

纯种柔嫩艾美耳球虫的分离培养

张祝明¹, 曾明华¹, 李培英¹, 韩玲¹, 姚建国^{2*} (1.安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; 2.安徽农业大学理学院, 安徽合肥 230036)

摘要 用琼脂滴稀释法, 对 4 株柔嫩艾美耳球虫进行单卵囊分离, 每株各感染 5 日龄罗曼公雏 5 只, 结果感染成功率分别为 60%, 40%, 20%, 20%, 总的成功率为 35%, 能基本满足后续试验的需要。

关键词 鸡; 艾美耳球虫; 分离

中图分类号 S858.31 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)20-5273-01

Isolation and Culture of Single Oocyst of *E.tenella*

ZHANG Zhu-ming et al (Animal College of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract 4 strains of *E.tenella* were isolated with single oocyst technique and agar-drop method. 5 Lohmann-cocks with 5 day-age were inoculated with the oocyst. The infected rate was 60%, 40%, 20% and 20% and final rate was 35% in total.

Key words Chicken; *E.tenella*; Isolation

鸡球虫病是由艾美耳属的单细胞寄生虫引起的严重危害家禽生长发育的一种疾病。在各种鸡病中, 球虫病发生率最高, 占 1/6~1/5^[1]; 集约化养鸡场是球虫病爆发的最适场所, 其发病率为 50%~70%, 死亡率为 20%~30%, 严重时高达 80%^[2]。据报道, 全世界每年因球虫病造成的经济损失多达 20 亿美元, 抗球虫药的年消费为 3.2 亿美元^[2-4]。目前, 许多学者都在进行鸡球虫学的研究, 以便能更好地控制或消灭鸡球虫病。单卵囊分离扩增是鸡球虫学研究领域一项基本的操作技术, 鸡球虫的许多研究都必须在其基础上开展, 如虫种的鉴定, 免疫学的研究, 基因图谱, 同工酶谱以及耐药性的研究^[5-7]等。单卵囊的分离扩增主要有稀释法和显微操作法^[8]。该试验采用的是改良稀释法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 混合卵囊。取取自肥西、巢湖 I、巢湖 II、安庆的病鸡盲肠内容物, 分离培养, 主要含 *E.tenella*。

1.1.2 试验动物。购自安徽省畜禽品种改良站的罗曼雏公鸡。

1.1.3 仪器。恒温培养箱, 冰箱, 显微镜, 离心机, 电炉; 天平, 10 ml 移液管, 三角烧瓶, 血球计数板, 载玻片, 平皿等。

1.1.4 试剂。琼脂粉, 重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$), 饱和食盐水, 蒸馏水, 生理盐水等。

1.2 方法

1.2.1 卵囊准备。分离的病鸡盲肠内容物, 混匀在 20 倍体积的浓度为 2.5% 的重铬酸钾溶液中, 放入 27℃ 左右的恒温培养箱中培养。培养的前 18 h, 每 6 h 轻搅拌 1 次, 以后每天搅拌 1~2 次, 至 95% 的卵囊孢子化, 置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 琼脂板和琼脂滴的制备。在三角烧瓶中, 将琼脂粉按照 2% 的比例加入蒸馏水中, 于电炉上加热使其溶化, 沸腾后冷却至 70℃ 左右, 然后用 10 ml 的移液管取适量 (4 ml 左右) 均匀的加在载玻片上, 制成琼脂板 (注意保持琼脂面水

平, 厚度均匀, 约 2.5 mm)。待琼脂板凝固后, 用口径约 3.5 mm 的吸管在琼脂板上均匀的打孔, 再将孔内的琼脂滴轻轻的转移到另一张载玻片上 (每张片子以 9 个琼脂滴为宜)。为防琼脂滴变干, 可将制好的载玻片放在大平皿中, 加水加盖, 置于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.3 单卵囊选择。取已孢子化的卵囊样少许于离心管中, 加入饱和食盐水, 2 000 r/min 离心 3 min, 将上层含卵囊的液体移入事先洗净的青霉素小瓶中 (用细铁丝环沾取), 用生理盐水稀释到合适的浓度。低倍显微镜下观察时, 只有 1~2 个卵囊)。用牙签沾取卵囊悬液于琼脂滴上, 低倍显微镜仔细观察, 确实为单个卵囊的调至 40 倍观察, 确保卵囊孢子化完全。同时观察其形态特征, 并测量其大小, 符合柔嫩艾美耳球虫形态学特征的用厚约 1.5 mm 的琼脂片包好移入胶囊中, 做好标记备用, 饲喂小鸡。

1.2.4 雏鸡分组及单卵囊感染。选取 20 羽 5 日龄粪检无球虫感染的罗曼小公雏, 随机分成 4 组, 每组 5 羽。第 1 组接种安庆株分离的单个卵囊, 记组号为 A, 并依次编号为 A₁, A₂, A₃, A₄, A₅; 第 2 组接种巢湖株 I 分离的单个卵囊, 记组号为 B, 并依次编号为 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅; 第 3 组接种巢湖株 II 分离的单个卵囊, 记组号为 C, 并依次编号为 D₁, D₂, D₃, D₄, D₅; 第 4 组接种肥西株分离的单个卵囊, 记组号为 F, 并依次编号为 F₁, F₂, F₃, F₄, F₅。

