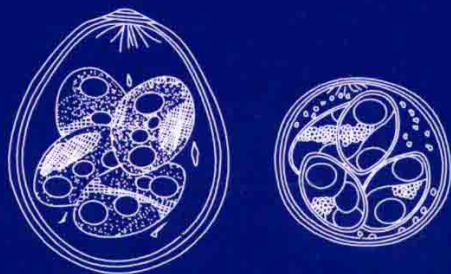


动物寄生虫病学 实训教程

■ 主编 郝桂英



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

动物寄生虫病学实训教程

主 编 郝桂英
副主编 刘利春 叶 岚
参 编 李凤琴 王燕群



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物寄生虫病学实训教程/郝桂英主编. —武汉:武汉大学出版社, 2016. 5
ISBN 978-7-307-17787-1

I. 动… II. 郝… III. 动物疾病—寄生虫病—高等学校—教材
IV. S855. 9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 085530 号

责任编辑:刘小娟 李嘉琪

责任校对:方竞男

装帧设计:张希玉

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:whu_publish@163.com 网址:www.stmpress.cn)

印刷:虎彩印艺股份有限公司

开本:787×1092 1/16 印张:10.75 字数:252 千字

版次:2016 年 5 月第 1 版 2016 年 5 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-17787-1 定价:27.00 元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

随着社会的进步和经济的发展,人民的生活已达到了较高水平。为了适应社会的需要,培养学生的专业素质、实践能力和创新能力,能从事兽医临床工作,编者根据动物寄生虫病学的理论和实践的发展,结合多年临床工作经验,在搜集和借鉴大量文献资料的基础上编写了本书。

本书根据高等教育人才培养和教学大纲要求,以职业岗位技能为核心,以教学目标和生产应用为目的,注重科学性、先进性和实用性。本书旨在引导学生利用所学的知识分析、解决兽医临床中的实际问题,强调学生创新能力、团队精神和解决实际问题的能力。

本书由西昌学院郝桂英担任主编,西昌学院刘利春、凉山州畜牧局叶岚担任副主编,西昌学院李凤琴、王燕群担任参编。具体编写分工如下:郝桂英编写了第一至第五部分、第七部分及附录,王燕群、叶岚编写了第三部分,李凤琴、刘利春编写了第六部分。全书由郝桂英统稿。

本书与“动物寄生虫病学”课程相对应,可作为动物医学、畜牧兽医等专业学生的实训教材,也可作为兽医行业中、高级职业工种技能鉴定培训教材,对从事兽医临床的技术人员有很好的参考价值。

由于编者水平有限,书中的疏漏与错误在所难免;同时,随着科学技术的快速发展,新的检测技术不断出现,旧的技术将不断被更新。因此,敬请各位同行专家和广大师生对本书中存在的不妥之处提出宝贵意见,不胜感激。

编 者

2016 年 1 月

目 录

第一部分 牛寄生虫病实训	(1)
实训一 牛消化系统寄生虫的检查	(1)
实训二 牛呼吸系统寄生虫的检查	(15)
实训三 牛循环系统寄生虫的检查	(18)
实训四 牛肌肉寄生虫的检查	(27)
实训五 牛皮肤寄生虫的检查	(31)
实训六 牛生殖系统原虫检查	(35)
第二部分 羊寄生虫病实训	(40)
实训一 羊消化系统寄生虫的检查	(40)
实训二 羊呼吸系统寄生虫的检查	(47)
实训三 羊血液原虫的检查	(50)
实训四 羊神经与肌肉寄生虫的检查	(54)
实训五 羊皮肤寄生虫的检查	(57)
实训六 羊线虫耐药性的检测	(61)
第三部分 猪寄生虫病实训	(65)
实训一 猪消化系统寄生虫的检查	(65)
实训二 猪呼吸系统寄生虫的检查	(69)
实训三 猪泌尿系统寄生虫的检查	(71)
实训四 猪肌肉寄生虫的检查	(72)
实训五 猪皮肤寄生虫的检查	(77)
实训六 猪弓形虫病的诊断	(78)
第四部分 禽寄生虫病实训	(94)
实训一 禽消化系统寄生虫的检查	(94)
实训二 禽呼吸系统寄生虫的检查	(101)
实训三 禽血液原虫的检查	(104)
实训四 鸡球虫抗药性的检测	(106)
第五部分 马属动物寄生虫病实训	(113)
实训一 马属动物消化系统寄生虫的检查	(113)
实训二 马属动物呼吸系统寄生虫的检查	(116)

实训三 马属动物血液原虫的检查..... (118)

实训四 马属动物生殖系统原虫的检查..... (127)

第六部分 犬、猫寄生虫病实训 (130)

实训一 犬、猫消化系统寄生虫的检查 (130)

实训二 犬循环系统寄生虫的检查..... (135)

实训三 犬皮肤寄生虫的检查..... (138)

第七部分 其他综合实训..... (141)

实训 动物驱虫试验及其效果评定..... (141)

附录..... (147)

附录一 常用试剂及其配制..... (147)

附录二 显微镜测微器在寄生虫学方面的使用方法..... (150)

附录三 动物常见寄生虫虫卵图谱..... (151)

附录四 显微镜下所能见到的动物粪便中常见的其他物体..... (156)

附录五 蠕虫标本采集、制作及保存 (157)

参考文献..... (163)

