

兽医原动物种质资源库的建立

刘光远 殷宏 罗建勋 田占成 白启

(中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 利用生物学等方法对流行于我国的一些主要的原动物进行收集、分离、鉴定与保藏, 陈述病原收集与鉴定的一般方法, 并介绍已收集的主要原动物种类、传播媒介与传播方式。自野外采集动物血液、传播媒介、相关组织、排泄物等, 根据对病原形态鉴定、传播媒介鉴定、实验性感染易感动物、单一虫株克隆、不同致病部位等方法, 对我国不同地区、不同家畜的原虫病原进行分离, 并通过媒介传播试验确定传播媒介的种类与传播方式; 采用 18S rRNA 基因测序方法, 对本实验室已分离的部分原虫进行进化关系研究。收集、分离、鉴定与保藏的原虫涉及 7 个目, 8 个科, 30 多个种, 160 多个不同地区分离株, 对虫种资源从分离技术、保藏方法、病原形态学、致病性、生活史等普通生物学, 到 18S rRNA 的基因序列测定及某些基因克隆表达的分子生物学技术等全方位的研究, 初步建成了国内较大的原虫活虫种库。采用血液注射、媒介传播、单一虫株克隆、组织感染等方法对原虫进行了有效分离, 通过传统分类学和病原进化关系的研究, 可对动物原虫进行正确的分类鉴定。

关键词: 原动物; 种质资源库; 收集; 鉴定; 18S rRNA 基因

中图分类号: Q959.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)增-0024-08

原动物 (Protozoa) 简称原虫, 是最原始、最简单、最低等的单细胞动物, 是一个独立的动物界门。目前与动物疾病有关的主要原虫有数十种, 隶属于 5 门、5 纲、10 多个科, 尤以孢子虫纲 (Sporozoa) 的种类最多, 对畜禽的危害最大, 其中有一部分为人畜共患寄生虫^[1,2]。这些原虫是动物寄生虫病的主要病原, 对畜牧业发展的危害非常严重, 给国民经济和人民生活造成极大的威胁。兽医原虫的收集、分离、鉴定、保藏及资源库的建立, 是开展寄生虫学与寄生虫学研究的基础和前提, 对病原学、免疫学和检测技术研究, 疾病的诊断与普查, 港口检疫与药物筛选, 教学和生产用标准虫种及标准阳性血清的制备与提供等具有重要意义。我所 20 多年来, 在侧重梨形虫、球虫、弓形虫、锥虫及传播媒介研究的同时, 也兼顾收集、分离了一些其他原虫^[3-9], 初步建立了兽医原虫种质资源库, 本文对这些工作进行了全面的介绍。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6—12 月龄的犊牛及 3—4 月龄的羔羊均购于甘肃省定西县, 实验小鼠来自本所实验动物场的清洁级小白鼠, 试验用小鸡为刚孵出未落盘的雏鸡。在试验开始前 30d, 用于梨形虫分离和传播试验的动物均被切除脾脏, 并对动物进行病原学检查, 只有血涂片检查无任何血液原虫感染及试验检测无相应病原的动物, 才能用于本试验。

1.2 媒介蜱 用于病原分离的媒介蜱采集于梨形虫病流行区; 用于传播试验的媒介蜱为实验室多代培育的清洁蜱。

1.3 病原样品 血液样品为采自疫区牛、羊或相应易感动物的抗凝血液, 冰盒内保藏或液氮储存, 带回实验室感染除脾动物。采自疫区的粪便样品冰盒内保藏带回或就地用饱和盐水漂浮法收集粗提的混合卵囊, 带回实验室感染小鸡。

1.4 梨形虫不同地区株的分离

收稿日期: 2007-10-25; 修订日期: 2008-02-19

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21205-3); 国家高新技术研究发展计划 (863) 项目 (2006AA10A207); 甘肃省自然科学基金项目 (32S041-A25-035) 资助

通讯作者: 刘光远 (1963—), 男, 汉族, 甘肃镇原人; 副研究员, 博士; 研究方向为预防兽医学。Tel: 0931-8311181; Fax: 0931-8340977; E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

1.4.1 血液接种法 将野外采集的疑似感染的抗凝血液 10—20mL, 在 48h 内接种于除脾的易感动物, 每天注射地塞米松注射液(10—20mg/100kg 体重), 并测定动物体温、自耳尖采血制备血液涂片, 经吉姆萨染色后进行病原学检查, 待染虫率达 1%以上时采集血液, 保藏于液氮中。

1.4.2 蜱传播试验法 将在流行区内动物体表或草场收集的硬蜱进行分类整理后, 饥饿或半饱血的蜱可直接感染敏感动物。如收集到的为饱血雌蜱, 则将其置于 28℃、80%—90%相对湿度下产卵, 孵化出的次代幼蜱、若蜱、成蜱用于病原的分离。在进行蜱的感染时, 在动物背部粘贴布口袋, 将蜱释放于其中, 每天检查蜱叮咬吸血的情况。试验过程中须将实验动物固定牢靠, 以防止动物将布袋损坏, 导致媒介蜱逃逸。感染后的检查方法与“血液接种方法”同。

1.4.3 梨形虫的单一分离技术 由于在同一地区常常存在多种媒介蜱, 加之同一种媒介蜱可传播多种病原, 因而一个动物个体常常被多种病原同时感染(即:混合感染), 如:双芽巴贝斯虫、牛巴贝斯虫与边缘无浆体、卵形巴贝斯虫与瑟氏泰勒虫、羊巴贝斯虫未定种与泰勒虫未定种经常发生混感。本实验室先后利用病原感染过程中的潜伏期差异对某些药物的敏感性差异和蜱传播特性的差异等特性, 对混合感染的病原进行了单一分离^[3-6]。

