ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

鸡球虫卵囊的收集及孢子化技术

Propagation and sporulation technique for coccidial oocysts in chickens

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会兽医寄生虫病防治分会提出。
本文件由中国兽医协会归口。
本文件起草单位：
本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

鸡球虫卵囊的收集及孢子化技术

1 范围

本文件规范了鸡球虫卵囊的扩繁，收集及其孢子化方法。

本文件适用于鸡球虫病相关科研工作、流行病学调查、疾病诊断和疫苗生产等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

本文件没有规范性引用文件。

3 术语与定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号与缩略词

无

5 仪器设备和主要试剂

5.1 仪器材料

80目和180目网筛、玻璃棒、15 mL离心管、1 mL注射器（无针头）、250 mL离心瓶、烧杯、手术剪刀、镊子、微量移液器（1 mL和20 μL）、麦氏计数器、血细胞计数板、水平离心机、28 ℃恒温培养箱。

5.2 主要试剂

去离子水、饱和食盐水、2.5 %重铬酸钾溶液，配制方法见附录A。

6 操作步骤

6.1 卵囊的计数

将保存于4 ℃ 2.5 %重铬酸钾溶液中的鸡球虫孢子化卵囊取出，混合均匀。将一小部分卵囊用饱和食盐水稀释100倍后混合均匀，用1 mL移液器吸取稀释液并填满麦氏计数器左右两个计数室，静置2 min，在显微镜10倍镜下计数孢子化卵囊。一般计数对角线10个小格里中的卵囊，最终确定1 mL重铬酸钾溶液中的孢子化卵囊数。具体计数方法按附录B说明进行。

6.2 卵囊的洗涤

中国兽医协会 CVMA

根据1 mL重铬酸钾溶液中的孢子化卵囊数及扩繁卵囊数确定重铬酸钾溶液体积，将重铬酸钾溶液转移至15 mL离心管中，4000 r/min离心8 min，弃上清，加入去离子水重悬沉淀清洗并离心，反复用去离子水清洗直到上清澄清，最后用去离子水重悬卵囊沉淀并将卵囊密度调至1×10^4个·mL^{-1}。感染剂量见附录C。

6.3 鸡球虫的感染

将1日龄健康雏鸡饲养在经严格消毒的无球虫动物房内，喂养至15~25日龄，在感染前半天禁止喂水喂料，饮水和饲料均不添加任何抗球虫药物。用1 mL注射器（无针头）吸取6.2中卵囊悬液1 mL，经口灌服至嗉囊。

6.4 粪便的收集

鸡感染球虫后，排卵囊期长短与不同虫种和鸡的免疫力有关，卵囊产量不仅与免疫力、攻虫剂量、鸡的年龄有关，也与虫种和鸡的品系相关。不同球虫的排卵囊期和排卵囊高峰也不同，因此需要收集对应虫种排卵囊期的粪便。7种球虫的粪便收集时间见附录C。

6.5 粪便中卵囊的收集

将排卵囊期收集到的粪便用5倍体积的去离子水充分浸泡并搅拌，充分搅碎粪渣，释放出足够多的卵囊。将粪便悬液用80目网筛进行过滤，粪渣用适量去离子水充分浸泡并搅拌后再次用80目网筛进行过滤，2次滤液混合在一起后再用180目网筛进行过滤，最后将收集到的滤液进行离心处理。

将滤液转移至200 mL离心瓶中，4000 r/min水平离心8 min，弃上清，收集沉淀，向沉淀加入10倍于沉淀体积的饱和食盐水（先加少许，充分混匀后再加入其余盐水），充分混匀，4000 r/min水平离心8 min，将表层浮液倒入另一容器中，加入不少于浮液10倍体积的去离子水将浮液稀释，4000 r/min水平离心8 min，弃去上清，沉淀则含有球虫卵囊。粪便中卵囊的收集均适用于7种球虫卵囊以及各种混合卵囊的收集。

