

前 言

球虫病(coccidiosis)是多种动物的一种重要寄生虫病,对家畜、家禽、鱼类和野生动物等均有不同程度的危害,各国均有发生。本病对家禽和兔危害较大,急性暴发的死亡率可超过30%;其次是猪、牛、羊等大家畜,急性感染常引起下痢,生长严重受阻;也偶有鱼类和野生动物发生球虫病的报道。特别在集约化的养殖中,若控制不严,会造成重大的经济损失。

本病的病原为孢子虫纲(Sporozoa),球虫亚纲(Coccidia),艾美耳科(Eimeriidae)中的艾美耳属(*Eimeria*)、等孢属(*Isospora*)、泰泽属(*Tyzzeria*)、温扬属(*Wenyonella*)的球虫。每种动物都有各自特有的球虫种,文献记录畜禽和野生动物的球虫种已达1340种。国内外对球虫病诊断的经典方法是病原检查,并结合临床症状和病理剖检进行综合诊断。尽管国内外学者建立了多种免疫学和血清学技术,如色素试验法、孢子制动反应、间接凝集试验、免疫荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫细胞化学技术、随机引物扩增多态性DNA(RAPD)等,但由于这些方法检出的准确性和操作复杂等问题,尚不能代替现有方法。最常用的方法仍是病原检查和综合诊断技术。

病原检查简单、易行,既可定量、又可定性,既可用于发病前、又可用于发病后,以确定动物或动物群感染球虫的程度。综合诊断主要用于发病或死亡后的诊断,确定动物或动物群是否因感染球虫而发病或死亡。病原检查可广泛用于流行病学调查、防治药物的筛选和临床验证、进出口检疫、无本病健康动物群的建立等。

为了规范球虫与球虫病的检疫方法,使得检出结果客观、准确、一致,以保证《中华人民共和国动物防疫法》的实施,特制定本标准。

本标准的附录A、附录B为标准的附录,附录C为提示的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所、中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:黄兵、陈兆国、白启。

动物球虫病诊断技术

Diagnostic techniques for animal coccidiosis

1 适用范围

本标准规定了动物球虫病的病原检查和综合诊断技术。
本标准适用于禽类和兔的球虫病(感染)的诊断。

2 病原检查

2.1 材料准备

2.1.1 饱和盐水,配制方法见附录 A(标准的附录)。

2.1.2 60 目铜丝网或尼龙网、100 mL 量杯、50 mL 和 100 mL 烧杯、5 mL 玻璃瓶、吸管、镊子、天平、离心机、麦氏虫卵计数板、载玻片、盖玻片、显微镜等。

2.1.3 被检动物或动物群的新鲜粪便不少于 200 g。

2.2 操作方法

2.2.1 定性检查

2.2.1.1 取被检动物或动物群的新鲜粪便 10 g,放入 50 mL 烧杯中,加入适量水。

2.2.1.2 轻轻搅匀,经 60 目铜丝网或尼龙网过滤。

2.2.1.3 将滤液移入 4 支 10 mL~15 mL 试管,2 500 r/min 离心 10 min。

2.2.1.4 倾去上清液,各管沉淀物中加入少量饱和盐水,混匀。各管的沉淀物混悬液移入一个 5 mL 玻璃瓶。

2.2.1.5 用饱和盐水(见附录 A)加满,盖上盖玻片(盖玻片须能与液面接触),静置 10 min。

2.2.1.6 取下盖玻片,放在载玻片上。

2.2.1.7 置载玻片于显微镜台上,用 10×10 或 10×40 的倍数进行检查。

2.2.1.8 判定:

a) 发现球虫卵囊,判为阳性,说明该动物(群)已感染球虫,并可根据附录 C(提示的附录)卵囊形态特征,初步确定为哪一属的球虫;

b) 未发现球虫卵囊,需重复检查 5 次,仍未见球虫卵囊,本粪样可判为阴性。只有连续检查粪便 7 d~10 d,均未发现球虫卵囊,方可说明该动物(群)未感染球虫。

2.2.2 定量检查

2.2.2.1 对定性检查中呈阳性的粪样,要进行定量检查。

2.2.2.2 取待检粪样 2 g,放入 50 mL 烧杯。

2.2.2.3 加入少量自来水搅匀,经 60 目铜丝网或尼龙网过滤,并用自来水冲洗几次滤网。

2.2.2.4 滤液经 2 500 r/min 离心 10 min。

2.2.2.5 用少量饱和盐水将沉淀物搅匀,移入 100 mL 量杯,加饱和盐水至 60 mL 处,充分混匀。

2.2.2.6 用吸管吸取混悬液注满麦氏虫卵计数板,静置 5 min。

2.2.2.7 将麦氏虫卵计数板置于显微镜下检查,用 10×10 或 10×40 倍,数出每个刻室(1 cm×1 cm×

0.15 cm=0.15 cm³,含100个小方格)内的所有卵囊数,计算出平均值A。对压线的卵囊,按左、上压线计,右、下压线不计处理。

2.2.2.8 每克粪便卵囊数(OPG)按式(1)计算:

$$\text{OPG} = (A \div 0.15) \times 60 \div 2 = A \times 200 \quad \dots\dots\dots(1)$$