1.5 媒介蜱种类与传播方式的确定

1.5.1 巴贝斯虫的传播试验 给动物静脉接种已知的巴贝斯虫单一感染血液 10mL, 选择适当时机将疑似媒介蜱的饥饿成蜱释放于粘贴在易感动物体表的布袋内使其自行叮咬, 收集在虫血症期间脱落的饱血雌虫, 置 28℃、80%—90%相对湿度下产卵并孵化, 所孵育的下一代幼蜱、若蜱和成蜱分别感染除脾动物, 进行传播试验。

1.5.2 泰勒虫的传播试验 用已知的泰勒虫单一感染血液, 经颈静脉注射感染除脾动物, 待红细胞染虫率达 1%以上时, 将适量媒介蜱的饥饿幼蜱和若蜱分别置于粘贴在动物背部的两个布口袋中, 每天观察叮咬和吸血情况, 收集虫血症期间脱落的饱血幼蜱和若蜱, 置于 28℃、相对湿度 70%条件下进行孵育, 所孵化的饥饿若蜱和成蜱用于蜱传播试验。

1.5.3 感染动物的检查与结果判定 每天对用于蜱感染和传播试验的动物进行体温测定, 并制作血液涂片, 经甲醇固定后进行吉姆萨染色。在光学显

微镜下观察巴贝斯虫和泰勒虫是否出现, 若在动物末梢血液涂片中发现病原, 则认为该试验为阳性结果; 如果在 60d 内未发现任何血液原虫, 则认为该试验为阴性结果。

1.6 锥虫的分离

1.6.1 毛细管分离法 将野外采集的疑似锥虫病的血液接种健康小鼠, 每日在小鼠尾部采集末梢血液, 压片用显微镜检查, 待每视野虫体数约 50—100 个左右时, 颈静脉采血, 用生理盐水稀释至每视野 1 个虫体时, 用毛细管小心吸出视野中活力较好的单个虫体, 置一干净的载玻片, 镜检确认仅为 1 个虫体时, 用该虫体接种小鼠。

1.6.2 结果判定 每日在小鼠尾部采血, 压片检查末梢血液, 若小鼠体内发现锥虫时, 则确认获得单一克隆的地方虫株。

1.7 球虫单一虫株的分离

1.7.1 毛细管分离法 将野外采集的病鸡粪使用饱和盐水反复洗脱漂浮, 收集球虫卵囊, 经培养孢子化后洗净稀释, 用 1.6.1 的方法选取单一孢子化卵囊, 饲喂接种雏鸡。

1.7.2 切胶法 将前述收集的球虫卵囊用生理盐水稀释至每视野约 1 个卵囊, 取约 0.5mL 的卵囊稀释液滴加在事先铺好的 2×YT 平板表面, 用显微镜检查平板, 当只有 1 个孢子化卵囊时, 将该卵囊连同琼脂一起切下, 饲喂接种雏鸡。

1.7.3 感染动物的检查与结果判定 从接种后第 3 天起, 每日收集雏鸡的粪便, 用生理盐水漂浮检查, 待发现卵囊时大量收集。根据球虫的寄生部位、卵囊的形态和大小、卵囊潜在期、症状的轻重程度等特点来判断球虫的种类。雏鸡饲养所用的一切器具、饲料、饮水和周围场地要严格消毒, 清除一切可疑的卵囊, 工作人员在操作时亦要严格注意消毒, 防止混染。

1.8 18S rRNA 测序与进化关系研究

1.8.1 虫体分离与纯化 用保存的各类单一虫体分别接种易感动物, 当染虫率达到一定要求时, 收集相应的材料, 采用低渗裂解、差速离心、超声破碎、研磨等方法分离纯化原虫的裂殖子或孢子囊。

1.8.2 虫体基因组 DNA 的提取 使用博大泰克生物基因技术公司的试剂盒提取 DNA, 按说明书进行操作。

1.8.3 18S rRNA 基因的扩增 由于比较保守, 根据文献上已发表的 18S rRNA 基因序列^[10-12]设计适当引物。PCR 扩增是在 40.88μL 扩增系统中完成,

该系统中含 3.8 μ L 10 倍无 Mg²⁺ PCR 缓冲液, 0.8 μ L 10mmol/L dNTP 混合物, 3.5 μ L MgCl₂, 1.8 μ L 20 pmol/ μ L 上下游引物, 1 μ L DNA 模板, 28 μ L 灭菌去离子水, 0.18 μ L Taq DNA 5 U/ μ L 聚合酶, 选择适当的反应条件在 PCR 扩增仪上进行扩增。

1.8.4 PCR 扩增片段的纯化和回收 按博大泰克生物基因技术公司的 DNA 片段玻璃奶回收试剂盒的使用说明进行。

1.8.5 18S (16S) rRNA 基因的克隆与测序

基因的克隆 将回收的 PCR 产物按试剂盒说明书规定程序连接到 Pgem-T Easy 载体上, 总体积为 10 μ L, 混匀后于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后导入 JM109 感受态细胞, 轻轻地振荡混匀, 冰浴 45min, 42 $^{\circ}$ C 热激

