

ISSN 0025-8326

2009

С-инфо

**МЕДИЦИНСКАЯ  
ПАРАЗИТОЛОГИЯ  
И  
ПАРАЗИТАРНЫЕ  
БОЛЕЗНИ**

1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВСЕРОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ,  
МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ООО «С-ИНФО»

---

# МЕДИЦИНСКАЯ ПАРАЗИТОЛОГИЯ и паразитарные болезни

---

Квартальный научно-практический журнал. Основан в 1923 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР В.П. СЕРГИЕВ**

**Т.Н.АВДЮХИНА, А.Н.АЛЕКСЕЕВ,  
Ю.В.АНАНИНА (зам. главного редактора), С.А.БЕЭР,  
Л.С.БОЙКО, А.М.БУТЕНКО, Т.М.ГУЗЕЕВА А.С.ДОВГАЛЕВ,  
В.Д.ЗАВОЙКИН, Э.И.КОРЕНБЕРГ, В.А.МАЛОВ,  
Н.А.МАЛЫШЕВ, А.К.ТОКМАЛАЕВ, Н.И.ТУМОЛЬСКАЯ,  
А.А.ФРОЛОВА (ответственный секретарь),  
Н.В.ЧЕБЫШЕВ, Н.В.ШЕСТОПАЛОВ**

*Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий,  
выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы  
основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени  
доктора медицинских и биологических наук (ВАК, май 2007 г.)*

1

январь—февраль—март

**С-инфо**

«С-ИНФО» • МОСКВА • 2009

## МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРИХИНЕЛЛЕЗА

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И.Скрябина,  
<sup>2</sup>ИМПигТМ им. Е.И.Марциновского ММА им. И.М.Сеченова, Москва

Экспериментальные исследования по проблемам трихинеллеза (изучение особенностей патогенеза инвазии, скрининг и оценка эффективности новых специфических лечебных и профилактических средств) проводятся на лабораторной модели инвазии. Диагностика трихинеллеза у экспериментально зараженных лабораторных животных основана на методах компрессорной трихинеллоскопии (КТ) и (или) переваривания в искусственном желудочном соке скелетных мышц и диафрагмы. Однако эти методы, перенесенные в экспериментальные исследования из практической ветеринарии без существенных изменений со времени основополагающих рекомендаций [1, 3, 4], сопряжены с обязательным убоем подопытных животных и позволяют выявлять личинки трихинелл (ЛТ) лишь на поздней мышечной фазе инвазии, что исключает возможность определения на морфологическом уровне качественных и количественных параметров инвазии на миграционной и ранней мышечной фазах у каждого животного в динамике. Такой же информативностью обладает и предложенный ранее метод прижизненной диагностики трихинеллеза у человека [2], основанный на КТ биоптата из икроножной мышцы.

Разработанный нами метод прижизненной диагностики (МПД) трихинеллеза у экспериментально зараженных лабораторных животных, представляющий собой КТ с повышенной разрешающей способностью, основан на использовании впервые выявленного феномена манифестации наличия инвазии и важнейших ее параметров (интенсивность и фаза инвазии) при микроскопии в тонком слое малых проб из скелетных мышц массой 1—1,5 мг у живых лабораторных животных, зараженных инвазионным материалом в дозах, используемых обычно при моделировании трихинеллеза (10—15 ЛТ на 1 г массы тела животного).

МПД осуществляли следующим образом. Исследование проводили с соблюдением мер, обеспечивающих безопасность

оператора и исключающих распространение возбудителя. В опытах использовали лабораторных грызунов разных видов (белые мыши и крысы, золотистые хомяки, хлопковые крысы), пола и возраста, зараженных трихинеллезом путем введения каждому животному в желудок с помощью шприца и металлической канюли по 150—600 декапсулированных ЛТ (выделенных методом пептического переваривания [1] из скелетных мышц и диафрагмы от экспериментально зараженных белых мышедоноров). Штамм *Trichinella spiralis* (выделенный от спонтанно инвазированной свиньи в Белоруссии), был получен из ВИГИС. Инвазированных животных исследовали в разные сроки после заражения на кишечной, миграционной и мышечной фазах инвазии. Исследуемое животное фиксировали, на месте предполагаемого разреза выстригали шерсть и проводили местную анестезию (подкожная инъекция 0,1 мл 1% лидокаина). Скальпелем или глазными ножницами рассекали кожу и наружную фасцию (длина разреза — 3—4 мм) до обнажения скелетной мышцы. Глазным пинцетом захватывали участок мышцы и отрезали от него глазными ножницами 1—10 фрагментов массой 1—1,5 мг каждый. Точность навески контролировали с помощью аналитических торсионных весов типа ВТ. У каждого животного брали пробы из скелетных мышц одной или разных групп (массетер, икроножная, бедренная, корня хвоста, лопаточная и др.). После взятия мышечной пробы кожную и мышечную раны обрабатывали антисептическим раствором (5% спиртовая настойка йода). Каждую мышечную пробу помещали между двумя предметными стеклами и подвергали микроскопии при малом увеличении микроскопа. В процессе микроскопии пробу подвергали мануальной компрессии в три последовательных этапа, характеризовавшихся разными интенсивностью и характером компрессии:

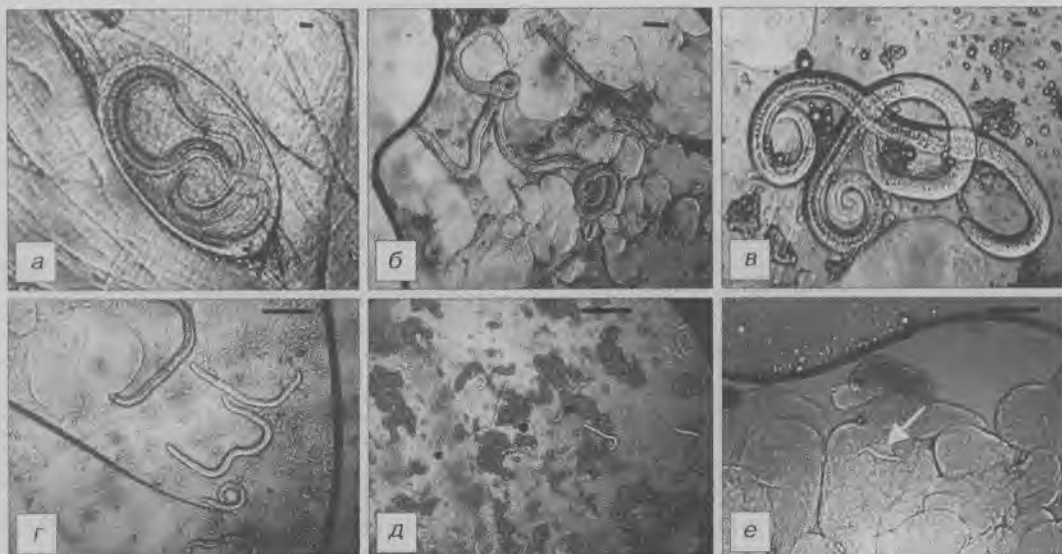
1) при слабой и постоянной компрессии, приводившей к умеренному сдавливанию

пробы, достигались выявление и визуализация внутренней структуры всех живых, погибающих и погибших инкапсулированных ЛТ в пробе (см. рисунок а); у живых ЛТ выявлялась двигательная активность в течение 10—15 мин после взятия пробы; к этому сроку тело ЛТ было развернутым; 2) более интенсивная и импульсивная по характеру компрессия приводила к вытеснению всех инкапсулированных ЛТ из их соединительно-тканых капсул (искусственное декапсулирование) вместе с жидким содержимым капсул в краевую зону за пределы мышечной пробы; у живых декапсулированных ЛТ двигательная активность повышалась, максимально визуализировалась их внутренняя структура (см. рисунок б, в); искусственное декапсулирование погибших и погибающих ЛТ не происходило; 3) последующее повышение интенсивности импульсивной компрессии приводило к вытеснению тканевой жидкости из мышечной пробы вместе с новорожденными ЛТ (длиной 80—100 мкм) и другими неинкапсулированными ЛТ разного возраста в краевую зону за пределы мышечных волокон, где визуализировались их количество, размеры, особенности внутренней структуры и двигательная активность (см. рисунок г, д); некоторые невытесненные из пробы новорожденные ЛТ просматривались внутри мышечных волокон (см. рисунок е).

Сравнительная характеристика техни-

ческих параметров и информативности МПД и традиционной КТ, приведенная в таблице, свидетельствует о явном преимуществе МПД перед КТ.

