

鸡柔嫩艾美耳球虫西宁株的分离与鉴定

康明, 陈刚, 李英, 李周清 (青海大学农牧学院动物医学系, 青海西宁 810003)

摘要 [目的] 鉴定鸡柔嫩艾美耳球虫西宁株。[方法] 采用单卵囊分离技术从西宁当地鸡粪便中获得1株纯种球虫, 经鸡体传代增殖, 对该虫体的寄生部位、潜伏期、孢子化时间、形态结构等指标进行观察和测定。[结果] 该虫株寄生于鸡的盲肠, 卵形指数为1.22, 最短孢子化时间为18 h, 潜伏期为114 h。卵囊为卵圆形, 卵囊壁光滑, 呈黄绿色, 孢子化卵囊未见卵膜孔和卵囊残体; 孢子化卵囊平均为20.08 μm \times 16.55 μm 。孢子囊纺锤形, 有一斯氏体, 其平均大小为8.65 μm \times 4.90 μm 。综合鉴定该球虫为柔嫩艾美耳球虫, 并暂命名为柔嫩艾美耳球虫西宁株。[结论] 该研究为进一步研究球虫的致病性和药物效应奠定了基础。

关键词 柔嫩艾美耳球虫西宁株; 分离; 鉴定

中图分类号 S831.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-08001-02

Separation and Identification of *Eimeria tenella* Xining Strain

KANG Ming et al (Veterinary Medicine Department, Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining, Qinghai 810003)

Abstract [Objective] The aim was to identify *Eimeria tenella* Xining strain. [Method] 1 pure coccidium strain was obtained from chicken feces in Xining local area by single oocyst isolating technique. After passage propagation through chicken, the indexes such as parasitic site, latent period, sporulation time and morphology of the coccidium were observed and detected. [Result] The coccidium parasitized in the chicken appendices, the oval index was 1.22, the shortest sporulation time was 18 h and the latent period was 114 h. Its oocyst was ovoid, and the oocyst wall was smooth and Kelly. There was not seen micropyle and oocyst residue in sporulation oocyst. The average sporulation oocyst was 20.08 μm \times 16.55 μm . The sporangium was spindle and had one steadite which was 8.65 μm \times 4.90 μm averagely. Through comprehensive identification, the coccidium was *Eimeria tenella* and it was named *Eimeria tenella* Xining strain temporarily. [Conclusion] The research laid the foundation for further study on pathogenicity and drug effect of coccidium.

Key words *Eimeria tenella* Xining strain; Separation; Identification

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。鸡球虫分布广泛、危害大, 严重威胁养鸡业的发展, 尤其对15~30日龄的雏鸡危害严重, 常常造成毁灭性的损失。其发病率高达50%~70%, 死亡率20%~30%, 严重时高达80%^[1]。在鸡的各种疾病当中, 球虫病的发生率相当高, 占1/6~1/5^[2]。据Bogal^[3]称, 全世界每年因鸡球虫病造成的损失达20亿美元, 抗球虫药年消耗32亿美元^[4]。我国年养鸡量约为30亿只, 按每只0.2元的抗球虫药支出计算, 年支出的抗球虫药费为6亿元人民币^[5]。目前, 我国已经发现了9种鸡球虫^[6], 其中致病性最强的是柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)。但在自然情况下多系混合感染, 且以某一种占优势, 国内外学者为了研究的方便及研究结果的准确性, 常应用纯种虫株进行研究。结果表明, 不同球虫地理株在抗药性和致病力之间都表现出不同的抗药水平, 在分子水平也证明了它们之间具有遗传上的差异^[7]。近几年, 随着青海省养鸡规模的不断扩大, 全省养鸡总数约为300万只, 养鸡户因鸡球虫病影响所造成的损失也逐渐加大。因此, 开展对柔嫩艾美耳球虫西宁株的研究, 具有很高的实用价值, 也可为西宁地区的鸡球虫病防治策略重点的制定和球虫苗组成成分的研制提供有价值的资料。并且对进一步研究球虫的致病性, 药物效应和机体对球虫的免疫性等均有极其重要的意义。而西宁地区鸡球虫的研究尚属空白, 鉴此, 笔者于2008年3~5月对西宁地区鸡球虫进行了分离与鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试动物。岭南黄肉鸡(俗称三黄鸡), 购自西宁某种鸡场。出壳后运回青海大学农牧学院寄生虫学实验室, 饲