50s, 立即冰浴 2min。然后加入 800 μ L 预热至 37 $^{\circ}$ C 的 SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C 120 r/min 振荡培养 1.5h, 4 $^{\circ}$ C 2900r/min 离心 10min, 弃上清液。混合剩余的培养液和细胞沉淀, 在无菌条件下涂布于含氨苄青霉素 (100 μ g/mL)、16 μ L 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、4 μ L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 的 LB 琼脂平板上, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养 12—16h 后转移至 4 $^{\circ}$ C, 使蓝色充分显现, 挑取白色菌落, 用质粒提取试剂盒纯化质粒, 然后用 EcoR I 酶切鉴定并进一步作 PCR 扩增鉴定。

基因的测序 将酶切和 PCR 扩增鉴定均为阳性的克隆过夜培养, 取 1mL 菌液送大连宝生物工程有限公司用双脱氧链终止法进行测序。

表 1 已分离的各种原虫

Tab. 1 Obtained isolates of Protozoa infective to animal

| 病原 Parasite | 宿主 Host | 分离地区 Area | 传播媒介 Tick vector | 传播方式 Transmission way |
|--|-------------------|--------------|--|---------------------------------|
| 牛巴贝斯虫 <i>Babesia bovis</i> | 牛 Cattle | 河南 Henan | 微小牛蜱 <i>Boophilus microplus</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 双芽巴贝斯虫 <i>Babesia bigemina</i> | 牛 Cattle | 云南 Yunnan | 微小牛蜱 <i>Boophilus microplus</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 大巴贝斯虫 <i>Babesia major</i> | 牛 Cattle | 伊犁 Yili | 刻点血蜱 <i>Haemaphysalis punctata</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 卵形巴贝斯虫 <i>Babesia ovata</i> | 牛 Cattle | 河南 Henan | 长角血蜱 <i>Haemaphysalis longicornis</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 巴贝斯虫未定种 <i>Babesia</i> sp. | 牛 Cattle | 喀什 Kashi | 璃眼蜱未定种 <i>Hyalomma</i> spp. | 经卵传递 Transovarially |
| 环形泰勒虫 <i>Theileria annulata</i> | 牛 Cattle | 宁夏 Ningxia | 残缘璃眼蜱 <i>Hyalomma. detritum</i> | 期间传播 Transtadially |
| 瑟氏泰勒虫 <i>Theileria sergenti</i> | 牛 Cattle | 甘肃 Gansu | 长角血蜱 <i>Haemaphysalis longicornis</i> | 期间传播 Transtadially |
| 中华泰勒虫 <i>Theileria sinensis</i> | 牦牛 Yak | 甘肃 Gansu | 青海血蜱 <i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> | 期间传播 Transtadially |
| 羊巴贝斯虫未定种 <i>Babesia</i> sp. | 绵羊 Sheep | 甘肃 Gansu | 青海血蜱 <i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 巴贝斯虫未定种 <i>Babesia</i> sp. | 绵羊 Sheep | 甘肃 Gansu | 长角血蜱 <i>Haemaphysalis longicornis</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 巴贝斯虫未定种 <i>Babesia</i> sp. | 绵羊 Sheep | 喀什 Kashi | 小亚璃眼蜱 <i>Hyalomma a. anaticum</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 吕氏泰勒虫 <i>Theileria luvenshuni</i> | 绵羊 Sheep | 宁夏 Ningxia | 青海血蜱 <i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> | 期间传播 Transtadially |
| 尤氏泰勒虫 <i>Theileria uilenbergi</i> | 绵羊 Sheep | 甘肃 Gansu | 青海血蜱 <i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> | 期间传播 Transtadially |
| 牛边缘无浆体 <i>Anaplasma marginale</i> | 牛 Cattle | 云南 Yunnan | 微小牛蜱 <i>Boophilus microplus</i> | 机械传播 Mechanical transmission |
| 羊无浆体 <i>Anaplasma ovis</i> | 绵羊 Sheep | 甘肃 Gansu | 长角血蜱 <i>Haemaphysalis longicornis</i> | 机械传播 Mechanical transmission |
| 弩巴贝斯虫 <i>Babesia caballi</i> | 马 Horse | 甘肃 Gansu | 草原革蜱 <i>Dermacentor nuttalis</i> | 经卵传递 Transovarially |
| 马泰勒虫 <i>Theileria equi</i> | 马 Horse | 吉林 Jilin | 草原革蜱 <i>Dermacentor nuttalis</i> | 期间传播 Transtadially |
| 弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i> | 绵羊 Sheep | 甘肃 Gansu | 人和各种哺乳动物 Human and mammalian | 垂直传播 Vertical transmission |
| 柔嫩艾美耳球虫 <i>Eimeria tenella</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 巨型艾美耳球虫 <i>Eimeria maxim</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 堆型艾美耳球虫 <i>Eimeria acervulina</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 毒害艾美耳球虫 <i>Eimeria necatrix</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 布氏艾美耳球虫 <i>Eimeria brunetti</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 和缓艾美耳球虫 <i>Eimeria mitis</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 早熟艾美耳球虫 <i>Eimeria praecox</i> | 鸡 Fowl | 甘肃 Gansu | 无 No | 饮食传播 Dietetic spread |
| 马媾疫锥虫 <i>Trypanosoma equiperdum</i> | 马 Horse | 甘肃 Gansu | 无 No | 交配传播 Mating transmission |
| 伊氏锥虫 <i>Trypanosoma evansi</i> | 马 Horse | 广西 Guangxi | 虻 Horse fly | 唾液传播 Saliva transmission |
| 刚果锥虫 <i>Trypanosoma gongoense</i> | 牛 Cattle | 美国 America | 采采蝇 Tsetse fly | 唾液传播 Saliva transmission |
| 布氏锥虫 <i>Trypanosoma brucei brucei</i> | 牛 Cattle | 美国 America | 采采蝇 Tsetse fly | 唾液传播 Saliva transmission |
| 家蚕微孢子虫 <i>Nosema bombycis</i> | 家蚕 Bombyx mori | 重庆 Chongqing | 无 No | 经卵传递 Transovarially |

