

# 鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的构建及致病性研究<sup>\*</sup>

林 青, 于三科, 陈秀荔, 潘广林, 王建锋, 李 涛

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 构建了一种新的鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术, 并对杨陵柔嫩艾美耳球虫地理株进行了分离, 对继代增殖的纯种卵囊进行了致病性试验。结果表明, 该单卵囊分离技术简单易行, 单卵囊感染成功率可达40%; 该虫株对雏鸡有很强的致病性, 经口接种  $1 \times 10^5$  个孢子化卵囊, 致死率高达80%。

[关键词] 柔嫩艾美耳球虫; 单卵囊分离技术; 致病性; 鸡

[中图分类号] S858.315.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0035-03

鸡球虫分布广、危害大, 严重威胁养禽业的发展, 特别对于雏鸡, 常常是毁灭性的。集约化养鸡场是球虫病暴发的最适宜场所, 其发病率为50%~70%, 死亡率20%~30%, 严重时高达80%<sup>[1]</sup>。在各种鸡病中, 球虫病的发生率最高<sup>[2]</sup>, 占1/6~1/5<sup>[3]</sup>。据Bhogal等<sup>[4]</sup>报道, 全世界每年因鸡球虫病造成的损失达20亿美元, 抗球虫药的年消费为3.2亿美元。随着养鸡业的不断发展, 这一数据还呈加倍上升趋势。我国年支出抗球虫药费用6~18亿元, 迄今为止, 控制球虫病的主要手段仍然是化学药物防治。由于耐药性与药物残留两大问题的日趋严重<sup>[5~11]</sup>, 免疫预防研究引起了广泛重视<sup>[12]</sup>。随着生物技术的迅速发展, 国内外学者对鸡球虫病及其病原的研究更加深入。在生产中, 鸡球虫呈混合感染, 为了研究方便及结果的准确性, 往往要求纯种株, 这就需要采取某些试验手段将混合的不同艾美耳球虫(*Eimeria*)分离开来, 人们曾将卵囊通过连续的蔗糖质量浓度梯度离心纯化, 最后用次氯酸钠处理<sup>[13]</sup>, 该方法能够从粪便中分离大量孢子化的卵囊, 但不能保证所获得的卵囊为完全意义上的纯种。因此, 有必要寻找一种简便、实用、准确而经济的单卵囊分离技术。

## 1 材料与方法

**试验动物** 刚孵出的尼克红小公雏, 购自西北农林科技大学畜牧站鸡场, 在严格消毒的无球虫环境中饲养。试验前检查球虫卵囊, 未发现球虫感染。

标记管、取样器 均为实验室自制。

**卵囊培养** 在对杨陵鸡球虫病原种类进行全面调查的基础上, 采集感染强度较高的新鲜鸡粪样, 加入质量分数2.5%重铬酸钾溶液浸泡搅匀, 放入(27±1)℃恒温箱中培养(每天搅动1~2次, 并加入适量重铬酸钾溶液, 以防干涸), 直至80%以上的球虫卵囊孢子化。置4℃冰箱中保存备用。

**琼脂板制备** 琼脂粉, 北京奥博星生物技术责任有限公司, 批号20000801。按质量分数2%的比例加入蒸馏水中, 水浴加热使其熔化, 观察其透明澄清时即可, 然后匀速倾倒在载玻片上, 制成琼脂板, 注意保持均匀, 厚度约3mm。将制好的琼脂板放在大平皿中加水加盖置于4℃冰箱中, 以防变干。

**单卵囊选择** 取已孢子化的卵囊粪样少许, 用饱和蔗糖水漂浮15min, 用吸管吸取上清液表层溶液, 均匀滴在制好的琼脂板上, 放在显微镜下观察, 确定为孢子化的柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)单卵囊时, 用自制的标记管做好标记。

**雏鸡分组与单卵囊感染** 选取20羽14日龄体重相近的尼克红小公雏, 分为2组, 每组10羽, 其中1组做为空白对照, 另1组从1~10依次编号, 用自制取样器取出标记好的孢子化单卵囊。依次经口投服给无球虫雏鸡, 然后单个分离饲养于严格消毒的笼舍中, 饲料和饮水均严格消毒, 收集感染后6~8d新鲜粪便, 若发现有卵囊, 将其培养至孢子化。

**继代增殖** 用孢子化的第一代卵囊感染14~

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2002-01-09

[作者简介] 林 青(1972-), 男, 陕西吴旗人, 讲师, 在职硕士, 主要从事家畜寄生虫学的教学与研究工作。

20 日龄无球虫雏鸡, 收集感染后 6~8 d 粪样进行卵囊培养, 再感染雏鸡。同样方法, 连续若干代次, 直至收集到大量 *E. tenella* 卵囊, 孢子化后保存备用。