养于严格消毒的无球虫环境中, 备用。

1.1.2 试剂和器材。2.5%重铬酸钾溶液、饱和食盐水、白开水、酒精、1%琼脂粉、60目铜丝筛、100目铜丝筛、300目铜丝筛、研钵、平皿、刀片、细针头、载玻片、盖玻片、滴管、试管、光学显微镜、DYL-5低速离心机、DHP-162型电热恒温培养箱、电热鼓风干燥箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 虫种采集。选择西宁当地病鸡进行粪便检查和剖检, 将具有盲肠肿大、盲肠粘膜增厚、盲肠内充满凝固的暗红色物质、盲肠浆膜面可见出血点的病鸡盲肠内容物和粪便进行费勒鹏氏法漂浮, 收集球虫卵囊, 置于2.5%重铬酸钾溶液中, 在27℃恒温培养箱内培养至孢子化, 以获得混合球虫卵囊。混合的孢子化卵囊液置于4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 初次分离。取混合的孢子化卵囊液反复离心数次, 以洗净重铬酸钾液, 接种于10只5日龄雏鸡, 于接种后第7天剖杀, 取盲肠段内容物, 收集卵囊, 培养至孢子化。再经无虫鸡体反复增殖4代, 以获取该次试验所需孢子化卵囊总量。

1.2.3 单卵囊感染。

1.2.3.1 单卵囊分离。参照周克夫等报道方法^[8], 制备1%的琼脂, 溶解后浇在载玻片上, 厚约2~3 mm。用针头沾取初次分离卵囊稀释液轻轻滴在琼脂块表面, 在低倍镜下确定为1~2个卵囊时, 用刀片切割琼脂块, 用细针头将切割的小块琼脂移置另一载玻片上, 再次用高倍镜检确定为符合条件的单个卵囊后收集备用。将所收集的卵囊投喂给10只5日龄无球虫雏鸡, 并滴入1~3滴白开水, 促其吞咽。感染后5 d逐只检查粪便, 发现卵囊即为单卵囊后代, 随即剖杀后收集卵囊培养至孢子化。

1.2.3.2 增殖。将分离出的单卵囊后代经15只13日龄无球虫鸡体增殖, 每天观察鸡的精神状态、食欲、饮水、粪便等变化。从感染后第3天开始, 每天用费勒鹏氏法检查每只鸡

作者简介 康明(1972-), 男, 甘肃临洮人, 硕士, 副教授, 从事兽医寄生虫学研究。

收稿日期 2009-03-18

的粪便,记录球虫感染率、在雏鸡体内的潜伏期,详细观察临床症状以及有无球虫卵囊排出等情况。收集感染后第5~7天的粪便,并于感染后第7天剖杀,取盲肠内容物并刮取肠粘膜,收集虫体、分离和培养。

1.2.4 虫种鉴定。收集增殖后的虫体,观察卵囊和孢子囊形状、颜色、大小结构等指标,记录最短孢子化时间,并随机测量100个孢子化卵囊、孢子囊的大小,计算卵形指数,进行虫种鉴定^[8-13]。

2 结果与分析

2.1 人工感染雏鸡临床症状 鸡体感染单卵囊后第3~4天,雏鸡粪便中未检出球虫卵囊;第5天在雏鸡粪便中检出少量球虫卵囊,并出现少量血便;自第6天起出现轻微精神沉郁,饮、食欲略减退并检出多量球虫卵囊,出现较多血便;第7天在雏鸡粪便中检出大量球虫卵囊,血便严重。雏鸡感染成功率为100%。

2.2 人工感染雏鸡病理变化 感染后第7天,剖杀后观察其病理变化,发现雏鸡均盲肠肿大,盲肠粘膜增厚,盲肠内充满凝固的暗红色物质,盲肠浆膜面可见针尖大的出血点。其余肠段未见明显病变。粪便及盲肠中均检出卵囊,其余肠段未检出卵囊。

2.3 球虫种类的鉴定 显微镜下观察未孢子化卵囊,多呈宽卵圆形,少数卵圆形,壁光滑,分为2层,呈淡绿色,原生质呈淡褐色,潜伏期为114 h。取盲肠内容物和黏膜刮取物镜检所见卵囊为卵圆形和宽卵圆形,一端钝圆,另一端稍尖,卵囊壁光滑,呈黄绿色,囊壁分2层,未见卵膜孔和极帽,无残体。卵囊最短孢子化时间为18 h;孢子化卵囊未见卵膜孔和卵囊残体;随机测量100个2代孢子化卵囊和孢子囊大小。由表1可知,其平均大小为(20.08 × 16.55) μm。孢子囊纺锤形,有一斯氏体,其平均大小为(8.65 × 4.90) μm。

