

西昌学院“质量工程”资助出版系列教材

# 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. — IV.

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 号

武汉大学出版社

责任编辑:李嘉琪 刘小娟

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:

开本:787×1092 1/16 印张:10.75 字数:250千字

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学的理论和实践的发展,结合多年临床工作,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。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于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

<b>第一部分 牛寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第二部分 羊寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第三部分 猪寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第四部分 禽寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第五部分 马属动物寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第六部分 犬、猫寄生虫病实训</b> .....	(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)
<b>第七部分 其他综合实训</b> ·····	(141)
实训 动物驱虫试验及其效果评定·····	(141)
<b>附录</b> ·····	(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、保存及标本制作·····	(157)
<b>参考文献</b> ·····	(163)

武汉大学出版社

# 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性物质相区别;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  $\mu$ 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、MgCl<sub>2</sub>、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(见图 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。

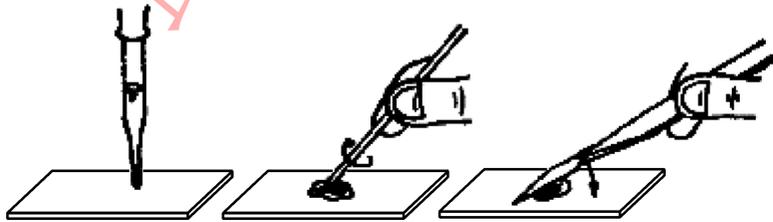


图 1-1-1 直接涂片法示意图

###### 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倍量的清水,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(floatation 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倍量的饱和食盐水,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

尼龙兜淘法操作迅速、简便,适用于体积较大虫卵(直径大于60  $\mu\text{m}$ 的虫卵)的检查。需要特制的尼龙网兜,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。然后沿总胆管剪开肝脏,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,或通过饱和食盐水平浮法检查。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5~10g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 °C 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子孢子。

### (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,自然干燥后滴加石碳酸溶液于粪膜上,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。子孢子呈月牙形,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。

② $2C_3$ 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  $\mu$ L 3% BSA,在 37 °C 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  $\mu$ L 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  $H_2SO_4$  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  $\mu$ 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'-TTCTAGAGCTAATA CATGCG-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  $\mu$ L;25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液 25  $\mu$ L;2.5 mmol/L dNTPs 溶液各 8  $\mu$ L;10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L;DNA 模板 2  $\mu$ L;5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L;加入灭菌双蒸水到 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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'-AAGGAGTAGGA AACAACCTCCA-3'。PCR 反应条件和 PCR 反应混合液成分除 MgCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 °C 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 °C 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 粪样品,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  $\mu\text{L}$  SP1 buffer,再加入 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L 上清液到新的 2 mL Eppendorf 管中。

m. 加入 250  $\mu$ L BL Buffer,再加入 250  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## ② PCR 扩增

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

第一次 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  $\mu$ L 中含有 1  $\mu$ L 阳性参照 DNA,1 $\times$ Taq buffer、2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、dNTPs 各 200  $\mu$ mol/L、Taq 酶 1 U、引物 ExF 和 ExR 各 0.1  $\mu$ 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  $\mu$ L 体积中含 1  $\mu$ L 第 1 次 PCR 产物、1 $\times$ Taq buffer、1.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、dNTPs 各 200  $\mu$ mol/L、Taq 酶 1.25 U、引物 SF 和 NesR 各 0.05  $\mu$ 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  $\mu$ 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 个长方形格。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( $0.15 \text{ cm}^3$ ),如图 1-1-2 所示。

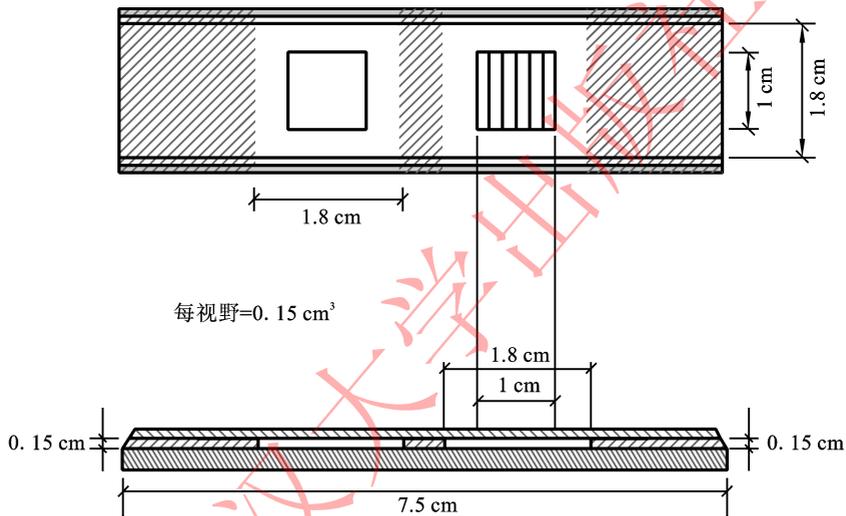


图 1-1-2 麦克马斯特氏计数板示意图

##### 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卵数。

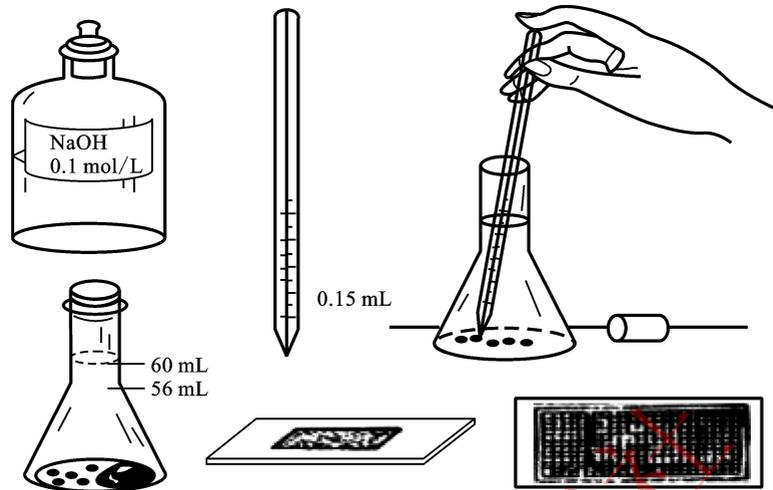


图 1-1-3 斯陶尔氏法示意图

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 粪样采集及注意事项;
- (2) 牛消化系统蠕虫的检查;
- (3) 牛消化系统原虫的检查;
- (4) 虫卵/卵囊计数。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,具体标准如下。

**优秀(85~100分):**熟练掌握粪便学检查技术、ELISA 技术、PCR 技术、幼虫培养技术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

**良好(70~84分):**能较为熟练掌握粪便学检查技术、ELISA 技术、PCR 技术、幼虫培养技术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

**及格(60~69分):**基本掌握粪便学检查技术、ELISA 技术、PCR 技术、幼虫培养技术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下);操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。



## 拓展阅读

### 1. 蠕虫卵的基本结构和特征

#### (1) 吸虫卵(trematode eggs)

吸虫卵多数呈卵圆形或椭圆形,为黄色、黄褐色或灰褐色。卵壳由数层卵膜组成,比较厚而坚实。大部分吸虫卵的一端有卵盖,卵盖和卵壳之间有一条不明显的缝(新鲜虫卵在高倍镜下时可看见)。当毛蚴发育成熟时,则顶盖而出;有的吸虫卵无卵盖,毛蚴则破壳而出。有的吸虫卵卵壳表面光滑,也有的有各种突出物(如结节、小刺、丝等)。新排出的吸虫卵内,有的含有卵黄细胞所包围的胚细胞,有的则含有成形的毛蚴,如表 1-1-1 所示。

表 1-1-1 常见几种吸虫卵的鉴别

虫卵名称	大小/ $\mu\text{m}\times\mu\text{m}$	色彩	形状及构造	其他特征
肝片吸虫	(117~150) $\times$ (70~82)	黄褐色	呈卵圆形、锐端有卵盖	卵黄细胞充满
土耳其斯坦 东毕吸虫	(72~140) $\times$ (18~60)	无色	无卵盖,一端有小刺,另一端有结节	卵内含有一未发育成毛蚴的胚胎
鹿前后盘吸虫	(114~170) $\times$ (73~100)	淡灰色 (同多数线虫卵)	卵呈卵圆形,锐端有一卵盖	卵黄细胞不甚充满,一端略有空隙
胰阔盘吸虫	(40~50) $\times$ (23~34)	暗褐色	多数呈两侧对称的椭圆形,壳薄,卵盖大而明显	卵内已有发育的毛蚴
中华双腔吸虫	(38~51) $\times$ (21~30)	暗褐色	多呈两侧不对称的椭圆形,壳厚,卵盖大而明显	卵内已有发育的毛蚴

#### (2) 绦虫卵(cestode eggs)

牛体内寄生的绦虫均为圆叶目绦虫。绦虫卵中央有一椭圆形具 3 对胚钩的六钩蚴。六钩蚴被包在一层紧贴着的膜里,该膜称为内胚膜;还有一层膜位于内胚膜之外,称为外胚膜。内外胚膜之间呈分离状态,中间含有或多或少的液体,并常含有颗粒内含物。有的绦虫卵的内层胚膜上形成突起,称为梨形器(灯泡样结构)。各种绦虫卵卵壳的厚度和结构有所不同。绦虫卵大多数为无色或灰色,少数呈黄色、黄褐色。

莫尼茨绦虫卵形态一般为三角形、方形或圆形,直径为 50~60  $\mu\text{m}$ ,呈灰白色,卵内有六钩蚴和梨形器。其中扩展莫尼茨绦虫卵以三角形为多,贝氏莫尼茨绦虫卵略大,以四角形、圆形为多。

曲子宫绦虫卵近似圆形,没有梨形器,有六钩蚴。

#### (3) 线虫卵(nematode eggs)

一般的线虫卵有四层膜(光学显微镜下只能看见两层)所组成的卵壳,壳内为卵细胞。但有的线虫卵随粪便排至外界时,已经处于分裂前期;有的甚至已含有幼虫。各种线虫卵

的大小和形状不同,常见椭圆形、卵形或近于圆形。卵壳的表面也各有所不同,有的完全光滑,有的有结节,有的有小凹陷等。各种线虫卵的色泽也不尽相同,从无色到黑褐色。不同线虫卵卵壳的薄厚不同,蛔虫卵卵壳最厚;其他多数卵壳较薄。

捻转血矛线虫卵形态特征:多呈椭圆形,卵壳薄,大小为 $(80\sim 85)\mu\text{m}\times(40\sim 45)\mu\text{m}$ 。新鲜虫卵的卵细胞为16~32个,浅灰色,比较充满。

奥斯特线虫卵形态特征:圆形,卵壳薄,卵细胞通常集中于一端,空隙稍大。

毛圆线虫卵形态特征:长卵圆形,一端钝一端尖,两侧不对称,卵细胞色淡而多。

细颈线虫卵形态特征:最大的一种线虫卵,大小为 $(220\sim 280)\mu\text{m}\times(100\sim 130)\mu\text{m}$ 。呈两端略窄的椭圆形。新鲜的虫卵内含有2~8个卵细胞,色深,并位于中央,卵内空隙较大。

食道口线虫卵形态特征:呈椭圆形,卵细胞界限较明显,一端有空隙,大小为 $(73\sim 89)\mu\text{m}\times(34\sim 45)\mu\text{m}$ 。

仰口线虫卵形态特征:略似长方形、两端钝圆,两侧平行(有时一侧稍向里凹入),大小为 $(79\sim 97)\mu\text{m}\times(47\sim 50)\mu\text{m}$ 。卵细胞大而少(5~8个),颜色较深黑。

夏伯特线虫卵形态特征:长椭圆形,大小为 $(100\sim 120)\mu\text{m}\times(40\sim 50)\mu\text{m}$ 。卵壳较厚,卵细胞较大,排列整齐,颜色较深。

毛尾线虫卵:似橄榄状或腰鼓状,两端各有一个透明的栓塞状物,颜色由淡黄到褐黄色。随粪便排出时,卵内具有未分裂的卵细胞或幼胚。

牛粪便中的几种虫卵图形见图1-1-4~图1-1-9。

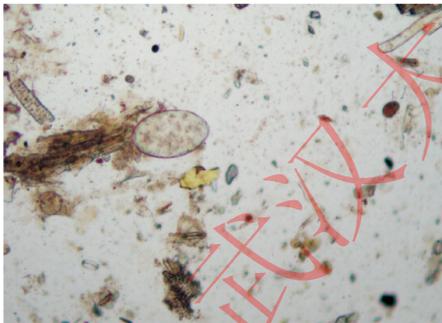


图 1-1-4 牛粪便中的前后盘吸虫卵(100×)



图 1-1-5 牛粪便中的前后盘吸虫卵(400×)

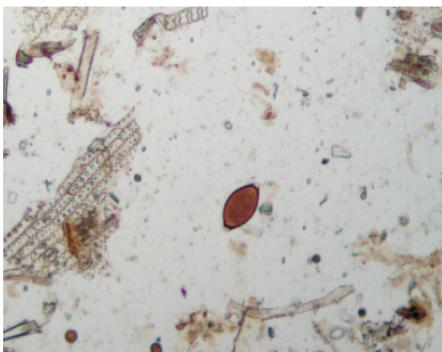


图 1-1-6 牛粪便中的鞭虫卵(100×)



图 1-1-7 牛粪便中的鞭虫卵(400×)



图 1-1-8 牛粪便中的球虫未孢子囊(400×)



图 1-1-9 牛粪便中的线虫卵(400×)

## 2. 观察蠕虫虫卵和幼虫时的要点

在粪便检查过程中,观察蠕虫虫卵和幼虫时,应从以下几个方面去进行观察、比较。

(1) 卵和幼虫的大小:要注意比较各种虫卵或幼虫的大小,必要时可用显微测微尺进行测量。

(2) 卵的颜色和形状:颜色呈黄色还是灰色、淡黑、黑或灰色,形状呈圆形、椭圆形、卵圆形或其他形状,看两端是否同等的锐或钝,是否有卵盖,两侧是否对称,以及有无附属物等。

(3) 卵壳厚薄:一般在光学显微镜下可见几层,厚或薄;是否光滑或粗糙不平。

(4) 卵内结构:吸虫卵内卵黄细胞的充满程度;胚细胞的位置、大小、颜色;有无毛蚴的形成。绦虫卵内的六钩蚴形态及有无梨形器等。线虫卵内卵细胞的大小、数量、颜色深浅,是否有排列规则,充盈程度,是否有幼虫胚胎。

(5) 幼虫特点:口囊的大小和形状;食道长短及形态构造;肠细胞的数目、形状,幼虫有无外鞘;幼虫尾部的特点(尖、圆、有无结节)及尾长(肛门至虫体尾端的距离)、鞘尾长(肛门至鞘的末端距离)。

## 实训二 牛呼吸系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握牛呼吸系统寄生虫的检查方法,并能在显微镜下辨别胎生网尾线虫第一期幼虫的形态,使所学理论知识与实践相结合,巩固和加深对新知识的理解,增强动手能力,同时培养学生自我学习、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、记号笔、烧杯、试管、试管架、离心管、玻棒、纱布、漏斗、漏斗架、乳胶管、止水钳、胶头滴管、剪刀、瓷盆、擦镜纸、载玻片、盖玻片、小表面皿、平皿、电磁炉、锅、温度计、酒精灯、普通离心机、光学显微镜、生理盐水、碘液等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备。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,制订牛呼吸系统寄生虫的检查方案,并经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)贝尔曼氏法。

(3)局部剖检法。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

(1)采集粪便。采集待检牛新鲜粪便 50 g,装入干净塑料袋中,并详细记录采集样品的时间、地点,待检牛的耳标号、年龄、性别、采食情况、膘情及驱虫情况等。低温运回实验室后,置于 4℃ 冰箱中保存待检。