第一部分 牛寄生虫病实训

实训一 牛消化系统寄生虫的检查

一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练运用寄生虫病学常见的实验室粪便检查技术,并能在光学显微镜下辨别各类蠕虫卵、原虫卵囊、幼虫或虫体等,且能与粪便中的非寄生生物质相区别;同时,熟练掌握虫卵计数的方法及球虫的孢子化、PCR(聚合酶链式反应, Polymerase Chain Reaction)等技术,使所学理论知识与生产实践相结合,巩固和加深对新知识的理解,并增强动手意识,能够规范书写实训报告。另外,还能培养学生自我学习、分析问题、解决问题及与人合作等能力。

二、实训条件配备要求

本实训需要指导教师2人,学生分组进行。学生操作之前应由指导教师讲解操作规程和注意事项,指定各组组长,各组按分工进行项目实施准备及项目实施。

本实训内容需准备的材料与用具:塑料袋、标记笔、一次性塑料手套、烧杯(或塑料杯)、眼科镊(或竹签、火柴棍)、试管、试管架、直径5~10 mm的铁丝圈、玻棒、40目(或60目、100目、150目、200目)铜筛(或纱布)、胶头滴管、尼龙筛绢、8号铁丝、瓷盆(或桶)、解剖针、毛笔、黑色浅盘、放大镜、培氏皿(培养皿)、滤纸、剪刀、细线、擦镜纸、载玻片、盖玻片、电磁炉、锅、玻璃珠、三角小烧瓶、10 mL离心管、50 mL离心管、100 mL球状烧瓶、100 mL量筒、300 mL容量瓶、特制球状烧瓶(或大试管、小三角烧杯)、40孔反应板、200 μ L微量移液器及配套吸头、1.5 mL离心管、麦克马斯特氏虫卵计数板、计数器、托盘天平、显微测微尺、液氮罐;普通离心机、光学显微镜、恒温培养箱、酶标检测仪、漩涡振荡仪、冰箱、水浴锅;食盐、甘油、重铬酸钾、蔗糖、甲醇、碱性复红、无水乙醇、苯酚、硫酸、孔雀绿、香柏油、福尔马林、乙酸乙酯、吐温-20、乙二胺四乙酸(EDTA)、PBS缓冲液、碳酸钠、碳酸氢钠、牛血清白蛋白、生理盐水、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、蛋白酶K、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、醋酸钠、TE缓冲液、10 $\times$ PCR缓冲液、MgCl₂、dNTPs、上下游引物、Taq DNA聚合酶、灭菌双蒸水、硫酸锌、碘、碘化钾、伊红、Stool DNA Kit全粪便DNA提取试剂盒、液氮等。

三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前做好动员工作,并说明纪律要求,特别强调采样时的安全问题。要求学生复习、巩固有关的理论知识,根据“动物寄生虫病学”理论课程学习和

查阅相关资料,制订牛消化系统寄生虫的检查方案,并经指导教师讲解及组内交流和讨论进行检查方案的修订与决策,确定采样地点和检查方法,准备好实训所需仪器设备、工具及材料。

(2)消化系统蠕虫的检查。

(3)消化系统原虫的检查。

(4)虫卵/卵囊计数。

四、实训步骤与方法

(一)取样

根据养牛场牛的数量、年龄、性别等进行牛粪便的采集,一般按饲养量的 30% 左右随机采样。每份粪样 150 g,装入干净塑料袋中,并详细记录采集粪样的时间、地点,以及待检牛的耳标号、年龄、性别、采食情况、膘情和驱虫情况等。低温运回实验室后,置于 4℃ 冰箱中保存待检。

采样过程中要注意:①所采的粪样要新鲜,最好是刚排出的或从直肠直接掏取的粪便,并要注意防止粪样之间的相互污染;②选择采样的牛要有代表性,且所采粪样的重量也要足量;③做好样品标识;④在粪样运输过程中,要用冰袋保持所采粪样的温度,不能过高,以防止虫卵孵化成幼虫。

(二)牛消化系统蠕虫的检查

1. 直接涂片法(examination of direct smears)

在洁净的载玻片上滴 1~2 滴 50% 甘油水(或自来水),用眼科镊或竹签挑取少量新鲜粪便置于其中,与载玻片上的甘油水混匀,并去掉较大的或过多的粪渣,将已混匀的粪液涂成薄膜,薄膜的厚度应以能隐约透视纸上的字迹为宜,然后在粪膜上覆以盖玻片,置于低倍显微镜下检查,如发现虫卵,再换高倍镜仔细观察。

直接涂片法(图 1-1-1)的优点是简便易行、快速,适合于虫卵量大的粪便检查;缺点是对虫卵含量低的粪便检出率低。因此,在实际工作中,需多检几片,以提高检出率。

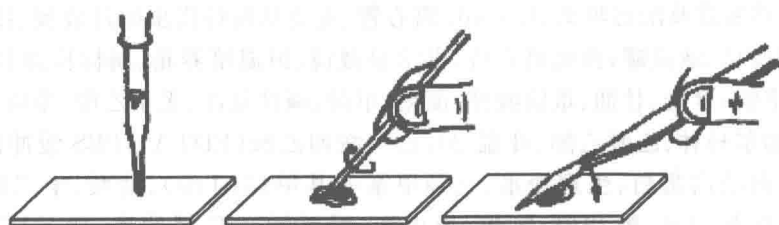


图 1-1-1 直接涂片法示意图

2. 沉淀检查法(sedimentation technique)