6.6 肠道内容物及肠黏膜中卵囊的收集

此外，对于*E. tenella*和*E. necatrix* 2种在雏鸡盲肠部位形成卵囊的球虫，还可通过盲肠内容物和肠黏膜进行收集，在感染后第6天（*E. tenella*）或第7天（*E. necatrix*）剖杀雏鸡，取出盲肠，将其剪开，刮出肠道内容物和肠黏膜，并混在一起剪碎。然后用pH值为8.0，浓度为1.0~1.5 %的胰蛋白酶39 ℃水浴消化20 min，每隔5 min进行颠倒混匀。消化结束后，先后用60目和100目铜筛过滤消化液，将滤液转移至离心管中，4000 r/min水平离心8 min，弃上清。

向沉淀中加入饱和食盐水并将其重悬，然后4000 r/min水平离心8 min，收集上清液。向上清液加入10倍以上的去离子水进行稀释，继续4000 r/min水平离心10 min，弃上清。沉淀用10~20 %的次氯酸钠溶液重悬，4℃孵育10~15 min，4000 r/min水平离心10 min，弃上清。沉淀用去离子水重悬，4000 r/min水平离心10 min，并重复3~4次洗去残留的次氯酸钠，沉淀即为球虫卵囊。

中国兽医协会 CVMA

6.7 卵囊的孢子化

用少量2.5 %重铬酸钾溶液将6.5或6.6中收集到的卵囊沉淀重悬，将悬液转移至适当的容器中，并继续用2.5 %重铬酸钾溶液调节卵囊密度至不超过1×10^6个·mL^{-1}，容器中重铬酸钾溶液的厚度不超过0.7 cm，用记号笔对液面位置进行标记，并将容器置于25~28 ℃的恒温培养箱中培养1~7天使卵囊孢子化。此间每天对培养液轻轻搅拌3~5次或用移液器轻轻吹打液面几十次，并观察液面，若液面下降，向容器中加入去离子水使液面调至标记处。

7 结果判定

7.1 卵囊孢子化的判定

取 6.7 中的球虫重铬酸钾悬液置于显微镜下观察卵囊孢子化情况，孢子化卵囊内含 4 个孢子囊，孢子囊前端的斯氏体清晰可见，每个孢子囊内有 2 个子孢子，子孢子的遮光体也清晰可见（孢子化卵囊和未孢子化卵囊见附录 D）。

7.2 孢子化率的判定

将 6.7 中的球虫重铬酸钾悬液摇晃混匀，用 20 μL 移液器吸取悬液充满血细胞计数板，并置于显微镜 10 倍物镜下观察，对孢子化卵囊进行计数，同时对所有卵囊（包括孢子化卵囊和未孢子化卵囊）进行计数，计数方法按附录 E 说明进行，计算孢子化率，当孢子化率达到 80 %以上时，停止培养，将球虫重铬酸钾悬液置于 4 ℃保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A

（规范性）

试剂及其配制

1. 饱和食盐水配制

称取食盐380 g，将其加入1000 mL开水中，充分搅拌后冷却至室温，有少量盐晶析出，即为饱和食盐水，其比重约为1.18 g/cm^3。

2. 2.5 %重铬酸钾溶液配制

称取重铬酸钾固体25 g，放入1 L烧杯中，加入去离子水800 mL，用玻璃棒充分搅拌均匀，使固体完全溶解无颗粒，继续补加去离子水至1000 mL，充分混匀后即为2.5 %重铬酸钾溶液。

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（规范性）
麦克马斯特法（**McMaster's method**）计数

将稀释液混匀后并填满麦氏计数器左右两个计数室，静置2 min，在显微镜10倍物镜下计数孢子化卵囊。计数室容积为1×1×0.15＝0.15（mL），两个计数室则为0.30 mL，若两个计数室所查孢子化卵囊数分别为a + b，则1 mL稀释液中的孢子化卵囊总数为(a + b) / (2×0.15)×10。