(2)牛的气管及肺脏。

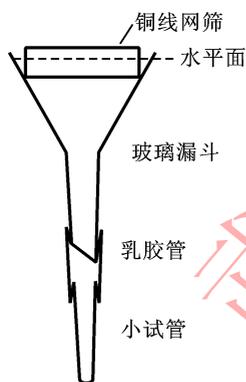


图 1-2-1 贝尔曼氏幼虫分离装置示意图

#### (二)检查

##### 1. 贝尔曼氏法

贝尔曼氏法,又称漏斗幼虫分离法,其装置示意图见图 1-2-1。取被检粪便约 20 g,置于漏斗内的粪筛或纱布中,漏斗下连接一长 10~20 cm 的乳胶管,并用止水钳夹住胶管的游离端。然后向漏斗内慢慢加入 40℃ 左右的温水,以刚淹过粪便为宜,静置 1 h 后,松开止水钳,将乳胶管下面液体放入试管内,静置 30 min,或离心沉淀 2 min,倒掉上层液体,将沉淀全部倒入小表面皿内或用胶头滴管吸取后滴在载玻片上,置于显微镜下检查。

在显微镜下观察到,胎生网尾线虫的第一期幼虫长 0.31~0.36 mm,头端钝圆,其上无扣状结构,尾部短而尖。

##### 2. 局部剖检法

按一般解剖法切开牛胸壁,连同食管、气管将胸腔内的全部脏器摘出。从喉头沿气管、支气管剪开,注意不要把管道内的虫体剪坏,发现虫体即应直接采取。将肺组织在水中尽量撕碎,用手挤压组织,充分水洗后,取出肺组织碎块并用反复沉淀法检查沉淀物。若肺脏上有结节,则把结节取出放在盛有温生理盐水的平皿内,然后分离结节的结缔组织,仔细取出虫体。

胎生网尾线虫(图 1-2-2)寄生于牛的气管和支气管内,雄虫的体长为 40~55 mm,交

合伞的中侧肋与后侧肋完全合二为一。交合刺较小,黄褐色,为多孔性结构。导刺带为多泡性构造。雌虫的体长为 60~80 mm,阴门位于虫体中央附近。虫卵呈椭圆形,大小为 (120~130) $\mu\text{m}$  $\times$ (70~90) $\mu\text{m}$ 。卵内含有已发育的第一期幼虫。

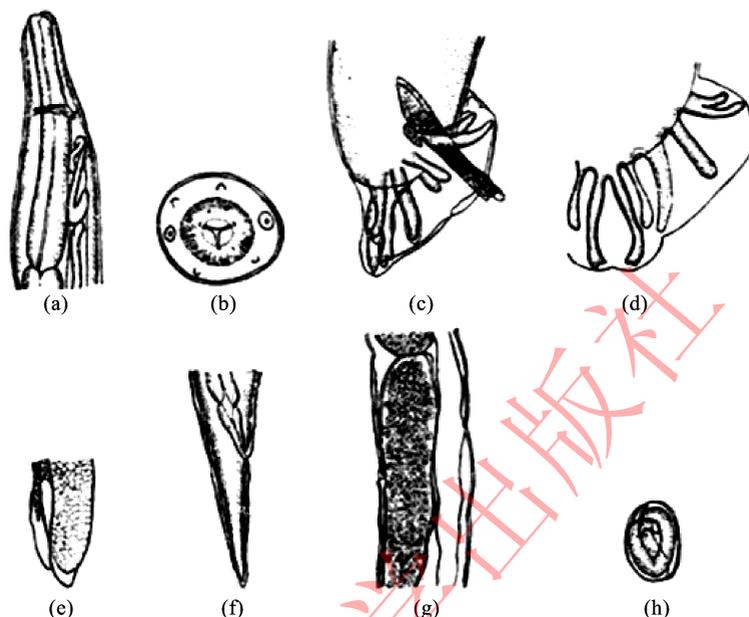


图 1-2-2 胎生网尾线虫

(a)前部;(b)头顶面观;(c)雄虫尾部侧面;(d)交合伞;  
(e)交合刺末端;(f)雄虫尾部;(g)雌虫生殖孔;(h)虫卵

### 3. 注意事项

凡是检查组织器官材料,应尽量撕碎;但检查粪便时,直接将粪便放入,不必弄碎,以免渣子落入小试管底部,镜检时不易观察;温水必须充满整个小试管和乳胶管,并使其浸泡住被检材料(使水不致流出为止),中间不得有气泡或空隙;为了静态观察幼虫形态构造,可用酒精灯或滴入少量碘液,将载玻片上的幼虫杀死后再进行观察。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人提交 1 份实训报告。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格

四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 牛循环系统寄生虫的检查

### 一、实训目的及要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握牛血液原虫的血涂片技术和染色方法、日本血吸虫病的诊断技术,并能在显微镜下正确判断各种常见血液原虫的形态特点,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、解决问题、分析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:记号笔、塑料袋、真空采血针、真空采血管(含抗凝剂)、真空采血管(不含抗凝剂)、消毒的针头、竹筷、40目铜筛(或纱布)、青霉素瓶、离心管、金属环、260目锦纶筛兜、500 mL三角烧瓶、烧杯(50 mL、100 mL、500 mL)、500 mL平底孵化瓶、塑料杯、镊子、试管、蜡笔、胶头滴管、解剖针、湿盒、电磁炉、锅、微量移液器、96孔V形有机玻璃微量血凝反应板、12 cm×16 cm玻璃凝集反应板、硝酸纤维素膜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、染色缸、酒精棉球、脱脂棉、微量移液器、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱、冰箱、PCR扩增仪、电泳仪、凝胶成像系统、甲醇、姬姆萨染色液、瑞氏染色液、甘油、香柏油、重铬酸钾、硫酸、无水乙醇、柠檬酸钠、肥皂、双蒸水、生理盐水、虫体裂解缓冲液、十二烷基磺酸钠(SDS)、蛋白酶K、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、醋酸钠、2×Taq MasterMix、引物、琼脂糖、TAE缓冲液、食盐、硫酸锌、碘液、日本血吸虫标准阳性血清、日本血吸虫标准阴性血清、日本血吸虫冻干虫卵、血吸虫病血凝抗原、PBS缓冲液(pH=7.2)、PAPS血吸虫病快诊液、三联斑点酶联免疫吸附诊断试剂盒(浙江省农业科学院畜牧兽医研究所)、吐温-20、过氧化氢等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备。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,制订牛循环系统寄生虫的检查方案,并经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)牛血液原虫的检查。

(3)日本血吸虫的检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一)取样

#### 1.采血

用真空采血管对待检牛进行颈静脉采血或用消过毒的针头刺破耳尖血管采血,每头牛采集双份血样,一份全血用于牛血液原虫病的检查;一份用于分离血清。将血样放入冰盒带回实验室,保存待检。

#### 2.新鲜粪样

采粪季节宜为春、秋两季,其次是夏季,不宜为冬季。粪样最好于清晨从牛直肠中掏取,或刚排出的新鲜粪便。每头待检牛采集 200 g 新鲜粪样,并编号和记录详细信息,于采粪当天低温送到实验室待检。

### (二)牛血液原虫的检查

#### 1.涂片染色检查

##### (1)载玻片的选用

制作血涂片的载玻片要求表面光滑,清洁无油。清洁新玻片,先用清水冲洗后晾干,再浸泡在稀清洁液中 1~2 d,除去游离碱质。取出后用自来水彻底冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 1 次,再经 95%酒精浸泡后擦干。如是用过的旧载玻片,则应先将玻片逐步投入沸腾的 5%肥皂水(或洗衣粉、洗涤剂的溶液)中,浸泡 1~2 h,用纱布擦洗,再以清水冲洗。晾干后放入稀清洁液中浸泡 1~2 d,再用流水彻底洗净,烤干。最后在 95%酒精中浸泡 1 d 后擦干。已清洗的玻片要用干净无油的纸包好备用。

##### (2)制片

取洁净载玻片 2 片,选一片边缘光滑平整者(最好是磨口边缘)作推玻片,另一片则平置于桌上,或以左手拇指和食指夹持其两端。取一滴血液(直径 1~2 mm)滴在载玻片的一端,使推玻片和此滴血液接触,当血液扩散成一均匀的粗线时,使推玻片与载玻片成 30°~40°,自右向左均匀地向前推,直至载玻片的尾部。尾部应结束在载玻片左侧 1/6 处。

操作时,血量不宜太多或太少,两载玻片间的夹角要恰当,否则血膜会过厚或过薄。推片时用力要均匀,一次推成,切勿中途停顿或重复推片。质量好的血膜应呈舌形,血细胞分布均匀。

##### (3)染色

###### ①瑞氏染色法

取瑞氏染色液 5~8 滴直接加到未固定的血膜上,静置 2 min,其后加等量蒸馏水于

染色液上,摇匀,3~5 min后,流水冲洗,晾干,镜检。

#### ②姬姆萨染色法

滴甲醇 2~3 滴于血膜上,固定 2~3 min。将血片浸入用 10 份蒸馏水加 1 份姬姆萨染色液稀释的染色液缸中 30 min 或者过夜。或将蒸馏水与染液按 2:1 稀释好的染色液直接滴加于血片上,染色 10 min。血片取出后,用流水冲洗,晾干,镜检。

#### (4)镜检

牛双芽巴贝斯虫有环形、圆形、椭圆形、梨籽形、变形虫形等,典型虫体的形状是成双的梨籽形虫体,以其尖端相连成锐角;虫体多位于红细胞的中央,每个红细胞内虫体数目为 1~2 个,很少有 3 个以上的。虫体原生质呈浅蓝色,边缘较深,中部淡染或不着色,呈空泡状的无色区。虫体染色质多为两团,位于虫体边缘。

牛巴贝斯虫呈梨籽形、环形、椭圆形、边虫形和阿米巴形等,多居于红细胞边缘。虫体长度小于红细胞半径,瘦长的梨籽形虫体以尖端相连成钝角为特征。

血液型牛环形泰勒虫虫体很小,形态多样,有圆环形、杆形、卵圆形、梨籽形、逗点形、圆点形、十字形和三叶形等各种形状。典型虫体的形状是环形虫体呈戒指状,染色质一团,居虫体一侧边缘上。经姬姆萨染色液染色后,原生质呈淡蓝色,染色质呈红色。

伊氏锥虫:寄生于血浆内,虫体呈纺锤形或柳叶状,体长为 18~24  $\mu\text{m}$ ,为红细胞直径的 3~4 倍,宽 1~2  $\mu\text{m}$ ,小于红细胞的半径。经姬姆萨染色液染色后,虫体呈淡蓝色。原生质呈浅蓝色,细胞核呈紫红色椭圆形,位于前端虫体中央。副基体在虫体后端,呈紫红色的小圆点,鞭毛在虫体后端,呈细长鞭毛状。

#### 2. 虫体浓集法

在离心管中加入 2% 柠檬酸钠生理盐水 3~4 mL,再加被检牛血液 6~7 mL,混匀后,以 500 r/min 的转速离心 5 min,使其中大部分红细胞沉降;而后将含有少量红细胞、白细胞和虫体的上层血浆,用胶头滴管吸到另一离心管中,并在这血浆中补加一些生理盐水,将此离心管以 2500 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液。取沉淀物制成抹片,按上述染色方法染色检查。

#### 3. 牛巴贝斯虫的间接 ELISA 检查

##### (1)抗原的制备

使用蛋白纯化试剂盒(MagneGST Protein Purification System)中的磁珠、磁力架与洗脱液(含谷胱甘肽还原酶),按照说明书进行棒状体相关蛋白 1(RAP-1)C 端(BORCT)蛋白和 GST 蛋白的纯化。

(2)抗原包被。用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH=9.6)将纯化的 BORCT 蛋白液稀释成 15.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜。

(3)封闭。用含有 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液洗涤 1 次后,用 3% 脱脂奶粉封闭液进行封闭,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h。

(4)加样。将微量板用 PBST 洗涤 3 次后,加入 1:100 稀释的被检血清,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h。

(5)加二抗。用 PBST 洗涤 3 次后,加入 1:4000 稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  下 1 h。

(6)底物。用 PBST 洗涤 3 次后,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物(OPD),并在 37  $^{\circ}\text{C}$  下避光作用 10~15 min。

(7)用酶标检测仪读取 OD 值。

(8)判定标准。阴性血清对照孔的平均值必须低于 0.1,待测样品的 OD 值等于或大于 0.2 为阳性,低于 0.2 为阴性。

#### 4. PCR 检查

##### (1)DNA 抽提

取 300  $\mu\text{L}$  抗凝血样,加入 300  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液、30  $\mu\text{L}$  10% SDS、10  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (10 mg/mL)50  $^{\circ}\text{C}$  消化过夜。加入等体积 Tris 饱和酚轻柔振荡 20 min,以 12000 r/min 的转速离心 10 min;取上清液加 1/2 体积的苯酚(氯仿)混匀,以 12000 r/min 的转速离心 10 min;取上清液加入等体积氯仿颠倒混匀,以 12000 r/min 的转速离心 10 min;取上清液加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的醋酸钠,在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下沉淀 30 min 后以 12000 r/min 的转速离心 10 min;弃上清液,用 75% 的酒精洗涤,待自然干燥后加入 40  $\mu\text{L}$  的双蒸水,即用或在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

##### (2)PCR 扩增

①PCR 反应体系:PCR 扩增均在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中进行。该体系包括:2  $\times$  Taq MasterMix 10  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,模板各 1.0  $\mu\text{L}$ ,超纯水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。瞬时离心后选择适当的反应条件在 PCR 扩增仪上进行扩增。

表 1-3-1

引物名称及序列

虫种名称	引物名称	引物序列
环形泰勒虫	THX-F1	5'-GTAACCTTTAAAAACGT-3'
	THX-R1	5'-GTTACGAACATGGGTTT-3'
	THX-F2	5'-AAGACCCTTAAGGTCGGAGACAAGA-3'
	THX-R2	5'-GTCGACAACCTGGTTTGTAAATC-3'
瑟氏泰勒虫	TSSH-F	5'-CACGCTATGTTGTCCAAGAG-3'
	TSSH-R	5'-TGTGAGACTCAATGCGCCTA-3'
牛双芽巴贝斯虫	BSHY-F	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
	BSHY-R	5'-GAATGATCCTTCCGCAGGTTCCACC-3'
其他牛巴贝斯虫	NBBS-F1	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
	NBBS-R1	5'-CCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAA-3'
	NBBS-F2	5'-CCGGAGAGGGAGCGTGAGAA-3'
	NBBS-R2	5'-TCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'

##### ②PCR 反应参数

a. 环形泰勒虫巢式 PCR 反应参数。第 1 轮 PCR 反应:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。第 2 轮 PCR 反应(以第 1 轮 PCR 产物为模板):94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,

72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

b. 瑟氏泰勒虫 PCR 反应参数: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 2 min, 63 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

c. 牛双芽巴贝斯虫 PCR 反应参数: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58.1 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

d. 其他牛巴贝斯虫 PCR 反应参数: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 2 min, 63 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

③电泳检测: 反应结束后, 取 5  $\mu$ L 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 紫外灯下检测有无特异条带。

### (三) 日本血吸虫的检查

#### 1. 直接涂片法

粪便中虫卵数量多时可采用直接涂片法检查。用胶头滴管在载玻片表面加 50% 的甘油水溶液或清水 1~2 滴, 取黄豆大小的被检粪便放入液滴内, 混匀, 剔除粗粪渣, 加盖盖玻片, 在显微镜下镜检虫卵。

#### 2. 沉淀法

日本血吸虫卵的比重大, 可沉于容器底部, 采用自然沉淀法或离心沉淀法检查。

##### (1) 自然沉淀法

取被检粪便 20~30 g 于烧杯或塑料杯内, 加适量清水搅拌均匀, 经双层纱布过滤到另一干净的烧杯或塑料杯中, 补加清水至满, 静置 20~25 min, 倒去上层液体, 重新加满清水, 以后每隔 15~20 min 换水 1 次 (3 或 4 次), 直至上层液体清亮为止。最后倒去上层液体, 取沉渣做涂片镜检。

