

鸡球虫的分离与保存

黄兵, 韩红玉, 董辉, 姜连连, 赵其平, 王鑫, 韩静芳

【提要】 获得大量纯化的球虫卵囊是进行鸡球虫病的防治、球虫的生物学、免疫学等方面研究的前提。本文着重对鸡球虫的分类地位、卵囊的分离方法以及保存条件等方面进行介绍。

【关键词】 鸡; 球虫; 分离; 保存

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

Isolation and Storage of Coccidial Oocysts in Chicken

HUANG Bing, HAN Hong-yu, DONG Hui, JIANG Lian-lian,
ZHAO Qi-ping, WANG Xin, HAN Jing-fang

(Key Laboratory for Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200232, China)

【Abstract】 Recovery of the oocysts is one of essential techniques used in the studies of *Coccidia* and coccidiosis of domestic fowls. The details of the procedures on isolation and storage of coccidial oocysts in chickens were summarized in this paper.

【Key words】 Chickens; *Coccidia*; Isolation; Storage

Supported by the Natural Resource Platform Project from Ministry of Science and Technology (No.2005DKA30480, No.2005DKA21104)

鸡球虫病是由艾美耳球虫引起的一种全球性家禽寄生虫病。该病严重危害家禽的生产发育, 给养鸡业造成巨大的经济损失。鸡球虫分布广, 凡是养鸡的地方都可能存在球虫, 国内已有 31 个省(市、自治区)报道有柔嫩艾美球虫(*Eimeria tenella*)分布^[1]。由于鸡球虫病在养殖业中的重要性, 吸引了许多的研究者从事球虫的生物学、免疫学、生物化学以及球虫病防治等研究, 而这些研究必须以获得大量纯化的球虫卵囊为前提。本文着重对鸡球虫分类地位、卵囊的分离方法以及保存条件等方面进行了介绍。

1 鸡球虫的分类地位

鸡球虫是属于顶器复合门(Apicomplexa)、孢子虫纲(Sporozoa)、球虫亚纲(Coccidiasina)、真球虫目(Eucoccidiorida)、艾美亚目(Eimeriorina)、艾美科(Eimeriidae)的一类寄生于鸡肠道的寄生性原虫。据统计, 全世界已报道的鸡球虫共有 15 种^[2], 除多数作者公认的堆形艾美球虫(*Eimeria acervulina*)、布氏艾美球虫(*E. brunetti*)、巨型艾美球虫(*E. maxima*)和缓艾美球虫(*E. mitis*)、毒害艾美球虫(*E. necatrix*)、早熟艾美球

虫(*E. praecox*)、柔嫩艾美球虫(*E. tenella*)等 7 种艾美属(*Eimeria*)球虫^[3]外, 还有杜氏艾美球虫(*E. dubeyi*)、哈氏艾美球虫(*E. hagani*)、变位艾美球虫(*E. mivati*)、范氏艾美球虫(*E. vanm-urghawi*)、鸡等孢球虫(*Isospora gallinae*)、诸鸡等孢球虫(*I. gallinarum*)、等孢球虫种(*I. sp.*)、鸡温扬球虫(*Wenyonella gallinae*)。

2 鸡球虫的分离

鸡球虫主要存在于鸡的粪便和肠组织中, 其分离的基本原理是借助鸡球虫卵囊与杂质大小和比重的不同, 通过漂浮和离心的方法使之分离, 从而获得鸡球虫卵囊。

首先从鸡场取新鲜鸡粪便 10 g, 加入 50 ml 水, 搅拌均匀后经 60 目铜筛网或尼龙网过滤, 1 040×g 离心 10 min。沉淀加入少量饱和盐水, 混匀, 移入 5 ml 玻璃瓶(或青霉素瓶)中, 加满饱和盐水, 在瓶口覆盖一盖玻片(盖玻片需与液面接触), 静置漂浮 10 min 后, 取下盖玻片, 放在载玻片上, 显微镜下(10×10或 10×40)观察是否有球虫卵囊, 如果镜检发现卵囊, 再从鸡粪便或肠道中分离卵囊。

2.1 粪便中鸡球虫卵囊的分离^[4]

2.1.1 蔗糖溶液漂浮法 蔗糖溶液的制备: 将 500 g 化学纯蔗糖和 6.5 g 结晶石炭酸(或 6.7 ml 石炭酸溶

基金项目: 科技部自然资源平台项目(2004DKA30480;2005DKA21104)
作者单位: 中国农业科学院上海兽医研究所, 农业部重点开放实验室, 上海 200232

液)溶于 320 ml 蒸馏水中。此溶液常称为西泽尔 (Sheather) 氏糖溶液。

卵囊的分离: 根据鸡球虫种类不同, 收集 24~48 h 内含有球虫卵囊的粪便, 移至消毒过的容器中, 加入 2 倍于粪便体积的水搅拌均匀。将粪便混悬液经两次网筛过滤(先经 50 目, 再经 100~200 目), 滤液与等量 Sheather 氏糖溶液混合, 以 $1\ 500\times g$ 离心 3 min。吸取上层漂浮的卵囊液置于另一离心管中, 加入 10 倍量的水稀释, 以 $1\ 500\times g$ 离心 10 min, 重复离心洗涤 1~2 次, 以去除残留糖液, 沉淀物即为分离的球虫卵囊。

