

鸡巨型艾美耳球虫早熟株选育及其生物学特性研究

郝飞飞,王天成,张黎,弥成龙,冯玉萍,张雪松,郑明学

(山西农业大学 动物科技学院,山西 太谷 030801)

摘要:为选育鸡巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)早熟株,并对其生物学特性进行研究,采用早熟选育法对*E. maxima*亲本株进行连续鸡体传代以获得早熟株,再分别将鸡*E. maxima*亲本株和早熟株孢子化卵囊以不同剂量口服接种14日龄无特定病原(SPF)雏鸡,测定*E. maxima*亲本株和早熟株的潜隐期、卵囊形态大小,并分析比较其致病性强弱和繁殖力高低。结果表明,成功选育出潜隐期为113 h的鸡*E. maxima*早熟株,其卵囊长和宽均显著小于亲本株卵囊。在整个试验过程中,各组鸡接种*E. maxima*亲本株和早熟株孢子化卵囊后均无死亡现象;当鸡*E. maxima*亲本株和早熟株孢子化卵囊接种剂量为 $0.5 \times 10^4 \sim 20.0 \times 10^4$ 个/羽时,等剂量下*E. maxima*早熟株组鸡的相对体质量增加率显著大于亲本株组;接种量在 $10.0 \times 10^4 \sim 20.0 \times 10^4$ 个/羽时,等剂量下*E. maxima*早熟株组鸡的肠道病变记分显著低于亲本株组;随接种剂量的增加,*E. maxima*亲本株和早熟株组鸡的相对体质量增加率逐渐降低,临床症状逐渐加重。此外,相同接种剂量下,*E. maxima*早熟株组卵囊产量均显著低于亲本株组,前者卵囊产量是后者的60%~75%;但随接种剂量的增加,*E. maxima*亲本株和早熟株组单卵囊繁殖力均呈下降趋势。综上,选育的鸡*E. maxima*早熟株与亲本株相比,致病力减弱、繁殖能力降低,能够为球虫多价活疫苗提供*E. maxima*虫种,以进一步加强鸡球虫病的防治。

关键词:鸡;巨型艾美耳球虫;早熟株选育;致病力;繁殖力;生物学特性

中图分类号:S852.723 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2019)03-0132-05

Breeding and Biological Characteristics Research of Chicken *Eimeria maxima* Precocious Strain

HAO Feifei, WANG Tiancheng, ZHANG Li, MI Chenglong, FENG Yuping,

ZHANG Xuesong, ZHENG Mingxue

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: To breed *E. maxima* precocious strain and study its biological characteristics, which was obtained with premature induction method from *E. maxima* virulent strain by continuous chicken passage, then two kinds of *E. maxima* strains were orally inoculated with 14-day-old chicks in different sporulated oocysts. Their latent period, size of oocyst were determined and their pathogenicity and fertility were analyzed. Results showed that the latent period of precocious strain was 113 h, the average length and width of the oocysts was significantly smaller than the oocysts of virulent strain. There was no death in each group, when the dose of chicken *E. maxima* strains was $0.5 \times 10^4 \sim 20.0 \times 10^4$ of spore oocysts, the relative weight gain rate of precocious group was significantly higher than virulent strain group in the same does;

收稿日期:2018-08-15

基金项目:山西省科学技术厅项目(201703D221024-3)

作者简介:郝飞飞(1993-),男,山西忻州人,在读硕士研究生,研究方向:动物传染病发生与免疫机理。

E-mail:HaoFeiFei1993@163.com

通信作者:郑明学(1962-),男,山西平陆人,教授,博士,主要从事动物传染病的发生与免疫机理研究。

E-mail:zhengmingxue288@163.com

when the inoculation was 10.0×10^4 — 20.0×10^4 of spore oocysts, the intestinal lesions scores of precocious group were significantly lower than those in the virulent group in the same doses. The relative weight gain rate of chickens gradually decreased, but the clinical symptoms gradually increased as inoculate doses increased. Its oocyst yield was lower than the virulent strain group significantly in the same dose, and the former oocyst yield was 60%—75% of the latter; but the fecundity of the two coccidial oocysts decreased with the increase of the inoculation dose. It is indicated that the *E. maxima* precocious strain of chicken has weaker pathogenicity and lower reproductive ability than the virulent strain. Our study aims to provide species of vaccine and relevant evidence for the prevention of avian coccidiosis.

