

贝氏隐孢子虫生活史的超微结构研究

田纯见*

(华南农业大学兽医系)

摘要 本文利用透射电镜观察了樱桃谷鸭贝氏隐孢子虫人工感染石岐杂鸡后法氏囊虫体生活史的超微结构。结果表明:各期虫体,除裂殖子、子孢子或小配子外,均寄生于微绒毛包围形成的带虫空泡内,但未与上皮细胞浆接触。在虫体和上皮细胞间存在附着带和营养器。成熟裂殖体具有8个或4个裂殖子,孢子化卵囊具有4个子孢子。裂殖子前端有顶泡、锥体前环、锥体、棒状体和微线。后端有致密体、粗面内质网、高尔基体和细胞核。但没有发现线粒体、多糖颗粒、微孔和膜下微管。大配子除具有1~4个成熟体和2种成囊壁颗粒外,还有多糖颗粒、粗面内质网和液泡。

关键词 超微结构;贝氏隐孢子虫;裂殖生殖;配子体;卵囊;鸭

中图分类号 S852.729

利用透射电镜观察球虫的超微结构,并阐明其生活史中结构与功能的关系,在艾美尔球虫科和住肉孢子虫科中已有大量报告^[1]。隐孢子虫超微结构最早的报告是Hamton^[6]利用透射电镜研究了鼠隐孢子虫各期虫体的超微结构及其与宿主的关系。Vetterling等^[9]和Marcial等^[8]则报告了豚鼠的隐孢子虫各期虫体的超微结构及其与宿主的关系。禽类隐孢子虫超微结构的报告则只见于Itakura等^[7]对鸡气管、盲肠和法氏囊的隐孢子虫的扫描和透射电镜观察。在国内,我们对广州樱桃谷鸭贝氏隐孢子虫生活史进行了透射电镜观察,现将结果报告如下。

1 材料与方法

从贝氏隐孢子虫阳性樱桃谷鸭群中采集新鲜粪样20~30g,用饱和硫酸锌溶液漂浮法收集卵囊,以鸡继代繁殖获取大量卵囊。取5日龄石岐杂鸡20只,经检查无球虫感染,在严格隔离消毒的条件下饲养。除6只作对照作,其余每只经嗦囊接种贝氏隐孢子虫卵囊 2×10^6 个。接种后18~24天内每天剖杀2只,取法氏囊组织,生理盐水冲洗,2.5%戊二醛和1%锇酸先后固定,系列酒精脱水,丙酮和812树脂过渡和包埋,LKB切片机超薄切片,置100目载网上,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,荷兰产EM400型透射电镜观察,拍照记录结果。

2 结果

2.1 宿主细胞与虫体的超微结构关系

* 现在广州市畜牧兽医总站工作

1992-10-24收稿

透射电镜观察可见贝氏隐孢子虫虫体附着在上皮细胞表面,位于微绒毛丛中(图版1)。虫体的寄生改变了上皮细胞及其微绒毛的超微结构。主要表现在虫体寄生部位的上皮细胞表面出现附着带(图版3);虫体与宿主细胞接触部分的细胞膜发生改变,形成梳状营养器,具有5~10条营养管(图版21)。附着带与微绒毛膜相互衔接(图版6,18),微绒毛膜是由虫体两侧的微绒毛生长并融合连接而形成的(图版24)。其次,靠近附着带的宿主细胞浆内出现颗粒和空泡,颗粒呈圆形,由双层膜包围,内部有更细小的质粒(图版3)。

2.2 滋养体、裂殖体和裂殖子的超微结构

滋养体位于上皮细胞微绒毛包围形成的带虫空泡内(图版2,3)。带虫空泡间隙平均宽约0.15 μm ,外侧微绒毛膜由双层构成,最宽有0.30 μm (图版22,23)。滋养体呈椭圆形或圆形,有双层膜包围。近中央有一细胞核和核仁,其直径大小分别为1.6 μm 和0.5 μm 。细胞核由双层核膜包围(图版3)。滋养体细胞质丰富,含游离核糖体、高尔基体和粗面内质网(图版2,3)。滋养体靠近附着带的细胞质中有低电子密度区,可见一些大小不一的圆形颗粒,有双层膜包围(图版2)。