Благодаря прижизненному применению и повышенной разрешающей способности МПД обеспечивает диагностику трихинеллеза на миграционной, ранней и поздней мышечных фазах инвазии и позволяет определять в динамике индивидуальные особенности инвазии у каждого зараженного животного на протяжении всей его жизни, начиная с 7 дня после заражения (сроки начала и окончания миграционной фазы, элиминации кишечных трихинелл, начала формирования соединительно-тканной капсулы вокруг ЛТ, интенсивность инвазии, морфологические особенности, двигательная активность и жизнеспособность инкапсулированных и неинкапсулированных ЛТ разного возраста). Высокая информативность, малая трудоемкость и быстрое осуществление МПД обеспечивают ускорение, повышение продуктивности и снижение затратности экспериментальных исследований с его использованием. Так, применение МПД позволяет проводить скоротечные эксперименты по скринингу новых лечебных противотрихинеллезных препаратов длительностью до 1 недели на ограниченном количестве животных в группах численностью в 3—5 голов каждая. Применение МПД в исследованиях по скринингу новых противо-



Микрофотограммы проб скелетных мышц, исследованных методом прижизненной диагностики экспериментально зараженных трихинеллезом аутбредных мышей. Нативные препараты. Измерительная шкала — 100 мкм.

а — инкапсулированная личинка *T. spiralis*; б, в — искусственно декапсулированные личинки трихинелл;

г — неинкапсулированные личинки трихинелл разного возраста, вытесненные с тканевой жидкостью за пределы мышечной пробы;

д — новорожденные личинки трихинелл, вытесненные с тканевой жидкостью за пределы мышечных волокон;

е — новорожденная личинка в мышечном волокне через 7 дней после заражения животного.

**Сравнительная характеристика методов прижизненной диагностики (МПД)  
и компрессорной трихинеллоскопии (КТ) у экспериментально зараженных лабораторных животных**

Отличительный признак	Методы исследования	
	КТ	МПД
Применение метода	посмертное	прижизненное
Максимальная масса пробы мышечной ткани (ПМТ), мг	50	1,5
Минимальное число ПМТ	24	1
Инструменты	пинцет, ножницы	глазные пинцет и ножницы
Приспособление, обеспечивающее компрессию ПМТ	компрессорий	два предметных стекла
Степень и характер компрессии	постоянная	мануальная, постепенно повышаемая, импульсивная
Срок от начала взятия ПМТ до начала ее исследования, мин	20—30	1
Продолжительность исследования ПМТ, мин	15—20	2—8 (в зависимости от стадии инвазии)
Возможность визуализации нормальной структуры, деструктивных изменений и двигательной активности инкапсулированных личинок трихинелл (ИЛТ) в ПМТ	отсутствует (из-за ограниченной компрессии ПМТ, исследуемой в толстом слое)	имеется (благодаря интенсивной компрессии малой массы ПМТ, исследуемой в тонком слое)
Возможность искусственного декапсулирования всех ИЛТ в ПМТ для повышения точности тестирования жизнеспособности каждой личинки	исключена (из-за большой массы ПМТ и недостаточной ее компрессии для вытеснения личинок из капсул)	реализуется (благодаря импульсивной компрессии ПМТ, обеспечивающей вытеснение каждой живой личинки из капсулы за пределы ПМТ)
Возможность выявления, количественной характеристики, визуализации нормальной структуры, деструктивных изменений и двигательной активности неинкапсулированных личинок трихинелл (НЛТ)	исключена (ввиду недостаточной компрессии для вытеснения из ПМТ тканевой жидкости вместе с НЛТ)	реализуется (благодаря компрессии ПМТ, обеспечивающей вытеснение НЛТ с тканевой жидкостью за пределы ПМТ)
Пригодность способа для определения сроков начала и окончания миграционной фазы инвазии	не пригоден (так как с помощью компрессория новорожденные личинки не выявляются)	пригоден (благодаря тому, что он обеспечивает раннее и позднее выявление новорожденных личинок)
Определение наличия, интенсивности, фазы инвазии и жизнеспособности личинок у одного и того же животного в динамике на протяжении всей его жизни	исключено (ввиду того, что ПМТ исследуют посмертно)	реализуется (благодаря возможности многократного прижизненного исследования ПМТ на протяжении всей жизни животного)
Минимальный срок выявления инвазии после заражения животных, дни	30—40	6—8

трихинеллезных препаратов на поздней мышечной фазе экспериментальной инвазии (фаза стабилизации количества прижившихся инкапсулированных ЛТ) дает возможность заменить традиционную посмертную КТ (не дающую информацию о танатогенезе ЛТ) новой методикой, позволяющей проводить прижизненный мониторинг особенностей губительного действия исследуемых препаратов на инкапсулированные ЛТ (скорость, характер, степень выраженности, синхронность) на протяжении всего курса лечения до момента гибели всей популяции ЛТ у всех леченых животных. На этой модели представляется перспективным быстрое и точное прижизненное тестирование био-

доступности новых экспериментальных лекарственных форм препаратов группы карбаматбензимидазолов, пригодных для химиотерапии ларвальных эхинококкозов. С применением МПД тестирование целевого эффекта экспериментальных противотрихинеллезных вакцин становится возможным уже с 7 дня после контрольного заражения иммунизированных животных.

