌幼虫,然后用美蓝-伊红-硼砂染液染色鉴定肌幼虫活力^[4](经不同温度、时间点冻存样本各随机观察 2 000 条肌幼虫,重复实验 5 次),计算各组肌幼虫死亡率。死亡率 = (染色肌幼虫数/观察肌幼虫总数) × 100%。

1.2.3 -18 °C 与 -72 °C 冻存对肌幼虫感染力的影响 根据幼虫活力体外鉴定结果,将 55 只小鼠随机分 11 组,每组 5 只,分别经口感染 -18 °C 冻存不同

时间(0、6、12、24、36、48 h)的肌幼虫或 -72 °C 冻存不同时间(0、15、30、45、60 min)的肌幼虫各 300 条,其中 0 h 和 0 min 为未经 -18 °C 和 -72 °C 冻存处理对照组。感染 35 d 后处死,将小鼠全身肌肉消化后收集肌幼虫并计算 RCI,RCI = 回收的肌幼虫数/接种的肌幼虫数。

1.3 统计学方法 采用 χ^2 检验、方差分析和 q 检验及等级相关分析。

2 结 果

2.1 -18 °C 冻存对肌幼虫活力影响 肌幼虫经 -18 °C 冻存 0、6、12、24、36、48 h 的死亡率分别为 0.00%、6.30%、18.23%、35.81%、74.60% 及 100.00%,差异均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。 -18 °C 冻存时间与幼虫死亡率呈显著正相关关系($r_s = 0.50, P < 0.01$),幼虫死亡率随 -18 °C 冻存时间延长而升高。

表 1 -18 °C 冻存不同时间小鼠肌幼虫死亡率的比较

冻存时间/h	观察肌虫数	生存数	死亡数	死亡率/%	χ^2	P
0	10 000	10 000	0	0.00		
6	10 000	9 370	630	6.30		
12	10 000	8 177	1 823	18.23		
24	10 000	6 419	3 581	35.81	33 663.52	<0.01
36	10 000	2 540	7 460	74.60		
48	10 000	0	10 000	100.00		
合计	60 000	36 506	23 494	39.16		

2.2 -72 °C 冻存对肌幼虫活力影响 肌幼虫经 -72 °C 冻存 0、15、30、45、60 min 的死亡率分别为 0.00%、21.21%、57.11%、86.24% 及 100.00%,差异均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 2)。 -72 °C 冻存时间与幼虫死亡率呈正相关关系($r_s = 0.604, P < 0.01$)。

表 2 -72 °C 冻存不同时间小鼠肌幼虫死亡率的比较

冻存时间/min	观察肌虫数	生存数	死亡数	死亡率/%	χ^2	P
0	10 000	10 000	0	0.00		
15	10 000	7 879	2 121	21.21		
30	10 000	4 289	5 711	57.11		
45	10 000	1 376	8 624	86.24	28 698.76	<0.01
60	10 000	0	10 000	100.00		
合计	50 000	23 544	26 456	52.91		

2.3 -18 °C 冻存对肌幼虫感染力的影响 -18 °C

冻存处理 0、6、12、24、36、48 h 后感染小鼠的肌幼虫回收个数分别为(49 110.60 ± 3 211.32)、(37 916.40 ± 2 072.47)、(20 575.20 ± 1 451.20)、(3 775.20 ± 531.18)、(1 732.20 ± 232.61)、(0.00 ± 0.00), 其中肌幼虫处理 48 h 后 RCI 已为 0, 表明感染活性丧失, 故不计入统计, 其他不同时间 RCI 差异有统计学意义($P < 0.01$)。两两比较发现, 随着时间的延长, RCI 值逐渐下降, 且差异均有统计学意义($P < 0.01$) (见表 3)。等级相关检验发现, RCI 与处理时间呈负相关关系($r_s = -0.989, P < 0.01$)。

表 3 -18 °C 冻存不同时间小鼠肌幼虫 RCI 的比较($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

冻存时间/h	RCI	F	P	MS _{组内}
0	163.70 ± 10.70			
6	126.38 ± 6.90 **			
12	68.58 ± 4.83 ** △△	635.63	<0.01	37.831
24	12.58 ± 1.77 ** △△##			
36	5.77 ± 0.77 ** ##○○			

q 检验: 与 0 h 比较 * * $P < 0.01$; 与 6 h 比较 △△ $P < 0.01$; 与 12 h 比较 ## $P < 0.01$; 与 24 h 比较 ○○ $P < 0.01$