沉淀检查法的原理是利用虫卵比重比水大的特点,让虫卵在重力的作用下,自然沉于容器底部,然后进行检查。

(1)自然沉淀法。

自然沉淀法又称循序沉淀法。取 5~10 g 待检新鲜粪便置于烧杯或塑料杯内,先加

少量清水搅拌均匀,再加入 10~20 倍体积的清水,充分搅拌成混悬液,经 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤至另一干净的烧杯或塑料杯内,再加清水至距离杯口 2 cm,静置 15~20 min,待粪渣沉到杯底后倾去上层液体,留下沉淀物再加满清水静置 10~15 min,如此反复进行 2~3 次,直至上层液体变清亮为止,最后倾去上层液体,吸取沉渣涂于载玻片上,镜检。

(2) 离心沉淀法。

称取 5 g 被检新鲜粪便,置于烧杯或塑料杯内,约加 5 倍体积的清水,充分搅拌成混悬液,用 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤至另一干净烧杯或塑料杯内,将滤液倒入离心管中,置于离心机内,以 2000~2500 r/min 的转速离心 3 min,取出后倾去管内上层液体,再加水搅拌均匀,离心沉淀,如此离心沉淀 2~3 次,最后倾去上层液体,留约为沉淀物 1/2 的溶液量,用胶头滴管混匀后,取适量粪汁(2 滴左右)置于载玻片上,加盖玻片,镜检。

沉淀检查法对于检查各种蠕虫卵及幼虫均可适用,特别适用于检查比重大的虫卵(如吸虫卵等)。

3. 漂浮检查法(flotation method)

漂浮检查法的原理是应用比重高于虫卵的漂浮液,使粪便中的寄生虫卵、球虫卵囊等浮于液体表面,然后进行检查。漂浮检查法对大多数较小寄生虫卵,如某些线虫卵、绦虫卵和球虫卵囊等有很好的检出效果,但对吸虫卵和棘头虫卵效果较差。

(1) 试管漂浮法。

称取新鲜被检粪便 2~5 g,置于烧杯或塑料杯内,加入 10~20 倍体积的饱和食盐水,充分搅拌均匀,用 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤到另一干净的烧杯或塑料杯中,再将滤液倒入直立的平口试管中,直到液面接近管口为止,然后用胶头滴管补加粪液或饱和食盐水,滴至液面凸出管口为止,将盖玻片盖在管口上,并使盖玻片与液面完全接触,注意不要有气泡。静置 15~30 min 后,取下盖玻片,以湿面覆于载玻片上,镜检。

(2) 直接过滤漂浮法。

称取新鲜被检粪便约 5 g,置于烧杯或塑料杯内,加入少量饱和食盐水,充分搅拌;待粪便与食盐水充分混匀后,再加入粪便的 10~12 倍体积的饱和食盐水,并搅拌均匀;用 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤,滤液静置 30 min 左右,虫卵上浮;用直径 5~10 mm 的铁丝圈,与液面平行接触以蘸取表面液膜,抖落在载玻片上,加盖玻片,镜检。

4. 尼龙兜淘洗法

尼龙兜淘洗法操作迅速、简便,适用于体积较大虫卵(直径大于 60 μm 的虫卵)的检查。需要特制的尼龙兜,其制法是将 260 目尼龙筛绢剪成直径 30 cm 的圆片,沿圆周用尼龙线将其缝在 8 号铁丝弯成的带柄圆圈(直径为 10 cm)上即可。其操作方法如下:

取新鲜被检粪便 5~10 g 于烧杯或塑料杯内,加水调匀成糊状,先通过 40 目(或 60 目)铜筛过滤到另一杯中,将粪液全部倒入 260 目尼龙筛网,依次浸入 2 只盛水的器皿(盆或桶)内,并反复用玻棒轻轻搅拌网内粪渣,直至粪渣中杂质全部洗净为止。最后用少量清水淋洗网壁四周与玻棒,使粪渣集中于网底,用胶头滴管吸取网内粪渣,滴于载玻片上,加盖玻片,镜检。

5. 淘虫法和虫体观察法

大型虫体和较大节片,先检查粪便的表面,然后轻轻拨开粪便检查。较小的虫体或节片,可将粪便置于瓷盆中,加入5~10倍自来水或生理盐水,彻底搅拌后静置10 min,然后倾去上层液体,重新加入清水搅拌静置,如此反复数次,直到上层液体清亮为止。最后倾去上层液体,将少量沉淀物放在黑色浅盘[或衬以黑色纸片(黑布)的玻璃]中检查,必要时可用放大镜或解剖镜检查,发现虫体用解剖针或毛笔挑出,以便进行鉴定。

6. 粪便圆线目线虫虫卵体外培养

圆线目中有很多线虫的虫卵在形态结构上非常相似,难以进行鉴别。有时为了进行科学研究或达到确切诊断的目的,可进行第三期幼虫的培养,再根据这些幼虫的形态特征进行种类的鉴定。另外,做人工寄生性线虫感染试验时,也要用到幼虫培养技术。

取新鲜粪便或经水洗沉淀后所收集的粪渣放入培氏皿内,培氏皿底部预先放有一层滤纸,加水调成糊状(稀粪则不加水),并堆成半圆形,使其顶部略高于培氏皿的边缘,后加盖与粪便相接触。置于25~30℃恒温培养箱中,每日观察粪便是否干燥,并适时加水以保持培氏皿内湿度。经7~15 d,用胶头滴管吸取培氏皿盖上的水珠或培氏皿内液体,滴在载玻片上覆以盖玻片,在显微镜下进行观察。在观察幼虫时,如果幼虫运动活跃,不易看清,可将载玻片通过火焰或滴加碘液杀死幼虫后,再仔细观察。

