

马来丝虫幼虫低温保存的初步研究

沈丽英 袁行政 顾雪如 宋昌存

(浙江医学研究院寄生虫病研究所)

摘要 以 5% 二甲基亚砷为冷冻保护剂, 将马来丝虫微丝蚴置于含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 保存液内, 在低温下 (-196°C) 保存。经过 30—270 天, 微丝蚴解冻后的存活率为 93—98%, 大部均可使蚊虫宿主感染, 并在终宿主长爪沙鼠体内发育为成虫, 在其腹腔液内检获微丝蚴。

同法冻存含马来丝虫感染期幼虫的蚊体, 经 30、90 及 180 天后, 解冻的蚊体内幼虫, 其存活率为 46.2—54.4%, 90 天前大部幼虫可在沙鼠体内发育并产出子代, 但冻存 180 天组似已失去感染性。

为寻求保存马来丝虫幼虫的简易方法, 我们于 1985 年开始对马来丝虫微丝蚴和感染期幼虫的低温保存进行了初步研究, 现将结果报道于下。

材 料 和 方 法

(一) 虫体来源 从实验感染的长爪沙鼠 (简称沙鼠) 腹腔内取得周期型马来丝虫微丝蚴。用胎盘膜饲血法使中华按蚊感染微丝蚴, 并从经过饲养的按蚊体内获得感染期马来丝虫幼虫 (L_3)。

(二) 低温保存步骤

1. 保存液及样本的制备 用腹腔灌洗法抽取马来丝虫阳性沙鼠腹腔液, 置冰箱 (4°C) 30 分钟后, 加入小牛血清、RPMI-1640 培养液和二甲基亚砷 (DMSO), 最终使成含 5% 二甲基亚砷和 20% 小牛血清的冷冻保存液, 分别以 2ml 量装入容量为 4ml 的玻璃瓶内, 迅速密封备冻。将含有 L_3 的中华按蚊麻醉, 并加入适量的冷冻保存液, 装入容积为 4ml 的玻璃瓶内, 每瓶装 50 只按蚊, 密封后备冻。

2. 冷冻 将样品分别装入 $4 \times 4 \times 6 \text{ cm}^3$ 的泡沫塑料盒内, 先置 -70°C 冰箱 (预测盒内降温速率为每分钟 -1°C), 24 小时后, 将塑料盒迅速移入液氮罐内 (-196°C)。

3. 复苏 经冷冻 30、90、180、270 天时, 分

别从液氮中取出样品, 立即置 48°C 水浴, 快速振荡融冻。

(三) 存活率和感染性的测定

在室温显微镜下观察 200 条微丝蚴或 1, 的形态与活动情况, 按虫体活动, 形态完整的虫数与观察数求出存活率。在观察融冻的微丝蚴时, 微丝蚴先经生理盐水清洗一次。

感染性测定分二种。测定融冻微丝蚴的感染性时, 作胎盘膜饲血法感染中华按蚊试验, 并从感染蚊中获得 L_3 , 将其感染沙鼠, 以微丝蚴对按蚊的感染率和感染度以及 L_3 感染沙鼠的阳性率为判断指标。观察 L_3 感染性时, 则省去上述有关感染按蚊的试验。

胎盘膜饲血法感染按蚊试验所用的微丝蚴, 系用适量兔血稀释, 使微丝蚴密度为 360 条/ 20mm^3 左右。血餐后按蚊经 25°C 、相对湿度 80% 的恒温室饲养 9—10 天后解剖, 观察其感染率和感染度。 L_3 接种沙鼠试验, 用 2 个月龄的沙鼠, 腹腔接种, 3 个月后, 抽腹腔液检查微丝蚴, 求出沙鼠阳性率。

结 果

(一) 微丝蚴经不同时间冷冻后的存活率和感染性

在 -196°C 经 30、90、180、270 天冷冻的微丝蚴, 复苏后的存活率分别为 98%、97%、

表1 马来丝虫微丝蚴经不同时间冷冻后的活力测定

冷冻时间 (天)	存活率 (%)	感染中华按蚊				接种长爪沙鼠		
		解剖蚊数	阳性		平均感染度(条/蚊)	鼠数(只)	阳性	
			蚊数	%			数(只)	微丝蚴密度
0	99	100	88	88	12.75±5.89	8	6	++
30	98	50	33	66	6.34±2.24	8	5	++
90	97	80	44	55	4.84±2.92	6	3	+++
180	95	120	60	50	4.42±2.25	6	4	++
270	93	78	36	46.2	3.42±2.52	—	—	—

注: 1. 冷冻和未经冷冻的微丝蚴感染中华按蚊的密度均为 360 条/20mm³。

2. 每鼠腹腔内接种 L₃ 数均为 200 条。

3. (++)表示 10mm³ 沙鼠腹腔液内检测到微丝蚴 400—600 条,(+++)为 600—800 条/10mm³。

95%和 93%(表 1), 分别与未经冷冻时的存活率(99%)相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。经过冷冻的微丝蚴对中华按蚊的感染性与未冷冻的相比, 明显呈减低; 冻存 30、90、180、270 天的微丝蚴对蚊体的感染率分别为 66%、55%、50% 和 46.2%; 未经冷冻的感染率为 88% (见表 1)与冷冻微丝蚴相比均有显著性差异 ($P < 0.01$)。

