

鸭源隐孢子虫种类鉴定及对鸡鸭致病性研究

张龙现^{1,2*} 宁长申² 蒋金书¹

(1 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

(2 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要 为鉴定在河南地区鸭群中广泛存在的隐孢子虫种类及其致病性, 我们将河南省鸭源隐孢子虫分离株传代增殖, 10 只鸡和 10 只鸭分别逐只接种上述分离株 640 万个卵囊, 应用光镜和扫描电镜技术对样品进行观察。根据卵囊形态测定数据, 排卵囊规律, 寄生部位及其寄生特点鉴定该分离株为贝氏隐孢子虫 (*Cryptosporidium baileyi*)。该分离株接种鸡、鸭后主要引起呼吸道和法氏囊的炎症。病理形态学变化表现为气管纤毛脱落, 杯状细胞排空, 上皮细胞肥大或增生。除虫体寄生处之外, 其他区域微绒毛尚保持完整。对虫体寄生密度, 临床症状和病理变化综合比较的结果表明鸡对贝氏隐孢子虫易感性比鸭高。

关键词 鸭; 隐孢子虫; 致病性; 病理形态学

中图分类号 S852.72; S858.230

Identification of *Cryptosporidia* from Ducks and Pathogenicity to Chickens and Ducks

Zhang Longxian^{1,2} Ning Changshen² Jiang Jinshu¹

(1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science,
Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract *Cryptosporidium* extensively exist in ducks in Henan Province. The isolate from ducks could be propagated in chicks. Each animal from ten chickens or ten ducks was inoculated with 6.4×10^6 oocysts of the isolate respectively, the samples that got from the animals were observed by the light microscopy and scanning electron microscopy to identify species and its pathogenicity. Results of the observation revealed the isolate was *Cryptosporidium baileyi* according to the morphometric data, regular pattern of oocysts discharged, parasitic sites and parasitic characteristics. It caused mainly inflammation in the respiratory tract and bursa of Fabricius. The morphopathologic change of mucosal surface showed goblet cell secretion completely, hypertrophy, hyperplasia and deciliation of the respiratory epithelium. The microvilli showed that normal pattern except the parasite harboured area. The amount of cryptosporidia in chickens was more than that in duck. It was concluded that the chicken was more susceptible to *Cryptosporidium baileyi* than that of duck from comparison of parasitic intensity, clinical symptoms, pathologic change.

Key words duck; cryptosporidia; pathogenicity; morphopathology

收稿日期: 2001-10-22

河南省杰出青年科学基金和河南省农业科技攻关资助项目(981040033)

* 张龙现, 博士, 副教授, 研究方向为球虫生物学。北京圆明园西路 2 号

隐孢子虫病是重要的人兽共患原虫病,广泛分布于世界各地。隐孢子虫宿主种类广泛,可以寄生于170多种动物。隐孢子虫有效种目前已达到8个,其中已确定的鸟类有效种有2个,即贝氏隐孢子虫(*Cryptosporidium baileyi*)和火鸡隐孢子虫(*C. meleagridis*),还可能还存在其他有效种,即分离自白尾鹧鸪和鸵鸟的2个虫株也可能是2个有效种^[1]。目前已查明30多种禽类可以感染隐孢子虫,除幼禽之外,也可寄生于成年禽类并致病,造成一定的经济损失^[2]。文献报道禽类隐孢子虫也感染免疫抑制的病人,因此也可能发生禽源人兽共患隐孢子虫病^[3]。禽类隐孢子虫在我国也普遍存在,北京、广东、四川、上海、河南、宁夏等地区均有文献报道,鸡、鸭、鹅、鹧鸪、孔雀、珍珠鸡、雉鸡、丝毛乌骨鸡均可自然感染或人工感染^[4-8]。本研究在对河南省鸭隐孢子虫病流行病学调查的基础上,对分离自某樱桃谷肉鸭群的隐孢子虫分离株,进行了虫种鉴定,及该分离株对鸡、鸭的致病性观察。

1 材料与方法

隐孢子虫卵囊:采用饱和糖溶液漂浮法从郑州市郊某樱桃谷肉鸭场分离收集隐孢子虫卵囊,保存于2.5%重铬酸钾中,放置于4℃冰箱中备用。

隐孢子虫分离株的传代增殖:从河南农业大学畜牧站购入1日龄黄金品种雏鸡20只,饲喂于经火焰喷灯消毒的笼内,喂全价料,自由饮水。2日龄时经喙囊接种鸭源隐孢子虫卵囊,收集排卵囊高峰期的卵囊,纯化后保存于2.5%重铬酸钾中,血细胞计数器计数后,置4℃冰箱待用。