序列的连接及分析 利用 DNASTar 软件将所测得的序列片断连接到一起, 并进行比较分析, 确定虫株之间的亲缘关系, 用所测得的我国牛羊梨形虫虫株和 GenBank 上下载的梨形虫代表虫株的 18S rRNA 基因序列构建泰勒虫和巴贝斯虫的系统进化树。

2 结果

2.1 病原的分离

目前共分离、收集到 7 个目、8 个科、30 多个种原虫的 160 多个不同地区分离株, 其中牛羊梨形虫 13 个种 (含 5 个新种、2 个新记录) 100 多个地方株, 牛羊无浆体 2 个种 20 多个地方株, 马的梨形虫 2 个种 5 个地方株, 锥虫 4 个种 9 个地方株, 球虫 7 个种 11 个地方株, 弓形虫 1 个种 5 个地方株, 微孢子虫 1 个种, 收集的种类(表 1)。

2.2 媒介蜱的种类与传播方式

主要研究确定了大部分梨形虫及无浆体的媒介蜱种类, 并通过试验证实了媒介蜱的传播方式及传播阶段, 表明巴贝斯属的原虫是被媒介蜱以经卵传递的方式传播, 泰勒属的原虫以阶段性方式进行传播 (表 1)。

2.3 原虫 18S rRNA 测序与进化关系研究

18S (16S) rRNA 序列 巴贝斯虫和泰勒虫 18S rRNA 基因的全长为 1653—1699bp 之间, 泰勒虫 18S rRNA 基因的全长为 1740bp, 艾美耳球虫 18S rRNA 基因的全长为 1488—1704bp 之间, 无浆体 16S rRNA 基因的全长为 1425bp。

进化关系研究 图 1 中包括了对牛、羊、马、犬、鹿和鼠具有感染性的 26 株巴贝斯虫, 为便于结果的分析, 将其人为划分为 7 个大枝: 第 1 枝由 4 株牛的卵形巴贝斯虫 (*B. ovata*)、2 株双芽巴贝斯虫 (*B. bigemina*) 和 2 株羊的莫氏巴贝斯虫 (*B. motasi*) 组成, 第 2 枝由 1 株羊的粗糙巴贝斯虫 (*B. crassa*)、1 株羊巴贝斯虫未定种 (*B. sp. Turkey*) 和 1 株牛的大巴贝斯虫 (*B. major*) 组成, 第 3 枝包括 2 株牛的分歧巴贝斯虫 (*B. divergens*)、1 株白尾鹿的空齿鹿巴贝斯虫 (*B. odocoili*)、1 株吉氏巴贝斯虫 (*B. gibsoni*) 和 1 株犬巴贝斯虫 (*B. canis*), 第 4 枝由 2 株牛的巴贝斯虫未定种 (*B. sp.*) 和 1 株马的弩巴贝斯虫 (*B. caballi*) 构成, 第 5 枝包括田鼠巴贝斯虫 (*B. microti*) 和罗氏巴贝斯虫 (*B. rodhaini*) 各 1 株, 第 6 枝仅有绵羊巴贝斯虫 (*B. ovis*) 1 个种, 第 7 枝由 4 株牛巴贝斯虫 (*B. bovis*) 组成。我国分离的牛的巴贝斯虫分别分布于第 1 枝、第 2 枝、第 4 枝和第 7 枝。

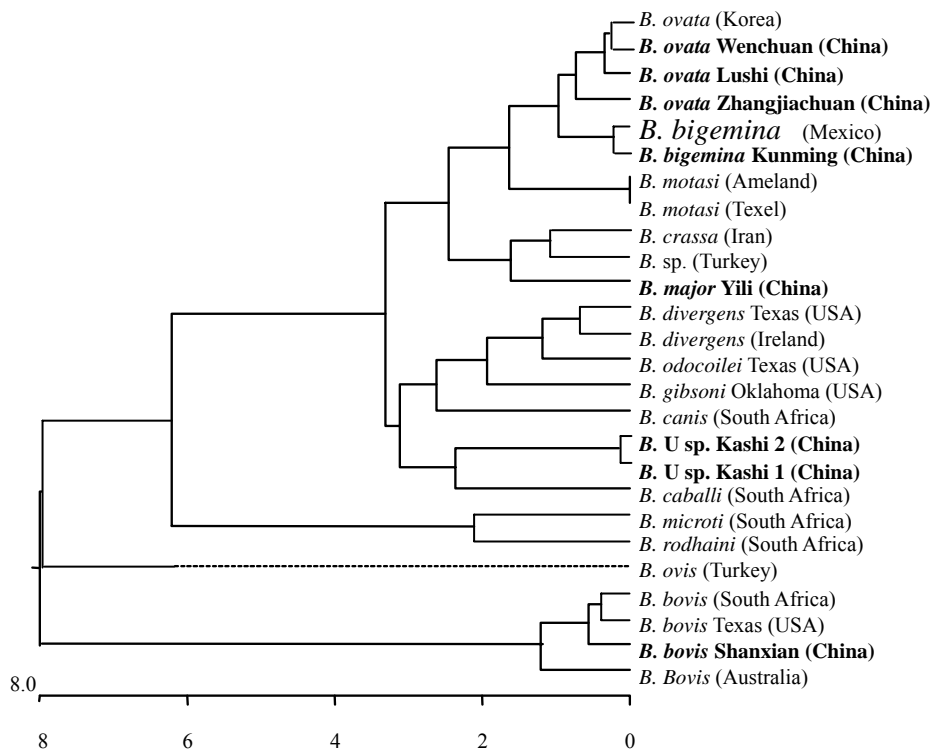


图 1 巴贝斯虫的进化树

Fig. 1 Rooted neighbor-joining phylogenetic tree of the 18S rRNA gene of Chinese *Babesia* spp. And some valid *Babesia* species available in GenBank

