

鸡球虫的单卵囊分离和感染法 及其在种的鉴定上的应用*

林维庆 陈淑玉 林辉环 陈炳德

(畜牧兽医系)

提 要

将球虫卵囊悬浮液少许混入大量的2%重铬酸钾溶液中,于室温下静置4—7天,这样卵囊就会孢子化。用吸管吸取一滴含此种孢子化卵囊的溶液于载玻片上,加上一滴等渗氯化钠溶液稀释至每个视野含1—2个卵囊。在低倍显微镜下,用玻璃毛细吸管对着一个卵囊,将其吸取,然后吹落于铺有琼脂薄膜的玻片上,并在镜下检查证实只有一个卵囊时,用细镊子划出含此卵囊的相应部分琼脂薄膜,并喂给一天龄小鸡。这些试验小鸡应注意保温和分别隔离饲养,喂以煮沸过的饲料和饮水,避免一切环境污染的可能性。经过排卵囊前期之后,这些小鸡就应在粪便中排出单纯一个种的卵囊。

一、前 言

球虫病是鸡的主要寄生虫病,具有重大的经济意义^[1-3]。

鸡球虫是一种原虫,属孢子虫纲球虫目艾美耳科。目前世界公认有9种鸡球虫^[1,4,5,6]: (1) *Eimeria tenella*; (2) *E. mitis*; (3) *E. acervulina*; (4) *E. maxima*; (5) *E. necatrix*; (6) *E. praecox*; (7) *E. hagani*; (8) *E. brunetti*; (9) *E. mivati*。但是,苏联的Орлов和Ильбин等认为只有6—7种可靠^[7-9],英国的Long^[2]只承认6种,澳大利亚的Webster^[5]鉴定了其中的7种。近年来对*E. acervulina*与*E. mivati*的争论较多,大多数美国研究者已将它们列为独立的种,或因两者难以鉴别而将它们列在一起,称为*E. acervulina—mivati*,若干英国学者将后者列为前者的亚种^[10]。在我国,何承德、张朝聘(1959)^[11]报告西安有*E. maxima*和*E. mitis*二种;甘肃农大的教材(1960)^[12]提到兰州有*E. tenella*,

*本研究是在卞荣禄教授的指导下进行的,特此致谢。

*E. maxima*和*E. mitis*以及*Isospora lacazei*四种；华北农大(1977)^[4]报导北京地区有上述的前七个种；江苏农学院和福建农学院主编的《家畜寄生虫病学》(1979)^[13]一书也只提到这七个种。

全国家畜寄生虫病研究工作第一次会议(1963)^[14]在其纪要中谈到球虫病时强调指出：“首先要从球虫的分类上做起，不论是治疗还是免疫，都不能离开种的问题，种搞不清即谈不上治疗、免疫，即使是流行病学的调查也和种有密切关系”。球虫种的鉴定应根据寄生肠段；显微损害的性质；卵囊大小、形态和颜色；最短孢子化时间；最短潜在期^[注]，裂殖体大小及其发育部位；在肠上皮细胞中的位置；交叉免疫试验等几方面进行^[1]。不同种的球虫有不同种的特性，在上述几方面的表现有所差异，从而使种的鉴定得以进行。但是，在自然情况下，极少是单一种感染的，往往是混合感染，即在同一个病鸡的粪便中，常常可以发现几种球虫。这样就给种的鉴定带来不少困难，如能从单卵囊感染一天龄雏鸡入手，则这问题较易获得解决。

关于单卵囊的分离和感染，国外不少研究者如Levine(1938)^[15]，Edgar等(1964)^[16]曾有报导，但因需要专门仪器，操作繁琐，在一般设备条件下是不易办到的。1964年，Remmler和McGregor报导^[17]，用不锈钢制造一个切割琼脂的特别装置，旋在显微镜镜头转换盘上亦能进行分离。据Richardson和Kendall^[18]介绍，用一微量吸管或通过将稀释材料置于琼脂平板上，以显微镜检查卵囊分离并将含卵囊的相应部分切割下来的方法，可以将单卵囊分离出来。至于其余方面未作详细叙述。我们参考此法并将其具体化，用一根玻璃毛细吸管成功地分离到球虫的单卵囊，用孢子化卵囊感染雏鸡，可以得到单一种球虫的感染，为球虫种的鉴定和疫苗的研制提供了一个有效的方法。