鸭隐孢子虫种类鉴定及对鸡、鸭的致病性试验:自河南农业大学畜牧站和郑州黄河桥鸭场分别购进1日龄雏鸡和1日龄樱桃谷肉鸭各20只,每种动物均分为2个组,饲喂于上述方法消毒的笼内,隔离饲养,喂全价料,自由饮水。其中各1个组,2日龄时每只经口接种传代隐孢子虫卵囊640万个,另一组作对照,自接种之日始,每天取粪样用糖漂浮法检查卵囊排出情况(样品、糖溶液的量均固定),测定排卵囊规律,每日观察动物的临床症状。在试验组感染后第5天(DP I5, 5 days of post inoculated),第10天(DP I10),第20天(DP I20),每组随机剖杀2只动物,肉眼观察病理变化,并取喉头、气管、十二指肠、卵黄蒂前段、卵黄蒂后段、直肠、盲肠、泄殖腔、法氏囊等器官,电镜样品置预冷的2.5%戊二醛PBS固定液中;光镜样品置波恩氏(Bouin's)固定液中,4℃冰箱内保存备用。取样结束后,刮取上述各器官样品粘膜进行涂片,用改良齐-尼二氏抗酸染色法(Ziehl-Neelsen staining modified by Henriksen)检查,据此结果取舍光镜和电镜样品。

光镜样品的制备:波恩氏固定液固定后的样品,修块、石蜡包埋、切片、HE染色、镜检、记录、显微照像。

扫描电镜样品的制备:按常规方法取样、修样、固定、脱水,最后转入醋酸异戊酯中过夜,临界点干燥,喷金后用S-570H I T A C H I型扫描电镜观察与拍照。

2 结果

2.1 鸭隐孢子虫的种类

卵囊形态特点:光镜观察发现卵囊呈短椭圆形,内有一个大的残体和4个香蕉形的子孢子,糖液中的卵囊呈玫瑰红色,显著区别于在重铬酸钾中的淡灰白色。粪便涂片和粘膜涂片经改良齐尼二氏抗酸染色法染色后,在蓝绿色的背景下,虫体呈红色。观察108个卵囊,测定大小

范围为(5.10~7.14) μm \times (4.08~5.10) μm , 平均为6.02 μm \times 4.40 μm , 卵形指数(L/W, oocyst shape index) 1.10~1.62, 平均为1.37。

排卵囊规律: 试验组接种 6.4×10^6 个卵囊之后, 在鸡体内的潜隐期 (prepatent period) 3 d, 排卵囊高峰期 DP15~DP115, 持续排卵囊时间, 即显露期 (patent period) 25 d。高峰期卵囊数量在 10×100 倍镜下观察, 每个视野 10~16 个卵囊。在鸭体内潜隐期 (prepatent period) 3 d, 排卵囊高峰期为 DP17~DP19, 显露期 (patent period) 15 d, 高峰期卵囊数量在 10×100 倍镜下观察, 每个视野 2~6 个。

虫体寄生部位及寄生特点: 经粘膜涂片抗酸染色, 组织切片 HE 染色和扫描电镜检查, 发现虫体主要寄生于喉头、气管、泄殖腔和法氏囊, 而十二指肠、卵黄蒂前段、卵黄蒂后段、直肠、盲肠则未见虫体寄生。虫体寄生于法氏囊、泄殖腔、气管、喉头的粘膜表面, 形似图钉状嵌于纤毛或微绒毛丛中。虫体位于带虫空泡 (parasitophorous vacuole) 内, 各发育阶段虫体大小不一, 裹有带虫空泡的虫体呈亚球形或球形, 基部形成梳状结构, 虫体逸出后带虫空泡塌陷, 有的带虫空泡顶部崩解, 裸露出内部的虫体或残体 (图 1-1, 4, 5, 8)。