培养幼虫时如无培氏皿,可用一大一小两个平皿来代替,将小平皿(去掉盖)加上粪便放于大平皿中央,大平皿内加入少许水,然后用大平皿盖盖上,即可进行培养。也可用两个塑料杯来培养幼虫,效果更好。即先将一个塑料杯(上大下小)一截为二,较小的底部用针扎许多小孔,装满待培养粪便,用双层纱布蒙上,再把截下的那部分套上(头向下),使纱布绷紧;然后在另一个塑料杯内加少量水,把待培养粪便杯套在该杯上(纱布面朝向),外面套上塑料袋进行培养即可。培养好后,用幼虫分离法分离幼虫。即把装粪便的塑料杯放在分离装置的漏斗上(用三角量筒也可),同时把另一个塑料杯内的水也倒入其中(用水冲洗几次)。注意在放待培养的粪便时务必小心,不要使粪便散开。

7. 剖检法

按照一般解剖方法剖开牛的腹腔。先结扎食道末端和直肠,然后切断食道、胃肠上相连的肝脏、胰脏及肠系膜、直肠末端,取出消化系统。肝、脾、胰也一并取出。最后将食道、瘤胃、真胃、网胃、瓣胃、小肠、大肠和盲肠分段做双重结扎后分离,依次检查。

(1) 食道。

先检查食道的浆膜面,观察有无肉孢子虫寄生,必要时可取肌肉压片镜检。再剖开或用玻棒将食道反转,仔细检查食道黏膜下有无筒线虫和纹皮蝇幼虫寄生。用小刀或载玻片刮取食道黏膜表层,压在两张载玻片之间检查,当发现虫体时,揭开上面的载玻片,用解剖针将虫体挑出。

(2) 胃肠内容物。

检查瘤胃时,注意检查胃黏膜上的虫体,然后观察与胃壁贴近的胃内容物中的虫体,发现虫体全部检出,胃内容物不必冲洗。

检查真胃时,剪开真胃,将内容物倒在瓷盆内,检出较大的虫体。然后用1%的盐水将胃壁洗净,取出胃壁并刮取胃壁黏膜的表层,把此刮下物放在两张载玻片之间做压片镜

检。洗下物应加1%的盐水,反复洗涤、沉淀,待液体清亮透明后,分批取少量沉渣,放入大培养皿中,仔细观察并检查所有虫体。

网胃和瓣胃的检查方法同瘤胃的检查。

(3) 肠系膜。

分离前先以双手提起肠管,把肠系膜充分展开,然后对着光线从十二指肠起向后依次检查,看静脉中有无虫体(日本血吸虫、东毕吸虫)寄生,分离后剥开淋巴结,切成小块,压片镜检。

(4) 小肠。

把小肠分为十二指肠、空肠、回肠三段,分别检查。先将每段内容物倒入指定的容器内,再将肠壁翻转(将肠浆膜内翻入肠腔内,使其黏膜面翻到外面)。然后用1%的盐水洗涤肠黏膜面,仔细检出残留在上面的虫体,洗下物和沉淀物分别用自然沉淀法处理后,检查沉淀物中所有的寄生虫。

(5) 大肠。

将大肠分为盲肠、结肠和直肠三段,分段进行检查。在分段以前先对肠系膜淋巴结进行检查。在肠系膜附着部的对侧沿纵轴剪开肠壁,倾出内容物,以自然沉淀法检查沉淀物中所有的寄生虫。

(6) 肝脏。

首先观察肝表面有无寄生虫结节,如有可做压片检查。然后沿胆总管剪开肝脏,检查有无寄生虫。再把肝脏自胆管的横断面切成数块放在水中用两手挤压,或将其撕成小块,置于37℃温水中,待虫体自行游出。最后经充分水洗后,取出肝组织碎块并用自然沉淀法检查沉淀物。

(7) 胆囊。

将胆囊从肝上剥离,把胆汁倾入大平皿内,加生理盐水稀释,检出所有的虫体,最后检查胆汁,观察黏膜上有无虫体附着,也可用水冲洗,把冲洗后的液体自然沉淀后,详细检查。

(8) 胰腺。

用剪刀沿胰管剪开,检查其中虫体,而后将其撕成小块,并用手挤压组织,最后在沉淀中寻找虫体。

注意观察瘤胃有无前后盘吸虫,真胃有无捻转血矛线虫、奥斯特线虫、长刺线虫、马歇尔线虫、古柏线虫等,小肠有无蛔虫、毛圆线虫、仰口线虫、细颈线虫、似细颈线虫、古柏线虫、莫尼茨绦虫、曲子宫绦虫、无卵黄腺绦虫等,盲肠有无毛尾线虫,大肠中有无结节虫、夏伯特线虫,肝脏有无片形吸虫、双腔吸虫、细粒棘球蚴,胰脏有无阔盘吸虫,肠系膜静脉、门静脉有无日本血吸虫、东毕吸虫,肝表面、网膜及肠系膜表面有无细颈囊尾蚴,腹腔中有无腹腔丝虫等。