##### (2) 离心沉淀法

将上述过滤后除去粗渣的粪液倒入离心管中, 以 1500~2000 r/min 的转速离心 1~2 min, 倒去上层液体, 加入清水, 再离心沉淀, 如此沉淀 3~4 次, 直至上层液体清亮为止, 最后倒去上层液体, 取沉渣镜检。

#### 3. 漂浮法

##### (1) 饱和盐水漂浮法

用竹筷取黄豆粒大小的被检粪便置于青霉素瓶 (高 3.5 cm、直径约 2 cm) 中, 加入少量饱和食盐水调匀, 再慢慢加入饱和食盐水到液面略高于瓶口但不溢出为止。此时在瓶口覆盖一载玻片, 静置 15 min 后, 将载玻片提取并迅速翻转, 镜检。

##### (2) 饱和硫酸锌离心漂浮法

取被检粪样约 1 g, 加 10~15 倍的清水, 充分搅拌均匀, 过滤, 将滤液倒入离心管中, 反复离心 3~4 次, 至水清为止, 最后倒去上层液体, 在沉渣中加入饱和硫酸锌溶液 (33% 的溶液), 调匀后再加饱和硫酸锌溶液至距离管口约 1 cm 处, 离心 1 min。用金属环取表面的粪液置于载玻片上, 加 1 滴碘液, 镜检。

#### 4. 毛蚴孵化法

毛蚴孵化法是日本血吸虫病病原学检查最常用的方法。其原理是将含有血吸虫卵的粪便在适宜的温度条件下进行孵化, 等毛蚴从虫卵内孵出来后, 借着毛蚴向上、向光、向清

的特性,进行观察,做出诊断。

(1)常规孵化法(又称沉淀孵化法或沉孵法)

取待检新鲜粪便(尽量取带有黏液或血液的部分)300 g,搅拌混匀后分成3份,每份100 g。将分好的粪便置于500 mL烧杯内,加水调成糊状,经40目铜筛滤入另一个500 mL烧杯内,加水至九成满,静置沉淀,之后将上层液体倒掉,再加清水搅拌均匀,沉淀。如此进行3~4次。第一次沉淀时间约为30 min,以后20 min即可。最后将上述反复淘洗后的沉渣置于三角烧瓶内,再加30℃的温水,三角烧瓶瓶口用中央插有玻璃管的胶塞塞上,瓶内的水量以距瓶口2 cm为宜,且玻璃管中必须有一段露出的水柱,之后将其放入22~26℃的恒温培养箱中孵化。沉孵法装置示意图见图1-3-1。

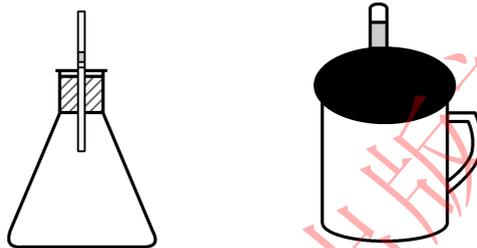


图 1-3-1 沉孵法装置示意图(Yang,2005)

在开始孵化后1 h、3 h、5 h分别观察水柱内是否有毛蚴,观察时间为2 min以上。发现日本血吸虫毛蚴即判为阳性。日本血吸虫毛蚴肉眼观察为白色、折光线强的梨形小虫,似针尖大小,多在距水面下方4 cm以内的水中做水平的或略斜向的直线运动,或沿管壁绕行。有时混有纤毛虫,其颜色也为白色,需加以区别。小型纤毛虫呈不规则螺旋形运动或短距离摇摆;大型纤毛虫呈波浪式或反转运动。无法区分时,可用胶头滴管吸出在显微镜下观察。显微镜下可见毛蚴前部宽、中间有个顶突,两侧对称,后渐窄,周身有纤毛。样品中有1~5个毛蚴记为“+”,6~10个毛蚴记为“++”,11~20个毛蚴记为“+++”,21个以上毛蚴记为“++++”。也可将粪便滤液倒入260目锦纶筛兜内,加水充分淘洗,直到滤出液变清亮为止;将锦纶筛兜内粪渣倒入500 mL三角烧瓶内进行孵化。

(2)棉析毛蚴孵化法(简称棉析法)

取待检粪便50 g,经反复淘洗或锦纶筛兜淘洗后(不淘洗也可),将粪渣移入500 mL的平底孵化瓶中,灌注25℃的温水至瓶颈下部,在液面上方塞一薄层脱脂棉,大小以塞住瓶颈下部不浮动为宜,再缓慢加入20℃清水至距瓶口1~3 mm处,如图1-3-2所示。如棉层上面水中有粪便浮动,可将这部分水吸去再加清水,然后进行孵化。

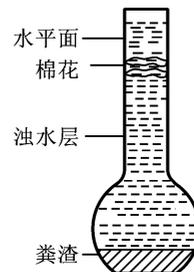


图 1-3-2 棉析法装置示意图

这种方法的优点是粪便只需略微淘洗或不淘洗就可装瓶孵化,毛蚴出现后可集中在棉花上层有限的清水水域中,可和下层混浊的粪液隔开,因而便于毛蚴的观察。

(3)塑料顶管孵化法

以塑料杯作容器,容器上加盖,盖上有圆孔,可插入玻璃管或倒插的试管,如图1-3-3

所示。将粪渣倒入容器,加水至满后加盖(注意防止漏水),然后从盖的圆孔插入玻璃管或倒插入试管。插入玻璃管后,由玻璃管上口加水,直至距管口下 1 cm 处为止,倒插入试管时,试管预先要盛满水,倒插入容器后试管中仍保留一定高度的水柱。

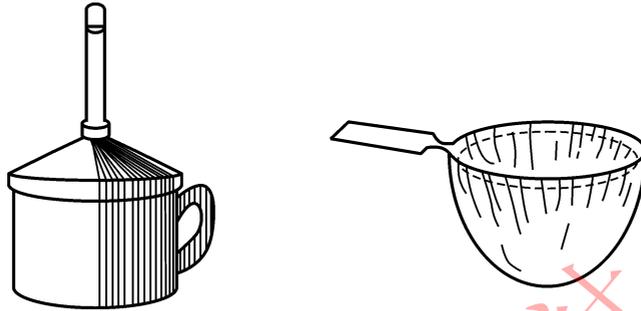


图 1-3-3 塑料杯顶管装置及尼纶筛网示意图

#### (4) 毛蚴孵化注意事项

- ①粪样必须新鲜,忌用接触过农药、化肥或其他化学药物的纸、塑料布等包装粪便。
- ②用水必须清洁,未被工业污水、农药或其他化学药物污染;水的酸碱度以 pH 值以 6.8~7.2 为宜;自来水应含氯量少,含氯量高时应存放过夜后再用;河水、井水、池塘水等应加温到 60℃,杀死其中的水虫,冷却后使用。

③洗粪时应防止毛蚴过早孵化,为此可用 1%~1.2% 的盐水代替常水,一般在水温不足 15℃ 时用常水;水温为 15~18℃ 时于第一次换水后改用盐水;水温超过 18℃ 时一直用盐水。

#### 5. 血清学检查

##### (1) 环卵沉淀试验(circumoval precipitin test, COPT)

环卵沉淀试验是以血吸虫全卵为抗原的特异免疫血清学试验,虫卵内毛蚴或胚胎分泌排泄的抗原物质经卵壳微孔渗出与检测血清内的特异抗体结合,可在虫卵周围形成特殊的复合物沉淀,在光镜下判读反应强度并计数,反应卵的百分率即环沉率。

操作步骤:

- ①取载玻片,在中央横轴两侧涂 2 行平行蜡,蜡间距离与盖玻片宽度相同。
- ②用胶头滴管吸取被检动物血清 1~2 滴(约 25 μL),用解剖针挑取新鲜虫卵或干卵约 100 个,放入血清中,并用针搅拌,使虫卵散开,盖好盖玻片,四周用蜡封闭。

③将制好的玻片放入湿盒(在有盖盘中预先放置一层湿纱布),置于 37℃ 恒温培养箱中培养。

④48 h 后,取出玻片在显微镜下观察,记录环卵沉淀情况,并计算环卵沉淀率。

⑤判定标准。

阳性判定标准:泡状、指状、片状或细长弯曲状的折光性沉淀物,边缘整齐,与卵壳牢固粘连。环卵沉淀率达 5% 者为阳性。

$$\text{环卵沉淀率} = \frac{\text{全片阳性反应卵数}}{\text{全片虫卵数}} \times 100\%$$

环卵沉淀判定标准:卵周出现泡状、指状沉淀物的面积小于卵周面积的 1/4,片状沉

沉淀物的面积小于卵周面积人的  $1/2$ , 细长曲带状沉淀物的长度不足卵的长径, 记为“+”; 泡状、指状沉淀物总面积大于卵周面积的  $1/4$ , 片状沉淀物大于卵周面积的  $1/2$ , 曲带状沉淀物的长度相当于或超过卵的长径, 记为“++”; 泡状、指状沉淀物总面积大于卵周面积的  $1/2$ , 片状沉淀物面积等于或超过卵周大小, 曲带状沉淀物的长度超过卵长径数倍, 记为“+++”或“++++”。

(2) 间接血凝试验(indirect haemagglutination test, IHA)。

间接血凝试验是以甲醛和鞣酸处理过的绵羊红细胞或“O”形人红细胞为载体, 将血吸虫虫卵或成虫抗原吸附于载体上, 当受检动物血清中存在相应的抗体时, 红细胞会因抗原-抗体的结合而被动呈现凝集现象。IHA 操作简便, 敏感性高, 适于现场使用。

操作步骤如下:

①用微量移液器在 96 孔 V 形有机玻璃微量血凝反应板左边第 1 孔、第 2 孔、第 3 孔内分别加入生理盐水  $100\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \mu\text{L}$ 。

②在第 1 孔内加入被检血清  $25\ \mu\text{L}$ , 混匀, 使血清成  $1:5$  稀释。

③吸取第 1 孔的血清液  $25\ \mu\text{L}$ , 加入第 2 孔, 混匀, 此孔血清成  $1:10$  稀释。

④吸取第 2 孔的血清液  $25\ \mu\text{L}$ , 加入第 3 孔, 混匀, 此孔血清成  $1:20$  稀释。然后吸取此孔血清液  $25\ \mu\text{L}$  丢弃。

⑤如有多份样本, 每个样本均按上述操作处理。

⑥阳性对照和阴性对照采用标准血清也按上述操作处理。另外, 用生理盐水设空白对照。

⑦用微量移液器吸取血吸虫病血凝抗原, 在各个样本和对照的  $1:10$  和  $1:20$  的稀释孔分别加  $25\ \mu\text{L}$ , 振荡混匀, 置于  $37\ ^\circ\text{C}$  条件下。当空白或阴性血清两孔的红细胞全部沉于孔底中央(无圆形红点或仅有小的圆形红点)时, 即可判定诊断结果。

⑧判定标准。

阳性血清判定: 以血清  $1:10$  稀释孔出现阳性(包括弱阳性)时被检血清判定为血吸虫病牛阳性。

反应强度判定: 红细胞全部下沉到孔底中央, 形成紧密红色圆点, 周缘整齐为阴性“-”; 红细胞少量沉于孔底中央, 形成一较小的红色圆点, 周围有少量凝集红细胞为弱阳性“+”; 红细胞半数沉于孔底中央, 形成一更小的红色圆点, 周围有一层淡红色凝集红细胞为阳性“++”; 红细胞 75% 以上散于孔底斜面, 形成一层淡红色薄层为强阳性“+++”; 红细胞全部凝集, 均匀散于孔底斜面, 形成一层淡红色薄层为强阳性“++++”。

(3) 乳胶凝集试验(latex agglutination test, LA)。

乳胶凝集试验是以聚苯乙烯胶乳颗粒为载体, 将血吸虫抗原联结在胶乳颗粒上。试验时将一定量的联结有抗原的胶乳试剂加入待检血清中, 如待检血清中有相应的抗体, 则抗原与抗体结合, 胶乳颗粒发生凝集。

操作步骤:

①在  $12\ \text{cm} \times 16\ \text{cm}$  玻璃凝集反应板的左边第 1 孔中加 PBS 缓冲液  $100\ \mu\text{L}$ , 第 2 孔中加 PBS 缓冲液  $25\ \mu\text{L}$ 。

②在第 1 孔中加待检血清  $25\ \mu\text{L}$ , 混匀, 使第 1 孔成  $1:5$  稀释。

③在第2孔中加第1孔稀释血清液 25  $\mu\text{L}$ ,混匀,使第2孔成 1:10 稀释。

④在每孔中加 PAPS 快诊液 25  $\mu\text{L}$ ,混匀,10 min 后观察结果。

⑤判定标准。

阳性血清判定:1:10(第2孔)血清稀释孔出现“+”即为阳性。

反应强度判定:1~2 min 内胶乳全部凝集出现粗颗粒,并且四周形成一白色框边,液体清亮,记为“++++”;3~4 min 内胶乳全部凝集出现粗颗粒,四周白色框边不太明显,液体较清亮,记为“+++”;5~6 min 内 70%~80%胶乳出现凝集颗粒,四周液体微浑浊,记为“++”;8~10 min 内 40%~50%胶乳出现凝集颗粒,液体微浑浊,记为“+”;不出现凝集颗粒,呈白色均匀浑浊状,记为“-”。

(4)斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA) 

①用记号笔在试管上标好待检血清号码,用铅笔在硝酸纤维素膜右端标上待检血清号码,用剪刀将硝酸纤维素膜条剪下,放入相应试管中。

②分别在每个试管中加入 1.5 mL PBST 溶液,并在各个试管中加 4  $\mu\text{L}$  相应编号的待检血清、标准阳性血清、标准阴性血清,轻轻摇匀。

③将摇匀的试管置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中孵育 50~60 min,每隔 20 min 轻轻摇动试管 1 次。

④取一干净烧杯,加入约 40 mL PBST 溶液,用镊子将每支试管中膜夹出,放入盛有 PBST 溶液的烧杯中,每隔 2 min 轻轻摇动、洗涤 1 次,共 3 次。

⑤洗涤好的膜用镊子夹出,放在滤纸上吸去膜表面水后,放入盛有用 PBST 稀释的封闭液的烧杯中,用镊子翻动膜,使其充分接触液体,然后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中反应 50~60 min,隔 25 min 用镊子翻动膜 1 次。

⑥反应结束后洗涤膜 3 次,方法同④。

⑦洗涤好的膜用镊子夹出,放在滤纸上吸去膜表面水后,放入盛有用 PBST 溶液稀释的单克隆抗体溶液的烧杯中,用镊子翻动膜,使其充分接触液体,然后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中反应 50~60 min,隔 25 min 用镊子翻动膜 1 次。

⑧反应结束后洗涤膜 3 次,方法同④。

⑨用滤纸吸去膜表面水后,将膜放入盛有底物溶液的烧杯中,振摇显色 10~20 min。

⑩待有任一清晰斑点出现后终止反应。将烧杯中的反应液弃去,用自来水充分洗涤至水清为止。然后判定结果。

判定标准如下。

阳性血清判定:凡出现“+”即判为阳性血清。

反应强度判定:深棕色为“++++”,浅棕色为“+++”,黄色为“++”,浅黄色为“+”,稍有黄色为“±”,无色为“-”。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

## (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)血样的采集;
- (2)粪样采集及注意事项;
- (3)牛血液原虫的检查;
- (4)日本血吸虫的检查。

## (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

**优秀(85~100分):**熟练掌握牛血液原虫的血液涂片技术、染色技术及 PCR 检查技术,日本血吸虫病的粪便学检查技术、毛蚴孵化技术、血清学检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

**良好(70~84分):**能较为熟练掌握牛血液原虫的血液涂片技术、染色技术及 PCR 检查技术,日本血吸虫病的粪便学检查技术、毛蚴孵化技术、血清学检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