Key words: Chicken; *E. maxima*; Premature breeding; Pathogenicity; Fertility; Biological characteristics

鸡球虫病是由于艾美耳球虫寄生于鸡肠道内所引起的一种危害极严重的全球性寄生虫病^[1-2], 我国将其列为二类动物疫病。鸡感染球虫后一般表现为慢性经过, 发病期间饲料转化率降低且鸡生长缓慢, 给肉鸡体质量的增加造成了严重威胁; 但若表现为急性感染, 鸡的死亡率则高达 80%^[3]。目前, 给我国传统养鸡业造成严重危害的球虫包括鸡柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)、毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)、堆形艾美耳球虫(*E. acervulina*)和巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)。其中, 鸡 *E. maxima* 病流行性广, 且对鸡的生长和体质量的增加影响严重, 感染后鸡的相对体质量增加率可下降 50% 以上^[4]。我国是养鸡大国, 每年用于抗球虫药物的花费约为鸡病全部防治费用的 30%, 且这一数据还在持续上升^[5]。

将球虫活苗制备成疫苗对雏鸡进行免疫, 是实际生产中唯一可替代抗球虫药物来控制球虫病的方法^[6-7]。目前, 商用的鸡球虫疫苗有强毒活疫苗和弱毒活疫苗。由球虫亲本株制备的强毒活疫苗虽然免疫效果良好, 但使用不当易导致免疫失败, 甚至导致鸡场暴发球虫病; 而由球虫亲本株选育出的早熟株是全世界公认的免疫原性好、致病力低且遗传稳定的球虫疫苗虫株^[8], 由其制备的弱毒活疫苗在世界范围内被广泛使用。山西农业大学兽医病理实验室前期已从鸡 *E. acervulina*、*E. necatrix*、*E. tenella* 的亲本株中成功选育出其各自的早熟株, 球虫多价弱毒苗的制备还缺少 *E. maxima* 早熟株。在疫苗中添加 *E. maxima* 早熟株能够增加其免疫原性, 同时配合基因佐剂加强免疫能够缩短免疫空窗期, 降低疫苗副作用, 从而对鸡球虫病起到更好的预防效果。因此, 本研究选用由山东分离出的鸡 *E. maxima* 进行早熟株选育, 旨在为球虫多价苗提供 *E. maxima* 早熟株虫种并研究其生物学特性, 为防治球虫病提供相关依据。

1 材料和方法

1.1 鸡 *E. maxima* 亲本株与供试动物

供试鸡 *E. maxima* 亲本株为山东分离株(潜隐

期 124 h), 由山西农业大学兽医病理实验室保存与提供。无特定病原(SPF)雏鸡由北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡 *E. maxima* 早熟株的选育 14 日龄 SPF 雏鸡(20 羽/批)以 1.0×10^4 个/羽的剂量口服接种 *E. maxima* 亲本株孢子化卵囊, 接种后 123 h 起每小时检查 1 次鸡粪便中有无球虫卵囊。记录每次接种后最先发现卵囊的时间。由此开始, 连续收集 10 h 鸡粪便中的卵囊, 在体外培养成熟后继续接种下一批雏鸡。连续传代至虫株潜隐期时, 则表明成功选育出鸡 *E. maxima* 早熟株。

1.2.2 鸡 *E. maxima* 早熟株和亲本株潜隐期的卵囊形态观察 于 14 日龄时对空腹的 SPF 雏鸡进行体质量称量, 将 42 羽体质量接近的雏鸡随机分为 2 个组, 每组 21 羽, 分别以 20.0×10^4 个/羽的剂量口服接种 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊。接种后以 24 h 为间隔, 在 2 个组中分别随机挑取 3 羽鸡进行剖检。观察鸡空肠有无肉眼可见的病变, 并取空肠中段卵黄蒂附近的肠上皮进行组织涂片, 同时对该部位肠道进行取材并制作石蜡切片, 经 HE 染色后于光镜下观察裂殖体及卵囊出现时间, 以及球虫卵囊孢子化前的大小。