(三) 牛消化系统原虫的检查

1. 球虫卵囊的检查

取待检新鲜粪便,按蠕虫虫卵的检查方法,或直接涂片检查,或通过饱和食盐水漂浮法检查。若要对不同种类的球虫进行区别,需孢子化后再行观察。可取5~10 g阳性粪

便于烧杯或塑料杯中,加适量清水,用玻棒充分搅拌均匀,经40目(或60目)铜筛或双层纱布过滤,收集滤液,将滤液倒入离心管中,以3000 r/min的转速离心5 min;弃上清液,加适量饱和食盐水漂浮静置20 min,以2000 r/min的转速离心6 min;取上层液体,加入10倍以上的自来水,混匀,以3000 r/min的转速离心5 min;弃上清液,取沉淀物放入装有2.5%重铬酸钾溶液的培养皿中,置于28℃左右的恒温培养箱中培养48 h至孢子化。培养期间,每隔6 h观察卵囊发育情况。

依据资料进行球虫种类鉴定。取孢子化后的卵囊液制片,置于带有目镜测微尺的显微镜下,在10×40倍下观察孢子化卵囊的结构。根据球虫卵囊、孢子囊和子孢子的形态、颜色等进行鉴定,并测量其大小。每个粪样测量50个卵囊。

2. 隐孢子虫的检查

(1) 饱和蔗糖离心漂浮法。

每份被检粪样取10~15 g,加入5倍体积的自来水,充分搅拌均匀,经60目铜筛过滤后,将滤液倒入离心管中,以3000 r/min的转速离心10 min,弃去上清液,在沉渣中加入饱和蔗糖溶液,搅拌均匀后再加饱和蔗糖溶液至距管口约1 cm处,以3000 r/min的转速离心10 min。离心后再加满饱和蔗糖溶液,使液面凸出管口后加盖玻片,静置2~5 min后取下盖玻片放在载玻片上,镜检是否有隐孢子虫卵囊。隐孢子虫卵囊在漂浮液中浮力较大,常紧贴于盖玻片之下,但1 h后卵囊脱水变形不易辨认,故应立即镜检。

隐孢子虫卵囊为椭圆形或卵圆形,透明无色,囊壁光滑,单层组成,无微孔及极粒。卵囊内无孢子囊,但有一团残体和4个呈淡黄色的香蕉形孢子。

(2) 改良抗酸染色法。

取10~15 g被检新鲜粪样于烧杯或塑料杯中,加入5倍体积的自来水,搅拌均匀,经60目铜筛过滤,将滤液置于离心管中,以3000 r/min的转速离心10 min。倾去上清液,用胶头滴管将所留沉渣混匀,吸取粪液,滴一滴于载玻片上,用竹签或火柴棍涂布均匀,待粪膜自然晾干后,用甲醇固定3 min,自然干燥后滴加碳酸复红溶液于粪膜上,染色5 min,清水冲洗,滴加10%的硫酸溶液,脱色5~10 min,清水冲洗,滴加0.2%的孔雀绿水溶液,复染1 min,清水冲洗,自然干燥后在1000倍油镜下观察并测量卵囊大小。

经染色后,隐孢子虫卵囊呈玫瑰红色,背景为蓝绿色。卵囊多呈圆形,周围染色,中央淡染,内部结构不明显,内有红褐色的小颗粒,多数卵囊壁不能显示。孢子呈月牙形,但排列多不规则。

(3) 福尔马林-乙酸乙酯离心沉淀法。

取3~5 g待检新鲜粪便,自来水30 mL,搅拌均匀,用60目铜筛过滤,将滤液装入50 mL离心管中,以3000 r/min的转速离心5 min,弃上清液,加入中性福尔马林溶液10 mL,充分搅拌混匀,以3000 r/min的转速离心5 min,弃上清液,往沉渣中加中性福尔马林溶液10 mL,充分搅拌混匀后,加乙酸乙酯4 mL,充分振荡混匀,以3000 r/min的转速离心5 min,水洗,弃上三层留沉淀,加自来水至45 mL,搅拌均匀,以3000 r/min的转速离心5 min,沉淀物进行饱和蔗糖溶液漂浮和改良抗酸染色。

(4) 三步粪检法。

第一步,将粪便经碘染色,卵囊虽不着色,但粪便中所含酵母及其粪便标本均被染成

棕色,有利于初步快速鉴别;

第二步,采用改良抗酸染色,卵囊被染成鲜红色,酵母菌被染成绿色;

第三步,用饱和蔗糖离心漂浮法,以达到浓集卵囊的目的。

镜检,看到呈圆形或球形,有时呈锯齿状结构并染成粉红色的卵囊。

三步粪检法具有简便、易行、省时、经济、检出率高等优点。

(5)双抗夹心 ELISA 检测。

①取待检粪样 2 g,加入含 0.1% 吐温-20 及 2 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液 5 mL,搅拌均匀后过滤备用。