将准备好的含单个卵囊的胶囊经口投服给雏鸡, 然后单个隔离饲养于严格消毒的笼舍中, 饲料和饮水严格消毒, 感染后第 5 天起收集粪便镜检。检出有球虫的粪样, 镜下观察球虫形态, 大小一致并与祖代吻合的, 收集培养。感染后第 8 天扑杀剖检所有鸡只的盲肠。

1.2.5 继代增殖。用 A、B、C、F 4 株中孢子化卵囊的第 1 代分别感染 12 日龄无球虫雏鸡, 收集感染后第 6~8 天的粪样进行培养, 再感染雏鸡, 继代若干次, 直至收集大量的纯种卵囊, 孢子化后保存备用。

2 结果与分析

对所接种的卵囊进行了形状观察和大小的测量, 其结果见表 1。从表 1 可以看出, 在经接种 4 株球虫的雏鸡中, A 组检出有 3 羽感染成功, 感染率为 60%; C 组中感染成功的 (下转第 5275 页)

基金项目 安徽省教育厅自然科学基金项目 (2005KJ025ZD)。

作者简介 张祝明 (1980-), 男, 安徽望江人, 硕士研究生, 研究方向: 兽医驱虫药。* 通讯作者。

收稿日期 2006-04-05

(上接第 5273 页)

有 2 羽,感染率为 40%;D 组成功感染 1 羽,感染率为 20%;F 组成功感染 1 羽,感染率为 20%。

表 1 单卵囊分离所选祖代的球虫的大小 μm

编号	安庆株 A)	巢湖 I 株 C)	巢湖 II 株 D)	肥西株 F)
1	18.0×14.0	21.0×18.0	22.0×19.0	22.0×18.0
2	19.0×17.0	21.0×18.0	21.0×18.0	22.0×19.0
3	22.0×18.0	20.0×18.0	19.0×17.0	20.0×17.0
4	20.0×17.0	18.0×16.0	21.0×18.0	18.0×16.0
5	21.0×19.0	19.0×16.0	20.0×17.0	21.0×18.0

3 结论与讨论

单卵囊分离是球虫学研究领域一项基本操作技术,要获得好的分离效果应具备 3 个基本条件:①供接种的卵囊质量要高,孢子化效果要好;②要确保接种的球虫能顺利进入鸡体,以完成其生活史;③感染鸡的合适日龄。

单卵囊感染成功率与分离方法,雏鸡日龄,卵囊的侵袭力等因素有关。目前常用的分离方法有显微操作法和稀释法。显微操作法能准确的选取单个孢子化效果较好的卵囊来接种雏鸡,但该法对仪器和操作技术要求较高,关键是选取的单个卵囊能否顺利喂给幼雏以完成球虫的生活周期。对于稀释法,不同的学者选取的材料不同,但操作方法基本相似。安键等以玻璃纸做材料对 *E.tenella* 进行了分离,结果感染成功率为 38%,感染成功率不高的原因可能是玻璃纸影响了球虫脱囊^[9]。陶建平研究了雏鸡日龄对单个卵囊感染成功率的影响,结果第 1、7、15 和 30 天雏鸡的感染成功率分别为 63.3%、60%、3.33%和 0^[10],指出 1~7 日龄雏鸡易

感染成功,15~30 日龄不易或不能感染成功。

该试验采用琼脂滴稀释法,选取 5 日龄的雏鸡作为试验动物,对 4 株 *E.tenella* 进行单个卵囊的分离,结果 A、C、D、F 4 株的感染成功率分别为 60%、40%、20%、20%,已能满足后续试验的需要。

参考文献

- [1] 张龙现,蒋金书,刘群,等.毒害艾美耳球虫纯种卵囊收集鉴定及致病性测定[J].中国兽医杂志,2001,37(9):12-13.
- [2] 索勋,汪明,吴文学,等.强效艾美耳牌鸡球虫苗 I 型的田间试验[J].畜牧兽医学报,2001,32(3):265-269.
- [3] 李佩国,李蕴玉,张香斋,等.阶段用药抗柔嫩艾美耳球虫的效力[J].河北技术师范学院学报,2001,15(4):5-8.
- [4] 马立农,陈杖榴.鸡球虫耐药性的产生及其延缓措施[J].湖北农学院学报,1999,19(2):179-182.
- [5] CHAPMAN H D,SHIRLEY M W.Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken[J].Poultry Science,1994,73(1):1404-1408.
- [6] MCDUGALD L R,FULLER L,SOLIS J.Drug sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms [J].Avian Disease,1980,30(4):690-694.
- [7] STALLBAUMEI M,DAISY K J.The effects of monensin,narasin,salunomycin and nicarbazin of field strains of chicken coccidian[J].Avian Pathology,1988,17(7):793-801.
- [8] 索勋,李国清.鸡球虫病学[M].北京:中国农业大学出版社,1998:166-167.
- [9] 安键,汪明,王黎霞,等.鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的建立[J].北京农学院学报,2004,19(1):5-6.
- [10] 陶建平,符放齐.单卵囊感染雏鸡日龄及某些生物学特性的研究[J].江苏农学院学报,1997,18(4):77-78.