中国兽医协会
CVMA

附　录　C

（规范性）

7种球虫的感染剂量及感染后收集粪便的时间

虫种	感染剂量/个	粪便收集时间/天[a]
E. tenella	1000~10000	6~9
E. necatrix	1000~10000	6~9
E. acervulina	10000~100000	5~7
E. brunetti	1000~10000	6~8
E. maxima	10000~100000	6~9
E. mitis	10000~100000	5~8
E. praecox	10000~100000	4~7

[a]感染后天数

中国兽医协会
CVMA

附　录　D

（资料性）

孢子化卵囊和未孢子化卵囊对比

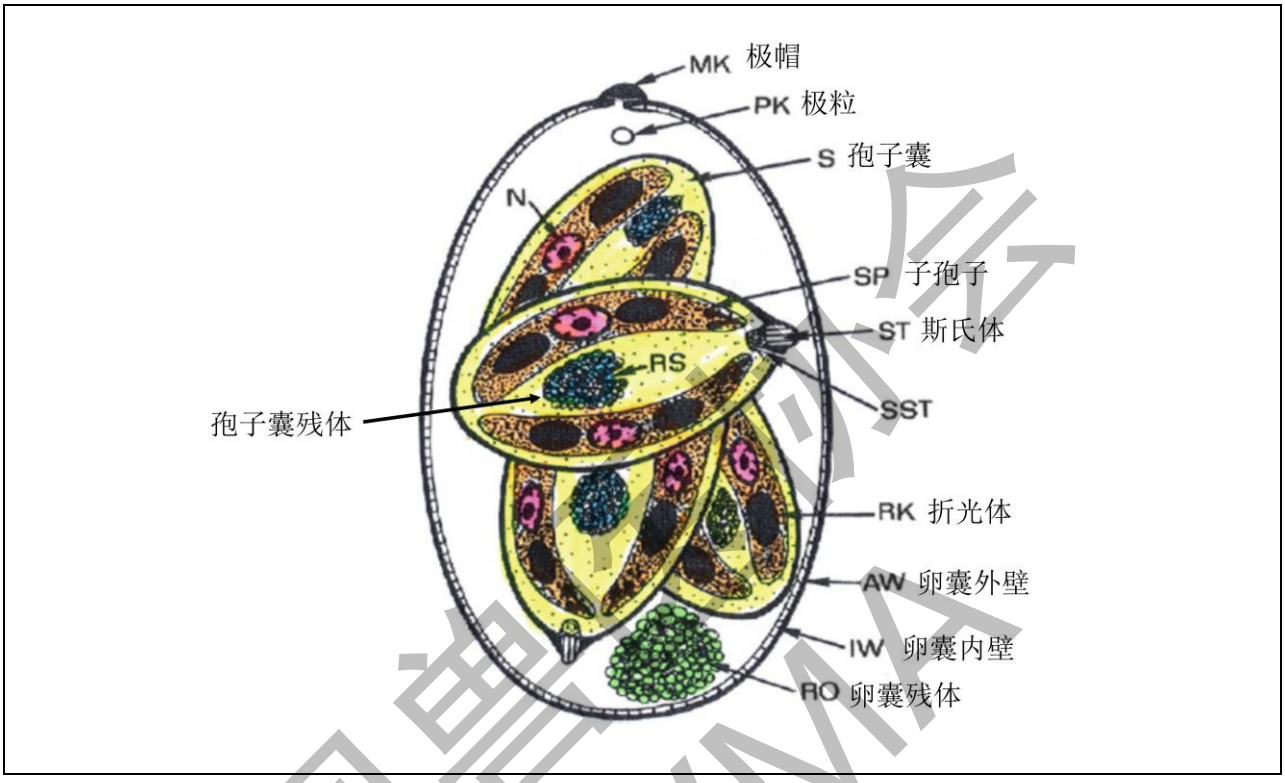

图1 孢子化卵囊模式图

A

图2A　未孢子化卵囊

B

图2B　孢子化卵囊

图2　未孢子化卵囊和孢子化卵囊对比

中国兽医协会 CVMA

附　录　D

（资料性）

孢子化卵囊和未孢子化卵囊对比

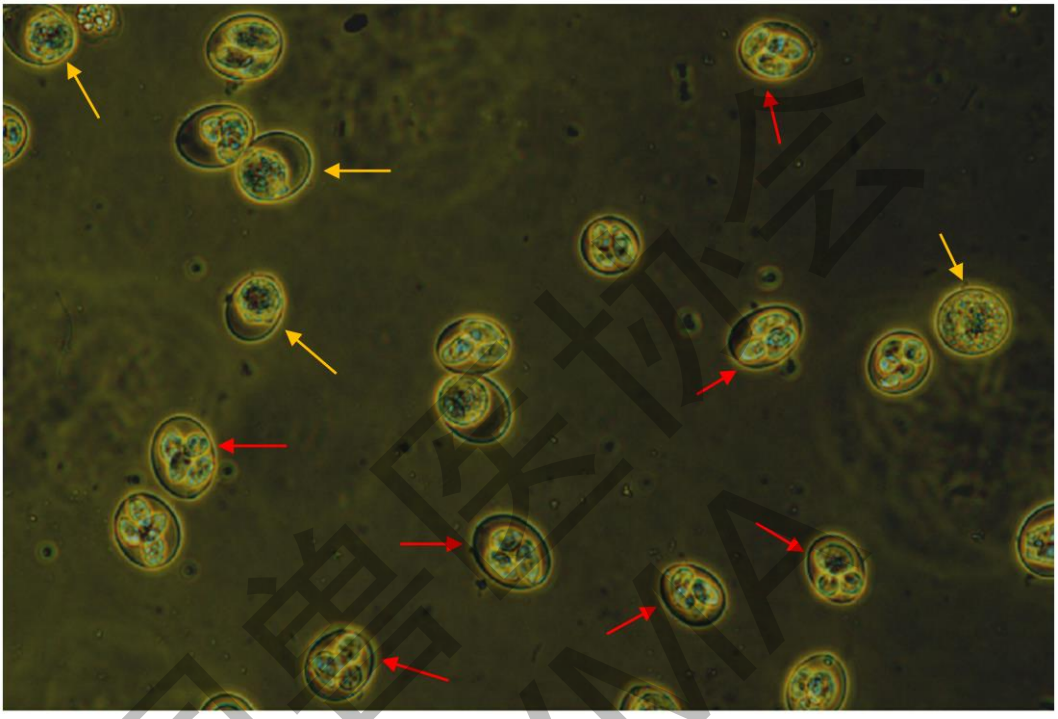

图3　显微镜下的孢子化卵囊（红色箭头）和未孢子化卵囊（黄色箭头）

中国兽医协会 CVMA

附　录　E

（规范性）

血细胞计数板计数

将充满有球虫悬液的血细胞计数板置于显微镜下，在10倍物镜下计算计数室四角4个大方格（每个大方格又分为16个中方格）中球虫卵囊总数，除以4求其平均数，乘以10^4即为1 mL悬液中的球虫卵囊数。若计数室四角没有大方格，则用正中的1个大方格，连续计数多次，求其平均数，再乘以10^4即为1 mL悬液中的球虫卵囊数。

中国兽医协会
CVMA

参考文献

[1] GB/T 1.1-2020, 标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则.

[2] GB/T 18647-2020, 动物球虫病诊断技术.

[3] 索勋, 李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京：中国农业大学出版社, 1998.

[4] 秦建华, 李国清. 动物寄生虫病学实验教程[M]. 北京：中国农业大学出版社, 2015.

[5] Holdsworth P A, Conway D P, McKenzie M E, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys[J]. Vet. Parasitol. 2004, 121(3-4):189-212.

[6] Tomley F. Techniques for isolation and characterization of apical organelles from *Eimeria tenella* sporozoites[J]. Methods. 1997, 13(2):171-176.

中国兽医协会
CVMA