二、材料及方法

球虫的卵囊：从本院鸡场收集临床症状明显的球虫病病鸡的粪便，以饱和硫酸镁溶液离心沉淀浮卵法收集之。收集到的卵囊放在小培养皿内，加入2%重铬酸钾溶液于室温情况下培养，待其彻底孢子化后进行单卵囊分离感染小鸡。

感染试验用的小鸡：从广州市种苗公司买回将出壳的鸡胚放入孵化器中，孵出后，以一天龄的雏鸡作为感染试验组和对照组用。单卵囊感染后的小鸡分别饲养于笼中，所食饲料均经煮过，以保证在试验前和试验过程中不感染其它的球虫。雏鸡感染后分别编号，登记感染日期、感染用的卵囊培养时间、潜在期、临床症状、粪中排出卵囊情况和病理剖检变化。

三、单卵囊的感染试验及其结果

(一) 单卵囊的感染试验

1、单卵囊的分离方法 用干洁的滴管，吸取在2%重铬酸钾溶液内已培养4~7天

^[注] 鸡只感染卵囊后到最初从粪便中排出卵囊止，其所需的时间称为潜在期或排卵囊前期。

的含有孢子化卵囊的溶液一小滴于载玻片上,并加入一滴生理盐水稀释,使在低倍显微镜下观察时,一个视野只有1~2个卵囊,以便于分离。然后在显微镜下,右手持玻璃毛细吸管,当毛细吸管的尖端正对视野中一个卵囊时,将吸管向卵囊直伸过去。由于毛细管现象,卵囊随溶液上升到毛细吸管内。随后把毛细吸管中的液体吹落到铺有薄层琼脂的载玻片上,在显微镜下观察,确证是一个卵囊时,单卵囊分离即告完毕。

2. 单卵囊的感染 用细的解剖针将玻片上含有单卵囊小滴液的琼脂周围划破,以小滴液为中心,将前后左右的琼脂薄膜摺叠覆盖起来,喂给一天龄的雏鸡。喂服时可令一助手协助,或单人操作,左手捉鸡,用姆指和食指将鸡口张开,右手用解剖针将含单卵囊的琼脂挑起,并小心放到鸡的喉部,然后用滴管吸几滴生理盐水滴入鸡口中,以便让其咽下。感染后的雏鸡隔离饲养,于感染第三天开始每天检查粪便,并观察其结果。

(二) 感染试验结果

本次感染试验共用一天龄雏鸡18只(其中4只对照)。试验鸡每只喂服在重铬酸钾溶液一

鸡球虫单卵囊感染试验结果

组别	编号	卵囊培养时间 (天)	感染卵囊数目 (个)	潜在期 (天)	粪检结果	感染率
试 验 组 (14只)	1	2	1	6	+	64.3%
	4	4	1	5	+	
	5	4	1	—	-	
	6	4	1	—	-	
	7	4	1	7	+	
	9	4	1	5	+	
	10	4	1	5	++	
	11	4	1	7	+	
	12	4	1	—	-	
	13	6	1	—	-	
	14	6	1	—	-	
	15	6	1	6	+	
	16	7	1	5	+	
	18	5	1	8	+	
对照组 (4只)	21~24				-	

注: 1. 试验组和对照组均为一天龄土种雏鸡。

2. “-”表示粪检时始终未发现卵囊;

“+”表示若干视野才发现几个卵囊;

“++”表示容易发现卵囊,但每个视野中卵囊数目不多;