滋养体发育成熟为裂殖体,但未发现多核裂殖体。成熟裂殖体由双层微绒毛膜包围形成带虫空泡,带虫空泡内有8个或4个裂殖子(图版4,6)。虫体内靠近附着带有一大残体,由单层膜包围,含粗面内质网和游离核糖体等(图版6)。

裂殖子呈香蕉形,均有两层膜包围(图版7,9,10)。裂殖子横切面没有发现膜下微管,但紧靠双层膜下有排列成环状的强嗜锇酸颗粒(图版10)。裂殖子前部由顶泡、锥体、极环和棒状体等组成(图版6,7)。顶泡呈半球形,直径约10~20 nm。顶泡下紧接锥体。经测量锥体前端直径约35 nm,末端约38 nm,高约40 nm。在锥体内部至少有3个强嗜锇酸的棒状体,其前部伸达锥体前端。紧靠棒状体后端有大量微线分布,呈圆形或椭圆形(图版7)。裂殖子细胞核位于后部,呈圆形或椭圆形,染色质沿周边分布,核周围间隙较宽,平均宽约5 nm。在细胞核前上方有高尔基体和粗面内质网(图版7,8)。裂殖子未见有多糖颗粒。

2.3 小配子体和大配子的超微结构

小配子体也有来自宿主上皮微绒毛的双层膜包围形成的带虫空泡。虫体与宿主上皮细胞接触部位有附着带。虫体内部在残体周围发现小配子,其横切面可见有双层膜包围,中央见细胞核(图版14)。

大配子也有双层膜包围,带虫空泡间隙较小。早期大配子有1个或多个细胞核,有时可见核仁,有的有1~4个成熟体。成熟体结构均一,呈椭圆形,周围有空隙,周边有膜包围(图版11,12)。成熟大配子只有1个细胞核,成熟体消失(图版13)。大配子细胞质除有多糖颗粒外,还有成囊壁颗粒、粗面内质网、游离糖体和半透明空泡(图版11,13,15)。大配子与宿主上皮细胞间也有附着带,靠近附着带的宿主细胞内出现空泡(图版3,15)。

2.4 卵囊的超微结构

卵囊和大配子均有成囊壁颗粒,多位于细胞质浅层。I型成囊壁颗粒呈圆形或椭圆形,均质,强嗜锇酸性;而II型成囊壁颗粒呈海绵状,质地疏松(图版16)。卵囊孢子化后有4个裸露的子孢子(图版17)。子孢子呈香蕉形,由双层膜包围,头部有顶器结构,微线十分发达(图版19)。

3 讨论与结论

在超微结构上,隐孢子虫与其它球虫的显著差别是寄生部位不同。我们观察发现,贝氏隐孢子虫寄生在上皮细胞刷状缘表面,位于由虫体两侧微绒毛包围融合而形成的带虫空腔内。虫体与上皮细胞间出现附着带,使得虫体虽然在粘膜上皮细胞内,但没有与宿主上皮细胞浆接触,而是在细胞浆外。Goebel 和 Braendler 观察鼠小肠隐孢子虫超微结构得出的结论与我们的是一致的^[5]。

上述隐孢子虫寄生部位的特点,决定了它对上皮细胞的损害作用较弱,不会象艾美尔球虫那样造成上皮组织的破坏,因而其致病性较弱。

贝氏隐孢子虫生长期虫体存在营养器。营养器呈梳状,增加了虫体与宿主细胞的接触面积。Vetterling 等^[9]认为隐孢子虫是从营养器附近的空腔区通过内吞作用获取营养的,但他们没有发现与内吞作用有关的营养小泡。我们认为,营养成份通过营养器进入虫体的过程可能为渗透或主动运输,与艾美尔球虫等通过细胞获取营养的过程相似。