2.4 -72 °C 冻存对肌幼虫感染力的影响 -72 °C 冻存处理 0、15、30、45、60 min 后感染小鼠的肌幼虫回收个数分别为(49 110.60 ± 3 211.32)、(5 458.20 ± 647.05)、(2 650.20 ± 417.31)、(930.60 ± 80.42)、(0.00 ± 0.00), 其中肌幼虫处理 48 h 后 RCI 已为 0, 表明感染活性丧失, 故不计入统计, 其他不同时间 RCI 差异有统计学意义($P < 0.01$)。两两比较发现, 随着时间的延长, RCI 值逐渐下降, 且差异均有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 4)。等级相关检验发现, RCI 与处理时间呈负相关关系($r_s = -0.984, P < 0.01$)。

表 4 -72 °C 冻存不同时间小鼠肌幼虫 RCI 的比较($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

冻存时间/min	RCI	F	P	MS _{组内}
0	163.70 ± 10.70			
15	18.19 ± 2.15 **			
30	8.83 ± 1.39 ** △	981.16	<0.01	30.278
45	3.10 ± 0.26 ** △△			

q 检验: 与 0 min 比较 * * $P < 0.01$; 与 15 min 比较 △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

3 讨论

旋毛虫病作为一种重要的食源性寄生虫病日益引起医学领域、兽医领域和食品安全领域的关注^[5]。为了避免含有肌幼虫的肉类流入市场, 旋毛

虫已被列为生猪屠宰后的必检项目。但由于检测方法的敏感性较低^[6], 难以避免有部分含有肌幼虫的肉类未能被检出而流入市场。如这部分肉类被生食或半生食, 则可能导致食入者感染旋毛虫, 引起严重后果。

利用冰箱冻存进行肉类保存是目前我国很多家庭短期储存肉类的主要方法, 因此, 采用低温冻存灭活肉类中的肌幼虫有望成为一种消费者易于接受的方法。关于肌幼虫的低温耐受能力, 国外学者已经进行了部分研究, 发现其与很多因素有关, 特别是旋毛虫的种类影响尤为显著^[7-8]。如乡土肌幼虫的低温耐受能力远远高于旋毛形线虫的低温耐受能力。在本次研究中, 我们发现中国河南株肌幼虫对低温较为敏感, 在 -18 °C 时, 随冻存时间延长, 肌幼虫的存活力和感染力下降($P < 0.01$), 48 h 即可完全灭活。但这个灭活时间长于李婷婷等^[9-10]的研究, 与邹云雪等^[11]的结果类似, 其中原因亦可能为不同地理株的低温抗性不同所致。尽管在灭活时间上存在一定的差别, 但目前国内外各猪源性旋毛虫 -18 °C 冻存灭活时间均不长于 48 h, 这提示我们利用家用冰箱的冷冻室 (-18 °C) 进行肉类肌幼虫灭活以预防旋毛虫感染是可行的。尽管我国目前肉类供应主要为热鲜肉(畜禽宰杀后不经冷却加工, 直接上市的畜禽肉), 但多数家庭在购买后除少量当日即食外, 多数还是储存于冰箱供日后烹调食用, 表明我国多数居民对于冷冻肉类食用是能够接受的。因此, 对于热鲜肉 -18 °C 冻存足够时间后再食用或直接购置冻鲜肉(经 -18 °C 冷库冻存销售的肉类)在理论上可避免罹患旋毛虫病的风险, 是一种有前景的易于为消费者所接受的预防旋毛虫病的方法。需要注意的是这里的冻存 48 h 是指肉的任何部分温度已均低于 -18 °C, 而不是指仅仅将肉放置于 -18 °C 冰箱的冷冻室的时间。因为在肉的中心温度达到冻存目的温度的时间与肉的大小等因素有关。

同时, 不同种类动物肉中的旋毛虫冷冻灭活时间也存在差异。尽管本研究中分离自实验小鼠的猪源旋毛虫河南株在 -18 °C 的温度下已完全灭活, 但在猪肉中是否可以完全灭活尚需进一步研究。国际旋毛虫协会在关于控制供人食用的家畜和野生动物中旋毛虫的推荐方案中建议采用 -15 °C 冷冻 20 ~ 30 d; -18 °C 至少冷冻 108 h 来灭活肉中的旋毛虫^[3]。而欧盟于 2015 年 8 月执行的肉类中旋毛虫