根据以上观察, 该鸭源隐孢子虫分离株应为贝氏隐孢子虫 (*C. baileyi*)。

2.2 鸭源隐孢子虫分离株对鸡、鸭的致病性和寄生器官的病理变化观察

鸭在 DP17 出现临床症状, DP14~DP118 为症状明显期, 其中有 4 只出现呼吸道症状 (4/10), 2 只出现眶下窦肿胀。呼吸道症状表现为伸颈、张口呼吸, 胸腹部起伏明显, 可听到咳嗽, 湿性罗音, 叫声嘶哑, 鼻孔有淡黄色粘液渗出, 一侧或两侧眶下窦肿胀。发病鸭精神抑郁, 食欲降低, 排白色水样稀粪。剖检发现气管内有粘液, 肺脏有部分实变, 气囊混浊增厚, 上有黄色干酪样沉积物, 法氏囊严重萎缩。此外, 剖开鸭肿大的眶下窦, 内有大量淡黄色粘液, 镜检, 内有隐孢子虫卵囊。

鸡在 DP17 出现临床症状, DP19~DP119 为症状明显期, DP125 症状消失, 其中 6 只出现呼吸道症状 (6/10)。呼吸道症状表现为伸颈、张嘴、甩头、振翅, 常呆立松羽, 饮食欲明显减退。出现呼吸困难的鸡迅速消瘦, 个体明显比对照鸡小。病鸡个体消瘦, 气囊混浊、增厚, 有黄色干酪样物附着, 肺脏有不同程度的实变, 法氏囊明显萎缩, 法氏囊与体重之比为 1/289, 而对照组为 1/195, 囊腔内粘液增多。气管及喉头粘液量明显增加。

光镜观察可见喉头、气管、法氏囊、泄殖腔的粘膜游离面粘附有较多的虫体, 除虫体之外, 粘膜表面尚可见粘液和细胞状碎屑, 上皮细胞肥大或增生。粘膜固有层有大量的炎性细胞浸润。喉头、气管粘膜上皮细胞的纤毛脱落 (图 1-1)

扫描电镜观察可见正常的气管纤毛排列整齐, 方向一致, 纤毛之间分布着杯状细胞; 正常的法氏囊粘膜上皮细胞顶端较平, 密集排列着一些微绒毛, 细胞之间界限清晰, 显示出整齐的排列方式 (图 1-2, 3)

DP15 气管粘膜表面寄生大量各发育阶段的虫体, 纤毛部分脱落, 显露出呈颗粒状的微绒毛, 残余纤毛排列紊乱, 呈倒伏状, 虫体嵌于纤毛丛中或微绒毛丛中, 由于纤毛脱落和虫体寄生使气管有效功能面积减少, 但此时未发现明显的呼吸困难症状, 说明尚处于炎症早期。粘膜表面有一些空洞, 这些是杯状细胞大量分泌粘液之后, 其顶端崩解所形成。DP110 气管粘膜上皮表面绝大部分纤毛脱落, 除虫体外, 尚可见一些形状不规则的分泌物团块, 粘膜上皮细胞向腔面凸起, 形状不规则, 大小不一致, 说明上皮细胞肥大和增生。此时呼吸困难症状严重, 说明有较重的呼吸道炎症。DP120 鸭气管粘膜表面虫体已很少, 纤毛也少见, 微绒毛尚保持完整, 鸡气管粘膜表面尚有较多虫体, 纤毛少见, 微绒毛较完整, 可以见到杯状细胞顶部崩解后留下的空洞 (图 1-4, 5)