**及格(60~69分):**基本掌握牛血液原虫的血液涂片技术、染色技术及 PCR 检查技术,日本血吸虫病的粪便学检查技术、毛蚴孵化技术、血清学检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

**不及格(60分以下):**操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

# 实训四 牛肌肉寄生虫的检查

## 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握牛住肉孢子虫、牛囊尾蚴、纹皮蝇等的检查技术,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:手术刀、手术剪、镊子、擦镜纸、载玻片、盖玻片、托盘天平、离心管、计数器、200 目铜网、液氮罐、纱布、96 孔有机玻璃血凝板、平皿、真空采血管(不含抗凝剂)、真空采血管(含抗凝剂)、真空采血针、胶头滴管、酒精棉球、微量移液器、水浴锅、组织破碎仪、超声波粉碎器、梅花形打孔器、光学显微镜、冰箱、751 型分光光度

计、恒温培养箱、普通离心机、微量振荡器、甘油、甲醛、姬姆萨染色液、巴比妥-巴比妥钠缓冲液、胃蛋白酶、液氮、琼脂、叠氮钠、石碳酸、PBS 缓冲液、阿氏液、戊二醛、鞣酸、1%兔血清、住肉孢子虫病快速 ELISA 诊断试剂盒(湖南省畜牧兽医研究所和湖南医科大学研制)、健康牛等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备。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,制订牛肌肉寄生虫的检查方案,并经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)肌肉压片检查。

(3)住肉孢子虫血清学检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)样品采集及保存

##### 1. 肉样

采集每头待检牛的心肌、食道肌、膈肌、腹外斜肌、咬肌、舌肌、臀肌等部位肉样各 10 g 左右,将采集到的肉样做好编号后带回实验室,在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下保存待检。

##### 2. 血清

采集每头待检牛的全血,常规分离血清,编号,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭能,在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下保存待检。

#### (二)肉眼及压片检查

将采集的每个待检肉样附着的结缔组织和脂肪组织剥去,分别称取 0.1 g,沿肌纤维纵长方向剪成小条,置于一载玻片上,分摊均匀,滴加适量 50%甘油水溶液至透明,盖上一片载玻片压片,将两张玻片用力挤压至肉样半透明为止。每个部位制作 3 片载玻片压片。

肉眼所见的住肉孢子虫虫体为寄生在横纹肌、心肌、食道壁、咬肌、舌肌和膈肌等各种肌肉组织内的包裹状物(称为米休氏囊),与肌纤维平行,多呈长圆柱形或纺锤形,灰白色或乳白色,其大小差别很大,大的可长达 1~5 cm,小的只有几毫米,需在显微镜下才能观察。

发现虫体时,用小镊子和小剪刀将虫体摘出,置于载玻片上,剪破虫体囊壁,可见乳白色液体流出,取此液 1 滴制成薄膜涂片,待干后用甲醛固定,姬姆萨染色镜检,如见有许多肾形、镰刀形或香蕉形,长 10~12  $\mu\text{m}$ ,宽 4~9  $\mu\text{m}$ ,一端稍尖,另一端钝圆,核偏位于钝圆一端的小体,即为住肉孢子虫的滋养体(又称为南雷小体)。

在任何一个部位发现住肉孢子虫包裹,即被视为阳性。

轻度感染:每 40  $\text{cm}^2$  肌肉上有虫体不超过 8 个,或仅有食道寄生较多虫体者。

中度感染:每 40  $\text{cm}^2$  肌肉上有虫体 9 个或 9 个以上,但肌肉无病变者。

重度感染:每 40 cm<sup>2</sup> 肌肉上有虫体 9 个或 9 个以上,但肌肉有病变者。

牛囊尾蚴主要寄生在牛的咬肌、舌肌、心肌、肩胛肌、颈肌和臀肌等处,在肌肉中呈乳白色、黄豆大小的圆形或椭圆形包囊,包囊内有半透明的液体,囊壁上有一个乳白色头节。把虫体压薄后镜检,可见头节上有 4 个吸盘,无顶突和角质小钩。

纹皮蝇的第 2 期幼虫可寄生在牛的食道壁,其幼虫分节,易与住肉孢子虫相区别。

### (三) 牛住肉孢子虫病血清学检查

#### 1. 间接血凝试验(IHA)

##### (1) 抗原制备

将牛的食道肌剪开拉平,细心剥离摘下住肉孢子虫包囊,放入生理盐水中洗涤 3 次,加入 6 倍 pH7.2 的 PBS 缓冲液,置于组织捣碎机中捣碎 5 min,过滤后经超声乳化 3 min,再以 6000 r/min 的转速离心 30 min,上清液即包囊可溶性抗原。用 751 紫外分光光度计测定其蛋白浓度。小瓶分装,于 -20 °C 冰箱保存。

按上法剥离的住肉孢子虫包囊,经洗涤后剪碎,研磨,再经 3 层纱布过滤,以 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次,即获得纯的缓殖子。将缓殖子于 -20 °C 冰箱中冻融 5 次,再经超声波粉碎 8~10 min,以 4000 r/min 的转速离心 30~60 min,收集上清液即为缓殖子可溶性抗原。用紫外分光光度计测定其蛋白浓度,分装于 -20 °C 冰箱保存。

##### (2) 致敏红细胞的制备

① 无菌采健康公绵羊颈静脉血,放入阿氏液中,捣匀后置于 4 °C 冰箱中 1 周,然后用两层纱布过滤,经 PBS 缓冲液洗涤 4 次,再以 PBS 缓冲液配成 5% 红细胞悬液。

② 将上述洗涤好的红细胞悬液,缓缓加入等量的 2% 戊二醛溶液,边加边搅拌,在室温醛化 3 h 后放入 4 °C 冰箱中 10 h,然后用 PBS 缓冲液洗涤 4 次,并配成 5% 悬液。

③ 醛化后红细胞悬液再加入等量的 0.001% 鞣酸,置于 37 °C 鞣化 30 min,最后以 PBS 缓冲液洗涤 4 次,配成 5% 悬液。

④ 将上述鞣化的红细胞悬液离心弃上清液,用准备好的各种不同蛋白含量的抗原,分别将红细胞沉淀稀释成 2.5% 的悬液,放入 37 °C 致敏 1 h,然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后以含 1% 兔血清稀释洗涤 1 次,并以此稀释液配成 1.5% 悬液,按 0.01% 加入叠氮钠防腐,即成致敏红细胞悬液,并按需要量分装于小瓶中,放在 4 °C 冰箱中保存。

另外,以同样方法制备不加抗原致敏的 1.5% 红细胞悬液,供对照用。

##### (3) 间接血凝试验

以生理盐水为稀释液,每孔 25 μL,将待检血清稀释使各孔成 1:5、1:10、1:20 至 1:2560,最后一孔不加血清作空白对照。各孔再加致敏红细胞悬液 25 μL,每板留 1 排孔加非致敏红细胞悬液作对照。用微量振荡器振荡 2 min,置于 37 °C 恒温培养箱中 2 h 后观察结果。

##### (4) 结果判定

红细胞全部集中于孔底,呈点状,边缘光滑,周围液体清亮者为阴性;红细胞均匀铺在孔底,周围液体呈云雾状或红细胞凝集成一圆圈,或边缘有颗粒状的凝集块等,均为阳性。

## 2. 琼脂扩散试验

### (1) 抗原制备

于食道肌内挑取含大量住肉孢子虫包囊部分肌肉,进行组织破碎,破碎后加入胃蛋白酶于 40 °C 下消化 15 min。消化后用 200 目铜网过滤 2 次,取滤液以 1500 r/min 的转速离心 15 min,弃上清液和上层棕色沉淀,取白色下层缓殖子。并将取得的缓殖子用生理盐水反复洗涤沉淀。缓殖子在洗涤 3 次后,进行超声波粉碎机破碎和 3 次液氮冻融,然后在 4 °C 下以 10000 r/min 的转速离心 60 min,取上清液,即为制备的住肉孢子虫可溶性抗原,置于 -20 °C 冰箱保存备用。以 751 型分光光度计测定蛋白含量。

### (2) 阴性对照血清

采用剖检、食道肌肉消化、间接血凝试验均为阴性的牛血液,分离血清作为阴性对照血清。

### (3) 琼脂扩散及结果观察

制备 pH=8.6 巴比妥-巴比妥钠缓冲液,加入 2% 琼脂及 0.02% 叠氮钠,用梅花形打孔器打孔,孔内径为 4 mm,中心孔与周围孔距离为 3 mm。中心孔滴入可溶性抗原,周围各孔分别滴入待检血清及阴性对照血清,置于 37 °C 恒温培养箱,下方垫 0.1% 石碳酸浸湿纱布,分别于 24 h、48 h、72 h 时观察,凡是能在抗原、血清间形成白色沉淀线者为强阳性。

## 3. ELISA 检查

按照住肉孢子虫病快速 ELISA 诊断试剂盒说明书操作。具体操作方法如下:取Ⅲ号液将被检血清做 1:10 稀释后加入酶标板,每孔 1 滴,室温反应 4 min;在酶标板各孔加Ⅱ号液 1 滴,数秒后拍干,用自来水冲洗 5 遍,拍干;在酶标板各孔加Ⅰ号液 1 滴,室温反应 4 min,按上法冲洗;在酶标板各孔分别加Ⅳ号和Ⅴ号液各 1 滴,室温反应 4 min;在酶标板每孔加Ⅵ号液 1 滴终止反应。同时设标准阳性血清和标准阴性血清对照孔。

被检血清孔呈现蓝色为阳性,无色为阴性。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 样品的采集及保存;
- (2) 肉眼及压片检查;
- (3) 牛住肉孢子虫病血清学检查。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格

四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握肉眼及压片检查技术、牛住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握肉眼及压片检查技术、牛住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握肉眼及压片检查技术、牛住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训五 牛皮肤寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握牛螨病、牛皮蝇蛆病的诊断技术,蝇的采集方法和种类鉴定。掌握用于螨病诊断的皮肤病料的采集方法,明确采取病料的注意事项;掌握检查螨的主要方法;进一步掌握疥螨、痒螨的形态特征,虱、蚤昆虫标本的采集、保存。对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:手术刀片、剪刀、镊子、培养皿(或带塞的试管)、标本瓶、棉签、玻璃、分离针、擦镜纸、载玻片、盖玻片、酒精灯、离心管、金属圈、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱、煤油(乙醚或氯仿)、碘酒、甘油、无水乙醇、福尔马林、冰醋酸、凡士林、加拿大树胶、氢氧化钠、硫代硫酸钠等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备。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,制订牛皮肤寄生虫的检查方案,并经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)牛体蝇、螨、牛皮蝇蛆、虱、蚤的采集。

(3)蝇、螨、虱、蚤的固定与保存。

(4)蝇、虱、蚤的种类鉴定。

(5)螨的检查。

(6)牛皮蝇蛆的检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一) 取样

#### 1. 牛体蝉的采集

蝉的个体较大,通过肉眼观察即可发现。在检查发现后用手或眼科镊拔取。拔取时应使虫体与皮肤垂直,慢慢地拔出假头,或以煤油、乙醚或氯仿抹在蝉身上和被叮咬处,而后拔取。

在采集时应注意雌蝉较雄蝉大得多,不能遗漏雄蝉,雄蝉是鉴定种类时的主要依据,缺少雄蝉将给种类鉴定带来困难,因此两者均应收集。

#### 2. 牛体螨的采集

找出病牛患部,然后在新生的患部与健康部交界的地方,剪去长毛,用经过火焰消毒的手术刀片,使刀刃和皮肤表面垂直用力刮取病料,直到微微出血为止。将刮到的病料收集到培养皿或带塞的试管内,刮取病料处用碘酒消毒。

为防止皮屑被风吹走,可在刀刃上蘸取少量 50% 的甘油水溶液,这样可使皮屑黏附在刀上。

#### 3. 牛体表虱、蚤的采集

在检查发现吸血虱、毛虱后,用手或小镊子捏取,或将附有虫体的毛剪下,置于培养皿中,再仔细收集。

大多蚤类活动性较强,捕捉困难。可以用撒有樟脑的布将牛体包裹,数分钟后取下布,蚤落入布内。也可用杀虫药喷洒畜体,待其死亡后采集。

#### 4. 牛皮蝇蚴的采集

在待检牛的颈、肩、背、腰及臀部皮肤上触摸牛皮蝇三期幼虫瘤疱或幼虫脱落留下的虫孔并详细统计计数。

### (二) 蝉、螨、虱、蚤的固定与保存

#### 1. 湿固定

蝉应小心地由动物体表摘下或在拖网上取下,防止蝉的假头断落,先投入开水数分钟,让其肢体伸直,便于日后观察。然后保存在 70% 酒精内,为防止酒精蒸发使蝉的肢体变脆,可加入数滴甘油。或把蝉、螨类先投入经加温的 70% 酒精(60~70 °C)固定,1 d 后保存于 5% 甘油酒精(70%)中;也可用 5%~10% 福尔马林和布勒氏(Bless)液固定保存。固定液体积须超过所固定标本体积的 10 倍以上,标本方能不坏。如此保存的蝉、螨标本可供随时观察。

采集的虱、蚤标本可用 70% 酒精或 5%~10% 福尔马林进行固定。但用专门的昆虫固定液效果更好,其配方是 120 mL 75% 的酒精中,溶解苦味酸 12 g,待溶后再加入氯仿 20 mL 和冰醋酸 10 mL。在昆虫固定液中固定的虫体,经过一夜后,应将虫体取出,放入 70% 酒精中保存。在保存标本用的 70% 酒精中,最好加入 5% 甘油。

所有保存标本须详细记录标本名称、宿主、采集地点、采集日期及采集者姓名。用铅笔写好标签放入瓶内,保存标本的瓶应用蜡封严。

## 2. 湿封法

用新鲜采集的病料散放在一块玻璃上,铺成薄层,病料四周应涂少量凡士林,防止虫体爬散,为了促使牛体螨类活动加强,可将玻璃稍微加温,然后用低倍镜检查,如发现虫体爬行于绒毛和皮屑之间,及时用分离针尖挑取单独的虫体,放置在预先安排好的有1滴布勒氏液的载玻片上,移动显微镜下判定其需要的背面或腹面,然后盖一个1/4盖片的小盖片,再用分离针尖轻压小盖片,并做圆圈运动,尽量使其肢体伸直。待其自然干燥约1周后,在小盖片上加盖普通盖片,用加拿大树胶封固,即成为永久保存的标本了。

如果采到的虫体饱食有大量的血液,则在采集后应先存放一定时间,待体内吸血的血液消化吸收后再行固定,否则血凝结在消化道内不易溶解,制片后不透明。

### (三) 蝉、虱、蚤的种类鉴定

蝉、虱、蚤的鉴定分类,以其外部形态结构为依据。可直接在解剖镜下或低倍显微镜下观察,也可制成永久装片标本观察。

制片前,先将虫体浸入10%氢氧化钾水溶液中,煮沸数分钟,使虫体内部的肌肉和内脏溶解,并使体表软化透明,便于制片观察。较大的虫体,浸入氢氧化钾溶液中,可用昆虫针在虫体上刺些小孔,以利于虫体内部组织的溶出。经氢氧化钾溶液处理后的虫体,应在水中洗去其碱液再行制片。其后的操作如下:

(1)加拿大树胶封片。取已准备好的蝉、虱、蚤等虫体,经30%、50%、70%、85%、90%、95%各级酒精逐级脱水,最后移入无水乙醇中,使其完全脱水;再移入二甲苯或水杨酸甲酯中至透明;透明后,取出置于载玻片上,滴几滴加拿大树胶,覆以盖玻片即成。本法经过各级酒精所需的时间,依虫体的大小而各异,一般需15~30 min,较大的虫体时间要长一些。