1.2.3 鸡 *E. maxima* 早熟株致病性和繁殖力的比较 于 14 日龄时对空腹的 SPF 雏鸡进行体质量称量, 将 110 羽体质量接近的雏鸡随机分为 11 组, 每组 10 羽, 其中, 5 组为亲本株接种组, 5 组为早熟株接种组, 分别按照 0.1×10^4 、 0.5×10^4 、 1.0×10^4 、 10.0×10^4 、 20.0×10^4 个/羽的剂量梯度口服接种 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊, 剩余 1 组为空白对照组, 每羽鸡口服等量不含虫株的稀释液。

接种后每天观察鸡的精神状况、粪便的质地和颜色以及发病死亡情况。收集接种后 5~7 d 鸡粪便中的卵囊, 通过计算排卵囊总量和单卵囊繁殖力来比较鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的繁殖力。其中, 排卵囊总量为排卵囊期间每羽鸡平均卵囊总产量。单卵囊繁殖

力为每羽鸡排卵囊总量与接种剂量的比值。

于接种后 168 h, 将鸡逐一空腹称体质量后进行剖解, 记录死亡数、体质量、病变记分。通过死亡率、相对体质量增加率并结合肠道病变记分对鸡 *E. maxima* 早熟株和亲本株的致病性进行比较分析。其中, 死亡率为各组死亡鸡的数量与组内鸡总数的百分比。相对体质量增加率 = 感染组鸡平均增质量/空白组鸡平均增质量 × 100%。病变记分依据 JOHNSON 等^[9]的方法对鸡小肠中段进行病变记分。

1.3 数据处理

采用 Prism 6.0 整理数据并绘制图表, 采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行方差分析和 t 检验。

2 结果与分析

2.1 鸡 *E. maxima* 早熟株的选育

14 日龄雏鸡口服接种 *E. maxima* 亲本株孢子化卵囊 1.0×10^4 个/羽来进行早熟株的选育, 结果显示, 每次传代后其潜隐期可缩短 1~2 h, 在第 13 代

时成功选育出潜隐期为 113 h 的 *E. maxima* 早熟株。继续将选育出的 *E. maxima* 早熟株在雏鸡体内进行连续扩繁时发现, 潜隐期能够稳定在 113 h, 且选育出的 *E. maxima* 早熟株繁殖力和致病性稳定, 能够稳定传代, 表明成功选育出 *E. maxima* 早熟株。

2.2 鸡 *E. maxima* 早熟株和亲本株潜隐期的卵囊形态

自雏鸡接种 *E. maxima* 早熟株后每隔 24 h 随机剖解 3 羽, 观察空肠中段肠黏膜中裂殖体、卵囊的数量及大小。结果发现, 其第 1 代、第 2 代裂殖体数量与亲本株接近, 但是第 3 代裂殖体数量较亲本株明显减少; *E. maxima* 早熟株接种后 113 h, 空肠肠道黏膜上皮中可见卵囊, 形状呈卵圆形, 囊壁分 2 层, 少数因附着颗粒状物显粗糙(图 1), 而亲本株在 124 h 时方可见卵囊; 且早熟株卵囊长、宽平均为 29.18 μm 和 21.74 μm, 显著小于亲本株卵囊 30.23 μm 和 22.13 μm (表 1)。表明早熟株的发育与亲本株相比存在缺陷。

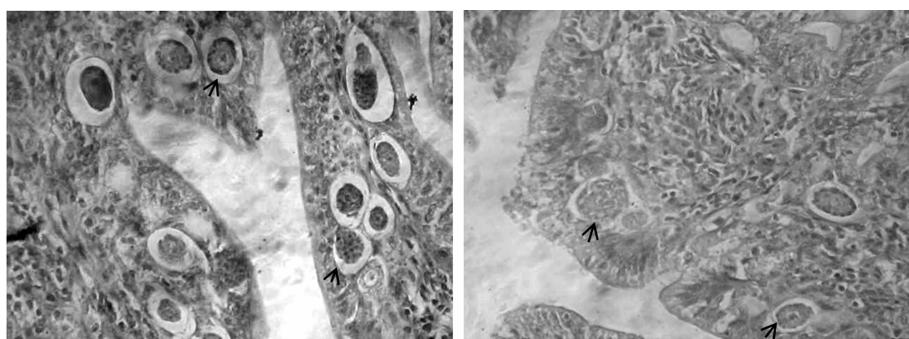


图 1 接种 *E. maxima* 早熟株 113 h 后鸡空肠黏膜中的 *E. maxima* 卵囊 (400 ×)