2.2.2.9 对卵囊数较多的粪样,可在60 mL的基础上,用饱和盐水再稀释B倍后计数,则OPG按式(2)计算:

$$\text{OPG} = A \times 200 \times B \quad \dots\dots\dots(2)$$

2.2.2.10 判定标准:

- a) $\text{OPG} > 10 \times 10^4$,为严重感染;
- b) $10 \times 10^4 \geq \text{OPG} \geq 1 \times 10^4$,为中度感染;
- c) $\text{OPG} < 1 \times 10^4$,为轻度感染。

3 病理检查

3.1 材料准备

3.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS),配制方法见附录B(标准的附录)。

3.1.2 50 mL或100 mL烧杯、吸管、镊子、玻片、盖玻片、显微镜、水浴锅等。

3.1.3 疑为发生球虫病的动物(群)的粪便或球虫感染致死或将要死亡的动物。

3.2 病变检查

3.2.1 对疑为球虫感染致死或将要死亡的动物,进行解剖,观察病变情况。

3.2.2 主要检查肠道病变。若肠道明显肿大、胀气或变形;肠浆膜面出现针尖大小,颜色为鲜红色、褐色或白色的斑点或斑块;肠内容物充满出血块、脱落的上皮细胞、纤维蛋白、粘液等,呈暗红色、橙黄色或乳白色,多为稀薄状;肠粘膜增厚,有坏死的病灶和灰白色的斑点或斑块等,可疑为球虫病,进一步做球虫裂殖子或卵囊的检查。

3.2.3 对兔,要检查肝脏。对鹅,要检查肾脏。若这些脏器上有灰白色的斑点或斑块,可疑为球虫病,进一步做球虫卵囊检查。

3.3 裂殖子检查

3.3.1 取病变明显的肠道,纵向剪开,用磷酸盐缓冲液(见附录B)轻轻洗去粘膜表面的杂物。

3.3.2 刮取少许粘膜,放在载玻片上,滴1~2滴磷酸盐缓冲液,加盖玻片,置于显微镜下检查。

3.3.3 在高倍镜下,如见有大量球形的像剥了皮的桔子似的裂殖体和香蕉形或月牙形的裂殖子,即可确诊为球虫病。

3.4 卵囊检查

3.4.1 将病变明显的肠道,纵向剪开。取少量内容物,放在载玻片上,滴1~2滴磷酸缓冲液,加盖玻片,轻轻将内容物压散,置显微镜下检查,若见大量球虫卵囊,可确诊为球虫病。

3.4.2 或取有灰白色斑点或斑块的肠道,纵向剪开,用磷酸盐缓冲液轻轻洗去粘膜表面的杂物。刮取少许有灰白色斑的粘膜,放在载玻片上,滴1~2滴磷酸盐缓冲液,加盖玻片,轻轻将内容物压散,置显微镜下检查,若见大量球虫卵囊,可确诊为球虫病。

3.4.3 对疑为兔或鹅的球虫病,从有灰白色斑点或斑块的肝脏或肾脏上,剪取少量病变组织,放在研钵内,加适量磷酸盐缓冲液,充分研磨。取1滴研磨液在载玻片上,加盖玻片,置显微镜下检查,若见大量球虫卵囊,可确诊为球虫病。

附录 A

(标准的附录)

饱和盐水的配制

称取 400 g 食盐,放入三角烧瓶中,加入 1 000 mL 水,将烧瓶置于电炉上,边烧边搅拌,待全部溶解后,静置冷却,有少量盐析出,即为饱和盐水,密度约 1.18。

附录 B

(标准的附录)

磷酸盐缓冲溶液(PBS)

B1 将下列试剂按次序加入到 1 000 mL 定量瓶中。

氯化钠	8.00 g
氯化钾	0.20 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g
蒸馏水	800 mL

充分搅匀,用适量 1 mol/L 盐酸(HCl)调溶液的 pH 值至 7.4,再加蒸馏水定容至 1 L。

B2 分装至 500 mL 或 250 mL 的盐水瓶中,在 103.41 kPa 压力下蒸气灭菌 20 min,室温保存。

附录 C

(提示的附录)

球虫卵囊形态特征

- C1 球虫卵囊呈椭圆形、圆形、卵圆形或梨形等不同的形态,均有卵囊壁。
- C2 未发育成熟的卵囊,其颗粒状的原生质多数呈圆形,位于卵囊中间。
- C3 发育成熟的卵囊因属不同,而内含的孢子囊和子孢子数不相同。
- C3.1 艾美耳属(*Eimeria*)球虫卵囊内有 4 个孢子囊,每个孢子囊含 2 个子孢子。
- C3.2 等孢属(*Isospora*)球虫卵囊内有 2 个孢子囊,每个孢子囊含 4 个子孢子。
- C3.3 泰泽属(*Tyzzeria*)球虫卵囊内没有孢子囊,内含 8 个子孢子。
- C3.4 温扬属(*Wenyonella*)球虫卵囊内有 4 个孢子囊,每个孢子囊含 4 个子孢子。