

УДК 619:616.995.132.6:1-07

DOI:

Поступила в редакцию 12.01.2016

Принята в печать 19.02.2016

Для цитирования:

Скворцова Ф.К., Успенский А.В. Диагностика трихинеллеза на ранних стадиях развития личинок. // Российский паразитологический журнал. – М., 2016. – Т.35. – Вып. 1. – С.

For citation:

Skvortsova F. K., Uspensky A.V. Diagnostics of trichinosis in the early stages of larval development. Russian Journal of Parasitology, 2016, V.35, Iss.1, pp.

**ДИАГНОСТИКА ТРИХИНЕЛЛЕЗА НА РАННИХ СТАДИЯХ
РАЗВИТИЯ ЛИЧИНОК**

Скворцова Ф.К., Успенский А.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К.И. Скрябина, 117218, Москва, ул. Б.Черёмушкинская, д.28, e-mail: scvorcova@vniigis.ru, director@vniigis.ru

Реферат

Цель исследования – Подтверждение диагноза на трихинеллез зависит от многих факторов, в числе которых значится отбор образцов мышечной ткани от определенных наиболее инвазированных частей туши, метода исследования и используемого оборудования.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы мышечной ткани от экспериментально зараженных *T.spiralis* крыс. Всего было заражено 18 беспородных белых крыс весом 90-100г в дозе 10 л/г. Для проведения ранней диагностики при трихинеллезе крыс убивали с 6 по 24 день после заражения.

В первую очередь исследовали компрессорным методом наиболее поражаемые и доступные мышцы: диафрагму, массетер и грудные мышцы при увеличении (x 25, 50, 100). На каждый срок сделаны микрофотографии личинок на срезах.

Затем образцы мышц задних конечностей массой 50 г исследовали автоматизированным методом пептолиза на аппарате Гастрос. По окончании цикла работы аппарата при микроскопировании учитывали количество выделенных личинок и их морфологическое развитие. Выделенными личинками 16 - 18-дневного возраста были заражены мыши (биопроба). Через 35-36 суток тушка мыши полностью подвергалась пептолизу для выявления трихинелл.

Результаты и обсуждение. При пептолизе автоматизированным методом мышечной ткани крыс, инвазированных личинками *T.spiralis*, установили, что личинки в возрасте с 10 по 15 сутки после заражения данным методом не выявляются. Единичные трихинеллы, начиная с 16-дневного возраста, выявляются при микроскопировании, несмотря на недостаточные размеры

личинок. Массовое выделение трихинелл начинается с 17-го дня после заражения, когда большая часть личинок достигает инвазионности.

Неинкапсулированные трихинеллы 16-дневного возраста становятся инвазионными, что показало успешное заражение белых мышей личинками, выделенными после пептолиза. По результатам биопробы основная масса личинок становится инвазионными к 19-20 дням после заражения.

Таким образом, автоматизированным методом пептолиза мышечной ткани легко диагностировать заражение животных неинкапсулированными личинками трихинелл, что затруднительно или иногда невозможно при компрессорном исследовании. Диагностика трихинеллеза автоматизированным методом наиболее эффективна при достижении личинками инвазионности.

Ключевые слова: трихинеллез, пептолиз на аппарате Гастрос, трихинеллоскопия, *Trichinella spiralis*, *T. Pseudospiralis*.

Введение

Основой профилактики трихинеллеза является обязательная ветеринарно-санитарная экспертиза мяса всех используемых в пищу туш свиней, кабанов, барсуков, медведей, других всеядных и плотоядных животных методами компрессорной трихинеллоскопии и пептолиза мышечной ткани зрелых личинок трихинелл. Подтверждение диагноза на трихинеллез зависит от многих факторов, в числе которых значится отбор образцов мышечной ткани от определенных наиболее инвазированных частей туши, метода исследования и используемого оборудования.