表1 试验测量结果与相关资料的比较

Table 1 The comparison between the measured results and the related data

	卵囊大小 μm Oocyst size	卵囊平均大小 μm Average size of oocyst	卵形指数 Oval index	孢子囊大小 μm Sporangium size	孢子囊平均大小 μm Average size of sprangium
资料1 ^[8] Data 1 ^[8]	(23.50 ~ 28.50) × (18.50 ~ 23.50)	25.80 × 20.80	1.23	-	-
资料2 ^[9] Data 2 ^[9]	(16.00 ~ 27.00) × (15.00 ~ 24.00)	21.00 × 16.50	-	(0 ~ 15.00) × (4.50 ~ 7.50)	12.20 × 6.00
资料3 ^[10] Data 3 ^[10]	(17.50 ~ 30.00) × (12.50 ~ 25.00)	21.80 × 17.29	1.23	(10.00 ~ 13.00) × (5.00 ~ 7.50)	11.49 × 6.35
资料4 ^[11] Data 4 ^[11]	(16.00 ~ 25.00) × (14.00 ~ 21.20)	20.60 × 17.50	1.17	-	-
资料5 ^[12] Data 5 ^[12]	(17.50 ~ 25.50) × (15.50 ~ 22.00)	21.50 × 18.60	1.16	-	-
资料6 ^[13] Data 6 ^[13]	(29.50 ~ 26.00) × (16.50 ~ 22.80)	22.00 × 19.00	1.16	-	-
试验测量结果 Measured results of the test	(15.00 ~ 26.25) × (12.50 ~ 20.75)	20.08 × 16.55	1.22	(5.00 ~ 10.50) × (3.75 ~ 7.00)	8.65 × 4.90

通过和文献[8-13]比较,该次试验测得的卵囊大小在文献记载范围之内。获得的指标与有关资料基本一致,个别虫体测量值偏小,可能与西宁地区气候条件有关,具体原因有待进一步探讨。

通过对卵囊的形态、大小、颜色和卵形指数等指标的观察与测定,并结合该次人工感染试验的临床表现及病理变化进行综合分析,鉴定该球虫是柔嫩艾美耳球虫,暂命名为柔嫩艾美耳球虫西宁株(H XN)。

3 讨论

3.1 几种单卵囊分离技术的优势比较 单卵囊分离技术能保证所获得的卵囊为纯种,进行雏鸡感染试验时,能保证试验的准确性,对虫种的鉴定具有重要意义。Chapman等^[14]对球虫单卵囊技术进行过研究和报道。国内学者田广孚等^[15],曾用5 cm高的DEAE 52纤维素柱,以pH值为8.0的甘氨酸缓冲液作为洗涤液对柔嫩艾美耳球虫进行了提纯。但因需要特殊仪器,操作技术繁杂,一般设备条件下根本无法办到。段嘉树等^[16]采用针头及透明塑料纸球虫单卵囊分离法感染雏鸡,与其他单卵囊分离法相比,用材简单,操作方便。但该方法在感染过程中,将透明塑料纸和卵囊一块投喂给雏鸡,由于感染数量大,进入鸡体的透明塑料纸量多而不易消化,使感染的成功率下降。而该文试验采用的琼脂板法单卵囊分离技术,将孢子化卵囊与周围的琼脂块一块喂给雏鸡,可以使感染率大大提高,适合普通实验室进行分离。

3.2 试验中的注意事项 在整个试验过程中,必须进行严格消毒,保证试验所需的无毒环境;每次离心收集卵囊时,要反复离心,以洗净盐分避免损坏虫体;离心后,应将离心管内液面逐层检查,以免由于离心时间不够或转数不足致使虫体未完全存在于某一液面层而造成卵囊的丢失;感染时,尽量在鸡较空时投服,避免由于其进食过多而造成投喂困难;向鸡口中滴入蒸馏水时要避免水从口中溢出,防止卵囊丢失。单卵囊感染后,鸡粪中排出子代卵囊的时间往往要迟于最小潜在期几小时到几十小时,一般有一定时间范围^[16]。但还应该在潜在期之前清除粪便,只是感染后前4 d无须检查粪便,以免浪费试验用品和耗费不必要的时间和精力。