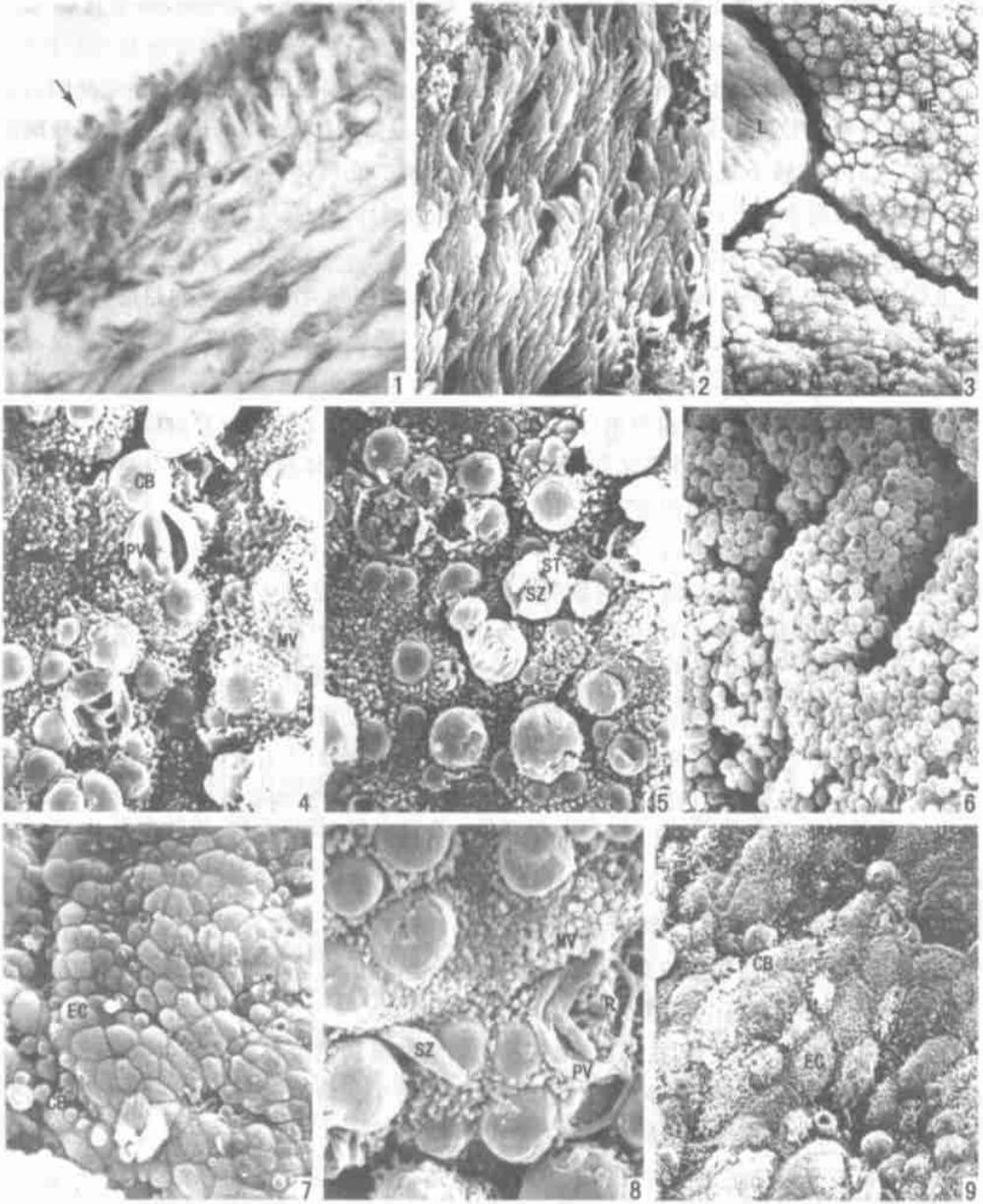


图1 贝氏隐孢子虫感染鸡鸭后病理形态学观察

- 1 DP15 鸡气管粘膜表面的虫体, LM, $\times 312.5$
- 2 6日龄鸡正常气管的纤毛, SEM, $\times 4\ 900$
- 3 6日龄鸭正常法氏囊粘膜腔面, L 示淋巴小结, ME 示粘膜上皮, SEM, $\times 1\ 000$
- 4 DP15 鸭气管粘膜腔面形态, CB 示虫体, PV 示虫体释出后的带虫空泡, MV 示微绒毛, SEM, $\times 5\ 000$
- 5 DP15 鸭气管粘膜腔面形态, ST 示裂殖体, SZ 示裂殖子, SEM, $\times 5\ 000$
- 6 DP15 鸡法氏囊粘膜腔面寄生的虫体, SEM, $\times 1\ 000$
- 7 DP120 鸭法氏囊粘膜腔面形态, EC 示变形的上皮细胞腔面形态, CB 示虫体, SEM, $\times 1\ 190$
- 8 DP120 鸭法氏囊粘膜腔面形态, SZ 示裂殖子, MV 示微绒毛, R 示颗粒状残体, PV 示残余带虫空泡, SEM, $\times 7\ 900$
- 9 DP110 鸭法氏囊粘膜腔面形态, CB 示虫体, EC 示上皮细胞腔面形态, SEM, $\times 2\ 900$