В число таких факторов также входит стадия развития паразита в течение биологического цикла до заражения нового хозяина. Единичные ювенильные личинки трихинелл появляются в миофибриллах мышечной ткани уже на 5-7-й дни после заражения, то есть с начала миграции по крови. Развитие личинок до инвазионной стадии возможно только в поперечно-полосатой мускулатуре, где они проходят сложный органогенез и увеличиваются в длину более чем в 10 раз. (Геллер Э.Р., Тимонов Е.В., 1969). Длительная миграция личинок ведет к накоплению их в мышцах к 25-30 суткам в зависимости от интенсивности инвазии.

Вопросу об инвазионности личинок трихинел всегда уделялось большое внимание. Трихинеллы становятся инвазионными на 16-17-й день после заражения, когда у большинства личинок заканчивается органогенез (Лемишко П.М., 1947, 1948, 1949).

По данным Richels (1955) на 17-19 день после заражения кутикула личинок становится непроницаемой и стойкой в отношении влияния химических веществ. Устойчивость мышечных трихинелл к действию желудочного сока объясняется своеобразным строением кутикулы. Геллер Э.Р. и Е.В.Тимонов (1969) считают, что личинки трихинелл приобретают устойчивость к перевариванию с 17-го дня после заражения и с этого возраста становятся инвазионными.

По Березанцеву Ю.А. (1969) только с 19-го дня единичные личинки бывают заметными в мышцах при трихинеллоскопии.

Формирование начальной капсулы внутри мышечного волокна начинается на 20-24 сутки (Силакова Л.Н., 1972). По данным Геллер Э.Р. и Переверзевой Э.В.(1965) только к 28-30 суткам у большинства личинок формируется тонкая гиалиновая капсула, которая малозаметна при

компрессорном исследовании, а через 2-3 месяца после заражения образуется отчетливая двуслойная капсула

Некоторые разногласия авторов в сроках достижения инвазионности и образования начальной капсулы объясняются использованием для заражения различных изолятов и даже видов трихинелл или их хозяев.

Отсутствие четко различимой капсулы у инвазионных личинок в раннем возрасте (16-24 сутки после заражения) затрудняет постановку диагноза. Так на практике при исследовании мяса на трихинеллез компрессорным методом трихинеллоскописты ищут инкапсулированных трихинелл, то есть трихинелл, спирально свернутых и окруженных капсулой. Это объясняется тем, что существующие руководства и методические положения по диагностике трихинеллеза направлены на выявление в основном инкапсулированных личинок (у капсулообразующих трихинелл) и редко упоминают свернутых в виде скрепки личинок бескапсульных трихинелл *T. pseudospiralis* или личинок на ранних стадиях развития.

Таким образом, часть инвазионных неинкапсулированных личинок или личинок с формирующейся капсулой на ранних стадиях развития могут оказаться невыявленными. Особенно это актуально при спонтанном заражении промысловых животных и обычной при этом невысокой интенсивности инвазии.

Следовательно, в ранние сроки после заражения (16-24 сутки) затруднительно обнаружить в мышечной ткани мигрирующие личинки трихинелл без капсул или с формирующейся капсулой компрессорным методом, который чаще всего применяется в повседневной практике.

Целью нашей работы являлась диагностика неинкапсулированных личинок трихинелл на ранних стадиях развития компрессорным методом и методом пептолиза на аппаратах для выделения личинок. Метод пептолиза широко внедрен в производство и становится незаменимым в спорных случаях для подтверждения диагноза трихинеллеза

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы мышечной ткани от экспериментально зараженных *Trichinella spiralis* крыс. Всего было заражено 18 беспородных белых крыс весом 90-100г в дозе 10 л/г. Для проведения ранней диагностики при трихинеллезе крыс убивали с 6 по 24 день после заражения.

В первую очередь исследовали компрессорным методом наиболее поражаемые и доступные мышцы: диафрагму, массетер и грудные мышцы при увеличении (x 25, 50, 100). На каждый срок сделаны микрофотографии личинок на срезах.

Затем образцы мышц задних конечностей массой 50 г исследовали автоматизированным методом пептолиза на аппарате Гастрос. По окончании цикла работы аппарата при микроскопировании учитывали количество выделенных личинок и их морфологическое развитие. Выделенными личинками 16 - 18-дневного возраста были заражены мыши (биопроба). Через 35-36 суток тушка мыши полностью подвергалась пептолизу для выявления трихинелл.