(2)洪氏液封片。取洪氏液滴于载玻片上,再取以氢氧化钾溶液处理过并经清洗的小型昆虫虫体,无须脱水,直接移入洪氏液中,加盖玻片盖好,即成。洪氏液:以鸡蛋白50 mL、福尔马林40 mL、甘油40 mL三者混匀于瓶中,加塞振荡,彻底均匀后,待其中气泡上升逸去;最后倒入平皿中,置干燥器内吸去水分,待液体仅占原容量的1/2时,取出装入瓶中,密封待用。

(3)甘油明胶封片。甘油明胶是在6份水中溶入1份明胶,溶解后,加入7份甘油混匀,并加入石碳酸1%,加温15 min制成。

以上各法中,以加拿大树胶封制的装片保存较久;其余各法的封固剂,时间过久后,会失去水分而干裂,有时在盖片周围用油漆环封,以减少水分散失,延长保存时间,但并不能完全阻止水分的丧失。

### (四) 牛疥螨和牛痒螨的检查

#### 1. 加热检查法

将刮下物放在黑纸上或有黑色背景的容器内,置恒温培养箱(30~40℃)中,或在酒精灯上加热,或用白炽灯照射一段时间,然后收集从皮屑中爬出的黄白色针尖大小的点状物置显微镜下检查。

检查牛痒螨时,可把牛牵到阳光下揭去“油漆起爆”状的痂皮,即可看到淡黄白色的麸

皮样缓慢爬动的痒螨。

#### 2. 显微镜下直接检查法

将刮下的皮屑置于载玻片上,滴加 50% 甘油溶液,覆以另一张载玻片并挤压,使病料散开,置于显微镜下检查。

#### 3. 虫体浓集法

为了在较多的病料中检出其中较少的虫体,可采用浓集法提高检出率。先取较多的病料,置于试管中,加入 5%~10% 氢氧化钠溶液。浸泡过夜或在酒精灯上加热煮沸数分钟,使痂皮全部溶解,虫体自皮屑中分离出来。而后待其自然沉淀或以 2000 r/min 的转速离心 5 min,虫体即沉于管底,弃去上层液,吸取沉渣,镜检。

也可采用上述方法的病料加热溶解离心后,倒去上层液,再加入 60% 硫代硫酸钠溶液,充分混匀后再离心 2~3 min,螨体即漂浮于液面,用金属圈蘸取表面薄膜,抖落于载玻片上,加盖玻片,镜检。

#### 4. 培养皿内加温法

将刮取到的干病料,放于培养皿内,加盖。将培养皿放于盛有 40~45 °C 温水的杯上,经 10~15 min 后,将培养皿翻转,则虫体与少量皮屑黏附于皿底,大量皮屑则落于皿盖上,取皿底检查。可以反复进行如上操作。该方法可收集到与皮屑分离的干净虫体,供观察和制作封片标本之用。

### (五) 牛皮蝇蚴的检查

牛皮蝇蚴出现在牛背部皮下时,皮肤上有结节隆起,隆起的皮肤上有小孔与外界相通,孔内通结缔组织囊,囊内有幼虫,用力挤压,挤出虫体。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 样品的采集及保存;
- (2) 蜱、螨、虱、蚤的检查;
- (3) 牛皮蝇蚴的检查;
- (4) 牛螨病的防治意见。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握蜱、螨、皮蝇蚴的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握蜱、螨、皮蝇蚴的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握蜱、螨、皮蝇蚴的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公共财物。

## 实训六 牛生殖系统原虫检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握牛胎儿毛滴虫病、新孢子虫病的诊断技术,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:采样管(呈中空的塑料长管,采样端钝,另一端可与吸球相连)、吸球、离心管、一次性吸管、剪刀、镊子、记号笔、一次性手套、吸水纸、桶、擦镜纸、载玻片、盖玻片、试管、真空采血针、真空采血管(不含抗凝剂)、研钵、天平、微量移液器、细胞培养瓶、培养箱、光学显微镜、普通离心机、基因扩增仪、水浴锅、漩涡振荡器、冰箱、琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像系统、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、酶标仪、生理盐水、胎儿毛滴虫运输培养基(TFTM)、Diamond培养基、姬姆萨染色液、PBS缓冲液、细胞裂解液、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、乙酸钠、10×PCR缓冲液、氯化镁、dNTPs、Taq聚合酶、琼脂糖、TAE缓冲液、消毒液、青霉素、链霉素、Vero细胞、犬新孢子抗体试剂盒(IDEXX公司产品)、液氮、蛋白酶K、异丙醇、无水乙醇、去离子水等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备。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,制订牛生殖系统原虫的检查方案,并经教师讲解及交流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)取样。

(3)牛胎儿毛滴虫的检查。

(4)牛新孢子虫的检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一) 取样

#### 1. 公牛阴茎包皮清洗液的采集

公牛用六柱栏保定,用绳子固定采样侧的后肢,剪短阴筒外面的阴毛,用清水洗净公牛的尿道口,并用纸擦干。将采样管的采样端插入阴筒内,将另一端的吸球压扁,用10 mL预热至35℃左右的生理盐水反复冲洗,吸取冲洗液。取出采样管,迅速将冲洗液注入无菌15 mL离心管中。将采样管放入消毒液中。冲洗液静置15~20 min,用一次性吸管吸取底部液体1 mL,分别注入两瓶TFTM中,0.5 mL/瓶。在18~37℃下,尽快送至实验室。

#### 2. 母牛生殖道清洗液、阴道黏液的采集

母牛六柱栏保定,用清水洗净牛的外阴部,经采样管的采样端插入阴道内,用10 mL预热至35℃左右的生理盐水冲洗,将另一端的吸球压扁并来回抽动,吸取阴道黏液。取出采样管,迅速将冲洗液注入无菌15 mL离心管中。将采样管放入消毒液中。冲洗液静置15~20 min,用一次性吸管吸取底部液体1 mL,分别注入两瓶TFTM中,0.5 mL/瓶。在18~37℃下,尽快送至实验室。

#### 3. 流产胎儿样品的采集

无菌采取胎儿的胃内容物1 mL,分别注入两瓶TFTM中,0.5 mL/瓶。在18~37℃下,尽快送至实验室。同时无菌采取流出胎儿新鲜的脑组织。

#### 4. 精液的采集

人工采集的新鲜或冷冻精液,取1 mL置于2瓶TFTM中,0.5 mL/瓶,尽快送至实验室。

#### 5. 血清

采集待检牛的颈静脉血,采集后置室温下6 h后,分离血清,编号,登记,于-20℃冷冻保存备用。

### (二) 牛胎儿毛滴虫的检查

#### 1. 虫体的培养与镜检

(1)样品送至实验室后,立即对样品进行离心,以2500 r/min的转速离心10 min,不弃上清液,无菌从管底取1~2滴沉淀物至载玻片,不盖盖玻片,100×镜下观察。

(2)如未发现虫体,另取2~3滴沉淀物接种到含10 mL Diamond培养基的试管中。接种时,应将沉淀物接种在培养液的上层近液面处。在37℃下培养7 d。

(3)分别在第2、4、5、7天从管底部取一滴检查。检查方法同(1)。

(4)发现虫体后,用姬姆萨染色液染色后观察。将待检样品取一滴置于载玻片一端,用另一片载玻片推成薄膜,室温下干燥,用甲醇固定2 min,将载玻片浸入含姬姆萨染色液的染色缸中,染色30 min。取出后,吸干多余染液,在400×物镜下观察。

#### 2. 虫体的鉴定

(1)形态学鉴定



胎儿毛滴虫是一种有鞭毛、呈梨形的真核原生动动物。具有三根前鞭毛、一根后鞭毛和波动膜,体长 $8\sim 18\ \mu\text{m}$ 、宽 $4\sim 9\ \mu\text{m}$ ,呈活泼的蛇形运动。虫体前半部有核,有1个不易观察到的胞质体和副基体。有鞭毛4根,其中3根向前游离与体长相等;1根向后沿波动膜延伸,出虫体后成游离鞭毛。波动膜有 $3\sim 6$ 个弯曲。虫体中央有一条纵走的轴柱,起始于虫体前端,沿体中线向后延伸,其末端突出于体后端。虫前端与波动膜相对的一侧有半月状胞口。

## (2) PCR 鉴定

### ① 虫体 DNA 的制备

取可疑虫体样品 $500\ \mu\text{L}$ ,以 $3000\ \text{r}/\text{min}$ 的转速离心 $5\ \text{min}$ ,弃上清液。将沉淀用 $100\ \mu\text{L}$  PBS 缓冲液重新悬浮。加 $100\ \mu\text{L}$  细胞裂解液,在漩涡振荡器上振荡 $10\ \text{s}$ 混匀,以 $12000\ \text{r}/\text{min}$ 的转速离心 $5\ \text{min}$ ,取上清液,用等体积的 $25:24:1$ 的氯仿:异戊醇抽提样本。取上层水相到另一干净的离心管中。加等量冰冻异丙醇和 $0.1$ 倍体积的 $3\ \text{mmol}/\text{L}$  乙酸钠溶液,置 $-20\ ^\circ\text{C}$   $2\ \text{h}$ 或过夜,沉淀 DNA。以 $12000\ \text{r}/\text{min}$ 的转速 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $10\ \text{min}$ ,倒掉上清液,加 $800\ \mu\text{L}$   $70\%$ 乙醇溶液,颠倒洗涤,以 $10000\ \text{r}/\text{min}$ 的转速在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下离心 $10\ \text{min}$ ,倒掉上清液,在空气中干燥 $10\ \text{min}$ ,加 $10\ \mu\text{L}$  TE 缓冲液,备用。

取标准虫体作阳性对照。

### ② 设计引物序列

5.8S rRNA 基因的引物序列 TFR3:5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3', TFR4:5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3',共扩增 $347\ \text{bp}$ 。

### ③ PCR 扩增

采用 $50\ \mu\text{L}$  反应体系。引物 TFR3、TFR4 终浓度为 $1.0\ \mu\text{mol}/\text{L}$ , $10\times$  PCR 缓冲液 $5\ \mu\text{L}$ ,dNTPs 终浓度为 $200\ \mu\text{mol}/\text{L}$ ,氯化镁终浓度为 $1.5\ \text{mmol}/\text{L}$ ,热启动 Taq 聚合酶 $2\ \text{U}$ ,模板(虫体 DNA) $5\ \mu\text{L}$ ,无菌去离子水补足体积至 $50\ \mu\text{L}$ 。

循环参数: $95\ ^\circ\text{C}$   $5\ \text{min}$ , $94\ ^\circ\text{C}$   $30\ \text{s}$ , $67\ ^\circ\text{C}$   $30\ \text{s}$ , $72\ ^\circ\text{C}$   $90\ \text{s}$ ,40个循环;然后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $5\ \text{min}$ 。

### ④ 结果观察

用 $1.5\%$  琼脂糖凝胶进行电泳检测扩增产物。在凝胶成像系统中观察有无 $347\ \text{bp}$  大小的特异性条带。如有必要应进行测序。

## 3. 结果判定

(1) 在连续 $7\ \text{d}$  培养观察中,任何一次镜检发现病原,判定样品胎儿毛滴虫检测阳性。

(2) 用 PCR 直接检测样品,若阳性对照成立,从样品检测结果为阳性,判定胎儿毛滴虫 PCR 检测阳性,否则判定胎儿毛滴虫 PCR 检测阴性。

(3) 如至第 $7$  天镜检仍未发现病原,PCR 检测为阴性,判定样品胎儿毛滴虫检测阴性。

## (三) 新孢子虫的检查

### 1. 犬新孢子虫体外培养

将无菌采集的牛流产胎儿新鲜的脑组织研磨成匀浆,加入 $2000\ \text{mg}/\text{L}$  青霉素和 $2000\ \text{mg}/\text{L}$  链霉素,用微量移液器吸取 $1\ \text{mL}$  匀浆接种到已长成单层的 Vero 细胞培养瓶

中,在 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下进行培养,同时设对照组。接种后 8 h 换液,每天用倒置显微镜观察 Vero 细胞和新孢子虫的形态。

新孢子虫呈弯月形或呈卵圆形。

## 2. 牛犬新孢子虫抗体 ELISA 检测

按犬新孢子虫抗体试剂盒(IDEXX 公司产品)操作说明进行,具体方法如下:取出犬新孢子虫抗体试剂盒,在室温孵育 30 min,每孔加 100 μL 用血清稀释液 1:100 稀释被检血清样品,在 37 °C 下孵育 1 h;吸干孔中的液体,每孔用 300 μL PBS 缓冲液洗涤 4 次;在每孔中滴加 100 μL 1:4000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,在 37 °C 孵育 1 h;吸干孔内液体,每孔用 300 μL PBS 缓冲液洗涤 4 次,每孔滴加 100 μL TMB,在室温孵育 15 min,最后每孔加入 100 μL 终止液终止反应。在酶标仪上检测并记录。

判定标准:阳性对照平均值减去阴性对照平均值的差必须大于或等于 0.150;阴性对照平均值必须小于或等于 0.200,试验结果才有效。

检测样品的阳性比值大于或等于 0.50,认为是犬新孢子虫抗体阳性,反之为阴性。

## 3. PCR 鉴定

### (1)DNA 的提取

①取 5 g 新鲜流产胎儿脑组织,剔除结缔组织,吸水纸吸干表面液体,剪碎放入研钵(越细越好)。

②倒入足量液氮,磨成粉末,转入离心管中,加入 10 mL 细胞裂解液(0.1 mol/L pH=8.0 Tris-HCl,10%SDS,0.1 mol/L NaCl,10 mmol/L EDTA),颠倒、振荡混匀,在 37 °C 恒温箱中作用 20 min,加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 50 μL,至终浓度 100 μg/mL,颠倒混匀后,在 55 °C 水浴过夜,直至组织完全解体。

③在充分消化后的离心管中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1)混合液进行抽提。静置 10 min,待分层后,以 3000 r/min 的转速离心 5 min(若振荡后上层呈乳白色浑浊可以 12000 r/min 的转速离心 15 min,分出蛋白质),取上清液至另一个离心管中。

④重复步骤③1 次。离心后取上层水相,加入 0.1 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 倍体积的预冷无水乙醇,温和颠倒混合,过夜。

⑤在 4 °C 下以 15000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,加入 70%乙醇,再在 4 °C 下以 15000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,在室温空气中干燥或真空干燥,加入 30 μL TE(10 mmol/L pH=8.0 Tris-HCl,1 mmol/L EDTA)缓冲液溶解 DNA,于 -20 °C 下保存。

### (2)PCR 检测

根据 GenBank 上登录的犬新孢子虫 NcSRS2 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物,扩增的片段约为 681bp。上游引物 P1 为 5'-ACTGGTGGCGTTCTTTGAC-3',下游引物 P2 为 5'-CCATCCTTAGTGTCGGGTT-3',以提取的胎儿脑组织 DNA 为模板,反应体系为 25 μL。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物,观察在 681bp 处有无特异条带。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)样品的采集;
- (2)牛胎儿毛滴虫的检查;
- (3)牛新孢子虫的检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握样品的采集,牛胎儿毛滴虫的检查,牛新孢子虫的检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握样品的采集,牛胎儿毛滴虫的检查,牛新孢子虫的检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握样品的采集,牛胎儿毛滴虫的检查,牛新孢子虫的检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 第二部分 羊寄生虫病实训

### 实训一 羊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,学生应能熟练掌握粪便检查的方法,并能在显微镜下辨别羊粪便中的各类蠕虫卵、原虫卵囊和包囊等,且能与粪便中的非寄生性物质相区别;熟练掌握虫卵计数的方法及球虫的孢子化、PCR 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,并增强学生的动手意识,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、一次性手套、烧杯或塑料杯、眼科镊(或竹签或火柴棍)、试管、试管架、直径 5~10 mm 的铁丝圈、离心管、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、培氏皿、滤纸、培养皿、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、离心管(10 mL 和 50 mL)、100 mL 球状烧瓶、100 mL 量筒、40 孔反应板、200  $\mu$ L 微量移液器及配套吸头、Stool DNA Kit 全粪便 DNA 提取试剂盒、Eppendorf 管、麦克马斯特氏虫卵计数板、计数器、托盘天平、显微测微尺、特制球状烧瓶(或大的试管、小三角烧杯)、300 mL 容量瓶、液氮罐、普通离心机、光学显微镜、恒温培养箱、酶标光度计、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)、磷酸盐缓冲液(PBS)、碳酸盐缓冲液(CB)、牛血清白蛋白(BSA)、生理盐水、液氮、氯化钠、Tris、盐酸、十二烷基硫酸钠(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、 $MgCl_2$ 、dNTPs、上下游引物、Taq DNA 聚合酶、灭菌双蒸水、硫酸锌、碘、碘化钾、伊红等。

#### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订羊消化系统寄生虫的检查方案,并经教师讲解及组内交流与讨论进

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

根据养羊场(养殖户)羊的数量、年龄、性别等不同进行粪便的采集。每份粪样采集 100 g 左右,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采样的时间,待检羊的耳标号、年龄、性别、饲养方式、采食情况、膘情及驱虫情况等。低温运回实验室后,置于 4℃ 冰箱中待检。

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,并注意防止粪样之间的相互污染。(2)根据羊的数量确定采样数量,要有代表性,且所采粪样的体积也要足量。(3)做好样品标识。(4)在粪样运输过程中,要用冰袋保持所采样品的温度,不能过高,以防止虫卵孵化成幼虫。

### (二) 羊消化系统蠕虫的检查

#### 1. 沉淀法

##### (1) 自然沉淀法

取 5~10 g 待检新鲜粪便置于烧杯或塑料杯内,加少量清水并将粪便全部捣碎,搅拌均匀,再加入 10~20 倍量的清水,充分搅拌成混悬液,经 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤于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,留下沉淀物,再加满清水,静置 10~15 min,如此进行 2~3 次,直至上层液变清亮为止,最后倾去上清液,吸取沉渣涂于载玻片上,镜检。

##### (2) 离心沉淀法

取 5 g 左右被检粪便,置于烧杯或塑料杯内,约加 5 倍量的清水,将粪便全部捣碎并充分搅拌成混悬液,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 1500 r/min 的转速离心 3 min,最后倾去管内上层液体,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。

#### 2. 漂浮法

##### (1) 试管漂浮法

取新鲜待检粪便 2~5 g,置于烧杯或塑料杯内,加入 10~20 倍体积的饱和盐水,将粪球充分捣碎并搅拌均匀,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

取新鲜待检粪便约 5 g, 置于烧杯内, 加入少量饱和食盐水, 将粪球充分捣碎; 待粪与盐水充分混匀后, 再加入粪便的 10~12 倍体积的饱和盐水, 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, 则虫卵上浮; 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。

### 3. 淘虫法和虫体观察法

大型虫体和较大节片, 检查粪便的表面。较小的虫体或节片, 可将粪便置于瓷盆中, 加入 5~10 倍体积的自来水或生理盐水, 彻底捣碎后静置 10 min, 然后倾去上层透明液体, 重新加入清水搅拌静置, 如此反复数次, 直到上层液体变透明为止。最后倾去上层透明液体, 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。

### 4. 粪便内圆线虫卵体外培养

取新鲜待检粪便捣碎或经水洗沉淀后所收集的粪渣放入培养皿内, 培养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, 使其顶部略高于培养皿的边缘, 后加盖与粪便相接触。置于 25~30 °C 恒温培养箱中, 每日观察粪便是否干燥, 要适时加水以保持皿内湿度。经 7~15 d, 用胶头滴管吸取皿盖上的水珠或皿内液体, 滴在载玻片上覆以盖玻片, 在显微镜下进行观察, 或用贝尔曼氏装置收集幼虫。

### 5. 局部剖检检查虫体

方法与实训“牛消化系统寄生虫的检查”中的方法完全相同。

寄生于羊消化系统的蠕虫主要有同盘吸虫、胰阔盘吸虫、双腔吸虫、片形吸虫、斯克里亚宾吸虫、棘球蚴、细颈囊尾蚴、莫尼茨绦虫、曲子宫绦虫、无卵黄腺绦虫、毛首线虫、绵羊斯克里亚宾线虫、食道口线虫、夏伯特线虫、细颈线虫、马歇尔线虫、古柏线虫、类圆线虫、毛圆线虫、仰口线虫、血矛线虫、奥斯特线虫、筒线虫等。

## (三) 羊消化系统原虫的检查

### 1. 球虫卵囊的检查

对待检新鲜粪便进行饱和盐水漂浮法检查。若要对不同种的球虫进行区别, 需孢子化后再行观察。可取 5~10 g 新鲜阳性粪便, 加入适量饱和食盐水, 充分捣碎并搅拌均匀, 用 40 目(或 60 目)铜筛或双层纱布过滤, 将滤液倒入离心管中, 置于离心机内, 以 2000 r/min 的转速离心 6 min, 取上层液体, 加入 10 倍体积以上的清水, 混合均匀, 以 3000 r/min 的转速离心 6 min, 弃上清液, 加 2.5% 的重铬酸钾溶液, 在 28 °C 左右的恒温培养箱中培养, 待其孢子化。

依据资料进行羊球虫种类鉴定。取孢子化后的卵囊液制片后, 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。每份粪样测量 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 20 g, 加入适量自来水, 将粪便捣碎, 搅拌均匀, 过滤, 将滤液倒入离心管中, 以 3000 r/min 的转速离心 10 min, 弃上清液, 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检查。

卵囊透明无色,囊壁光滑,内有一小暗点和呈淡黄色的子孢子。

#### (2) 改良抗酸染色法

取 5 g 被检新鲜粪样于烧杯中,加入 10 倍体积的清水,将粪球捣碎,搅拌均匀,经双层纱布过滤,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 1 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,自然干燥后滴加石碳酸复红溶液于粪膜上,染色 5 min,清水冲洗,滴加 10% 硫酸溶液,脱色 5~10 min,清水冲洗,滴加 0.2% 孔雀绿水溶液,复染 1 min,清水冲洗,自然干燥后油镜检查。

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。子孢子呈月牙形,但排列多不规则。

#### (3) ELISA 检查

方法与实训“牛消化系统寄生虫的检查”中的方法完全相同。

#### (4) PCR 检查

方法与实训“牛消化系统寄生虫的检查”中的方法完全相同。

### 3. 山羊贾第虫的检查

#### (1) 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,吸弃上清液,在沉渣中加入饱和硫酸锌溶液,调匀后再加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,在显微镜下检查。

#### (2) 醛醚沉淀法

取 3~5 g 被检粪便,自来水 30 mL,将粪球捣碎,搅拌均匀,用 40 目(或 60 目)铜丝筛或双层纱布过滤,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 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裹呈黄绿色,大小为  $(7.5\sim 9)\mu\text{m}\times(10\sim 14)\mu\text{m}$ 。囊壁与虫体之间有明显的空隙,未成熟的包裹有 2 个核,成熟的包裹有 4 个核,多偏于一端。

### (四) 虫卵/卵囊计数

方法与实训“牛消化系统寄生虫的检查”中的方法完全相同。羊粪便中的几种虫卵图形见图 2-1-1~图 2-1-10。图 2-1-11 为 9 种山羊球虫孢子化卵囊形态结构模式图。图 2-1-12 为 11 种绵羊球虫孢子化卵囊形态结构模式图。



图 2-1-1 羊粪便中的马歇尔线虫卵(400×)



图 2-1-2 羊粪便中的马歇尔线虫卵(400×)



图 2-1-3 羊粪便中的食道口线虫卵(400×)



图 2-1-4 羊粪便中的捻转血矛线虫卵(400×)

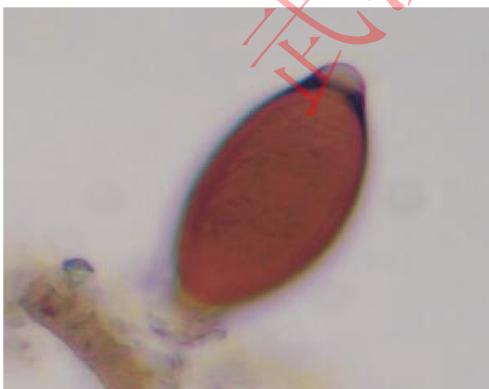


图 2-1-5 羊粪便中的鞭虫卵(400×)

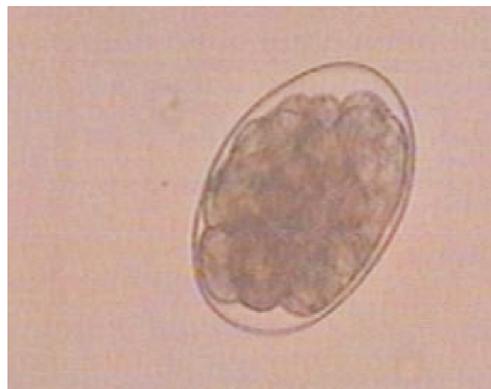


图 2-1-6 羊粪便中的奥斯特线虫卵(400×)

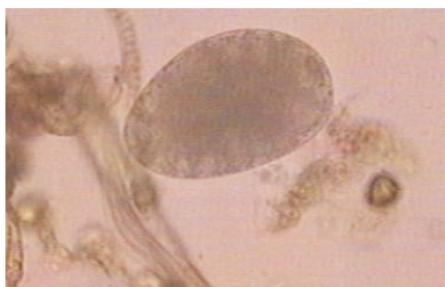


图 2-1-7 羊粪便中的前后盘吸虫卵(400×)



图 2-1-8 羊粪便中的扩展莫尼茨绦虫卵(400×)



图 2-1-9 羊粪便中的未孢子化球虫卵囊(400×)



图 2-1-10 羊粪便中的孢子化球虫卵囊(400×)

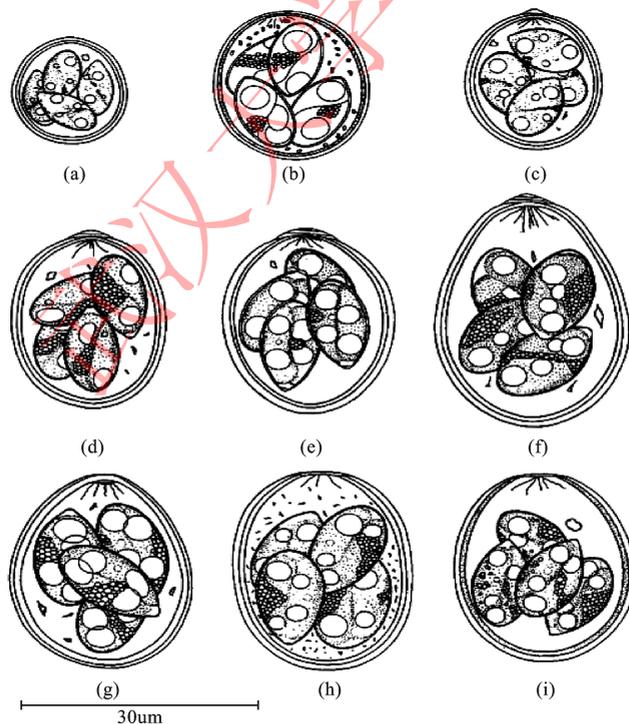


图 2-1-11 9 种山羊球虫孢子化卵囊形态结构模式图(摘自 Eckert et al,1995)

(a) *E. alijevi*; (b) *E. ninakohlyakimovae*; (c) *E. hirci*; (d) *E. arloingi*; (e) *E. jolchijevi*;  
(f) *E. christenseni*; (g) *E. apsheronica*; (h) *E. caprina*; (i) *E. caprovina*

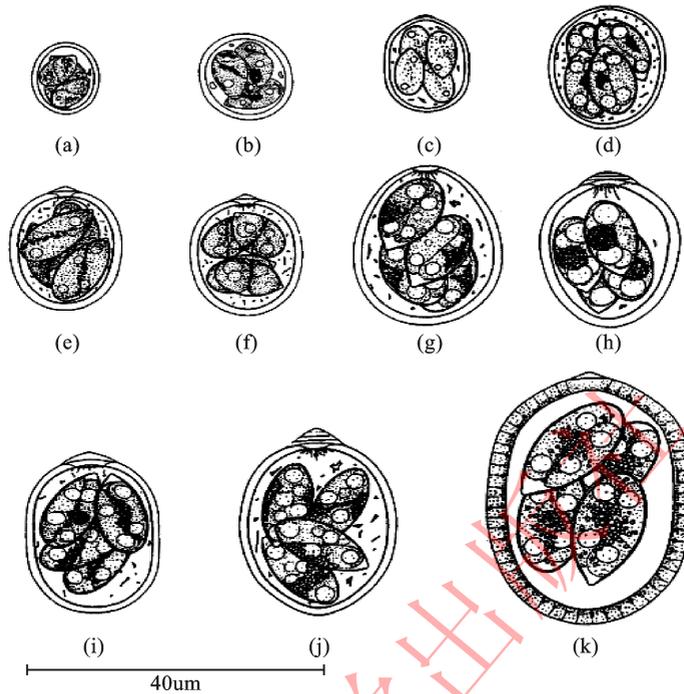


图 2-1-12 11 种绵羊球虫孢子化卵囊形态结构模式图(摘自 Eckert 等,1995)

(a) *E. pallida*; (b) *E. parva*; (c) *E. marsica*; (d) *E. ovinoidalis*; (e) *E. weybridgensis*;  
(f) *E. crandallii*; (g) *E. faurei*; (h) *E. granulosa*; (i) *E. bakuensis*; (j) *E. ahsata*; (k) *E. intricata*

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 粪样采集及注意事项;
- (2) 羊消化系统蠕虫的检查;
- (3) 羊消化系统原虫的检查;
- (4) 虫卵/卵囊计数。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握粪便学检查技术、ELISA 技术、PCR 技术、幼虫培养技

术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握粪便学检查技术、ELISA技术、PCR技术、幼虫培养技术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握粪便学检查技术、ELISA技术、PCR技术、幼虫培养技术、完全剖检技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训二 羊呼吸系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握羊肺线虫幼虫和羊鼻蝇蛆检查的方法,并能在显微镜下辨别丝状网尾线虫和原圆线虫第一期幼虫的形态,使所学理论知识与实践相结合,巩固和加深对新知识的理解,增强动手能力,同时培养学生自我学习、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、记号笔、烧杯、试管、试管架、离心管、玻棒、纱布、漏斗、漏斗架、乳胶管、止水钳、胶头滴管、剪刀、瓷盆、离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、平皿、电磁炉、锅、温度计、酒精灯、普通离心机、光学显微镜、生理盐水、碘液等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订羊呼吸系统寄生虫的检查方案,并经教师讲解及组内交流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)贝尔曼氏法。

(3)平皿法。

(4)局部剖检法。

## 四、实训步骤与方法

### (一) 取样

#### 1. 粪样

根据养羊场羊的规模、年龄、性别等不同进行粪便的收集,采集刚刚排出的新鲜粪便或从直肠直接掏取的粪便,每份粪样采集 50 g,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采样的时间,以及待检羊的耳标号、年龄、性别、饲养方式、采食情况、膘情和驱虫情况等。将粪样低温运回实验室后,置于 4 ℃ 冰箱中待检。

#### 2. 肺脏

收集待检羊的肺脏,用于肺线虫的检查。

#### 3. 羊头

采集待检羊的头用于羊鼻蝇蛆的检查。

### (二) 肺线虫的检查

#### 1. 贝尔曼氏法

取被检粪便约 20 g,置于漏斗内的纱布中,漏斗下连接一长为 10~20 cm 的乳胶管,并用止水钳夹住乳胶管的游离端。然后向漏斗内慢慢加入 40 ℃ 左右的温水,以刚淹过粪球为宜,静置 1 h 后,松开止水钳,将乳胶管下面的液体放入试管内,静置 30 min,或离心沉淀 2 min,倒掉上清液,将沉淀全部倒入小表面皿内或用胶头滴管吸取后滴在载玻片上,置于显微镜下检查。