3.3 虫株分离技术的意义 球虫的感染自然情况下多系混合感染,而以某一种占优势。由于不同的地理株在抗药性和致病力之间都表现出不同的抗药水平,所以为了研究的方便及研究结果的准确性,往往应用纯种株进行研究。球虫的单卵囊分离技术不但能保证所获得的卵囊为纯种,还可以进行球虫种类的鉴别和球虫纯种体系的建立。进行雏鸡感染试验时,能保证试验的准确性,对虫种的鉴定具有重要意义。总之,建立一个便捷可行的纯种分离技术是对球虫深入研究的前提和保证。尽管该次试验中所采用的方法简单,重复性和工作量大,但对以后进一步研究球虫的致病性、药物效应和机体对球虫的免疫性等均有极其重要的意义。

性能与人发也基本相同,也就是说用牦牛裙毛可代替人发生生产黑炭衬,用于高档服装生产。

3.5 牦牛皮 牦牛皮可分犏牛皮,小牛皮,大牛皮3类。犏牛生皮,一般加工成剪绒,用于制作毛皮手套、剪绒帽子、剪绒皮衣和棉鞋等;大、小牛皮可加工成皮革、面革和机械用革等,用于制作皮箱、皮包、皮衣、皮带及工业用品的生产等。

4 加快牦牛产品开发的措施

4.1 提高思想认识,加大宣传力度 我国的牦牛产品长期以来发展滞后的一个重要原因就是政府管理部门到牦牛从业人员,都不重视牦牛产品的开发和宣传。目前,在牧民的心目中,养牦牛只是为了吃肉,而其他牦牛产品则被视做副产品甚至边角料任意丢弃,比如牦牛毛绒不按时抓(剪),任其自然流失;牦牛皮随意堆放,形成“皱裂皮”、“四折皮”、“疙瘩皮”,甚至腐烂变质,严重影响其质量和使用价值^[17-18]。政府管理部门对牦牛产业也没有高度重视起来,牦牛是西部牧区的支柱产业,也是我国畜牧特色产业,但是,翻开《中国农业统计年鉴》既找不到我国的牦牛存栏、出栏数量,也找不到牦牛毛绒、牦牛肉、奶、皮产量的统计数据。也就是说,有关牦牛的统计数据在《中国农业统计年鉴》中处于空白状态,这不能不让人产生“牦牛产业是被国家放弃的产业”的疑惑。所以,笔者认为要发展牦牛产品,首先,要解决的是思想认识问题,不仅要提高牧民的思想认识,更重要的是要提高政府管理部门的思想认识。牧民要重视牦牛产品的生产和质量管理,政府部门要重视宣传和管理,特别是地方政府应通过各种传媒手段加大对牦牛资源、特性、产品优势、科研成果、行业动态、产品加工等的宣传力度,让国际社会认识牦牛、接受牦牛产品,投资开发牦牛资源,以促进牦牛产业的发展。

4.2 顺应市场需求,做大做强“绿色”品牌 牦牛长期生活在海拔3 000 m以上的纯天然牧场,人类活动少,生态环境没有任何污染,且以放牧为主要的饲养方式,饲草天然无污染,疾病少,几乎没有人为干预。因此,其生产的产品风味独特、品质优良,而且不含任何人工合成药物和促生长物质。这既满足了人们对天然无公害畜产品的需要,也正好顺应了国际市场绿色革命和食品安全的新潮流。特别是近年来,西方国

家多次发生疯牛病、口蹄疫等危害食品安全的事件,使国际贸易中的保护措施越来越倾向于“绿色”壁垒,这无疑给我国的牦牛产品创造了一个进入国际市场的大好时机。因此,我们要借此良机,做大做强我们的牦牛“绿色”品牌。

4.3 推行标准化生产,提高产品质量 目前,我国的牦牛业还是一个比较原始的产业,其饲养管理均处于粗放状态,我国有关牦牛饲养、管理及产品质量评价的标准几乎处于空缺。在全球经济一体化高速发展的今天,要使我们的牦牛产品在国际市场上占有一席之地,除了要有自己的特色之外,应该有好的质量,而好的质量就需要用统一的技术标准来指导生产。因此,我们应该在保护生态环境的前提下,在保持牦牛产品特色的前提下,在了解国际市场需求的前提下,制定牦牛饲养、管理及产品质量评价技术标准,按标准要求统一生产,提高产品质量和科技含量,使我们的牦牛产品尽快与国际市场接轨,扩大出口,创造效益。

参考文献

(上接第8002页)