Диагностика неинкапсулированных личинок трихинелл компрессорным методом

В период формирования в мышечных волокнах инвазионной личинки в ней происходят сложные преобразования. Личинка увеличивается в длину, при этом начинается формирование внутренних органов и вырабатываются защитные приспособления на реакцию хозяина для существования на

мышечной стадии. Выявление в мышечной ткани личинок трихинелл юных мигрирующих личинок при обычном увеличении трихинеллоскопа (x50) или МБС микроскопа (x25-50) затруднительно, так как в начале развития личинки располагаются по длине мышечных волокон и имеют лишь незначительные изгибы, легко маскируясь мышечной тканью. Срезы мышечной ткани для изучения должны быть предельно тонкими.

При компрессорном исследовании установили, что небольшое количество новорожденных личинок появляется в мышечных волокнах уже на 6-й день после заражения, куда заносятся по капиллярам с током крови. В мышечном волокне юная личинка располагается вдоль его. Однако, увидеть личинки на срезе крайне сложно даже при увеличении x100, но около среза в выделившейся жидкости наблюдали светлые юные личинки даже при увеличении x25.

Через 8-10 дней в жидкости около среза можно видеть одинаковых по длине личинок до 0,2 мм на разных стадиях дифференциации внутренних органов. Рост личинок происходит сначала больше в ширину, чем в длину, поэтому в одинаковых по длине личинках можно наблюдать различные стадии морфогенеза (Рис.1).

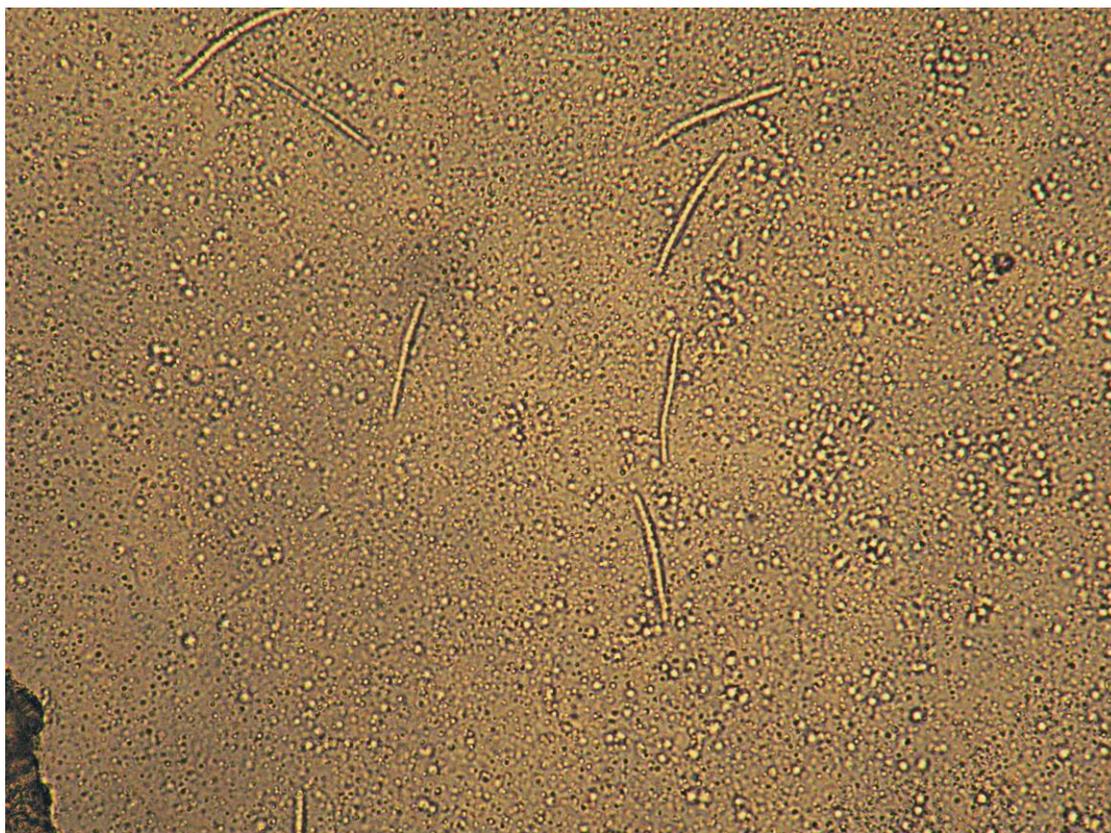


Рис. 1. Личинки *T. spiralis* в жидкости возле среза на 10-е сутки после заражения