#### 2. 平皿法

取待检粪样的 3~10 个粪球,置于放有少量温水(40 ℃ 左右)的平皿内,经 10~15 min 后,取出粪球,吸取平皿内的液体,在显微镜下检查幼虫。

随粪便排出的丝状网尾线虫幼虫是第一期幼虫,其头端有一扣状突出物。

#### 3. 肺脏局部剖检法

按一般解剖法切开羊胸壁,连同食管、气管将胸腔内的全部脏器摘出。从喉头沿气管、支气管剪开,注意不要把管道内的虫体剪坏,发现虫体即应直接采取。将肺组织在水中尽量撕碎,用手挤压组织,充分水洗后,取出肺组织碎块并用反复沉淀法检查沉淀物。若肺脏上有结节,则把结节取出放在盛有温生理盐水的平皿内,然后分离结节的结缔组织,仔细取出虫体。

丝状网尾线虫(*Dictyocaulus filaria*, 见图 2-2-1)寄生于羊气管和支气管内,虫体较长,呈乳白色细线状,是线虫中比较细长的一种。头端有一浅小的口囊,口囊有 4 个小唇片。雄虫体长 30 mm 左右。交合伞短小,两腹肋靠近,前侧肋单独一支,中侧肋和后侧肋的基部和中部完全合二为一,外背肋单独分出,两个背肋末端又分 3 个小支。交合刺粗短,黄褐色,呈靴状,为多孔性结构。导刺带为多泡性结构。雌虫体长 35~44.5 mm,阴门开口于虫体中部。

柯氏原圆线虫(*Protostrongylus kochi*)是小型肺线虫,如图 2-2-2 所示,寄生于羊的支气管、细支气管,有的寄生于肺泡。虫体细长,呈褐色。雄虫体长 24.3~30 mm,交合

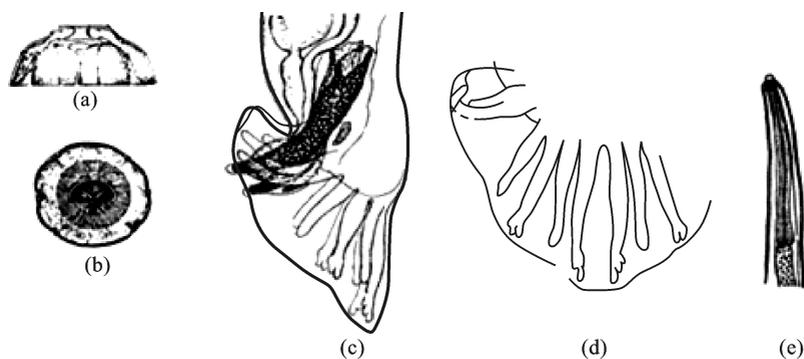


图 2-2-1 丝状网尾线虫

(a)头部侧面观;(b)头部顶面观;(c)雄虫交合伞侧面;(d)雄虫交合伞(展开);(e)第一期幼虫前部

伞不发达,交合伞的外背侧各有一个角化的弧形物。背肋由一个粗厚的球状物构成。上面生有小的突起(6 个小乳突),交合刺呈暗褐色,具有多孔性栉状构造。导刺带的构造比较复杂,由头、体、脚 3 个部分组成。有副导刺带。雌虫体长 28~40 mm,阴门开口于肛门附近,阴门前有一突起。

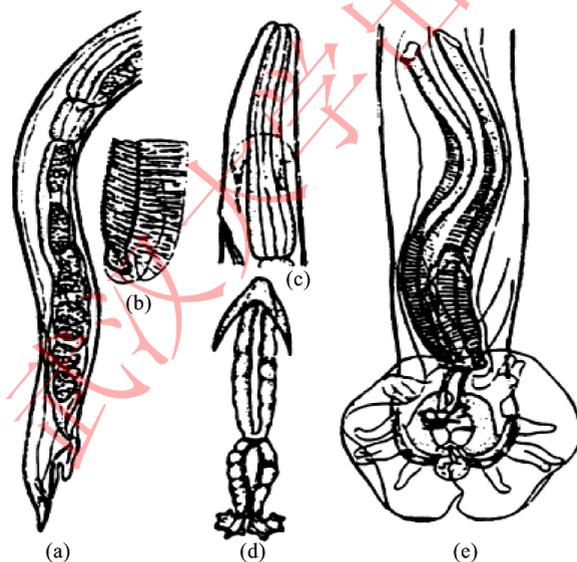


图 2-2-2 柯氏原圆线虫

(a)雌虫尾部;(b)交合刺末端;(c)体前部;(d)导刺带;(e)雄虫尾部

### (三)羊鼻蝇蛆的检查

通过临床症状观察确定疑似病例(鼻腔流出黏稠鼻液的羊作为羊鼻蝇蛆感染疑似病例),对疑似病例进行检查。从鼻、额部和颅顶正中锯开额窦、角窦和颅骨,检查鼻腔和与其相通的鼻窦内有无鼻蝇蛆不同期幼虫寄生。检查出羊鼻蝇蛆的羊计为确诊病例。

第一期幼虫为浅黄白色,体长约 1 mm,前方有两个黑色强大的口钩向后弯曲,口钩高度角质化。尾部末端突起上有 10 个或 11 个小刺。背部第 3 节片上有 3 排刺,其余节

片上有 2 排完整的刺和位于中间部分的 8~12 根刺。腹面的每个节片上有 3 排刺,最后 2 节有不完整的第 4 排刺。第二期幼龄虫体长 9~20 mm,体表的刺不明显。第三期幼虫体形似圆柱形,前端尖,强壮而弯曲,体长 25~30 mm。有两个强大的黑色口前钩,较发达,内部连接于咽部骨架上。虫体背面无刺,成熟后各节上具有颜色深浅不一的带斑(随成熟程度不同颜色深浅不同)。腹面各节前端具有小刺约 11 列。虫体后端平齐,凹处有两个“D”形气门板,中央有钮孔,两后气门板明显呈黑色且几乎相接,封闭着气门钮。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)样品采集及注意事项;
- (2)羊肺线虫的检查;
- (3)羊鼻蝇蛆的检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握羊肺线虫幼虫检查技术、羊鼻蝇蛆检查技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握羊肺线虫幼虫检查技术、羊鼻蝇蛆检查技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握羊肺线虫幼虫检查技术、羊鼻蝇蛆检查技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 羊血液原虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握血液涂片技术和染色方法,并能在显微镜下正确判断各种常见羊血液原虫的形态特点,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:真空采血管(含抗凝剂)、真空采血管(不含抗凝剂)、真空采血针、消过毒的针头、灭菌离心管、标记笔、10 mL 注射器、擦镜纸、载玻片、盖玻片、离心管、染色缸、酒精棉球、脱脂棉、胶头滴管、1.5 mL 离心管、光学显微镜、普通离心机、酶标仪、微量移液器、抗凝剂、甲醇、姬姆萨染色液、瑞氏染色液、生理盐水、甘油、香柏油、羊血清泰勒虫抗体 ELISA 试剂盒(中国农科院兰州兽医所)、细胞裂解液(Tiagen 公司)、血液/组织/基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)、 $2\times$  Taq MasterMix、引物、琼脂糖、TAE 缓冲液、蒸馏水(或去离子水)等。

## 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,设计羊血液原虫的检查方案,并经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)虫体检查。

(3)ELISA 检查。

(4)PCR 检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一)取样

#### 1. 全血

用真空抗凝管采集待检羊的颈静脉血,或用消过毒的针头刺破耳尖血管采集全血至干净的灭菌离心管(已加入适量抗凝剂)中,编号,并记录其详细信息,带回实验室后,置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中待检。

#### 2. 血清

每只待检羊采集  $3\sim 5\text{ mL}$  血液,待血液凝固析出血清后,以  $2500\text{ r/min}$  的转速离心  $5\text{ min}$ ,分离血清,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

#### 3. 淋巴结穿刺抽取淋巴组织

患有泰勒虫病的病羊,常呈现局部体表淋巴结肿大,可采取淋巴结穿刺物进行显微镜检查以寻找病原体。

先将病羊保定,用右手将肿大的淋巴结稍向上方推移,并用左手固定淋巴结,局部剪毛、消毒,以  $10\text{ mL}$  注射器和较粗的针头,刺入淋巴结,抽取淋巴组织。

### (二)虫体检查

#### 1. 涂片染色检查

取一滴待检血液(直径  $1\sim 2\text{ mm}$ )滴在载玻片的一端,使推玻片和此滴血液接触,当

血液扩散成一均匀的粗线时,使推玻片与载玻片成  $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ ,自右向左均匀地向前推,直至载玻片的尾部。尾部应结束在载玻片左侧  $1/6$  处。自然晾干。

#### (1) 瑞氏染色法

取瑞氏染色液 5~8 滴直接加到未固定的血膜上,静置 2 min,其后加等量蒸馏水于染色液上,摇匀,3~5 min 后,用流水冲洗,晾干,镜检。

#### (2) 姬姆萨染色法

滴甲醇 2~3 滴于血膜上,固定 2~3 min。将血片浸入用 10 份蒸馏水加 1 份染色液稀释的染色液缸中 30 min 或者过夜。或将蒸馏水与染液按 2:1 稀释好的染色液直接滴加于血片上,染色 10 min。血片取出后,用流水冲洗,晾干,镜检。

### 2. 淋巴结穿刺检查

拔去穿刺淋巴结后的一次性注射器的针头,将注射器管内的内容物推挤到载玻片上,进行抹片、固定、染色(与血片染色法相同),镜检,找柯赫氏体(或称石榴体、裂殖体)。

裂殖体有不同的形状和大小,呈圆形、椭圆形或肾形,存在于淋巴细胞、巨噬细胞胞浆内或散存于细胞外。用姬姆萨染色液染色,虫体胞浆呈淡蓝色,其中包含有许多红紫色颗粒状的核。

### 3. 虫体浓集法

在离心管中加入 2% 的柠檬酸钠生理盐水 3~4 mL,再加入被检羊血液 6~7 mL,混匀后,以 500 r/min 的转速离心 5 min,使其中大部分红细胞沉降;而后将含有少量红细胞、白细胞和虫体的上层血浆,用吸管移入另一离心管中,并在血浆中补加一些生理盐水,将此管以 2500 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液。取沉淀物制成抹片,按上述染色法染色检查。

## (三) ELISA 检查

### 1. 样品制备

用样品稀释液将待检血清按 1:100 稀释。阴性、阳性对照不用稀释。

浓缩洗涤液使用前应恢复至室温使沉淀溶解,然后用蒸馏水或去离子水做 20 倍稀释。

### 2. 检查

使用前将试剂盒置于室温下 30 min,恢复至室温。取所需用量酶标板条,设空白对照 1 孔、阴性/阳性对照各 2 孔,未用的板条尽快密封,于  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  下保存。空白对照孔加样品稀释液 100  $\mu\text{L}$ ;阴、阳性对照孔分别加入阴、阳性对照 100  $\mu\text{L}$ ;样品孔每孔加入稀释后的样品 100  $\mu\text{L}$ 。混合均匀,置于  $37^{\circ}\text{C}$  下反应 30 min 后洗涤(扣去孔内液体,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复洗涤 5 次,拍干)。每孔加酶标记物 100  $\mu\text{L}$ (空白孔除外)。置于  $37^{\circ}\text{C}$  下反应 30 min 后再次洗涤。每孔依次加底物液 A、底物液 B 各 50  $\mu\text{L}$ ,混合均匀,用空白孔调零,于 450 nm 处测定各孔吸光值(OD 值)。

### 3. 结果判定

试验有效性:阳性对照孔平均值大于或等于 1.00,阴性对照孔平均值小于或等于 0.10。临界值计算:临界值=阴性对照孔平均值+0.15;阴性判定:样品 OD 值小于临界值者为羊泰勒虫血清抗体;阳性判定:样品 OD 值大于等于临界值者为羊泰勒虫血清抗体阳性。

#### (四)PCR 检查

##### 1. 全血 DNA 提取

取 200  $\mu\text{L}$  EDTA 抗凝血于 1.5 mL 离心管中,加入 300  $\mu\text{L}$  细胞裂解液(Tiagen 公司)裂解 1 min,以 12000 r/min 的转速离心 4 min,弃上清液,若沉淀物呈深红色,则重复以上步骤直至沉淀物为白色为止。使用血液/组织/基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)提取全血基因组 DNA,向沉淀物中加入 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 及 200  $\mu\text{L}$  LGA,充分振荡混匀;加入 200  $\mu\text{L}$  LGB,于 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min 或直至液体呈透明;再加 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇,充分振荡混匀,一并加入 CB3 吸附柱中,以 13000 r/min 的转速离心 30 s,弃收集管中液体;向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  GD,以 13000 r/min 的转速离心 30 s,弃收集管中液体;向吸附柱中加入 600  $\mu\text{L}$  PW 缓冲液,以 13000 r/min 的转速离心 30 s,弃收集管中液体;重复这一步骤,弃收集管,将吸附柱置于室温静置 3 min,以去除吸附柱中的无水乙醇,将吸附柱置于干净 EP 管中,向吸附柱中心滴加 60  $\mu\text{L}$  TE 洗脱液,静置 1 min,以 13000 r/min 的转速离心 30 s,将溶液收集至离心管中,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

##### 2. PCR 扩增

梨形虫的通用引物:上游引物 RLB-F 为 5'-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA -3',下游引物 RLB-R 为 5'-TCTTCGATCCCCTAACTTTC-3'。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,50  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  90 s,40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。目的片段约为 1033bp;绵羊泰勒虫特异性引物:上游引物 BboF 为 5'-TGGGCAGGACCTTGGTTCTTCT-3',下游引物 BboR 为 5'-CCGCGTAGCGCCGGCTAAATA -3'。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,62  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。目的片段约为 520bp;尤氏泰勒虫特异性引物:上游引物 Tuil310 为 5'-GGTAGGGTATTGGCTACCGG -3',下游引物 Tuil680 为 5'-ACACTCGGAAAATGCAAGCA-3'。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。目的片段约为 380bp;吕氏泰勒虫特异性引物:上游引物 Tluw 310 为 5'-GGTAGGGTATTGGCTACTGA -3',下游引物 Tluw 680 为 5'-TCATCCGATAATACAAGT -3'。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,57  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。目的片段约为 380bp;莫氏巴贝斯虫巢式 PCR 引物:TBall-134-S 为 5'-CATGGATAACCGTGCTAATT -3', TBall-892-AS 为 5'-ATCGCTTTCGATCCCCTAACT -3', Bm-202-S 为 5'-TAAACCAATTTGTTGGT -3', Bm-495-AS 为 5'-TCTGCCAGGGTTTAAGTCGG-3'。反应条件如下。第一次反应:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  40 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;第二次反应:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,52  $^{\circ}\text{C}$  40 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

采用 30  $\mu\text{L}$  反应体系,包括 2 $\times$  Taq MasterMix 15  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 3  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 10.8  $\mu\text{L}$ 。

反应结束后,取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶成像系统下检查有无目的条带。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)样品采集及注意事项;
- (2)虫体检查;
- (3)ELISA 检查;
- (4)PCR 检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握血液涂片技术及染色技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握血液涂片技术及染色技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握血液涂片技术及染色技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训四 羊神经与肌肉寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握羊住肉孢子虫病、羊囊尾蚴病、羊脑包虫病的检查技术,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自主学习、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:手术刀、手术剪、采样袋、标记笔、真空采血管(不含抗凝剂)、真空采血针、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、托盘天平、直尺、离心管、计数器、光

学显微镜、普通离心机、甘油、甲醛、姬姆萨染色液等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订羊神经与肌肉寄生虫的检查方案,并经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)剖检检查。

(3)变态反应检查。

(4)羊住肉孢子虫病血清学检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 肉样

采集每头待检羊的心肌、食道肌、咽喉肌、咬肌、舌肌、膈肌等部位肉样各 10 g 左右,将采集到的肉样做好编号带回实验室,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