Fig. 1 *E. maxima* oocysts in the jejunal mucosa of chicks after inoculation of *E. maxima* precocious strains 113 h (400 ×)

表 1 鸡 *E. maxima* 早熟株和亲本株卵囊形态比较

Tab. 1 Comparison of oocysts morphology between *E. maxima* precocious and virulent strains of chicks

虫株 Strains	μm	
	卵囊长度 Length of oocyst	卵囊宽度 Width of oocyst
亲本株 Virulent strains	$30.23 \pm 0.24b$	$22.13 \pm 0.18b$
早熟株 Precocious strains	$29.18 \pm 0.18a$	$21.74 \pm 0.15a$

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different lowercase letters after data in the same column mean significant difference at $P < 0.05$.

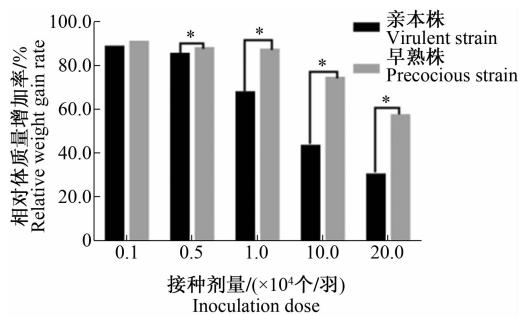
2.3 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的致病性分析

接种 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊的鸡在接种后 7 d 内均无死亡现象; 临床症状表现为精神不振、食欲下降、低头缩颈; 随着 *E. maxima*

亲本株和早熟株孢子化卵囊接种剂量的增加, 鸡的粪便变稀, 内容物呈橘黄色。由图 2 和图 3 可知, *E. maxima* 亲本株和早熟株接种鸡的相对体质量增加率均随接种剂量的增加逐渐降低, 而病变记分逐渐升高; 当鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊接种剂量为 0.5×10^4 ~ 20.0×10^4 个/羽时, 早熟株组鸡的相对体质量增加率显著大于亲本株组; 当鸡 *E. maxima* 亲本株孢子化卵囊的接种剂量在 10.0×10^4 ~ 20.0×10^4 个/羽时, 亲本株组鸡的相对体质量增加率无显著性差异; 接种剂量在 10.0×10^4 ~ 20.0×10^4 个/羽时, 早熟株组鸡的肠道病变记分显著低于亲本株组。表明随接种剂量的增加, *E. maxima* 亲本株和早熟株对雏鸡体质量增加影响逐渐严重; 且在相同接种剂量下, 亲本株的致病力强于早熟株。

2.4 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的繁殖力分析

当鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的接种剂量为 $0.1 \times 10^4 \sim 20.0 \times 10^4$ 个/羽时, 相同接种剂量下早熟株组的鸡 *E. maxima* 卵囊产量均显著低于亲本株组, 早熟株组鸡的 *E. maxima* 卵囊产量是亲本株组的 60% ~ 75%, 表明在同等接种剂量下, 早熟株卵囊繁殖力低于其亲本株, 且鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的卵囊产量均随接种剂量增加而增高(图 4), 但单卵囊繁殖力反而逐渐降低(图 5)。



* 表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 图 3 和图 4 同

* means significant differences ($P < 0.05$). The same as Fig. 3 and Fig. 4.

图 2 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株不同接种剂量对雏鸡体质量的影响

Fig. 2 Effect of different inoculation dose of *E. maxima* virulent and precocious strains on the weight gain of chicks

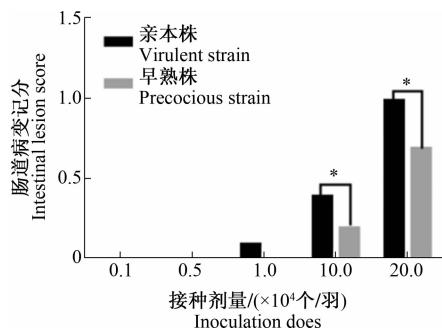


图 3 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株不同接种剂量对雏鸡肠道的影响

Fig. 3 Effect of different inoculation dose of *E. maxima* virulent and precocious strains on the intestinal tract of chicks