**致病性试验** 用单卵囊分离技术分离纯化的 *E. tenella* 进行致病性试验。取纯化的孢子化卵囊, 离心(3 000 r/min, 10 min), 水洗 3 次, 去除重铬酸钾, 垂悬定容, 血球计数器计数, 调整至含孢子化卵囊  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>。选取 60 羽无球虫 14 日龄尼克红小公雏, 逐只称重, 随机分为两组, 并适当调整各组体重, 使其相近, 每组 30 羽, 一组做不感染空白对照, 另一组每羽鸡经口一次接种感染纯化的孢子化卵囊  $1 \times 10^5$  个(0.1 mL)。接种后每日观测鸡的精神状态、食欲和粪便情况, 记录并剖检死亡鸡。感染后第 8 天剖杀全部试验鸡, 按 Johnson 等<sup>[14]</sup>所描述的方法进行盲肠病变记分。对感染后死亡的鸡, 随时称重, 剖检, 查明死亡原因。凡因球虫病死亡者, 病变记 4 分。收集各组鸡盲肠及其内容物, 分别置组织匀浆器内匀浆, 血球计数器计数每组每羽鸡平均盲肠卵囊产量(Oocysts per gram feces, OPG)<sup>[5~6]</sup>。

表 1 YL<sub>1</sub> 纯种 *E. tenella* 株致病性试验结果

Table 1 The result of the pathogenic assay with *E. tenella* YL<sub>1</sub> strain

| 组别<br>Group                | 试验鸡数<br>Chicken<br>number | 存活数<br>Survival<br>number | 存活率/%<br>Survival<br>rate | 试验始重/g<br>First<br>weight | 末重/g<br>Final<br>weight | 增重/g<br>Weight<br>gain | 相对增重/%<br>Relative<br>weight<br>gain rate | 盲肠病变记分<br>Lesion<br>score<br>(1- 4) | 卵囊数<br>Oocyst<br>number |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 感染组<br>Challenged<br>group | 30                        | 6                         | 20                        | 52.7                      | 82.3                    | 29.6                   | 76.9                                      | 3.5                                 | 3 665                   |
| 对照组<br>Control<br>group    | 30                        | 30                        | 100                       | 52.5                      | 91.0                    | 38.5                   | 100                                       | 0                                   | 0                       |

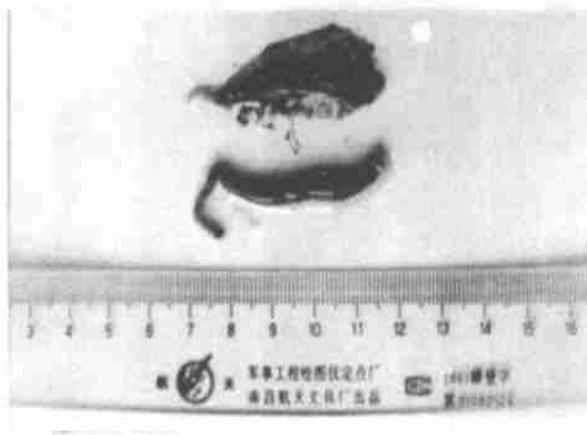


图 1 感染 YL<sub>1</sub> 株 *E. tenella* 雏鸡盲肠内的血凝栓

Fig. 1 Cecal core in chicken challenged with *E. tenella* YL<sub>1</sub> strain

从表 1 可以看出, YL<sub>1</sub> 株 *E. tenella* 毒力很强, 每羽鸡感染  $1 \times 10^5$  个卵囊, 死亡率可达 80%。鸡死

## 2 结果与分析

### 2.1 单卵囊感染结果

空白对照组 10 羽鸡在试验期间均未查出球虫卵囊, 而单卵囊感染组 10 羽鸡在试验期间共有 4 羽查出了卵囊, 即球虫卵囊检出率为 40%, 经统计, 查出卵囊的 4 羽鸡新鲜粪样中卵囊值平均约为 45 OPG。试验组和对照组体重无明显差异。

### 2.2 继代增殖与虫种鉴定结果

将查出卵囊的雏鸡粪样分别培养至卵囊孢子化后, 离心水洗 3 次除去重铬酸钾, 然后加少许生理盐水吹打均匀, 再喂给 14 日龄无球虫雏鸡, 收集感染后 6~8 d 粪样培养, 再感染雏鸡。同样方法, 连续增殖至第六代。经实验室鉴定(从形态学、卵囊大小、形态指数、孢子化时间等指标)和潜隐期分析, 确定为纯种 *E. tenella*, 分别命名为 YL<sub>1</sub>, YL<sub>3</sub>, YL<sub>4</sub>, YL<sub>8</sub> 株。