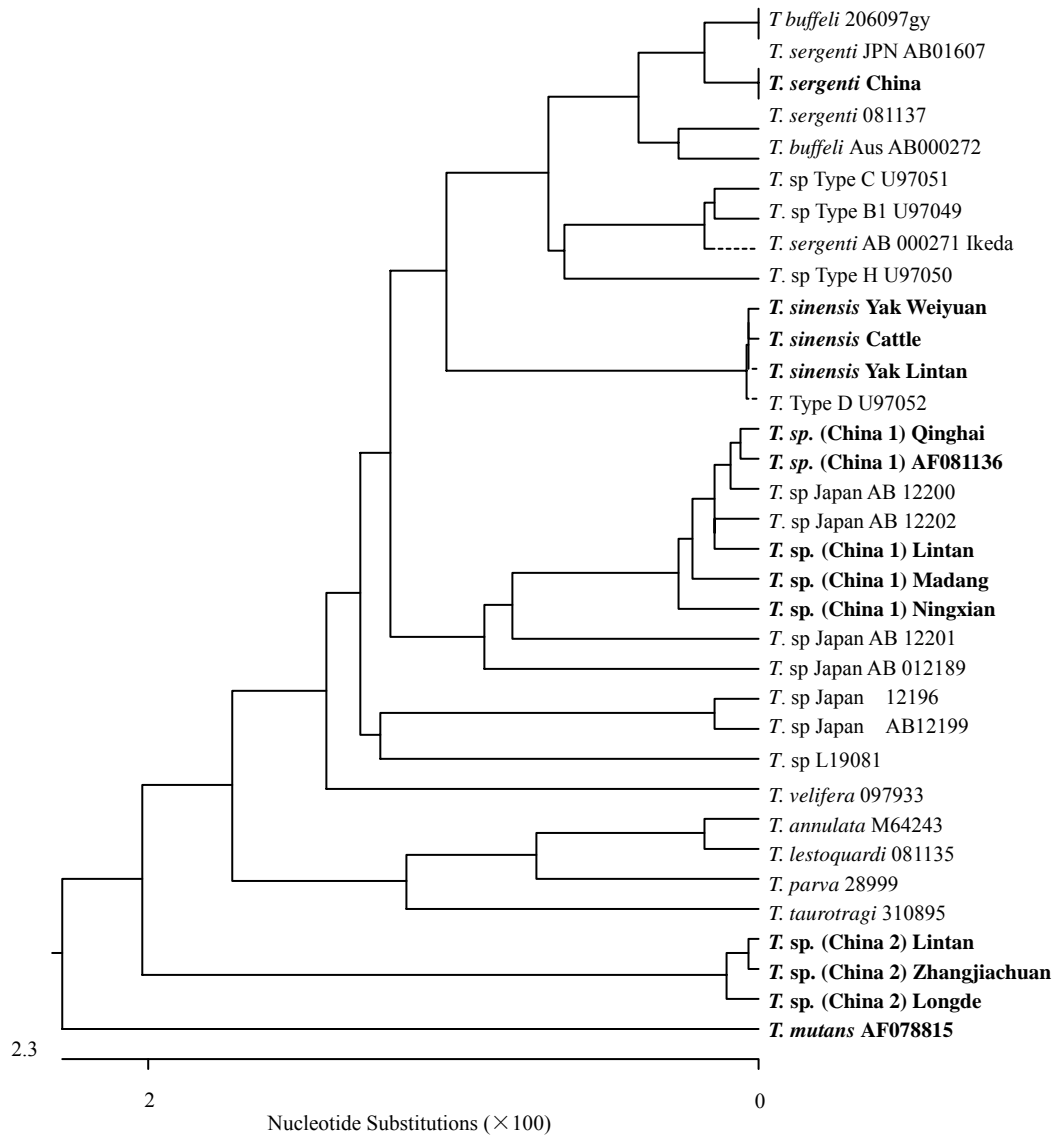


图 2 牛羊泰勒虫的进化树

Fig. 2 Rooted neighbor-joining phylogenetic tree of the 18S rRNA gene of Chinese *Theileria* sp., closest homology and some valid *Theileria* species available in GenBank

图 2 由来自国内外的 34 株动物泰勒虫组成，它们大体可分成 6 个分枝，我国的瑟氏泰勒虫 (*T. sergenti*) 和中华泰勒虫 (*T. sinensis*) 位于第 1 枝上，主要为病原性较弱的泰勒虫，这 1 枝还包括来自日本的瑟氏泰勒虫、澳大利亚的水牛泰勒虫；羊泰勒虫未定种被分成 2 组，第一组与 2 个由日本分离的能感染野山羊的泰勒虫未定种 (AB12201 和 AB012189) 同位于第 2 枝，第二组与牛的突变泰勒虫共同构成第 6 枝。