参考文献

- [1] 索勋,汪明,吴文学,等.强效艾美耳牌鸡球虫苗型的田间实验[J].畜牧兽医学报,2001,32(3):265-269.
- [2] 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.
- [3] BHOGAL BS, MILLER GA. Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for one-day-old broiler chicken against *E. acervulina* and *E. tenella* infections[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1992, 31: 323-335.
- [4] 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.
- [5] 孔繁瑶,宁长申,殷佩云.鸡球虫耐药性的现场监测方法综述[J].中国兽医学报,1994(14):90-94.
- [6] 苑淑贤,姚新华,杨金生,等.柔嫩艾美耳球虫纯种的分离鉴定和致病性观察[J].农业与技术,2005,25(4):90-92.
- [7] 孔繁瑶,宁长申,殷佩云.15株柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)对五种抗球虫药的抗药性调查研究[J].北京农业大学学报,1994,20(3):302-

- [1] 陈志远,伍兴荣,三郎尔甲.以我国加入WTO和西部大开发的契机加快牦牛业发展[J].中国畜牧杂志,2001,37(4):39.
- [2] 张容昶.中国的牦牛[M].兰州:甘肃科技出版社,1989.
- [3] 孙海梅.入世与我国的牦牛业[J].国际贸易问题,2002(5):16.
- [4] 中国畜禽遗传资源状况编委会.中国畜禽遗传资源状况[M].北京:中国农业出版社,2004:18.
- [5] 孙海梅.青海牦牛业的优势与发展对策[J].世界农业,2002,279(7):52.
- [6] 熊维权.我国牦牛资源开发前景与措施[J].农牧产品开发,1999(1):3.
- [7] 万占全,周生明,任崇凭,等.甘肃牦牛产业发展现状与前景[J].中兽医医药杂志,2003(1):43-44.
- [8] 朱国兴,张云玲.浅谈我国牦牛业生产现状及发展思路[J].中国畜牧杂志,2005,41(1):61.
- [9] 李齐发.中国牦牛分子系统发育的初步研究[D].南京:南京农业大学,2004.
- [10] 耿尧.牦牛皮肤结构与功能研究[D].兰州:兰州大学,2006.
- [11] 姬秋梅.中国牦牛品种资源的研究进展[J].自然资源学报,2001(6):28-32.
- [12] 钟金城,赵素君,陈智华,等.牦牛品种的遗传多样性及其分类研究[J].中国农业科学,2006,39(2):396.
- [13] 吴克亮,李藏兰,梁育林.天祝白牦牛产业发展的调查[J].中国畜牧杂志,2004,40(11):34-35.
- [14] 钱依宁,刘忠贤.牦牛资源的开发利用[J].饲料与畜牧,1999(6):29.
- [15] 张小建,王蕊,张重庆,等.论牦牛的产业化和民族经济的发展[J].四川畜牧兽医,2007(4):32.
- [16] 牛春娥.天祝白牦牛被毛纤维特性及超微结构的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2007.
- [17] 欧学志.生化法对牦牛毛改性整理的研究[J].天津纺织科技,2005(4):5-8.
- [18] 李选刚.拉细羊毛的研究[D].苏州:苏州大学,2004.

308.

- [8] 周克夫,章军,李雪松,等.柔嫩艾美耳球虫厦门株(*Eimeria tenella*)生物学研究[J].厦门大学学报,2005,44(4):572-575.
- [9] 索勋,李国清.鸡球虫病学[M].北京:中国农业大学出版社,1998.
- [10] 黄兵,赵其平,吴薛忠,等.柔嫩艾美耳球虫纯种的初步确定和致病性研究[J].上海畜牧兽医通讯,1993(5):18-20.
- [11] 于三科,林青,冯凯.陕西省杨陵区鸡球虫病病原种类的调查研究[J].动物医学进展,1999,20(4):39-41.
- [12] 刘振湘,唐晓玲.湖南省衡阳市鸡球虫病病原种类与流行情况调查[J].中国兽医寄生虫病,2001,9(2):26-28.
- [13] 孔繁瑶.家畜寄生虫学[M].2版.北京:中国农业大学出版社,1997.
- [14] CHAPMAN HD. Advances in the control of parasitic disease of poultry[C]// proceedings XI international congress of world veterinary poultry association. Cairo-Egypt, 2001:59-61.
- [15] 田广孚,田增义.柔嫩艾美耳球虫孢子的提纯[J].中国兽医杂志,1989,15(4):27-28.
- [16] 段嘉树,陈希,王时伟,等.针头及透明塑料纸球虫单卵囊分离感染法[J].动物医学进展,2005,26(5):118.