官方控制的具体规定也指出 -18 ℃ 至少冷冻 108 h 方可食用。因此,关于为预防猪源性旋毛虫而进行肉类冷冻的时间仍需要进一步大量研究。在没有达成共识之前,仍需按相关标准谨慎处理。需要指出的是,对于在肉类检疫中发现旋毛虫者,应按相关规定做销毁处理,不得食用。我们的实验结果还显示 -72 ℃ 冻存 15、30、45 min 时,肌幼虫死亡率分别为 21.21%、57.11%、86.24%,RCI 分别为 (18.19 ± 2.15)、(8.83 ± 1.39)、(3.10 ± 0.26),中国河南株肌幼虫 60 min 才可完全灭活 ($P < 0.01$),这与早期研究所获得的经验完全不同,在早期的研究中,灭活时间随温度下降而迅速缩短,-35 ℃ 需 40 min,-37 ℃ 仅需 2 min^[12],这种异常可能是我们此次研究采用的虫种为中国河南株旋毛虫,与国外早期研究所采用的虫种不同所致。这也进一步表明,不同地理株的肌幼虫的低温耐受力不同,甚至存在很大差异,不能将从一个地理株的结果简单应用于其他地理株,而需要进行细致的验证实验。

[参 考 文 献]

- [1] POZIO E. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans[J]. Vet Parasitol,2007,149(1/2):3.
- [2] 郑福德,肖宁,冯萍,等. 1964-2011 年中国大陆人体旋毛虫病流行分析[J]. 寄生虫与感染性疾病杂志,2011,9(3):119.
- [3] GAMBLE HR, BESSONOV AS, CUPERLOVIC K, et al.

International Commission on *Trichinellosis*; recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption [J]. Vet Parasitol, 2000,93(3/4):393.

- [4] 沈玉娟,常正山,张永年,等. 旋毛虫死活快速鉴别的实验研究[J]. 中国兽医寄生虫病杂志,2003,11(4):21.
- [5] GOTTSTEIN B, POZIO E, NÖCKLER K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of *Trichinellosis* [J]. Clin Microbiol Rev,2009,22(1):127.
- [6] 崔晶,王中全. 旋毛虫检疫技术及肉类的安全加工方法[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(9):871
- [7] HILL DE, FORBES L, GAJADHAR AA, et al. Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue[J]. Vet Parasitol,2007,146(1/2):102.
- [8] HILL DE, FORBES L, ZARLENGA DS, et al. Survival of North American genotypes of *Trichinella* in frozen pork[J]. J Food Prot, 2009,72(12):2565.
- [9] 李婷婷,毛福荣,崔晶,等. 旋毛虫不同地理株冷冻耐力的观察[J]. 中国热带医学,2009,9(9):1671.
- [10] 秦啸鸣,宋辉,傅皓,等. 旋毛虫的低温耐受性和感染性的实验研究[J]. 河南大学学报(医学版),2014,33(2):91.
- [11] 邹云雪,王丽君,王美玲,等. 对旋毛虫冷冻耐力的观察研究[J]. 江西畜牧兽医杂志,2012,2(1):12.
- [12] GOULD SE, KAASA LJ. Low temperature treatment of pork; effect of certain low temperatures on viability of *Trichina* larvae[J]. Am J Hyg,1949,49(1):17.

(本 文 编 辑 刘 梦 楠)

《蚌埠医学院学报》征订启事

《蚌埠医学院学报》创刊于 1976 年 3 月,由安徽省教育厅主管,蚌埠医学院主办,国内外公开发行的综合性医学学术期刊。主要刊登实验医学论文和应用医学论文。设有述评、基础医学、大学生科技园地、临床医学、检验医学、影像医学、药学、预防医学、祖国医学、精神卫生、护理学、技术与方法、综述、个案报道等栏目。

本学报现为月刊,每月 15 日出版,国际标准 A4 开本,144 页,铜版纸印刷。标准刊号:ISSN 1000-2200;CN 34-1067/R;CODEN:BYIXEM。邮发代号:26-37,每册定价 15.00 元,全年 180.00 元。欢迎广大读者及时向当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅,免收邮寄费。

邮购地址:安徽省蚌埠市东海大道 2600 号 邮政编码:233030 电话:(0552)3175456

http://xuebao.bbmc.edu.cn E-mail:byxb@vip.163.com

《蚌埠医学院学报》编辑部