②2C₃株抗微小隐孢子虫卵囊壁单克隆抗体用 0.01 mol/L pH=9.72 的 CB 溶液稀释后,包被 40 孔反应板,在 4 °C 下过夜。

③第二日取出后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 3 min。

④每孔加入 100 μL 3% BSA,在 37 °C 下同③封闭 0.5~1 h。

⑤倒去封闭液,洗涤同③。

⑥在反应体系中加入被检粪样,在 40 °C 下作用 10 min。

⑦倒去孔内液体,洗涤同③。

⑧每孔加入 100 μL 适当浓度的单克隆抗体酶结合物,在 37 °C 下作用 0.5~1 h 后取出洗涤。

⑨加入底物溶液,用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液终止反应。

⑩用酶标检测仪测定波长 492 nm 处的 OD 值。

(6)PCR 鉴定。

①卵囊的纯化。

将上述检测到隐孢子虫的阳性粪样取 10~15 g,用生理盐水稀释至 10 mL,漩涡振荡,先后过 100 目、150 目和 200 目铜筛,去除粗渣,再以适量生理盐水稀释后,以 3000 r/min 的转速离心 10 min,倒掉上清液后加入适量饱和蔗糖溶液,充分搅拌,使下层沉淀和蔗糖液充分混匀后以 3000 r/min 的转速离心 10 min。为收集较纯隐孢子卵囊,故用铁丝圈多次蘸取表层卵囊液膜于适量清水中反复洗涤,收集的卵囊液以 3000 r/min 的转速离心 10 min 后倒掉上清液,收集隐孢子卵囊沉淀备用。

用蔗糖密度梯度离心法进行隐孢子虫卵囊的纯化,操作如下:

a. 向 10 mL 离心管中加入 6 mL 1:1 蔗糖溶液(1 份饱和蔗糖溶液:1 份 PBS 缓冲液),再沿管壁缓慢加入上述的卵囊混悬液 3 mL,以 3500 r/min 的转速离心 15 min。

b. 用 5 mL 一次性注射器吸出卵囊富集层,加 5~10 倍体积的 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次,沉淀悬浮于适量 PBS 缓冲液中。

c. 将 5 mL 1:2 蔗糖溶液(1 份饱和蔗糖溶液:2 份 PBS 缓冲液)加入 10 mL 离心管中,上层缓慢加入 b 步骤中的卵囊混悬液,以 3500 r/min 的转速离心 15 min。

d. 同 b 步骤收集卵囊富集层,加 5~10 倍体积的 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次,沉淀再次悬浮于适量 PBS 缓冲液中。

e. 取 1:3 蔗糖溶液(1 份饱和蔗糖溶液:3 份 PBS 缓冲液)5 mL,注意尽量保持液面稳定,上层缓慢注入经 D 步骤后的卵囊混悬液,以 3500 r/min 的转速离心 15 min。

f. 同 b 步骤收集卵囊富集层,加 5~10 倍体积的 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次,沉淀再次悬浮于适量 PBS 缓冲液中。

g. 取 1:4 蔗糖溶液(1 份饱和蔗糖溶液:4 份 PBS 缓冲液)3 mL,沿管壁加入离心管中,然后沿管壁缓缓加入 1:5 蔗糖液 3 mL,最上层加入 1:3 蔗糖提取物卵囊悬液 3 mL,以 3500 r/min 的转速离心 15 min,回收卵囊层,用 PBS 缓冲液离心洗涤后,沉淀用少量 PBS 缓冲液悬浮。

每次离心后的样品分别取出置于显微镜下观察各层样品的纯度,并进行计数。

②模板 DNA 的提取。

将上述收集的卵囊在液氮中反复冻融 4 次(液氮 5 min,75 °C 5 min),然后加入 DNA 裂解液 300 μ L,混匀后 55 °C 水浴 12~24 h(其间混匀多次)。加入等体积的 Tris 饱和酚,将离心管中内容物混合成乳状液,以 10000 r/min 的转速离心 10 min。吸取上层水相移至另一个新的离心管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)溶液,重复上述步骤。吸取上层水相移至另一个新的离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)溶液,重复上述步骤。吸取上层水相移至另一个新的离心管中,加入 1/10 体积的 0.3 mol/L 醋酸钠溶液,混匀,加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,混匀,置于-20 °C 冰箱中 15~30 min,沉淀 DNA。在 4 °C 下离心回收 DNA,以 12000 r/min 的转速离心 10 min 可使 DNA 沉于离心管底部。弃去无水乙醇,加入 70% 的乙醇至离心管中 2/3 体积,混匀,漂洗以除去残余的盐,在 4 °C 下,以 12000 r/min 的转速离心 2 min,吸去上清液,晾干除去乙醇。最后将 DNA 重悬于 TE 缓冲液(pH=7.6~8.0)中,放入-20 °C 冰箱中保存备用。

③PCR 扩增。

第一个 PCR 扩增产物大约 1325 bp,第一对引物的上游引物为:5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3';下游引物为:5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'。PCR 混合液成分分别为:10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L;25 mmol/L $MgCl_2$ 溶液 25 μ L;2.5 mmol/L dNTPs 溶液各 8 μ L;10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L;DNA 模板 2 μ L;5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L;加入灭菌双蒸水到 100 μ L。

PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。

第二个 PCR 扩增产物约 820 bp,使用 2 μ L 的第一个 PCR 产物为模板,上游引物为:5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3';下游引物为:5'-AAGGAGTAGGAACAACCTCCA-3'。PCR 反应条件和 PCR 反应混合液成分除 $MgCl_2$ 溶液浓度为 3 mmol/L 之外,其他均与第一个 PCR 反应一样。

④PCR 产物的检测。

取 10 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,观察有无特异条带。

3. 牛源贾第虫的检查

(1)饱和硫酸锌离心漂浮法。

取自然沉淀法的沉淀物少许加入离心管中,并加满清水,以 2000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,在沉渣中加入饱和硫酸锌溶液,调匀后再加饱和硫酸锌溶液至距管口约 1 cm 处,以 3000 r/min 的转速离心 21 min。离心后再加满饱和硫酸锌溶液,液面凸出管