“+++”表示容易发现卵囊,且每个视野中卵囊数目很多。

表一、二、三中此种符号意义相同。

液中培养4~7天的孢子化卵囊一个。结果有9只鸡于感染后5~8天, 在粪检中都找到卵囊, 其感染率为64.3%。详见表一。

四、鸡球虫种的鉴别试验

(一) 从单卵囊感染的第16、11、7号雏鸡的粪便中收集卵囊, 这三只鸡所排出的卵囊在形态上有些不同, 经孢子化后, 再感染雏鸡, 并观察其潜在期、粪检结果、临床症状和病理剖检变化。感染结果见表二。

1. 16-(1~9)号鸡的感染结果, 潜在期为6~7天, 其中6只鸡7天, 1只6天, 2只因体弱很早死亡。粪检结果, 7只鸡的粪便中都发现卵囊, 且卵囊的形状都是椭圆形, 大小相差不大。临床症状: 5只鸡精神差, 排便血粪, 2只不明显。病理剖检: 有5只鸡主要病变是盲肠肿大、充血。其它的2只, 一只直肠肿大, 另一只病变不明显。早死的2只未剖检。

表二 鸡球虫种的鉴别试验(一)

组别	编号	卵囊培养时间(天)	感染卵囊数目(个)	潜在期(天)	粪检结果	临床症状	病理剖检	备注
试验组	16-1	4	40	6	+	无明显症状	未解剖	死亡
	2	"	38	/	/	/	直肠肿大*	
	3	"	21	7	+	精神差, 排便血粪	盲肠肿大	
	4	"	46	7	+	排便血粪	盲肠肿大	
	5	"	52	7	+	不明显	病变不明显	
	6	"	45	7	+	精神差、排便血粪	未解剖	
	7	"	50	7	+	精神差、缩头、垂翼	一侧盲肠肿大	
	8	"	40	7	卅	排便血粪	盲肠肿大出血坏死	
	9	"	50	/	/	/	盲肠肿大、粘膜严重出血*	死亡
对照组	11-1	"	6	4	+	症状不明显	病变不明显	死亡
	2	"	5	-	-	症状不明显	十二指肠肿大*	
	3	"	4	5	+	症状不明显	病变不明显	
	4	"	8	/	/	症状不明显	十二指肠粘膜出血	
	7-1	2	4	6	+	症状不明显	病变不明显	
	2	2	5	7	+	症状不明显	病变不明显	
对照组	10-11	/	/	/	-	-	-	

注: 1. 试验组和对照组均为一天龄雏鸡
2. *表示死后剖检

2. 11—(1~4)号鸡的感染结果, 潜在期4~5天。临床症状不明显。病理剖检十二指肠肿大。粪检结果2只找到卵囊, 卵囊椭圆形, 较16—(1~9)号鸡的小而且一端较尖。

3. 7—(1~2)号鸡的感染结果, 潜在期6~7天。临床症状和病理变化不明显。粪检结果, 2只鸡的粪便中都找到卵囊, 卵囊呈圆形, 较上述两种为小。

4. 对照组: 粪检阴性, 临床及剖检无异常。

为了对鸡球虫的种鉴别得更准确, 再进行如下试验。

(二) 再从16—6、16—8号鸡的粪便中收集卵囊, 培养孢子化后大量感染雏鸡, 并观察其潜在期、临床症状、粪检结果、卵囊形状、孢子化时间和病理剖检变化。试验结果见表三。

表三 鸡球虫种的鉴别试验(二)

组别	编号	卵囊培养时间(天)	感染卵囊数目(个)	潜在期(天)	粪检结果	临床症状	病理剖检
试验组	16(8)-1	14	200	/	/	精神萎顿, 闭眼	直肠、盲肠显著肿大出血*
	2	"	"	7	+	血 粪	盲肠肿大, 有出血点
	3	"	100	7	+	症状不明显	病变不明显
	4	"	"	8	+	血 粪	盲肠显著肿大, 有坏死点
	5	"	"	6	+	血 粪	盲肠稍肿大
	6	"	"	8	+	精神差、毛松、翅垂	盲肠充血、出血
	7	"	"	"	+	血 粪	病变不明显
	8	"	"	"	+	精神差、翅下垂	盲肠明显肿大, 有坏死点
	9	"	"	"	+	血 粪	直肠及一侧盲肠肿大
	10	18	50	"	+	不明显	一侧盲肠肿大
对照组	16(6)-1	6	100	5	+		盲肠肿大
	2	"	80	"	+		十二指肠肿大
	3	"	30	"	+		盲肠稍肿大
	4	"	30	"	+		盲肠肿大
	5	"	80	"	+		盲肠肿大
	6	"	30	"	+		盲肠稍肿大
对照组	11-13	/	/	/	-	-	-