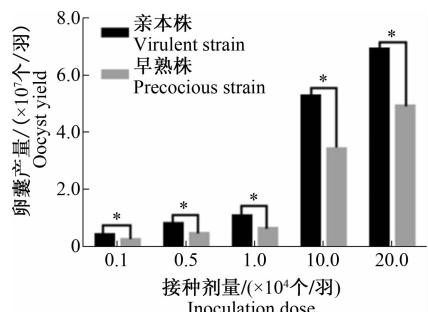


图 4 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株不同接种剂量对卵囊产量的影响

Fig. 4 Effect of inoculation dose of *E. maxima* virulent and precocious strains on the oocyst yield

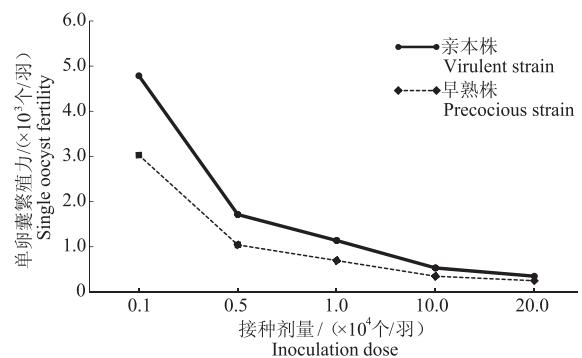


图 5 鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株不同接种剂量对 *E. maxima* 单卵囊繁殖力的影响

Fig. 5 Effect of different inoculation dose of *E. maxima* virulent and precocious strains on the ability of single oocyst fertility

3 结论与讨论

鸡 *E. maxima* 亲本株裂殖生殖阶段发育完整, 但由于早熟株最后 1 代裂殖体发育有缺陷, 会导致卵囊形成并排出的时间较亲本株缩短。因此, 早熟选育法利用鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株排卵时间有差异的特点, 通过亲代虫株多次选择最早成熟的卵囊反复传代, 筛选出在生物学特性方面与亲本株有差异的早熟株^[10]。本研究中, 鸡 *E. maxima* 亲本株的潜隐期为 124 h, 在经过 13 代选育之后, 早熟株的潜隐期与排卵高峰都提前 11 h 左右, 早熟株的第 1 代、第 2 代裂殖体数量与亲本株相近, 而第 3 代裂殖体数量明显减少, 且早熟株卵囊显著小于亲本株, 与蒋金书^[11]关于球虫早熟株特性的报道一致。

目前, 已证实 *E. maxima* 的主要毒力来源于其裂殖生殖和配子生殖阶段。由于 *E. maxima* 的裂殖体寄生在肠道绒毛较深的部位, 且相对于其他球虫来说体积较大, 因此, 在这个阶段的 *E. maxima* 容易造成肠道上皮细胞的死亡, 进而使肠道上皮发生脱落崩解引起继发性肠炎。本研究中, 各试验组鸡均无死亡且无异常表现, 在鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊接种剂量为 $0.5 \times 10^4 \sim 20.0 \times 10^4$ 个/羽时, 同等剂量下亲本株组鸡的相对体质量增加率均显著低于早熟株组, 且病变记分高于早熟株组。早熟株组鸡小肠内出现胀气, 浆膜发红充血, 肠内容物少, 各组病变记分均 ≤ 0.7 ; 而亲本株组鸡的空肠可见少量出血点, 内容物呈黄褐色, 各组病变记分均 ≤ 1.0 。说明鸡 *E. maxima* 亲本株对鸡肠道的致病作用强于早熟株。而 *E. maxima* 早熟株最后一代裂殖体发育不完全, 形成的后代卵囊数量少, 因而较其亲本株对鸡肠道造成的损伤更低, 使其致病力