Опыт 3-летнего применения МПД в лаборатории экспериментальной химиотерапии ИМПитМ им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова в исследованиях по скринингу и изучению эффективности новых средств для лечения и профилактики трихинеллеза на лабораторной модели инвазии показал, что биопсия

скелетных мышц легко переносилась зараженными трихинеллезом лабораторными грызунами разных видов (около 4 тыс. биопсий у белых мышей, крыс, золотистых хомяков и хлопковых крыс). Полное заживление кожной раны происходило через 4—5 дней после взятия мышечной пробы. При необходимости повторные биопсии у одного и того же животного проводили в течении продолжительных специальных исследований (изучение процесса резорбции погибших ЛТ у леченых животных) длительностью до 1 года.

В ходе разработки МПД впервые выявлены некоторые особенности инкапсулированных ЛТ, использованные нами в качестве дополнительных критериев жизнеспособности паразита. Так, жизнеспособные инкапсулированные ЛТ в прижизненных биоптатах из скелетных мышц всех зараженных лабораторных животных были всегда развернутыми (см. рисунок А) и проявляли выраженную двигательную активность внутри капсулы в течение 10—15 мин после взятия пробы (при 18—20°C). Затем ЛТ постепенно сворачивались в характерную тугую спираль в течение 52—60 мин после взятия пробы и становились неподвижными. После искусственного декапсулирования ЛТ разворачивались, их двигательная активность возобновлялась. Отсутствие эффекта искусственного декапсулирования у погибающих и погибших инкапсулированных ЛТ, связанное с потерей жидкого содержимого капсул, служило дополнительным критерием снижения жизнеспособности ЛТ. Результаты наших наблюдений свидетельствуют о том, что в мышцах инвазированного хозяина жизнеспособные инкапсулированные ЛТ всегда развернуты и находятся в постоянном движении (показатель активного метаболизма, сопряженного с постоянным выходом экскреторно-секреторных продуктов ЛТ в полость капсулы и окружающие ткани хозяина).

Таким образом, предложенный метод обеспечивает диагностику экспериментального трихинеллеза на миграционной, ранней и поздней мышечных фазах инвазии и позволяет на морфологическом уровне осуществлять контроль за качественными и количественными параметрами инвазии в динамике у каждого зараженного животного. Его применение будет способствовать повышению информативности, снижению затратности и ускорению экспериментальных исследований по проблемам трихинеллеза как фундаментального, так и прикладного характера.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бессонов А.С. Диагностика трихинеллеза. — Вильнюс, 1975.
2. Калюс В.А. Трихинеллез (трихиноз) человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1947.
3. Reissman E. // *Fleisch u. Milchhyg.* — 1908. — Bd. 19, No. 1. — S. 1—9.
4. Strobel H. // *Munch. Med. Wochr.* — 1911. — Bd. 58. — S. 672.

Поступила 06.11.08

#### LIFETIME DIAGNOSIS OF TRICHINOSIS IN EXPERIMENTALLY INFECTED LABORATORY ANIMALS

Ye.A. Repina, F.P. Kovalenko, I.V. Kukhaleva

The authors propose a new method for lifetime diagnosis (LTD) of experimental invasion of *Trichinella spiralis* in migratory and muscular phases, which is based on thin-layer microscopy of minor samples of skeletal muscles (weighing 1—1.5 mg) on gradually increased impulse manual compression. The LTD method permits the monitoring of the most important follow-up qualitative and quantitative invasion parameters in each infected animal in normalcy and under the action of specific therapeutic and preventive agents (the onset and termination of a migratory phase, the elimination time of intestinal *Trichinella* after infection, the number, sizes, morphological features, viability, and motor activity of nonincapsulated and incapsulated muscular *Trichinella* larvae of different age). The most important feature of LTD is its possibility of detecting and determining the viability of neonatal *T. spiralis* larvae. LTD enhances the informative value, reduces the costs of and makes experimental studies of the basic and applied problems of trichinosis shorter.