注: 1、试验组和对照组均为一天龄雏鸡

2、16(6)-1~6试验鸡只的病状未观察

3、*表示死后剖检

1. (1) 从16(8)-(1~10)号鸡的感染结果: 潜在期7~8天, 粪检结果除一只死亡外都是阳性。临床症状: 除2只不明显外, 其余8只鸡表现精神差、翅下垂、排血粪。病理剖检: 除2只鸡不明显外, 其余8只表现盲肠明显肿大, 出血并有坏死点。

(2) 16(6)-(1~6)号鸡感染结果: 潜在期为5天。粪检结果阳性。病理剖检除16(6)-2号鸡十二指肠肿大外, 其他鸡只都是盲肠肿大。

(3) 对照组：粪检阴性，临床和剖检无异常。

2. 卵囊形态的观察：从以上感染的雏鸡粪便中收集100个卵囊，在高倍显微镜下观察形态和测量大小，结果如下：

卵囊呈宽卵圆形，两端较圆钝，在较尖的一端常发现有一个发亮的极粒。卵囊有三层膜：外层膜薄而光滑，呈极淡的绿色；中层膜稍厚，淡绿色；内层膜最厚，呈墨绿色。未孢子化卵囊的原生质团块呈圆形，其边缘不整齐，多位于卵囊的中部，与卵囊内层膜之间有不大的空隙。在自然光照情况下，原生质呈极鲜艳的红色。在高、低倍显微镜下观察刚排出的卵囊，可见其原生质团块与内层膜所成的空隙间有很多不断自由运动的小极粒，称为动粒。

卵囊的大小为19.8—26微米×16.3—22.7微米，平均为23.7微米×19.5微米。

3. 卵囊孢子化时间的测定

从上列感染试验的鸡粪，用饱和硫酸镁溶液浮卵法收集卵囊，放于直径4~6厘米、编有号码的小平皿中；或将卵囊收集在编有号码的干洁载玻片上，然后在载玻片上用凡士林涂在含有卵囊的液体的周围，筑成一道“围墙”，使含卵囊的溶液不会流掉。培养液用(1)饱和硫酸镁上浮液；(2)饱和硫酸镁上浮液加入2%重铬酸钾溶液；(3)粪便加入2%重铬酸钾溶液。在室温27°C情况下培养，并每隔一小时在低倍显微镜下观察一次。孢子化时间测定结果见表四。

鸡球虫卵囊因所处的环境不同，孢子化所需的时间亦不同。在饱和硫酸镁上浮液中，经18~19小时开始孢子化，40~42小时孢子化即告完成。在饱和硫酸镁上浮液加入2%重铬酸钾溶液的环境中，经18小时开始孢子化，42小时孢子化完成。在粪便加2%重铬酸钾溶液的环境中，要经19小时才开始孢子化，50小时孢子化完成。本种鸡球虫卵囊彻底完成孢子化的时间为40~50小时。

上列鸡球虫种的鉴别试验结果总结如下：

(1) 本种鸡球虫卵囊的形态是呈宽卵圆形，两端较圆钝，较尖的一端常发现一个发亮的极粒，卵膜呈淡绿色，原生质团块呈极鲜艳的红色。

(2) 卵囊大小为19.8—26微米×16.3—22.7微米，平均为23.7微米×19.5微米。

(3) 孢子化时间为42—50小时，孢子化卵囊内含4个孢子，每个孢子又含2个子孢子。在孢子化卵囊和孢子囊内无残体存在。

(4) 本种球虫的潜在期为5~8天，以6~7天为多。

(5) 临床症状和病理剖检变化：主要临床症状为排血粪，精神差。病理剖检结果

表四 球虫卵囊孢子化时间

孢子化环境	孢子化时间 (小时)	
	孢子化开始	孢子化完成
饱和硫酸镁上浮液	18~19	40~42
饱和硫酸镁上浮液 + 2%重铬酸钾溶液	18	42
粪 便 + 2%重铬酸钾溶液	19	50