В мышечных волокнах личинки располагались вдоль оси волокна, заметить их возможно только при увеличении не менее $\times 100$ на очень тонком срезе и при высокой интенсивности инвазии исходного образца.

Через 11-12 дней в жидкости возле среза возрастало число выделившихся личинок разных размеров и с разной степенью дифференциации органов (Рис.2).



Рис. 2. Личинки *T. spiralis* в жидкости возле среза на 13-е сутки после заражения

Вокруг пораженных волокон иногда видны воспалительные клеточные инфильтраты ($\times 100$).

Через 13-14 дней личинки разных размеров хорошо видны в жидкости возле срезов в разных стадиях органогенеза, часть из них со сформированной пищеварительной системой и зачатками половых гонад ($\times 50$).

На мышечном срезе прямые ровные личинки трихинелл длиной около 0,3 мм в единичных случаях можно обнаружить под сарколеммой мышечного волокна по его длине при увеличении $\times 100$.

Через 15 суток в жидкости возле среза видно большое количество разновозрастных личинок на разных стадиях органогенеза. Выделяются единичные личинки темного цвета, согнутые в дугу или в полукольцо. Длина отдельных личинок достигает 0,5 мм (Рис. 3).



Рис. 3. Личинки *T. spiralis* в жидкости возле среза на 15-е сутки после заражения

На срезе ткани прямые личинки, расположенные по длине мышечного волокна, плохо просматриваются даже при $\times 100$. Первые попавшие в волокна единичные трихинеллы начинают скручиваться, изгибаться дугообразно или в виде петли.

Через 16 суток множество личинок разных размеров видны в жидкости возле среза. Наряду со светлыми и почти прозрачными юными личинками встречаются единичные темные личинки с оформленной пищеварительной и половой системами длиной до 0,6-0,7 мм.

В мышечной ткани встречались личинки с изогнутыми концами, свернутые дугообразно, в виде овала или петли, редко – свернутые спиралью ($\times 100$).

Через 17 и 18 суток. Личинки трихинелл разных размеров в большом количестве видны в жидкости возле срезов, среди них увеличилось число темных подвижных личинок длиной до 0,8 мм (Рис. 4).