口后加盖玻片,静置 2~5 min 后取下盖玻片,放在载玻片上,然后在显微镜下检查。

牛源贾第虫包囊呈椭圆形,囊壁较厚,大小为 $(10\sim 15)\mu\text{m}\times(6\sim 10)\mu\text{m}$ 。

(2) 醛醚沉淀法。

取 3~5 g 待检粪便,自来水 30 mL,搅拌均匀,用 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤,取滤液,置 50 mL 离心管中,以 3000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,沉淀中加中性福尔马林溶液 10 mL,充分搅拌混匀,以 3000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,沉淀中加乙酸乙酯 4 mL,充分振荡混匀,以 3000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,加自来水至 45 mL,搅拌均匀,以 3000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,留沉渣镜检。

(3) 卢戈氏碘液染色法。

取适量被检粪便涂于载玻片上,在粪膜上滴加卢戈氏碘液,盖上盖玻片镜检。

染色后贾第鞭毛虫的包囊呈黄绿色。新鲜粪便中大多数包囊的滋养体充满整个囊腔,部分包囊囊壁与滋养体之间有明显的空隙。未成熟的包囊有 2 个核,成熟的包囊有 4 个核,多偏于一端,囊内可见到鞭毛、丝状物、轴柱等。

(4) 贾第虫包囊的分离。

将经镜检后怀疑为贾第虫感染阳性的牛的新鲜粪便加水稀释后搅拌均匀,依次用 60 目、100 目、200 目铜筛过滤,滤液以 3000 r/min 的转速离心 15 min 后,弃上清液,沉淀物加水混匀,以 3000 r/min 的转速离心 15 min,再弃上清液。在沉淀物中加入 3~4 倍体积的 33% 的硫酸锌溶液,充分搅拌均匀后以 1500 r/min 的转速离心 10 min。小心将上清液倒入另一离心管,加入 10~20 倍体积的蒸馏水,混匀后以 3000 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液,在沉淀中加入适量蒸馏水,用吸管反复吹打混匀后,按上述方法再离心,如此反复用蒸馏水洗涤至上层液清亮,最后将沉渣悬浮于适量蒸馏水中,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

(5) 包囊的纯化。

取一离心管,加入 1:1 蔗糖溶液 8 mL;将上述分离的包囊混悬液慢慢加入到蔗糖溶液上层,以 3000 r/min 的转速离心 15 min,缓慢吸取蔗糖溶液与水界面部分的液体,再加 5 倍体积的蒸馏水,以 3000 r/min 的转速离心 10 min。如果杂质较多,在沉淀物中加入少量蒸馏水,搅拌均匀后加于 8 mL 蔗糖溶液界面上,按上述方法再纯化 1 次,最后将沉淀物用蒸馏水洗涤 3 次,加入少量蒸馏水,置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

(6) 包囊的活性鉴定。

将纯化的包囊滴于载玻片上,用伊红溶液染色后,在光学显微镜下观察。失去活性的包囊被染成红色。

(7) 套式 PCR 的检测。

① DNA 提取。

用美国 OMEGA Bio-Tek 公司生产的 Stool DNA Kit 全粪便 DNA 提取试剂盒进行提取。

a. 称取 50~100 mg 粪样,置于 2 mL Eppendorf 管(微量离心管)中,再加入 200 mg 玻璃珠,冰浴。

b. 加入 300 μL SP1 buffer,再加入 10 μL 蛋白酶 K 溶液,以最大功率漩涡振荡

5 min,使卵囊破碎。

c. 70 °C 孵育 10 min,孵育期间漩涡振荡 2 次以混匀样本。

d. 冰浴孵育 2 min。

e. 加入 100 μ L SP2 buffer,漩涡振荡 30 s,充分混匀。

f. 冰浴孵育 5 min。

g. 以 13000 r/min 的转速离心 5 min。

h. 小心吸取上清液至 1.5 mL Eppendorf 管中,注意不要触碰沉淀和杂质。

i. 加入 200 μ L HTR Reagent(加入前必须振荡混匀)。

j. 室温孵育 2 min。

k. 以 13000 r/min 的转速离心 2 min。

l. 移取 250 μ L 上清液到新的 2 mL Eppendorf 管中。

m. 加入 250 μ L BL Buffer,再加入 250 μ L 无水乙醇,漩涡振荡 10 s。

n. 将上步获得的全部样本移入到一个 HiBind DNA 柱中,HiBind DNA 柱被安装在一个 2 mL 的集合管中,以 13000 r/min 的转速离心 1 min,弃掉集合管及废液。

o. 将 HiBind DNA 柱置于一个新的 2 mL 集合管中,使用 500 μ L HB buffer 清洗柱子,以 13000 r/min 的转速离心 1 min,弃掉集合管及废液。

p. 将 HiBind DNA 柱置于一个新的集合管中,在柱子中加入 750 μ L DNA wash buffer,以 13000 r/min 的转速离心 1 min。弃去液体,将柱子重新安装到一个新的集合管中。

q. 室温下,以 13000 r/min 的转速离心 HiBind DNA 柱 2 min,干燥柱子。

r. 将 HiBind DNA 柱置于一个新的 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入 200 μ L EB(溴化乙锭,加入前在 60~70 °C 下预热),室温下孵育 2 min;以 13000 r/min 的转速离心 1 min,收集 DNA。