### 2.3 YL<sub>1</sub> 纯种株致病性试验结果

用 YL<sub>1</sub> 纯种 *E. tenella* 株做致病性试验, 结果见表 1。

亡多发生在感染后 5~7 d, 多数鸡呈现精神萎靡, 翅膀下垂, 闭眼缩脖, 卧地昏睡, 畏寒颤抖, 嗦囊胀满, 不食不饮, 体温下降, 下痢, 血便并出现严重贫血, 最后死亡; 只有少数鸡症状稍轻, 可以耐过, 但均有少量血便。剖检查看病理变化, 发现存活鸡表现盲肠粘膜稍增厚, 有少数散在性出血或少量肠芯; 死亡鸡两根盲肠显著肿大, 比正常鸡大 3~5 倍, 肠内充满凝固的或暗红色血液, 盲肠上皮变厚并有糜烂, 盲肠粘膜可见出血斑, 引起粘膜出血及坏死, 肠内容物血样内含坏死剥落的粘膜, 或为混有血液的干酪样凝栓(图 1)。其余肠段未见异常。

## 3 讨论

鸡球虫种类较多, 而且多呈混合感染, 杨陵鸡球虫混合感染发生率为 100%<sup>[15]</sup>, 这给研究带来了不便, 为此, 人们在不断探索如何能分离出纯种的球虫

株。作者曾采用 96 孔 U 型医用血凝滴定板等稀释法, 将孢子化卵囊稀释以后加入 96 孔血凝板中, 并在显微镜中观察, 选取只有 1 个卵囊的孔, 并用吸管吸取后经口接种于鸡。由于卵囊在吸取和接种过程中可能粘在孔壁或吸管壁上而导致接种过程失败, 成功率极低, 给试验带来很大不便。本试验所采用的琼脂板法单卵囊分离新技术, 可将孢子化卵囊与周围的琼脂一块喂给雏鸡, 使成功率大大提高, 达到 40%。这不但完全可以满足研究要求, 而且较前人所用方法精确, 纯度可达 100%, 加之试验操作简便,

适合普通实验室进行分离。作者认为, 该法确为一种好方法。

为保证试验的成功率, 在操作过程中一定要注意饲养环境卫生, 饲料、饮水等均应严格消毒, 及时清除粪便, 试验用雏鸡均应单只分离饲养, 以防鸡食入球虫卵囊。

从 YL<sub>1</sub> 株 *E. tenella* 致病性结果来看, 该虫株毒力很强, 对养鸡业危害很大, 应该引起人们足够的重视。该虫株的生物学特性还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 孔繁瑶 家畜寄生虫学[M] 第2版 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [2] Biggs P M. The world of poultry diseases[J]. Avian Pathology, 1982, 11: 218- 300
- [3] 左仰贤 球虫学——畜禽和人体的球虫与球虫病[M] 天津: 天津科学技术出版社, 1991. 11.
- [4] Bhogal B S, Miller G A. Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for one-day-old broiler chickens against *E. acervulina* and *E. tenella* infections[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1992, 31: 323- 335
- [5] 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性调查[J]. 北京农业大学学报, 1994, 20(3): 302- 308
- [6] 汪 明, 孔繁瑶, 殷佩云, 等 10 株柔嫩艾美耳球虫对四种药物的抗性检测[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5): 110- 114
- [7] 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: 1404- 1408
- [8] McDougald L R, Fuller L, Solis J. Drug sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler flocks[J]. Avian Disease, 1986, 30(4): 690- 694
- [9] Stallbaumer M, Daisy K J. The effects of monensin, narasin, salinomycin and nicarbazin of field strains of chicken coccidia[J]. Avian Pathology, 1988, 17: 793- 801
- [10] McDougald L R, D'Silva J M L D, Solis J, et al A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina[J]. Avian Diseases, 1987, 31(2): 287- 292
- [11] 黄 兵, 赵其平, 吴薛忠, 等 上海地区鸡球虫对 6 种抗球虫药的抗药程度研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2001, 9(2): 1- 7
- [12] 林 青, 于三科 鸡艾美耳球虫病免疫研究进展[J]. 陕西农业科学, 2001, (7): 36- 40
- [13] Wogenback G E, Challey J R, Burns W C. A method for purifying coccidian oocysts employing Clorox and sulfuric acid-dichromate solution[J]. J Parasitol, 1966, 52: 1222
- [14] Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: lesion scoring technique in battery and floor-pen experiments with chickens[J]. Exp Parasitol, 1970, 28: 30- 36
- [15] 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

## The establishment of *E. tenella* single-oocyst isolation technique and its pathogenicity in chicken

L IN Qing, YU San-ke, CHEN Xiu-li, PAN Guang-lin, WANG Jian-feng, LI Tao

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Yangling strain of *E. tenella* was isolated by using a new single-oocyst isolation technique. The pathogenic assay of the strain to chicken was conducted. The results show that the new technique is easy to operate and has a 40% successful rate. The strain is high pathogenic, and its mortality to chicken can reach as high as 80% when chicken are inoculated with a dosage of  $1 \times 10^5$  sporulated oocysts each bird.

**Key words:** *Eimeria tenella*; single-oocyst isolation technique; pathogenicity; chicken