Current 等^[2,3]利用微分干涉显微技术发现隐孢子虫具有两代裂殖生殖。随后,在研究贝氏隐孢子虫生活史时,他们又提出存在第3种类型的裂殖体^[4]。我们利用透射电镜观察到贝氏隐孢子虫的裂殖体有I型:内含8个裂殖子,裂殖子细长,大小约 $7.6\mu\text{m}\times 1.6\mu\text{m}$;II型:内含4个裂殖子,裂殖子并列;III型:内含8个裂殖子,但裂殖子比较粗短,大小约 $4.5\mu\text{m}\times 1.3\mu\text{m}$ 。Current 等^[4]利用光镜观察的结果与我们的电镜观察是一致的。

裂殖子没有膜下微管,这与 Vetterling 等^[9]的报道相同。但我们发现在裂殖子横切面的双层外膜内侧有强嗜锇酸颗粒,排列呈环状。Goebel 等^[5]观察到小配子的类似结构(Beehive structure),并认为与虫体的运动有关。

在大配子发育过程中,除细胞核发生变化外,Goebel 等^[5]还观察到与大配子核分裂有关的成熟体(Maturation body)。我们也观察到大配子具有成熟体,呈椭圆形,质地均一,大小不一,每个大配子可多达4个成熟体。

我们通过电镜观察到贝氏隐孢子虫与大多数球虫一样,其大配子或卵囊具有2种成囊壁颗粒。成囊壁颗粒大多数沿周边分布,呈椭圆形或圆形,有单层膜包围。成囊壁颗粒I质地均一,呈强嗜锇酸性。成囊壁颗粒II质地疏松,呈海绵状,弱嗜锇酸性。Vetterling 等^[9]认为 *C. wrairi* 只有一种成囊体。

我们还观察到粘膜上皮表面的卵囊含有4个裸露的子孢子,这表明贝氏隐孢子卵囊的孢子化过程是在宿主体内完成的。这种情况也见于住肉孢子虫属(*Sarcocystis*),而不同于艾美尔属(*Eimeria*)、等孢属(*Isospora*)、泰泽属(*Tyzzeria*)、温扬属(*Wenyonella*)、弓形虫属(*Toxoplasma*)和贝诺属(*Besnoitia*)。

致谢 陈淑玉教授给予指导,寄生虫教研室和电镜室提供方便。

参 考 文 献

- 1 朗 PL 主编. 球虫生物学. 蒋金书等译. 南宁:广西科技出版社,1990. 53~78

- 2 Current W L, Long P L. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J Infect Dis*, 1983,148(6):1108~1113
- 3 Current W L, Upton S J, Haynes T B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in fecting chickens. *J Protozool*, 1986,33(2):289~296
- 4 Current W L, Haynes T B. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 1984,224(4649):603~605
- 5 Goebel E, Braendier U. Ultrastructure of microgametes, macrogametes and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*, 1982,18(3):331~334
- 6 Hamton J C, Rosario B. The attachment of protozoon parasites to intestinal epithelial cells of the mouse. *J Parasit*, 1966, 55:929~949
- 7 Itakura C, Nakamura H, Umemura T et al. Ultrastructure of *Cryptosporidial* life cycle in chicken host cells. *Avi Pathol*, 1985,14:237~239
- 8 Marcial M A, Madara J L. *Cryptosporidium*; cellular localization, structural analysis of absorptive cell—parasitic membrane—membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*, 1986,90:538~594
- 9 Vetterling J M, Takeuchi A, Madden P A. Ultrastruture of *Cryptosporidium unauri* from the guinea pig. *J Protozool*, 1971, 18:248~260