以盲肠肿大及充血为主,个别盲肠有坏死点。

根据上述球虫卵囊的形态特点、孢子化时间、潜在期、临床症状及病理剖检变化,与*Eimeria tenella* (Railliet et Lucet, 1891)基本相符,故鉴定此种球虫为*Eimeria tenella*。

五、讨 论

(一)在单卵囊感染过程中,本次试验感染率是64.3%。雏鸡感染率的高低与卵囊孢子化时间、雏鸡体质的强弱及饲养管理有很大的关系。我们进行第一次感染试验时,由于孢子化时间不足2天,加之在雏鸡的饲料中以葡萄糖溶液代替饮水,试验全部失败。本次感染试验卵囊孢子化时间是2~7天,取消葡萄糖溶液,并发现没有感染上的鸡只,是比较强壮的。因此,在鸡球虫病的预防方面,加强饲养管理,增强雏鸡的体质,有很大的意义。

(二)在卵囊培养方面:2%的重铬酸钾溶液能抑制其他微生物的生长繁殖,可以经久保持卵囊的形态及生活力。在饱和硫酸镁溶液中培养,由于其浓度高,数天后常发现卵囊皱缩变形。因此,前者的培养效果较后者为好。

(三)单卵囊的分离方法:在14只雏鸡感染试验中,感染率为64.3%,并发现每只感染鸡的粪便中所排出的卵囊形状与大小都是比较单纯和一致,没有出现混合感染的现象,说明这一方法是可靠的。

(四)鸡球虫种的鉴定问题:我们从单卵囊感染的第16、11和7号鸡的粪便中分离卵囊,感染16—(1~9)号组、11—(1~4)号组和7—(1~2)号组的鸡,试验中也发现这三组鸡球虫的潜在期、卵囊形状、临床症状和主要病理变化有明显的差异。如16—(1~9)号组鸡球虫的潜在期是5~8天,卵囊呈卵圆形,两端较钝,以排血粪和盲肠肿大、出血为主要临床症状和病理变化。11—(1~4)号组的潜在期是4~5天,卵囊呈椭圆形,一端较尖,临床症状不明显,而主要病变在十二指肠。7—(1~2)号组的潜在期是6~7天,卵囊呈圆形,很小,卵膜与原生质块间空隙很少,无明显的临床症状和病理变化。又从16—(1~9)组的16~8号和16~6号的鸡粪中,再分离卵囊,分成两组即16(8)—(1~10)组和16(6)—(1~6)组,再进行一次雏鸡感染试验,结果这两组鸡球虫的潜在期、卵囊形状、临床症状和病理变化都和16—(1~9)号组的鸡相似。由此证明16—(1~9)号组,11—(1~4)号组和7—(1~2)号组三组球虫是不同种类的。我们根据以上试验特点已证明16—(1~9)号组鸡球虫为*Eimeria tenella*,11—(1~4)号组和7—(1~2)号组的鸡球虫的种尚待鉴定。

六、结 论

1. 本试验用单卵囊分离法共感染14只一天龄雏鸡,结果有9只于感染后5~8

天, 在粪便中检测到卵囊, 其感染率为64.3%。

2. 鸡球虫种的鉴定结果:

(1) 本种鸡球虫分离出的卵囊, 形状是宽卵圆形, 两端较钝。较尖的一端有一个发亮的极粒, 卵膜呈淡绿色, 原生质团块呈极鲜艳的红色。

(2) 孢子化时间是42~50小时, 孢子化卵囊内含4个孢子, 每个孢子又含2个子孢子, 在孢子化卵囊和孢子囊内无残体存在。

(3) 卵囊大小为19.8—26微米×16.3—22.7微米, 平均大小为23.7微米×19.5微米。

(4) 主要临床症状和病理变化为排血粪, 精神差, 盲肠肿大、出血, 个别有坏死点出现。

(5) 根据上述的特点与*Eimeria tenella* Railliet et Lucet, 1891, 相符。本种球虫鉴定为*Eimeria tenella*。

参 考 文 献

- [1] W.Malcolm Reid, Coccidiosis, Hofstad, M.F.1978. Diseases of Poultry, 7th Edition.784~815.
- [2] Long, P.L., Coccidiosis, Gordon, R.F. 1978. Poultry Diseases, 1st published 126~139.
- [3] Артемичев, М.А.1962. Кокцидиоз, Болезни Птиц, Москва.
- [4] 华北农业大学兽医系寄生虫病教研组(1977); 北京地区鸡球虫病的研究
- [5] Hungerford, T.G.1969. Diseases of Poultry, 4th Edition. 335~348.
- [6] 广东农林学院牧医系主编, 《家禽疾病防治学》(1977), 191~197
- [7] Орлов, Н.П.1956, Кокцидиозы сельскохозяйственных животных. Москва.
- [8] Орлов, Ф.М.1962.Болезни Птиц.Москва
- [9] Шубин, В.А.1978. Патологоанатомическая Диагностика Болезней Птиц. Москва, 222~229,
- [10] Avian disease experts in cooperation with the Autotutorial Committee of the American Association of Avian Pathologists, Slide, 7. Coccidiosis in chickens—W.M.Reid et al.
- [11] 何承德、张朝聘, 1959, 《西北大学学报》自然科学部分第一期。
- [12] 甘肃农业大学兽医系家畜寄生虫学与侵袭病教研组主编, 1960, 《家畜寄生虫学与侵袭病》农业出版社, 889。
- [13] 江苏农学院、福建农学院主编, 1979, 《家畜寄生虫病学》上海科技出版社, 191。
- [14] 全国家畜寄生虫病研究工作第一次会议纪要(草稿), 1963。
- [15] Levine, 1938. *Eimeria hagani n.sp.*, Cornell Vet, 28—263.
- [16] Edgar, S.A.1964. A new coccidium of chickens, *Eimeria mivati sp.n.* (Protozoa, *Eimeria*) with detail of its life history, Jour. of Parasit, Vol.50; 2—193.
- [17] Remmler, O. and McGregor, J.K.1964. A method to facilitate isolation of single coccidial oocysts. J. Parasit. Vol.50; 2—294.
- [18] Richardson, U.F. and Kendall, S.B.1957. Veterinary Protozoology, Second enlarged edition. 218.

A TECHNIQUE OF SINGLE COCCIDIAL OOCYST ISOLATION WITH SUBSEQUENT EXPERIMENTAL INFECTION OF CHICKS

Lin wei-qing Chen shu-yu Lin Hui-huan Chen Bing-de

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, SCAC)

ABSTRACT

A small volume of coccidial oocyst suspension is mixed with ample quantity of 2% potassium dichromate solution. After standing in room temperature for 4 - 7 days, most of the oocysts will sporulate. By using a pipette, a drop of this solution containing sporulated oocysts is drawn in and then blown onto a slide, while examining under a low power microscope, isotonic sodium chloride solution is added to dilute it to reach such a point with only 1 - 2 oocysts per microscopic field. Then, the manipulator must establish his own skill to use a capillary pipette to suck in a single oocyst and then transfer it onto another slide coated with agar gel film. At this time, it is important to make certain that there is only one oocyst on the film. Finally the film supporting the oocyst is cut and picked up with a pair of fine forceps to feed a day-old chick. All such experimental chicks must be reared individually in separate cases and supplied with well cooked feeds and boiled water to avoid environmental contamination of coccidial oocysts. Such chicks will excrete oocysts of a single species of coccidia after the preoocinosis period.