②PCR 扩增。

套式 PCR 外套引物,上游引物(ExF):5'-AAATYATGCCTGCTCGTCG-3',下游引物(ExR):5'-CACTGGCCARGCTTCTCGC-3'。内套引物,上游引物(SF):5'-GCTTCA GGACATGGGCTTGAGTAC-3',下游引物(NesR):5'-CAAACCTTCTCCGAAACC-3'。预期内套扩增片段大小约 357bp。

第 1 次 PCR 反应(引物对 ExF/ExR)以牛源贾第虫阳性参照作为扩增模板,按 25 μ L 中含有 1 μ L 阳性参照 DNA,1 $\times$ Taq buffer,2.0 mmol/L MgCl₂,dNTPs 各 200 μ mol/L、Taq 酶 1 U、引物 ExF 和 ExR 各 0.1 μ mol/L 的反应体系进行扩增。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。

第 2 次 PCR 反应(引物 SF/NesR)按 50 μ L 体积中含 1 μ L 第 1 次 PCR 产物、1 $\times$ Taq buffer、1.0 mmol/L MgCl₂,dNTPs 各 200 μ mol/L、Taq 酶 1.25 U、引物 SF 和 NesR 各 0.05 μ mol/L 配制反应体系。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

反应结束后,取 5 μ L PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,检测有无特异条带。

(四)虫卵/卵囊计数

1. 麦克马斯特氏法(McMaster's Method)

取 2 g 被检粪便混匀,放入装有玻璃珠的小瓶内,加入饱和食盐水 58 mL 充分振荡混合,通过 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤,后将滤液边摇晃边用吸管吸出少量滴入计数室内,置于显微镜载物台上,静置 1~2 min 后,用低倍镜将两个计数室内见到的虫卵全部数完,取平均值,再乘以 200,即为每克粪便中的虫卵数(EPG)。

麦克马斯特氏计数板由两片载玻片组成,其中一片较另一片窄一些(便于加液)。在较窄的载玻片上有两个 1 cm 见方的刻度区,每个正方形刻度区中又平分为 5 个长方格。另有厚度为 1.5 mm 的几个玻璃条垫于两个载玻片之间,以树脂胶黏合。这样就形成了两个计数室,每个计数室的容积为 0.15 mL(0.15 cm^3),如图 1-1-2 所示。

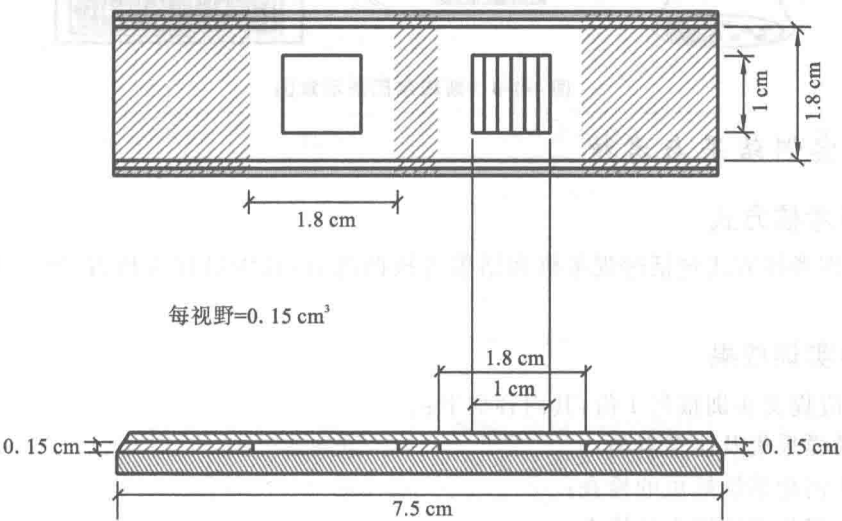


图 1-1-2 麦克马斯特氏计数板示意图

2. 斯陶尔氏法(Stoll's Method)

先加入 0.1 mol/L(或 4%)NaOH 溶液至特制球状烧瓶(或大的试管或小三角烧杯,事先标好 56 mL 和 60 mL 两个刻度)的 56 mL 处,再徐徐加入捣碎的粪便,使液面达 60 mL 处为止(大约加进 4 g 粪便)。然后加入 10 个玻璃小珠,充分振荡,使其呈细致均匀的粪悬液(也可过滤),后用吸管吸取 0.15 mL 置载玻片上,盖以不小于 22 mm×40 mm 的盖玻片镜检计数,如图 1-1-3 所示。所见虫卵总数乘以 100,即为每克粪便中的虫卵数。

3. 片形吸虫卵的计数法

称取 30 g 被检粪样,置于一个 300 mL 容量瓶中,加入少量 1.6% NaOH 溶液,将粪块搅碎,再加入 1.6% NaOH 溶液至 300 mL 刻度处。摇匀,立即吸取此粪液 5 mL 注入一离心管内,置离心机内,以 1000 r/min 的转速离心 2 min,倾去上层液体,加入饱和食盐水,再次离心后,倾去上层液体,再加入饱和食盐水,如此反复操作,直到上层液体完全清亮为止,倾去上层液体,将沉渣全部分滴于数张载玻片上,镜检,统计其虫卵总数,以总数乘以 2,即为每克粪便中的片形吸虫虫卵数。