2.1.2 饱和食盐溶液漂浮法 饱和食盐溶液的配制: 称取 400 g 食盐, 放入三角烧瓶中, 加入 1 000 ml 水, 将烧瓶置于电炉上, 边烧边搅拌, 待全部溶解后, 静止冷却, 有少量盐析出, 即为饱和盐水, 比重约为 1.18。

卵囊的分离: 将含球虫卵囊的粪便放入烧杯, 加入 5 倍于粪便的水搅拌均匀。将粪便混悬液经两次网筛过滤(先经 50 目, 再经 100~200 目), 滤液以 $100\times g$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀中加入 10 倍体积的饱和盐水, 充分混匀, 以 $375\times g$ 离心 10 min。吸取上层漂浮的卵囊液置于另一离心管中, 加入 10 倍量的水稀释, 以 $100\times g$ 离心 10 min, 重复离心洗涤 3 次, 以去除盐液, 沉淀物即为分离的球虫卵囊。

2.1.3 饱和硫酸镁溶液漂浮法 饱和硫酸镁溶液的配制: 称取 64.4 g 硫酸镁于 1 000 ml 蒸馏水中, 使其全部溶解。

卵囊的分离(步骤同前法, 只是悬浮液换为饱和硫酸镁溶液)

2.2 肠道中鸡球虫卵囊的分离

一般用于盲肠中柔嫩艾美球虫或毒害艾美球虫卵囊的分离。

2.2.1 蛋白酶消化法 鸡接种柔嫩艾美球虫或毒害艾美球虫卵囊, 7~8 d 后收集盲肠置于干净平皿内, 用灭菌匀浆机粉碎盲肠, 或者用灭菌剪刀将盲肠纵向剪开后, 以载薄片刮取内容物, 加水搅拌均匀。加入 2 mg/ml 胃蛋白酶, 调 pH 值为 2.0, $39\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴 2 h。或加入 0.5%~1% 的胰蛋白酶和 5%~10% 的鸡胆汁, $39\ ^\circ\text{C}$ 下恒温水浴 20 min。然后依次用 50 目、100 目、200 目过滤, 除去颗粒较大的杂质, 收集滤液。以 $1\ 500\times g$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀物加入少量水, 用吸管吹打均匀, 再加入 10 倍体积水混匀, 以 $1\ 500\times g$ 离心 10 min, 重复 3 次, 除去蛋白酶。沉淀中加入 5% 次氯酸钠, 搅拌均匀后在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下作用 15 min, 加 10 倍量的水稀释, 移入离心管, 以 $1\ 500\times g$

离心 10 min。重复洗涤 3 次, 除去次氯酸钠。沉淀物即为从肠道分离的球虫卵囊。

2.2.2 铬硫酸分离法^[5] 铬硫酸溶液的配制: 取 20% 的重铬酸钾溶液 100 ml, 置大三角瓶中, 在冰浴条件下缓慢加入浓硫酸 100 ml, 边加边搅拌。用玻璃滤器除去结晶, 即为所需液体。

卵囊的分离: 将含卵囊的肠道放乳钵中充分研碎, 加 10 倍水, 充分搅拌均匀, 以 $375\times g$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀物中加入 4~5 倍铬硫酸溶液, 冰浴条件下充分搅拌均匀, 以 $375\times g$ 离心 10 min。用吸管吸取漂浮在液体上层的卵囊, 加入 20 倍体积的冰水, 以 $375\times g$ 离心 10 min, 重复 3 次, 沉淀物即为所分离的球虫卵囊。

3 鸡球虫成熟卵囊的培养

从鸡粪便中排出的卵囊须在外界或实验室培养成熟(即孢子化)后, 才具有感染性。卵囊的孢子化需要适宜的温度、湿度和充足的氧气, 在实验室中可用 PBS (需加抗生素抑制杂菌污染)、0.1% 甲醛、1% 硫酸、2.5% 重铬酸钾等溶液进行培养, 通常使用 2.5% 重铬酸钾溶液。培养温度为 $25\sim 28\ ^\circ\text{C}$, 湿度大于 70%, 培养液中卵囊密度不超过 106 个/ml。用培养皿培养, 其液体深度一般不超过 7 mm, 每天需用吸管轻轻吹打 3~5 次; 用烧杯或其他容器培养, 其液体深度一般不超过容器高度的 2/3, 需用小气泵向溶液充气或将培养容器放置于震荡器上。培养 2~3 d 后, 取 1 滴卵囊液于载玻片上, 加盖玻片用显微镜 ($\times 100\sim \times 400$) 观察。记数未成熟卵囊和含 4 个孢子的成熟卵囊, 计算孢子化形成率。孢子化形成率达 80% 以上可结束培养, 不到 80%, 继续培养 2~3 d。

孢子化形成率计算公式:

孢子化形成率(%) = $[\text{成熟卵囊数} / (\text{未成熟卵囊数} + \text{成熟卵囊数})] \times 100$

4 鸡球虫种的鉴定

在自然感染中, 鸡球虫多呈混合感染, 通过寄生部位与卵囊形态结构、大小、形状等指标可对感染的虫种进行初步鉴定。而要进行虫种的准确鉴定, 则需进行球虫的单卵囊分离与纯化, 观察其寄生部位与卵囊结构、形态, 测定其卵囊大小、形状指数、最短潜在期(感染后卵囊最早排出时间)、最早孢子化形成时间等指标。在平常工作中, 通常可用下列几个指标对常见的 7 种鸡球虫进行鉴定。

卵囊形态: 显微镜下观察卵囊大小, 其长度大于 $30\ \mu\text{m}$ 卵囊可确定为巨型艾美球虫, 而长度小于 $18\ \mu\text{m}$

呈亚球形的卵囊为和缓艾美球虫。

肠道病变检查：不同种类球虫寄生部位不同，其致病部位、程度各不相同，通过检查肠道病变和内生发育阶段，能鉴定出堆形艾美球虫、布氏艾美球虫、毒害艾美球、柔嫩艾美球虫。

最短潜在期的测定：最早潜在期低于 85 h 可以确定为早熟艾美球虫，大于 85 h 则为其他虫种。

此外，有条件的可通过酶电泳法和鸡胚传代进行虫种鉴定。酶电泳法为小剂量感染雏鸡，3~5 d 内收集粪便，主要含有早熟艾美球虫、和缓艾美球虫、堆形艾美球虫，6~7 d 收集的粪便主要为柔嫩艾美球虫、布氏艾美球虫、巨型艾美球虫、毒害艾美球虫，通过 GPI 同工酶可区分早熟艾美球虫和堆形艾美球虫，LDH 同工酶可鉴定巨型艾美球虫和布氏艾美球虫。鸡胚传代为和缓艾美球虫、柔嫩艾美球虫、毒害艾美球虫可以在鸡胚中完成生活史。通过对 4~5 d 收集的卵囊进行鸡胚感染，再加上对卵囊形态的观察，即可确定和缓艾美球虫。通过对 6~7 d 收集的卵囊进行鸡胚传代，然后收集卵囊感染雏鸡，根据肠道病变来确定柔嫩艾美球虫和毒害艾美球虫。

5 鸡球虫的保存

卵囊培养完成后，一般按培养液中成熟卵囊含量 50~80 万个/ml 装于小口径瓶中，4 ℃冰箱低温保存。为保证其毒力，保种的卵囊一般半年繁殖 1 次；临床试验使用的卵囊，一般在使用前繁殖。

参 考 文 献

- [1] Shen J, Huang B. A list of parasites for livestock and poultry in China [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2004. 9-18. (in Chinese)
(沈杰, 黄兵. 中国家畜家禽寄生虫名录 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004. 9-18.)
- [2] Pellérdy LP. Coccidia and coccidiosis [M]. Berlin: Paul Parey, 1974. 220-261.
- [3] Wang M. Veterinary parasitology [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2004. 284-288. (in Chinese)
(汪明. 兽医寄生虫学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2004. 284-288.)
- [4] Suo X, Yang XY. Superior experimental directions of parasitology [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2005. 151-154. (in Chinese)
(索勋, 杨晓野. 高级寄生虫学实验指导 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005. 151-154.)
- [5] 角田清(日). Coccidiosis of domestic fowl [M]. Chen Y, Ming RJ Translated. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press, 1986. 98-99. (in Chinese)
(角田清. 鸡球虫病 [M]. 陈谊, 明如镜译. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1986. 98-99.)

(收稿日期:2006-11-10 编辑:盛慧锋)

【消息】

The First Announcement of the 1st International Symposium on Geospatial Health

The 1st International Symposium on Geospatial Health will be held in Lijiang, Yunnan province, China on 8-11 September 2007 with its theme of Geospatial Health and Control of Fish-borne Parasites in Asia.

Background:

There is increasing recognition of the public health importance of fish-borne zoonotic parasitic diseases in Asia and a new awareness of their links to poverty and cultural traditions, to intensification of agriculture and aquaculture, to environmental degradation, loss of biodiversity, and water development projects, and the lack of tools for their control. The conference will address the two most important liver flukes, *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*, closely related trematodes that have similar life cycles and epidemiology. Cholangitis, choledocholithiasis, pancreatitis and cholangiocarcinoma are the major clinical problems associated with the long term chronic disease pattern seen with these infections.

Venue:

Lijiang Wangfu Hotel

Add: 9 Yigu Xiang, Nanmen Street, Ancient Town, Lijiang

Tel: +86-888-5189 666

Fax: +86-888-5189 666

Location: Lijiang Wangfu Hotel is situated in the South Gate of Ancient Town. It is 27 km (45 min driving) to the airport, and 3 km from the Lijiang International Cultral Communication Center.

Surrounding: Black Dragon Pool Park, Lijiang Ancient Town and Jade Dragon Snow Mountain

Date:

The workshop will be take place from 8 to 11 September 2007, following the 7th RNAS+ Workshop on 5-7 September 2007. All participants are welcome to arrive before or on 7 September 2007.