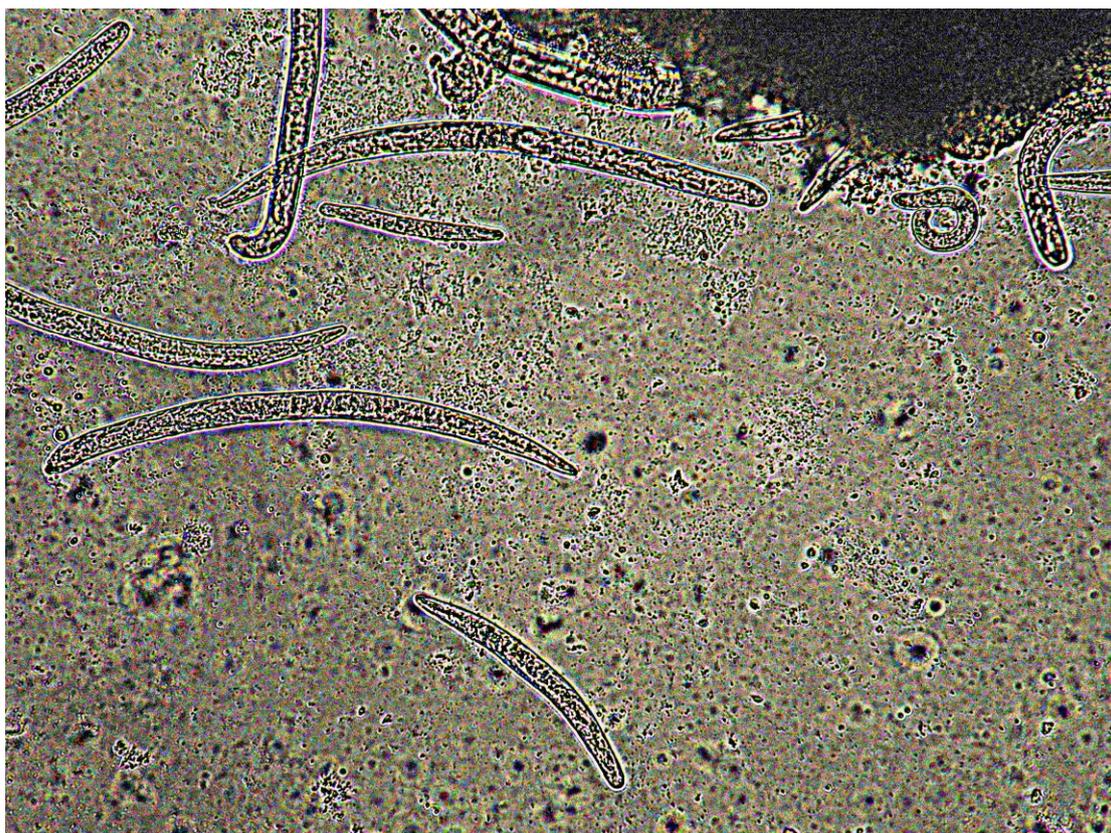


Рис. 4. Личинки *T. spiralis* в жидкости возле среза на 17-е сутки после заражения

В мышечной ткани накопилось значительное количество как вытянутых по длине волокон личинок, так и изогнутых дугообразно в виде восьмерок, скрепок или свернутых спирально, которые хорошо видны на тонких срезах при увеличении $\times 50$ и 100 .

Через 19 и 20 дней личинки трихинелл разных размеров в большом количестве видны в жидкости возле срезов, среди них выделяются темные подвижные личинки размером до $0,9$ мм, свернутые в спираль.

На срезе ткани у значительной части личинок изогнуты оба конца или они различно свернуты в виде скрепок, дуг, восьмерок, спирали, при внимательном изучении их можно заметить при увеличении $\times 25-50$.

Через 21 и 22 дня. Личинки разных размеров видны в жидкости возле среза, но количество светлых юных форм значительно уменьшилось. Большинство выделившихся личинок - темные подвижные размером до $0,9$ мм (Рис. 5).



Рис. 5. Личинки *T. spiralis* в жидкости возле среза на 22-е сутки после заражения

В мышечной ткани преимущественно встречались изогнутые с двух концов или спирально свернутые личинки. Капсулы у таких личинок не просматривались даже при высоком увеличении (x 100).

Через 24 дня в жидкости возле среза видны единичные светлые личинки и полностью сформированные темные подвижные трихинеллы в большом количестве длиной до 1 мм.

В мышечной ткани вокруг некоторых личинок с трудом различали тонкие капсулы, которые видны при x 50 и 100. Большинство личинок изогнуты дугообразно или скручены в спираль без заметных границ капсулы и хорошо видны при трихинеллоскопии.

Таким образом, выявление неинкапсулированных трихинелл на ранних стадиях развития требует дополнительного внимательного просмотра жидкости вокруг среза ткани при максимальном увеличении. Появление в выделившейся жидкости личинок на разных стадиях органогенеза говорит о заражении трихинеллами. Личинки с малопроницаемой темной кутикулой с полностью сформированной пищеварительной и половой системами появляются через 16 полных суток после заражения.

Тонкая соединительная капсула у личинок просматривается у единичных личинок обычно на 23-24сутки после заражения.

При исследовании на трихинеллез необходимо тщательно исследовать срезы и жидкость, выделяемую возле них, так как нельзя быть уверенными в пригодности мяса вследствие всегда невысокой инвазии трихинеллами при спонтанном заражении.