减弱^[12]。

本研究发现,在相同接种剂量下,鸡 *E. maxima* 早熟株组卵囊产量均低于亲本株组。刘丽丹^[13]报道,在相同接种剂量下布氏艾美耳球虫的繁殖能力显著高于其选育的早熟株,与本研究结果相同。同时,本研究还发现,鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株孢子化卵囊接种剂量在 20.0×10^4 个/羽和 10.0×10^4 个/羽时,其卵囊产量并无显著性差异,而且单卵囊繁殖力随接种剂量的增高也逐渐降低,符合研究者提出的“拥挤效应”^[14]。当接种量较低时,可供配子体寄生的肠黏膜上皮细胞数量多,充足的空间与营养给与球虫良好的生存条件,经过有性生殖后生成的卵囊数量多且随粪便排出体外,但是当接种剂量较大时,肠道内充满被释放的裂殖子,反而因为没有足够的肠上皮细胞供其寄生而导致死亡并排出体外,达到“过饱和”状态^[15]。在本研究进行致病性观察时也发现了这一现象,即鸡 *E. maxima* 亲本株孢子化卵囊接种剂量在 10.0×10^4 个/羽和 20.0×10^4 个/羽时鸡的相对体质量增加率无显著性差异,表明当鸡 *E. maxima* 亲本株孢子化卵囊接种剂量在 1.0×10^4 ~ 10.0×10^4 个/羽时,鸡的肠上皮细胞已达到感染数量阈值,早熟株组结果与之类似。

试验中对鸡 *E. maxima* 亲本株和早熟株的生物学特性进行比较发现,与亲本株相比,早熟株对鸡肠道的损伤程度降低、繁殖能力下降。本研究前期试验中,赵雁萍^[16]也已经对鸡 *E. maxima* 山西株繁殖力作过相关研究,观察到随接种剂量的增加卵囊产量也随之增大。本研究中也证实,鸡 *E. maxima* 早熟株对鸡的肠道损伤和增质量影响没有亲本株严重,且早熟株在低剂量接种时对鸡肠道的损失甚微。但是鸡 *E. maxima* 早熟株是否保持其亲本株完整的免疫原性,能否作为疫苗进行球虫病免疫,剂量该如何选择还有待深入探究。

参考文献:

- [1] 刘诗柱,方磊涵,韩庆斌.自拟纯中药复方制剂球克星对鸡球虫病的治疗效果[J].河南农业科学,2011,40(12):149-152.
- [2] 贡鑫,吕强华,郑明学,等.巨型艾美耳球虫不同地理株交叉免疫保护性研究[J].畜牧与兽医,2017,49(9):75-78.
- [3] SONG X K, XU L X, LI X R, et al. Construction of *Eimeria tenella* multi-epitope DNA vaccines and their protective efficacies against experimental infection[J]. Vet Immunol Immunop, 2015, 166(3/4):79-87.
- [4] 宿世杰.巨型艾美耳球虫重组配子体蛋白的免疫保护效果研究[D].扬州:扬州大学,2014.
- [5] 赵洪梅.鸡球虫病及抗球虫药物的临床应用[J].当代畜禽养殖业,2009,26(3):26-28.
- [6] TOMLEY F M, BILLINGTON K J, BUMSTEAD J M, et al. Et-MIC4: A microneme protein from *Eimeria tenella* that contain standem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats[J]. Int J Parasitol, 2001, 31(12):1303-1310.
- [7] 米同国,黄占欣,赵达,等.中草药抗球虫散超微粉对柔嫩艾美耳球虫感染鸡免疫机能的影响[J].河南农业科学,2017,46(5):144-146,156.
- [8] 李仁良,谭志坚,林瑞庆,等.鸡球虫病弱毒疫苗的免疫机理及研究进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(2):132-134.
- [9] JOHNSON J, REID W M. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floorpen experiments with chickens[J]. Exp Parasitol, 1970, 28(1):30-36.
- [10] 李婷.鸡球虫早熟株免疫效力及 *EtATPase* 基因特性研究[D].北京:中国农业科学院,2012.
- [11] 蒋金书.动物原虫病学[M].北京:中国农业大学出版社,2000:141-184.
- [12] 吕强华.鸡球虫四价五株活疫苗实验室效力和安全性研究[D].太谷:山西农业大学,2016.
- [13] 刘丽丹.布氏艾美耳球虫保定早熟株的选育及生物学特性研究[D].广州:华南农业大学,2012.
- [14] 郭钰珏,蔡秀敏,郑明学.堆形艾美耳球虫早熟株与强毒株致病性和繁殖力的比较[J].动物医学进展,2014,35(12):54-57.
- [15] REMMAL A, ACHAHBAR S, BOUDINE L, et al. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils[J]. Veterinary Parasitology, 2011, 182(2/4):121-126.
- [16] 赵雁萍.不同地理株 *E. maxima* 交叉免疫保护性及抗原变异株早熟诱导研究[D].太谷:山西农业大学,2014.