3 讨论

本文对我们在原虫病病原收集与鉴定方面所

做的工作进行了总结，结果显示：采用血液注射或蜱传播方法可自野外收集病原，并可用单一种分离技术获得某种原虫的单一种；通过蜱传播试验，确定了大部分已报道的梨形虫病的媒介蜱；通过传统分类方法（主要包括病原的形态、致病性、传播媒介与传播方式、生活史等）与分子生物学技术相结合的方法，对梨形虫进行正确的分类；对存在较大争议的羊泰勒虫和牛的巴贝斯虫，进行了 18S rRNA 基因测序研究，澄清了一些学术问题。

在我国，巴贝斯虫病原分类方面存在争议较大的是：由长角血蜱传播的一种牛的大型巴贝斯虫应鉴定为大巴贝斯虫还是卵形巴贝斯虫？璃眼蜱传

播的牛的巴贝斯虫是否为一个独立的种?以国外的文献记载为依据^[13],从生物学角度出发,由长角血蜱传播的卢氏株和张家川株应被命名为卵形巴贝斯虫,并且已将卵形巴贝斯虫卢氏株与日本的卵形巴贝斯虫标准虫株进行了比较,证实它们的形态和血清反应特性极为相似^[14];而由刻点血蜱传播的伊犁株则应命名为大巴贝斯虫。已有学者通过试验证明刻点血蜱既能传播卵形巴贝斯虫河南株,也能传播大巴贝斯虫伊犁株^[15],也就是说,刻点血蜱既可作为大巴贝斯虫的传播媒介,也可作为卵形巴贝斯虫的传播媒介。进化关系研究显示:长角血蜱传播分离的卵形巴贝斯虫与韩国报道的卵形巴贝斯虫处于同一分枝,说明它们属于同一个种。刻点血蜱传播的大巴贝斯虫单独成一枝,并且它们之间被莫氏巴贝斯虫(*B. motasi*)和粗糙巴贝斯虫(*B. crassa*)分开,说明大巴贝斯虫和卵形巴贝斯虫在分子生物学特性上确实存在明显区别,为两个独立的有效种。前者分布于我国的河南、甘肃、四川、辽宁等有长角血蜱分布的地区,而后者由刻点血蜱传播,仅分布于我国的新疆。由璃眼蜱传播的牛的巴贝斯虫国外已有报道,它们分别为:在前苏联报道的由小亚璃眼蜱(*Hyalomma anatolicum anatolicum*)传播的别氏巴贝斯虫(*B. beliceri*)^[16],在南非分离定名的由边缘麻点璃眼蜱(*Hy. marginatum rufipes*)传播的隐藏巴贝斯虫(*B. occultans*)^[17]。2002年用自新疆野外收集的小亚璃眼蜱分离发现了一种对牛具有感染性的巴贝斯虫^[18],并且通过蜱传播试验证实,该巴贝斯虫可被在我国北方广泛分布的小亚璃眼蜱、残缘璃眼蜱和麻点璃眼蜱经卵传播,不能通过阶段性方式传播,也不能被微小牛蜱(*Boophilus microplus*)和长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)传播^[19]。这在一定程度上证明该巴贝斯虫未定种与业已报道的巴贝斯虫存在明显不同,与别氏巴贝斯虫及隐藏巴贝斯虫之间的分类关系尚不清楚。这3种巴贝斯虫具有几个相似的特性,如:它们的媒介蜱均为璃眼蜱属的蜱种,均具有相对较弱的致病性等;但它们也确实存在着某些差异,尤其是在虫体大小上^[17,20]。此外,有学者在尼日利亚的5种璃眼蜱(*Hy. Impeltatum*、*Hy. Impressum*、*Hy. Marginatum*、*Hy. rufipes*和*Hy. truncatum*)饱血雌蜱的血淋巴中均发现了与隐藏巴贝斯虫形态相似的大裂殖体,但它们之间的分类关系尚未确定^[21];在南非,一个巴贝斯虫未定种被报道,该病原可被*Hy. truncatum*传播,而不能被边缘

麻点璃眼蜱传播,似乎也应为独立种^[22]。因而,要阐明璃眼蜱属蜱种传播的牛的巴贝斯虫虫株之间的分类关系,通过测定它们的18S rRNA基因序列,开展分子分类学研究可能是一个捷径,当然,必须将其与传统分类学研究方法相结合。本研究开展的牛的巴贝斯虫系统发生关系研究表明:璃眼蜱传播的牛的巴贝斯虫未定种与马的弩巴贝斯虫分布于同一枝上,且与其他牛巴贝斯虫有效种之间被多种动物巴贝斯虫隔离开,与双芽巴贝斯虫昆明株、牛巴贝斯虫陕县株、大巴贝斯虫伊犁株、卵形巴贝斯虫卢氏株、卵形巴贝斯虫张家川株和卵形巴贝斯虫汶川株之间的同源性均小于91.8%,说明至少在我国是一个新发现的病原。但由于别氏巴贝斯虫、隐藏巴贝斯虫及非洲的巴贝斯虫未定种的18S rRNA基因序列测定工作尚未开展,暂无法确定其与国外报道的由璃眼蜱传播的牛的巴贝斯虫种类之间的关系。综上所述,依据分子分类学研究结果,我国牛巴贝斯虫病病原可分为5个种,即牛巴贝斯虫、双芽巴贝斯虫、大巴贝斯虫、卵形巴贝斯虫和巴贝斯虫未定种。