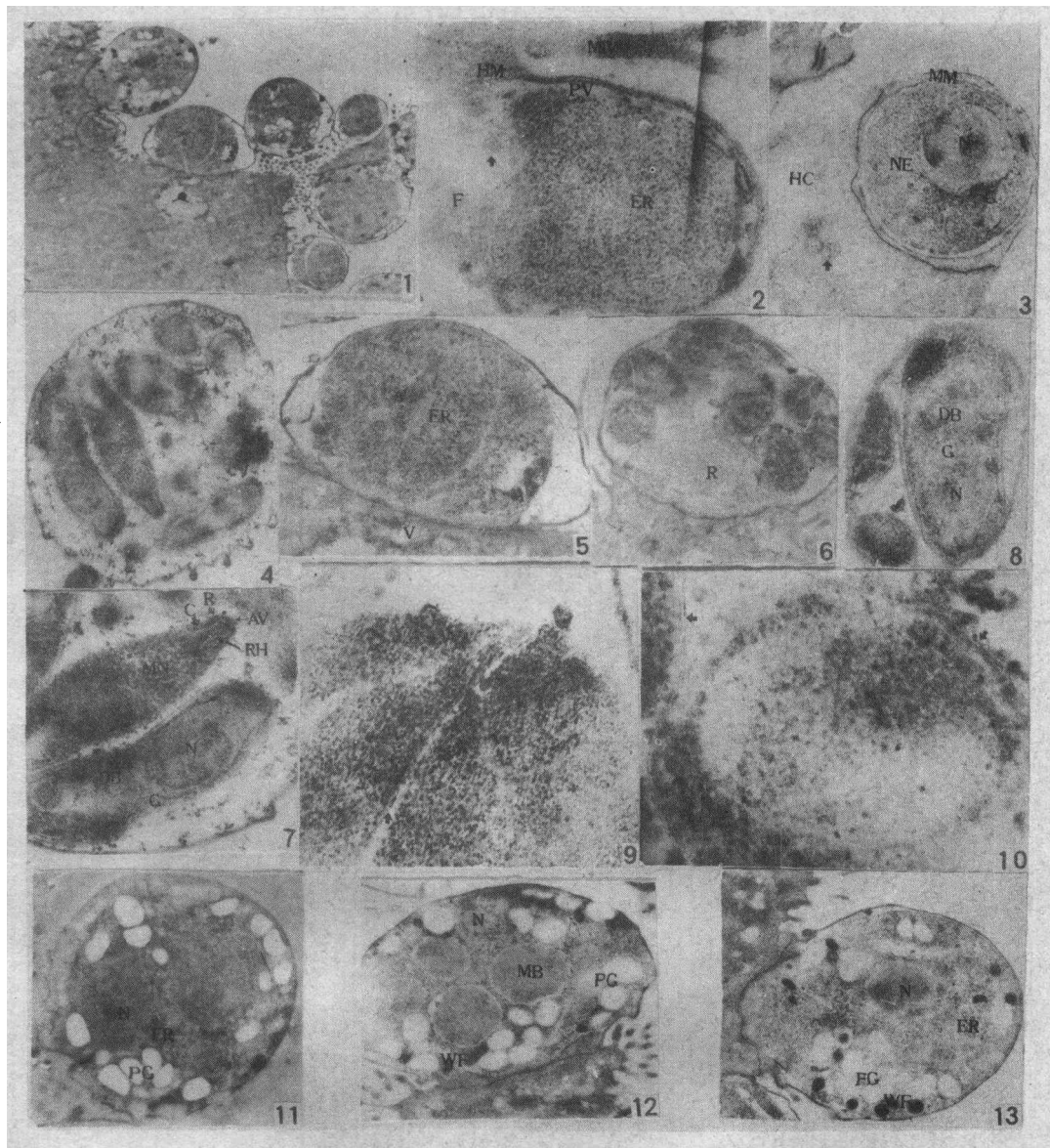
ULTRASTRUCTURAL STUDY IN THE LIFE CYCLE OF *CRYPTOSPORIDIUM BAILEYI*

Tian Chunjian

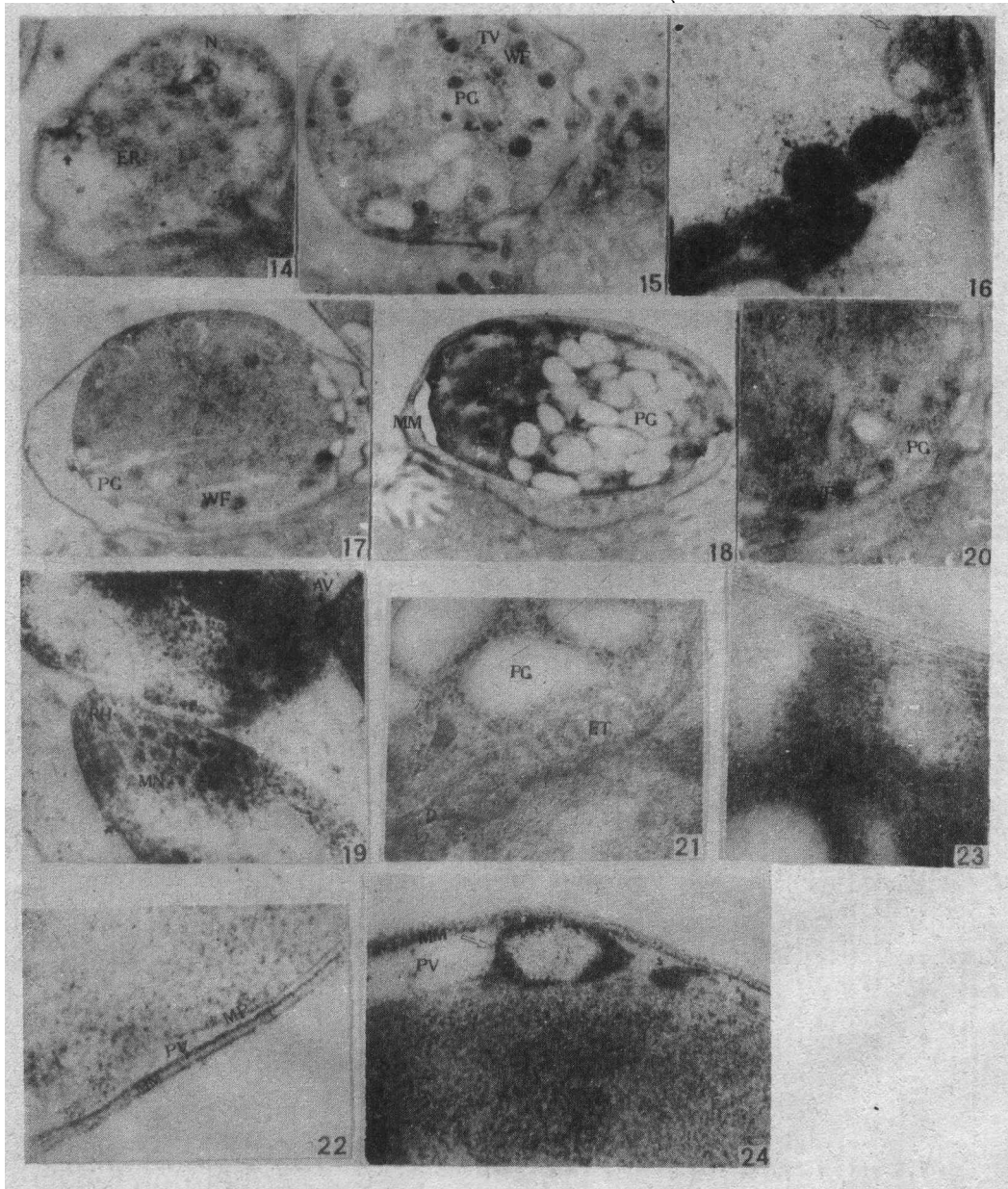
(Dept. of Veterinary, South China Agr. Univ.)

Abstract The ultrastructure of tissue stages of *Cryptosporidium baileyi* parasitising the bursa Fabricii of Shiqiza chickens experimentally infected with parasites isolated from Cherry Valley ducks was studied by transmission electron microscopy. All the stages of the protozoon excepting the motile merozoites, sporozoites or microgametes were in parasitophorous vacuoles formed by microvilli but not in contact with the cytoplasm. Close contact of the parasite with the membrane of the epithelial cell was made by means of the parasite's adhesion zone and feeder organelle between the parasite and epithelial cell. The developed schizonts had eight or four merozoites and the sporulated oocysts had four sporozoites. The anterior end of the merozoite consisted of an apical vesicle, preconoidal ring and conoid. The anterior portion of the merozoite contained rhoptries and micronemes while the posterior portion contained dense bodies, endoplasmic reticulum, golgi bodies and nucleus. No mitochondria, polysaccharide granules, micropore or microtubules were found. The macrogametes had 1~4 maturation bodies and two types of wall-forming bodies, as well as polysaccharide granules, endoplasmic reticulum and lipid body.