Диагностика неинкапсулированных трихинелл методом автоматизированного пептолиза

При пептолизе мышечной ткани 6 инвазированных трихинеллами крыс в дозе 10 л/г, с 10 по 15 сутки после заражения при микроскопировании в осадке личинок не обнаружили.

Через 16 суток после заражения крыс в образцах мышечной ткани от 2 крыс после пептолиза обнаружили 17 и 38 подвижных трихинелл (0,34 и 0,76 л/г). Личинки имели плотную слабопроницаемую кутикулу и сформированную пищеварительную и половую системы. Длина личинок не превышала 0,7 мм.

Выделенными личинками заразили две белые мыши. Через 36 дней после пептолиза мышечной ткани мышей обнаружили в небольшом количестве живые трихинеллы.

Через 17 суток в образце мышечной ткани после пептолиза обнаружили 176 подвижных трихинелл (30,5 л/г). Длина личинок составляла 0,8 мм. У личинок была хорошо выражена пищеварительная и половая системы и отчетливо заметен ректум. Личинками были заражены две мыши. После пептолиза мышечной ткани через 35 дней выявили высокую зараженность мышей трихинеллами.

Через 19 суток в образце обнаружили 877 личинок трихинелл длиной до 1.2 мм с законченным органогенезом (170,5 л/г). По длине ректума легко можно было различить половую принадлежность трихинелл (самцов и самок). Личинками заразили 10 мышей в дозе 10 л/г. Зараженность мышей через 32 дня оказалась очень высокой.

Через 21 сутки в образце обнаружили 920 личинок трихинелл (180,4 л/г).

Через 24 сутки – 985 личинок (190,7 л/г).

Таким образом, при пептолизе автоматизированным методом мышечной ткани крыс, инвазированных личинками *T. spiralis*, установили, что личинки в возрасте с 10 по 15 сутки после заражения данным методом не выявляются. Единичные трихинеллы, начиная с 16-дневного возраста, выявляются при микроскопировании, несмотря на недостаточные размеры личинок. Массовое выделение трихинелл начинается с 17-го дня после заражения, когда большая часть личинок достигает инвазионности.

Неинкапсулированные трихинеллы 16-дневного возраста становятся инвазионными, что показало успешное заражение белых мышей личинками, выделенными после пептолиза. По результатам биопробы основная масса личинок становится инвазионными к 19-20 дням после заражения.

Таким образом, автоматизированным методом пептолиза мышечной ткани легко диагностировать заражение животных неинкапсулированными личинками трихинелл, что затруднительно или иногда невозможно при компрессорном исследовании. Диагностика трихинеллеза автоматизированным методом наиболее эффективна при достижении личинками инвазионности.

Литература

1. Березанцев Ю.А. // «Wiadom.Parasitol.».-1969.- Т.15.-№5-6.-С.539-543.
2. Геллер Э.Р., Переверзева Э.В. // Мат. научн. конф. ВОГ- Ч.4.- М.-1965.- С.42-46.
3. Геллер Э.Р., Тимонов Е.В.// «Wiadom. Parasitol.».- 1969.-Т.15.-№5-6.- С.522-525.
4. Лемишко П.М. //Ветеринария.-1947.-№ 5.-С.37.

5. Лемишко П.М. // Ветеринария.-М.-1948.-№ 11.-С.36-37.
6. Лемишко П.М. //Тр. Киевского вет. ин-та.-1949.-Т.9.-С.88-95.
7. Силакова Л.Н. // Мат. докл. Всесоюз. конф. по проблемам трихинеллеза человека и животных.- Вильнюс.- 1972.- С.63-66.
8. Richels I. // « Ztblt. F. Vact.Abt. I. Orig».-1955.-Т.163.-С.46-84.

Russian Journal of Parasitology, 2016, V.35, Iss.1

DOI:

Received 12.01.2016

Accepted 19.02.2016

DIAGNOSTICS OF TRICHINOSIS IN THE EARLY STAGES OF LARVAL DEVELOPMENT

Skvortsova F. K., Uspensky A.V.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin, 117218 Russia, 28 B. Cheremushkinskaya St., e-mail: scvorcova@vniigis.ru, director@vniigis.ru