然而, 冷冻微丝蚴在蚊体内发育成的 L₃, 对沙鼠的感染性却未见改变。由冷冻 30 天的微丝蚴发育成的 L₃, 接种沙鼠 8 只, 腹腔液内检测微丝蚴者 6 只, 阳性率为 6/8; 冷冻微丝蚴 90 和 180 天发育而成的 L₃, 感染沙鼠的阳性率分别为 3/6 和 4/6。而未经冷冻者的阳性率为 6/8 (表 1), 与前二者相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

(二) 感染期幼虫经不同时间冷冻后的存活率和感染性(见表 2)。

表2 马来丝虫感染期幼虫全蚊冷冻保存后的活力测定

保存时间 (天)	解剖蚊数	蚊体内 L ₃ 存活情况			在沙鼠体内发育情况	
		总数(条)	存活数(条)	存活率(%)	接种鼠数(只)	阳性鼠数(只)
30	78	680	370	54.4	6	4
90	64	460	242	52.6	6	3
180	70	650	300	46.2	5	0

在 -196℃ 经 30、90 和 180 天冷冻的蚊体内的 L₃, 复苏后的存活率分别为 54.4%、52.6%、

46.2%; 接种沙鼠后, 在鼠腹腔液内检获微丝蚴的阳性率, 分别为 4/6、3/6 和 0/5; 冷冻 180 天的似已失去感染性。

讨 论

1. 近年来对于冷冻保存寄生虫的研究, 已有不少报道^[2,5,6]。Ham 等^[3]采用二步冷冻保存蟠尾丝虫微丝蚴, 获得较为理想的结果。本实验对 Ham 等的方法稍加改进, 用马来丝虫微丝蚴进行试验也获得较好的结果。但 Ham 的试验方法必须采用特定的仪器控制降温速率为每分钟 -1℃ 至 -17℃ 时, 将保存材料投入液氮。本实验采用泡沫塑料盒包裹冷冻样品, 不需要人工或仪器控制降温速率。简化了设备条件, 适宜在一般实验室使用。

2. 国外 Robert^[6]和国内陶鸿章^[1]等报道, 经低温保存的马来丝虫微丝蚴均能在中华按蚊体内发育至感染期幼虫。我们的实验观察与他们的报道基本一致, 而且进一步证实了这种微丝蚴不仅能在蚊体内发育至 L₃, 同时将该幼虫接种长爪沙鼠, 能在鼠体腹腔内发育至成虫并产生子代微丝蚴。从而说明, 经低温保存的马来丝虫微丝蚴能在实验室内完成其生活史。这对于丝虫保种和丝虫生物学及免疫学方面的研究提供了条件。

3. 经冷冻保存的丝虫幼虫, 复苏后仍能保持其存活力, 这一点国外已有报道^[4,7], 但用冻存的马来丝虫感染期幼虫接种健康沙鼠的结

果, 尚未见成功的报道。本实验采用全蚊冷冻, 融冻后, 从蚊体内收集幼虫, 证明全蚊冷冻 90 天内的幼虫, 仍能成功地感染, 看来这是成功的方法; 但是冷冻 180 天时, 蚊体内的幼虫感染沙鼠未能成功, 同时冷冻复苏的微丝蚴对中华按蚊的感染率也随冷冻时间的延长而降低。因此如何减少低温对生物细胞的损伤, 延长虫体的活力, 仍是值得进一步研究的问题。

参 考 文 献

[1] 陶鸿章等 1986 马来丝虫微蚴低温保存及其后在中华按蚊体内继续发育的观察, 动物学报 32(4): 383—384。
 [2] Ham, P. J., et al. Preliminary studies on the cryopreservation of onchocerca microfilariae using a proxy host model to assess viability. *Trans R Soc Trop Med*

Hyg. 72(4): 434.
 [3] Ham, P. J. 1979 Onchocerca spp: Cryopreservation of microfilariae and subsequent development in the insect host. *Exp Parasitol.* 47(3): 384—391.
 [4] Ham, P. J. et al. 1980 The recovery of viable third-stage larvae of Brugia pahangi from liquid nitrogen. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74(5): 677.
 [5] Jadin, J. et al 1976 Physiological and morphological characters in two pyrimethamine resistant lines of plasmodium berghei SP-11 after cryopreservation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 70(3): 235—237.
 [6] Jams, E. R. 1975 Cryopreservation of schistosomula. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 69(1): 170—171.
 [7] Lok, J. B. et al. 1983 Cryopreservation of Dirofilaria immitis microfilariae and third -stage larvae. *J Helminth* 57(4): 319—324.
 [8] Robert, C. J. R. Lowrie 1983 cryopreservation of the microfilariae of Brugia malayi Dirofilaria corynodes and Wuchereria Bancrofti. *Am J Trop Med Hyg.* 32(1): 138—145.