DP15 法氏囊粘膜表面形成皱褶并可见到大量的处于各个发育阶段的虫体, 鸡的尤其明显, 虫体的大量寄生形成明显的嵴, 嵴之间显示出一些沟。鸡法氏囊寄生虫体的密度明显比鸭的高。微绒毛尚无明显破坏。DP110 鸡的法氏囊粘膜表面仍然有较多虫体逸出后的带虫空泡, 除虫体外尚有大量形状不规则的粘液团块, 粘附在虫体四周, 无虫体寄生处微绒毛结构保持完整。DP110 鸭法氏囊粘膜表面虫体已很少, 粘膜表面凸凹不平, 这是上皮细胞肥大和增生的结果。DP120 鸡法氏囊粘膜表面仍有一些虫体。鸭法氏囊粘膜表面则很少看到虫体。粘膜皱缩, 上皮细胞形状不规则, 这是由于部分上皮细胞变性、坏死或脱落, 而另一部分肥大和增生造成(图 1-6~ 9)。

3 讨论

3.1 关于禽类隐孢子虫的种类和寄生部位

禽类隐孢子虫 2 个有效种分别是火鸡隐孢子虫 (*C. meleagridis*) 和贝氏隐孢子虫 (*C. baileyi*)^[11]。国内对 *C. baileyi* 报道较多, 并有生活史和虫体超微结构的研究^[10-13]。*C. baileyi* 显著区别于 *C. meleagridis*, 因为 *C. baileyi* 的卵囊比 *C. meleagridis* 大, 内生发育主要在气管、法氏囊和泄殖腔而不是在小肠。本试验分离的鸭源隐孢子虫, 卵囊大小 (5.10~ 7.40) $\mu\text{m} \times$ (4.08~ 5.10) μm , 平均为 6.02 $\mu\text{m} \times$ 4.40 μm ; 卵形指数 (L/W) 1.1~ 1.62, 平均为 1.37 (n=108); 寄生部位主要是喉头、气管、法氏囊、泄殖腔; 卵囊大小和寄生部位与文献^[15]报道的 *C. baileyi* 符合, 因此, 河南省鸭源隐孢子虫分离株为 *C. baileyi*。

3.2 关于禽类隐孢子虫的致病性和病理形态学变化

C. baileyi 可以感染鸡、鸭、鹅、鹌鹑、孔雀、雉鸡、珍珠鸡、鸽、火鸡、丝毛乌骨鸡等。以鸡、火鸡和鹌鹑的发病最为严重。本次试验接种剂量为 640 万个卵囊, 鸡、鸭均出现呼吸道症状和法氏囊炎症, 但鸡的症状持续时间比鸭长, 鸭的症状明显期到 DP118, 而鸡的症状明显期到 DP125, 法氏囊萎缩也比鸭重。赵亚荣和蒋金书^[4]研究 *C. baileyi* 鸡致病性试验的结果也表明鸡的症状持续时间(到 DP121)比鸭(到 DP114)长, 鸡的死亡率 50.8%, 鸭的死亡率 6.7%; 史美清等^[5]的试验也表明类似的结果。本次试验虽然 2 种动物均无死亡, 但从症状持续时间、增重、法氏囊萎缩各方面综合比较看, 鸡对 *C. baileyi* 的易感性明显比鸭高, 这个结果与文献报道一致。本次试验中, 在鸭体内的潜隐期 3 d, 排卵囊高峰期 DP17~ 9, 持续期为 15 d。在鸡体内的潜隐期为 3 d, 排卵囊高峰期 5~ 15 d, 显露期为 25 d。试验结果表明 *C. baileyi* 感染后, 排卵囊持续时间鸡比鸭长, 也说明鸡的易感性比鸭高; 与文献^[4-5]相比较可以发现排卵囊高峰期与接种剂量有关。扫描电镜观察发现 *C. baileyi* 在鸡体内寄生的密度也明显比鸭体内高; DP120 鸭的气管和法氏囊已很少见到虫体, 但鸡的气管和法氏囊则仍然有较多的虫体寄生。也说明鸡比鸭更适于 *C. baileyi* 寄生。*C. baileyi* 感染主要引起呼吸道症状; 眼观病变表现为呼吸道炎症和法氏囊炎症。在鸭尚出现鼻窦肿胀。这些均与文献报道一致^[6, 14]。