在泰勒虫病原学研究中,争论的焦点为羊泰勒虫和中华泰勒虫的分类问题。自从1958年在我国四川报道羊的泰勒虫病以来^[23],由于该泰勒虫具有较强的致病性,人们普遍认为在我国的泰勒虫为莱氏泰勒虫(原名为*T. Hirsi*,现名为*T. lestoquardi*),但也注意到它们之间也确实存在着很大不同。如:我国流行的羊泰勒虫传播媒介为青海血蜱^[24],而在中东、北非等地莱氏泰勒虫的媒介蜱为小亚璃眼蜱;我国流行的羊泰勒虫难于在体外进行裂殖体培养(与瑟氏泰勒虫相似),而莱氏泰勒虫则易于培养(与环形泰勒虫相似)。中华泰勒虫(*T. sinensis*)虽然在形态上和生物学上与环形泰勒虫、瑟氏泰勒虫、小泰勒虫、突变泰勒虫、斑羚泰勒虫、附膜泰勒虫存在明显差别,但由于它们的媒介蜱均为血蜱属的蜱种(瑟氏泰勒虫的传播媒介为长角血蜱,中华泰勒虫的传播媒介为青海血蜱),要确定其独立的分类地位,仍需提供新的证据。本实验室开展的梨形虫系统发生关系研究表明:中华泰勒虫虽然与瑟氏泰勒虫、水牛泰勒虫的亲缘关系较近,但它与同一枝上其他泰勒虫的差别大于瑟氏泰勒虫和水牛泰勒虫这两个独立种之间的差异,因而它可能为一个独立的种。我国流行的羊泰勒虫可分为两组,一组位于进化树的第二枝,另一组位于第四枝,它们之间被国际公认的环形泰勒虫、小泰勒虫和莱氏

泰勒虫隔离开来,因而它们极可能是两个新的梨形虫种类,但由于尚缺乏病原生物学证据,因而暂将它们设计为 *Theileria* sp. China 1 和 *Theileria* sp. China 2^[7]。

资源库现收集、分离、鉴定与保藏的原虫涉及 7 个目、8 个科、30 多个种的 160 多个地方虫株,涵盖 20 多个省市,基本包括了我国已报道的绝大多数重要原虫。对虫种资源从分离技术、保藏方法、病原形态学、致病性、生活史等普通生物学,到 18S rRNA 的基因序列测定及某些基因的克隆表达的分子生物学技术等全方位的研究,初步建成了国内较大的原虫活虫种库。

家畜原生动物病原收集与鉴定工作是开展原虫病防治技术研究的基础。本实验室将继续加强这一领域的工作,加强病原分类鉴定技术研究,建立我国家畜原生动物病原资源平台,并对现有资源进行了初步的规范化和标准化整理,为社会提供更加规范的原虫虫种资源,以及准确、丰富的数据信息,建成具有远程信息查询功能的数据库,极大地提高实物与信息共享水平。为科学研究提供统一有效的研究信息和全面的研究材料保障。对动物疫病预防、畜牧业健康发展、微生物资源有效利用、推动科学教育的发展和进步有着十分重要的意义。同时,更好地为教学、科学研究和疫病防治实践服务。

参考文献:

- [1] Levine N D, *et al.* A newly revised classification of the Protozoa [J]. *J. Protozoology*, 1980, **27**: 37—58
- [2] Jiang J S. *Veterinary Protozoology* [M]. Beijing: China Agricultural University Press. 2000 [蒋金书. 动物原虫病学. 北京: 中国农业大学出版社. 2000]
- [3] Bai Q, Yin S X, Chen Z H, *et al.* Studies on isolation and preservation of a single species of Haematocytocoon in Bocine: Isolation of pure strain of *Babesia bigemina* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1987, **9**: 25—27 [白启, 尹世兴, 陈震环. 双芽巴贝斯虫纯种虫株的分离. 中国兽医科技, 1987, **9**: 25—27]
- [4] Bai Q, Liu G Y, Zhou J Y, *et al.* Studies on isolation and preservation of a single species of Haematocytocoon in Bocine: Isolation of pure strain of *Babesia bovis* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1991, **1**: 20—22 [白启, 刘光远, 周俊英, 牛巴贝斯虫纯种虫株的分离. 中国兽医科技, 1991, **1**: 20—22]
- [5] Bai Q, Liu G Y, Zhang L, *et al.* Findings and isolation of a single species of *Babesia ovata* in China [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1990, **16**(12): 2—4 [白启, 刘光远, 张林. 卵形巴贝斯虫在我国的发现及分离. 中国兽医杂志, 1990, **16**(12): 2—4]
- [6] Bai Q, Liu G Y, Zhang L, *et al.* Studies on isolation and preservation of a single species of Haematocytocoon in Bocine [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1992, **25**(1): 83—88 [白启, 刘光远, 张林, 等. 牛血孢子虫单一种的分离技术及其保藏方法的研究. 中国农业科学, 1992, **25**(1): 83—88]
- [7] Yin H, Luo J X, Schnittger L. Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis* [J]. *Parasitol Res.*, 2004, **92**(1): 36—42
- [8] Luo J X, Yin H, Liu G Y, *et al.* Studies on comparison of 18S rRNA gene sequences of *Babesia* species infective to cattle [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2005, **36**(9): 906—911 [罗建勋, 殷宏, 刘光远, 等. 牛的巴贝斯虫 18S rRNA 基因序列比较研究. 畜牧兽医学报, 2005, **36**(9): 906—911]
- [9] Luo J X, Wang Z K, Shen Y L. Studies on in vitro culture of *Trypanosoma evansi* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1991, **7**: 4—7 [罗建勋, 汪志楷, 沈永林. 伊氏锥虫体外培养的研究. 中国兽医科技, 1991, **7**: 4—7]
- [10] Bai Q, Liu G Y, Yin H, *et al.* *Theileria sinensis* sp nov: A new species of Bovine *Theileria*-Molecular Taxonomic studies [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2002, **33**(2): 185—190 [白启, 刘光远, 殷宏, 等. 牛中华泰勒虫新种—II 分子分类学研究. 畜牧兽医学报, 2002, **33**(2): 185—190]
- [11] Yin H, Luo J X, Schnittger L. Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis* [J]. *Parasitol Res.*, 2004, **92**(1): 36—42
- [12] Luo J X, Yin H, Guan G Q. A comparison of small-subunit ribosomal RNA gene-sequence of bovine *Babesia* species transmitted by *Haemaphysalis* spp. in China [J]. *Parasitol Res.*, 2005, **95**(2): 145—149
- [13] Minami T, Ishihara T. *Babesia ovata* sp.n. isolate from cattle in Japan [J]. *Natl Inst Anim Health*, 1980, **20**: 101—113
- [14] Seiich Higuchi, Bai Q, Liu G Y, *et al.* Studies on *Babesia* sp. isolated from cattle in Henan, China [J]. *Bulletin of Veterinary College Of PLA*, 1991, **11**(1): 63—67 [樋口诚一, 白启, 刘光远, 等. 对分离于中国河南的一株牛的巴贝西原虫的鉴定. 兽医大学学报, 1991, **11**(1): 63—67]
- [15] Yin H, Lu W S, Luo J X, *et al.* Experiments on the transmission of *Babesia major* and *Babesia bigemina* by *Haemaphysalis punctata* [J]. *Vet Parasitol*, 1996, **67**: 89—98
- [16] Chaudhri R P, Gill B S, Khan N H. Studies on transmission of