Key words Ultrastructure; *Cryptosporidium baileyi*; Merogony; Gamete; Oocyst; Duck



图版1 感染后第22天可见石歧杂鸡法氏囊上皮细胞表面附着的大量孢子虫各期虫体。 $\times 5000$ 2 早期滋养体呈梨形,上皮细胞微绒毛(MIV)包围形成带虫空泡(PV),宿主细胞膜(HM)嗜银酸性加强,可见虫体膜折叠(F)、粗面内质网(ER)及被膜颗粒(箭头)。 $\times 39000$ 3 成熟滋养体呈球形,微绒毛膜(MM)发达,可见细胞核(N)、核膜(NE)、高尔基体(G)。宿主细胞(HC)内出现大量圆形被膜颗粒(箭头)。 $\times 11000$ 4 成熟裂殖体,内有8个裂殖子。 $\times 14,000$ 5 成熟裂殖体,内有4个裂殖子,见粗面内质网(ER)、宿主细胞内空泡(V)等。 $\times 14000$ 6 成熟裂殖体,内有8个裂殖子和一个大残体(R)。 $\times 11000$ 7 折叠裂殖子,见细胞核(N)、致密体(DB)、高尔基体(G)、微线(MN)、棒状体(RH)、锥体(C)、锥前环(R)及顶泡(AV)。 $\times 23000$ 8 裂殖子,见细胞核(N)、致密体(DB)和高尔基体(G)。 $\times 18000$ 9 正在发育中的裂殖子,见已生成的两个裂殖子有双层膜包围(箭头),顶端残体帽在脱落。中。 $\times 23000$ 10 裂殖子横切面,可见双层膜结构。 $\times 110000$ 11 未成熟大配子,呈球形,见细胞核(N)、粗面内质网(ER)和多糖颗粒(PG)。 $\times 11000$ 12 未成熟大配子,呈椭圆形,见细胞核(N)、成熟体(MB)、多糖颗粒(PG)及少量成囊壁颗粒(WF)。 $\times 11000$ 13 成熟大配子,见细胞核(N)、多糖颗粒(PG)、粗面内质网(ER)和成囊壁颗粒。 $\times 11000$



14 小配子体, 内有小配子, 见细胞核(N)、粗面内质网(ER), 并有双层膜包围(箭头)。×30000 15 大配子或合子, 见大量成囊壁颗粒(WF)、多糖颗粒(PG)和半透明空泡(TV)。×14000 16 成囊壁颗粒, I型(实心箭头)均质, 强嗜银酸性; II型(空心箭头)呈海绵状, 质地不均匀。×64500 17 卵囊, 见4个子孢子, 有成囊壁颗粒(WF)和多糖颗粒(PG)。×14000 18 大配子或未孢子化卵囊, 微绒毛膜(MM)发达, 多糖颗粒(PG)较多。×11000 19 子孢子头部, 见双层膜(箭头), 顶泡(AV)、棒状体(RH)和微线(MN)。×64500 20 成熟大配子附着带和营养器正在退化, 见附近的多糖颗粒(PG)、成囊壁颗粒(WF)和粗面内质网(ER)。×18000 21 未成熟大配子营养器发达, 有10—15个营养器(FT), 见多糖颗粒(PG)和致密带(D)。×50000 22 滋养体膜结构, 见微绒毛膜(MM)、寄生虫外膜(MP)和带虫空泡(PV)。×64500 23 大配子膜结构。×83500 24 微绒毛膜包围虫体的融合部位, 见双层微绒毛膜(MM)及带虫空泡内膜连接(实心箭头)和椭圆形泡状物(空心箭头)。×64500