光镜和扫描电镜观察可见虫体嵌于粘膜上皮表面, 难以辨清是细胞内寄生还是细胞外寄生, 透射电镜则可以解决这个问题, 虫体寄生于细胞膜内但在细胞质外^[11]。隐孢子虫感染后, 气管粘膜上皮细胞间杯状细胞内容物大量排空, 释放出较多粘液, 扫描电镜观察发现气管粘膜表面有许多空洞, 这些是排空后的杯状细胞, 与临床症状和眼观病变的现象一致。隐孢子虫寄生引起气管纤毛大量脱落。但除虫体寄生部位外, 微绒毛受影响较小, 未见到微绒毛大量脱落现象。这也说明隐孢子虫寄生, 对上皮细胞形态不造成破坏性的损伤。透射电镜观察发现虫体

寄生区域,纤毛和微绒毛被感染虫体完全置换。微绒毛丧失可能抑制隐孢子虫的吸附^[15,16]。因此,在隐孢子虫吸附于上皮细胞过程中微绒毛起着显著作用。有大量微绒毛的区域才能吸引虫体的寄生。因虫体寄生于粘膜游离面,造成虫体与细胞相互作用的表观现象,所以研究粘膜上皮组织的病理形态变化最适于用扫描电镜观察。

河南农业大学牧医工程学院本科毕业实习生吴宁鹏、朗利敏、李伟、唐锐茂帮助完成本项试验,谨致谢忱!

参 考 文 献

- 1 Fayer R, Spear, C A, Dubey J P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R ed *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1997, 1~ 41
- 2 Trampel D W, Pepper, T M, Blagburn B L. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens *Avian Dis*, 2000, 44: 479~ 484
- 3 O'Donoghue P J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals *Int J Parasitol*, 1995, 25 (2): 139~ 195
- 4 赵亚荣, 蒋金书. 北京鸭贝氏隐孢子虫(*Cryptosporidium baileyi*)人工感染试验 *中国农业科学*, 1991, 24 (1): 16~ 19
- 5 史美清, 陈淑玉, 林辉环, 等. 广东鸡鸭隐孢子虫种类鉴定与致病性研究 *畜牧兽医学报*, 1995, 26(2): 174~ 180
- 6 史美清, 林辉环, 翁亚彪, 等. 珍珠鸡和雏鸡贝氏隐孢子虫实验感染研究 *中国农业科学*, 1995, 28 (5): 83 ~ 88
- 7 查红波, 蒋金书. 贝氏隐孢子虫在鹌鹑与鸡体内发育比较的研究 *中国兽医科技*, 1993, 23(1): 7~ 10
- 8 宁长申, 张龙现, 高葆真, 等. 贝氏隐孢子虫对丝毛乌骨鸡的致病性试验 *畜牧兽医学报*, 1999, 30(5): 385~ 393
- 9 Current W L, Upton S J, Haynes T B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens *J Protozool*, 1986, 33: 289~ 296
- 10 查红波, 蒋金书. 火鸡隐孢子虫在鹌鹑体内发育史的研究 *畜牧兽医学报*, 1994, 25 (3): 272~ 278
- 11 赵亚荣, 蒋金书, 汪明. 贝氏隐孢子虫在北京鸭体内发育的超微结构研究 *动物学报*, 1993, 39(1): 6~ 11
- 12 史美清, 林辉环, 陈淑玉, 等. 贝氏隐孢子虫在珍珠鸡体内发育的扫描电镜观察 *动物学报*, 1996, 42(2): 113~ 118
- 13 张龙现, 宁长申, 高葆真, 等. 贝氏隐孢子虫(*Cryptosporidium baileyi*)内生发育虫体的扫描电镜观察 *畜牧兽医学报*, 2000, 31(4): 341~ 348
- 14 Lindsay D S, Blagburn B L, Sundemann C A. Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* from birds *Proc Helminthol Soc Wash*, 1989, 56: 91~ 92
- 15 Goodwin M A, Latimer K S, Brown J, et al. Respiratory cryptosporidiosis in chickens *Poultry Sci*, 1988, 67: 1684~ 1693
- 16 Todeja-Simboric L, Ochiai K, Itakura C. Ultrastructural changes of tracheal epithelial cells of chicks experimentally infected with *Cryptosporidium* sp. *Avian Pathol*, 1993, 22: 363~ 381