- Babesia bigemina* [J]. *Ann Soc Belg Med Trop*, 1975, **55**: 327—332
- [17] Gray J S, De Vos A J. Studies on a bovine *Babesia* transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 1981, **48**: 215—223
- [18] Luo J X, Yin H, Guan G Q, *et al.* Description of a new *Babesia* sp. infective for cattle in China [J]. *Parasitol Res.*, 2002, **88**: S13—S15
- [19] Luo J X, Chen F Y, Lu W S, *et al.* Experimental transmission of an unnamed bovine *Babesia* by *Hyalomma* spp., *Haemaphysalis longicornis* and *Boophilus microplus* [J]. *Vet Parasitol*, 2003, **116**: 115—124
- [20] Mamatkulov S S. On the transovarial transmission of blood parasites by the tick *Hyalomma anatolicum* [J]. *Veterinariya*, 1970, **47**: 59
- [21] Dipeolu O O, Amoo A. The presence of kinetes of a *Babesia* species in the hemolymph smears of engorged *Hyalomma* ticks in Nigeria [J]. *Vet Parasitol*, 1984, **17**: 41—46
- [22] De Waal D T, Potgieter F T, Combrink M P, *et al.* The isolation and transmission of an unidentified *Babesia* sp. to cattle by *Hyalomma truncatum* Koch 1844 [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 1990, **57**: 229—232
- [23] Yang F G, Feng Z G, Yu G H, *et al.* Report of *Theilia ovis* of Qianning county, Sichuan Province [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1958, (2): 33—37 [杨辅国, 冯泽光, 余广海, 等. 甘孜藏族自治州乾宁农牧站绵羊泰勒焦虫病报告. 中国兽医杂志, 1958, (2): 33—37]
- [24] Yin H, Luo J X, Guan G Q, *et al.* Experiments on transmission of an unidentified *Theileria* sp. to small ruminants with *Haemaphysalis qinghaiensis* and *Hyalomma anatolicum anatolicum* [J]. *Vet Parasitol*, 2002, **108**: 21—23

ESTABLISHMENT OF VETERINARY PROTOZOA GERMPLASM RESOURCE INFRASTRUCTURE AND COLLECTION AND IDENTIFICATION OF RESOURCE

LIU Guang-Yuan, YIN Hong, LUO Jian-Xun, TIAN Zhan-Cheng and BAI Qi

(State Key Laboratory on Veterinary Etiology & Gansu Provincial Key Laboratory of Veterinary Parasitology,

Lanzhou Veterinary Research Institute, CAAS, Gansu 730046)

Abstract: To collect, isolate, identify and preserve the major prevalent protozoa in China with biological method and to describe the common methods of collection and identification of protozoa and to introduce the species, vectors and transmission mode of protozoa. The protozoa were isolated from field animal blood, vectors, pathogenic tissue and secretions. Based on differences of the pathogen morphology, vector species, experimental infected animals, single parasite clone and parasitic tissues, protozoiasis pathogens from different areas and animals in China were isolated and the vectors and transmission mode were also determined by vector transmission trial. Sequence analysis of 18S rRNA gene was used to study the phylogeny of partial isolated protozoa. Protozoa from 7 orders, 8 families, and more than 30 species including almost 160 strains from different areas were collected, isolated, identified and preserved. The alive protozoa library was established and studied on isolated techniques, preservation methods, morphology, pathogenicity, life cycle, 18S rRNA gene sequence analysis and gene cloning and expression techniques were performed on protozoa germplasm resource. Protozoa were effectively isolated by blood inoculation, vector transmission, single strain cloning and tissue infection. The classical taxonomic methods and phylogeny analysis could be used to identify the protozoa species accurately.

Key words: Protozoa; Germplasm resource library; Collection; Identification; 18S rRNA gene