##### 2. 血清

采集每头待检羊的全血用于分离血清,编号,于  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 灭能,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

##### 3. 羊头

取出现神经症状的羊头。

#### (二)剖检检查

寄生于心肌、食道肌、深腰肌和膈肌等处肌纤维间的住肉孢子虫,形成与肌纤维平行的包囊(称为米氏囊),多呈椭圆形、纺锤形或线状,孢囊壁较厚,上有栅栏状突起,颜色呈灰白或乳白色,其大小差别很大,大的可长达  $1\sim 5\text{ cm}$ ,小的只有几毫米,需在显微镜下才能观察到。

将采集的每个待检肉样附着的结缔组织和脂肪组织剥去,分别称取  $0.1\text{ g}$ ,沿肌纤维纵长方向剪成小条,置于一块载玻片上,分摊均匀,滴加适量 50% 的甘油水溶液至透明,盖上一块载玻片压片,将两块载玻片用力挤压至肉样变为半透明为止。每个部位制作 3 块压片。发现虫体时,用小镊子和小剪刀将虫体摘出,至载玻片上,剪破虫体囊壁,可见乳白色液体流出,取此液 1 滴制成薄膜涂片,待干后,用甲醛固定,用姬姆萨染色液染色后镜检,如观察到有许多肾形或香蕉形,长  $10\sim 12\text{ }\mu\text{m}$ ,宽  $4\sim 9\text{ }\mu\text{m}$ ,一端稍尖,另一端钝圆,核偏,位于钝圆一端的小体,即为住肉孢子虫的滋养体。

在任何一个部位发现住肉孢子虫包囊,即被视为阳性。

羊囊尾蚴寄生于羊的心肌、膈肌、咬肌、舌肌等部位,在肌肉中是呈乳白色、黄豆大小的圆形或椭圆形包囊,包囊内有半透明的液体,囊壁上有一个白色结节,压片镜检可见头

节上有4个吸盘,无顶突和角质小钩。

脑多头蚴:寄生于羊脑部、脊髓、皮下、肌肉等处,呈圆形或卵圆形,为乳白色、半透明的囊泡,囊体有豌豆到鸡蛋大,囊内充满液体。囊壁由两层膜组成,内膜上有100~250个原头蚴。

### (三)变态反应检查

用变态反应原(用脑多头蚴的囊液及原头蚴制成乳剂)注入羊的上眼睑内做诊断,感染脑多头蚴的羊于注射1h后,皮肤呈现肥厚肿大(1.75~4.2cm),并保持6h左右,即可确诊待检羊感染脑多头蚴。

### (四)羊住肉孢子虫病血清学检查

方法与实训“牛肌肉寄生虫的检查”中的牛住肉孢子虫病血清学检查方法相同。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占30%,结果考核占70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告1份,其内容如下:

- (1)样品的采集及保存;
- (2)剖检检查;
- (3)变态反应检查;
- (4)羊住肉孢子虫病血清学检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握剖检技术、肌肉压片技术、变态反应检查、羊住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握剖检技术、肌肉压片技术、变态反应检查、羊住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握剖检技术、肌肉压片技术、变态反应检查、羊住肉孢子虫病血清学检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训五 羊皮肤寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握羊螨病的诊断技术,蜱、螨、虱、蚤的采集、固定和保存方法。掌握用于螨病诊断的皮肤病料的采集方法,明确采取病料的注意事项;掌握检查螨的主要方法,以及疥螨、痒螨、蠕形螨的形态特征,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:镊子、培养皿(或带塞的试管)、标本瓶、标记笔、剪毛剪、手术刀片(或锐匙)、剪刀、棉签、注射针头、分离针、擦镜纸、载玻片、盖玻片、酒精灯、真空采血针、真空采血管(不含抗凝剂)、离心管、金属圈、小药瓶、光学显微镜、恒温培养箱、组织捣碎器、超声波粉碎机、冰箱、紫外分光光度计、冷冻离心机、微量移液器、硝酸纤维素膜、煤油(或乙醚或氯仿)、碘酒、甘油、无水乙醇、福尔马林、冰醋酸、凡士林、加拿大树胶、氢氧化钠、硫代硫酸钠、PBS缓冲液、石碳酸、明胶、吐温-20、兔抗羊IgG、羊蠕形螨阳性血清、羊蠕形螨阴性血清、SPA、二甲基偶氮苯(DAB)、30%过氧化氢等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订羊皮肤寄生虫的检查方案,并经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)蜱、螨、虱、蚤的采集。
- (3)蜱、螨、虱、蚤的固定与保存。
- (4)蜱、虱、蚤的种类鉴定。
- (5)螨的检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 羊体蜱的采集

蜱的个体较大,通过肉眼观察即可发现(图2-5-1)。在检查发现后用手或镊子拔取。拔取时,应使虫体与皮肤垂直,慢慢地拔出假头,或以煤油、乙醚、氯仿抹在蜱身上和被叮咬处,而后拔取。



图 2-5-1 从羊耳朵摘出的虬

#### 2. 羊体疥螨和痒螨的采集

找出病羊患部,然后在新生的患部与健康部交界处,剪去长毛,用锐匙或外科手术刀片在体表刮取病料,所用器械在酒精灯上消毒后,与皮肤表面垂直,反复刮取表皮,直到稍微出血为止。将刮到的病料收集到培养皿或其他容器内,取样处用碘酒消毒。

#### 3. 羊蠕形螨的采集

蠕形螨寄生在毛囊内,检查时先在羊面部、眼眶四周、鼻部、颌下、颈部、肩胛、背部、腹部、臀部及四肢上部等部位皮肤上按摩,看有无砂粒样或黄豆大的结节。如有,大的结节可用注射针头或手术刀尖穿刺结节,或用小刀切开挤压,看到有脓性分泌物或淡黄色干酪样团块时,则可将其挑在载玻片上待检。

#### 4. 虱、蚤的采集

方法与实训“牛皮肤寄生虫的检查”中的方法相同。

#### 5. 血清

无菌颈静脉采可疑病羊血并分离血清、编号,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

### (二) 虬、螨、虱、蚤的固定与保存

#### 1. 湿固定

虬应小心地由动物体表摘下或在拖网上取下,防止虬的假头断落,先投入开水数分钟,让其肢体伸直,便于日后观察。然后保存在70%的酒精内,为防止酒精蒸发使虬的肢体变脆,可加入数滴甘油。或把虬、螨类先投入经加温的70%的酒精( $60\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ )中固定,1 d后保存于5%的甘油酒精(70%)中;也可用5%~10%的福尔马林或布勒氏液固定保存。

#### 2. 湿封法

用新鲜采集的病料散放在一块玻璃上,铺成薄层,病料四周应涂少量凡士林,防止虫体爬散,为了使螨类活动加强,可将玻璃稍微加温,然后用低倍镜检查,如发现虫体爬行于绒毛和皮屑之间,即时用分离针尖挑取单独的虫体,放置在预先安排好的其上有1滴布勒氏液的载玻片上,移至显微镜下判定其需要的背面或腹面,然后盖一个1/4盖片的小盖片,再用分离针尖轻压小盖片,并做圆圈运动,尽量使其肢体伸直。待自然干燥约1周后,

再在小盖片上加盖普通盖片,用加拿大树胶封固,即成为永久保存的标本了。

### 3. 虱、蚤的固定

方法与实训“牛皮肤寄生虫的检查”中的方法相同。

## (三) 疥螨和痒螨的检查

### 1. 直接检查法

将刮下物放在黑纸上或有黑色背景的容器内,置于恒温培养箱(30~40℃)中或用白炽灯照射一段时间,然后收集从皮屑中爬出的黄白色针尖大小的点状物,置于显微镜下检查。

### 2. 显微镜下直接检查法

将刮下的皮屑,放于载玻片上,滴加50%的甘油溶液,覆以另一张载玻片并挤压,使病料散开,置于显微镜下检查。

### 3. 虫体浓集法

为了在较多的病料中检出其中较少的虫体,可采用浓集法提高检出率。先取较多的病料,置于试管中,加入10%的氢氧化钠溶液。浸泡过夜或在酒精灯上煮数分钟,使皮屑溶解,虫体自皮屑中分离出来。而后待其自然沉淀或以2000 r/min的转速离心5 min,虫体即沉于管底,弃上层液,吸取沉渣,镜检。

也可采用上述方法的病料加热溶解离心后,倒去上层液,再加入60%的硫代硫酸钠溶液,充分混匀后再离心2~3 min,螨体即漂浮于液面,用金属圈蘸取表面薄膜,抖落于载玻片上,加盖玻片镜检。

### 4. 培养皿内加温法

将刮取到的干病料,放于培养皿内,加盖。将培养皿放于盛有40~45℃温水的杯上,静置10~15 min后,将培养皿翻转,则虫体与少量皮屑黏附于皿底,大量皮屑则落于皿盖上,取皿底检查。可以反复进行如上操作。该方法可收集到与皮屑分离的干净虫体,供观察和制作封片标本之用。

### 5. 隔绝氧气法

将病料放入小药瓶中,盖紧瓶盖,2.5 h后观察,可见离瓶口较近的瓶壁上部和瓶盖边缘爬有螨虫,隔绝时间越长,观察到的螨越多,即可判定。

疥螨呈龟形,腹部扁平,背面隆起似半球形,乳白色。雌螨平均长0.39 mm,宽0.30 mm;雄螨平均长0.215 mm,宽0.165 mm。体部无明显横缝,假头后方有1对粗短的垂直刺,有4对粗短的足。虫卵呈圆形或椭圆形,淡黄色,壳薄,大小为0.080 mm×0.180 mm;幼螨有3对足;若幼螨有四对足,则无生殖孔。

## (四) 蠕形螨的检查

### 1. 虫体检查

将挤压出的脓性分泌物或干酪样物质放在载玻片上,滴加1~2滴生理盐水,均匀涂成薄片,盖上盖玻片,在显微镜下检查。

蠕形螨成虫虫体细长,呈蠕虫样,半透明乳白色,一般体长0.17~0.44 mm,宽0.045~0.065 mm。成虫分头部(颚体)、胸部(足体)和腹部(末体)3部分,4对足,体表横纹显著,

幼虫呈淡褐色,胡萝卜状,腹面两侧 3 对足均匀排列,体表横纹不显著;若虫呈淡褐色至暗褐色,胡萝卜状,则背面见 3 对足,足体腹面 4 对足,体表有横纹,虫卵呈淡黄褐色,卵圆形或椭圆形,一端钝圆,另一端狭窄,卵长 0.056~0.094 mm。

## 2. Dot-ELISA 检查

### (1) 复合可溶性抗原的制备

无菌取出皮张上的蠕形螨病灶中的乳白色内容物(含大量成虫、各期幼虫、虫卵及其分泌物)20 g,加 pH 7.2 0.01 mol/L PBS 缓冲液 500 mL,加适量石碳酸,用捣碎机捣碎 15 min,以 3000 r/min 的转速离心 35 min,取上清液;沉淀物用组织捣碎器反复捣碎,直到用显微镜检查无完整虫体和虫卵为止。用上清液反复冲洗捣碎器至病料被冲净为止,将捣碎的病料分为 2 瓶,置-20℃冰箱反复冻融 10 次。用 250 mA 1000Hz 超声波粉碎机粉碎 2 次,每次 20 min,粉碎后置于-20℃冰箱冻融 2 次。再置于 4℃下以 10000 r/min 的转速离心 1 h,取上清液。用紫外分光光度计测定上清液中的抗原蛋白质含量。

### (2) Dot-ELISA 的操作程序

① NC 膜的打印及抗原点样。用蘸笔尖的后端圆头在 NC 膜上压出直径为 3 mm 的圆形印迹,印迹间隔 6 mm;将抗原稀释成 0.1 μg/mL,并用 20 μL 微量移液器在 NC 膜圆形印迹中央点加 1 μL 稀释抗原,置于 4℃冰箱中过夜。

② 封闭。用含 0.5% 明胶的 PBST 溶液封闭 NC 膜上的空白处,以防止非特异性结合。于 37℃下封闭 1 h,用 PBST 溶液洗涤 3 次,每次 3 min。

③ 加抗体。取小试管若干支,编号,用 PBST 溶液将阳性血清、阴性血清、待检血清分别稀释为 1:200。将点有抗原并编号的 NC 膜剪下放入相应试管中,轻摇片刻,置于 37℃下作用 1 h;取出 NC 膜放入 PBST 溶液中反复洗涤 3 次,每次 3 min。

④ 加兔抗羊 IgG 抗体。将 NC 膜放入 300 倍稀释的兔抗羊血清中,置于 37℃下作用 1 h,取出 NC 膜用 PBST 溶液反复洗涤 3 次。

⑤ 加 SPA。将 NC 膜放入按 1:1600 稀释的 SPA 中,置于 37℃下作用 30 min,取出 NC 膜放入 PBST 溶液中反复洗涤 3 次。

⑥ 加二甲基偶氮苯(DAB)显色液。临用前在 DAB 显色液(0.5 mg/mL)中加体积分数 30%的过氧化氢溶液,使终浓度为 0.1 mg/L,将 NC 膜放入其中,轻摇片刻,室温反应 1~2 min,用自来水终止反应,漂洗风干。

⑦ 结果判定。无斑点出现者为阴性,出现棕色斑点者为阳性,其中深棕色斑点为“++++”,浅棕色斑点为“+++”,黄色斑点为“++”,浅黄色斑点为“+”,微黄色斑点为“±”,无斑点为“-”;出现“+”以上者定为阳性。

## (五) 蜱、虱、蚤的鉴定

蜱、虱、蚤的鉴定分类,均以其外部形态结构为依据。可直接在解剖镜下或低倍显微镜下观察,也可制成永久装片标本观察。永久装片标本的制作见实训“牛皮肤寄生虫的检查”。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

## (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)样品的采集及保存;
- (2)疥螨和痒螨的检查;
- (3)蠕形螨的检查;
- (4)蜱、虱、蚤的鉴定。

## (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握蜱、螨的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握蜱、螨的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握蜱、螨的采集,蜱、螨的固定与保存,蜱的种类鉴定,螨的检查等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

# 实训六 羊线虫耐药性的检测

## 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握蠕虫耐药性检测技术。对检查结果能进行正确的处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、100 mL 塑料瓶、托盘天平、烧杯、量筒、80 目铜筛(或纱布)、玻棒、直径 8 mm 玻璃珠(若干)、麦克马斯特氏虫卵计数板、胶头滴管、塑料瓶、15 mL 离心管、1.5 mL 离心管、24 孔细胞培养板、擦镜纸、微量移液器、冰箱、恒温培养箱、光学显微镜、倒置显微镜、电子天平、普通离心机、食盐、二甲基亚砜、驱线虫药物(选择当地常用的驱线虫药物如丙硫咪唑、噻苯咪唑、左旋咪唑、伊维菌素、阿维

菌素等)、碘、碘化钾、蒸馏水等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订羊线虫耐药性检测的设计方案,并经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)粪便的采集、虫卵计数。

(3)粪便的厌氧保存。

(4)试验药液配制。

(5)虫卵孵化试验。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)粪便的采集

所调查的每个羊场,选用年龄在5个月至3岁,10周内未进行驱虫的羊,选每克粪便虫卵数(EPG)15个以上的羊用做试验,从每只羊的直肠中掏取粪便10g左右,装入干净塑料袋中编号送实验室待检。

#### (二)粪便虫卵计数

称取2g待检粪便,放入100mL三角瓶内,加入饱和盐水58mL,静置片刻使其松软,然后捣碎加入50粒左右的玻璃珠,用力振荡至粪球全部破碎,将粪液通过80目铜筛或双层纱布过滤,将滤液边摇晃边用胶头滴管吸出少量滴入计数室内,置于显微镜载物台上,静置1~2min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)。

#### (三)虫卵厌氧保存

(1)在100mL塑料瓶内放入10粒左右直径为8mm的玻璃珠,加入约85mL的自来水。

(2)在塑料瓶中加入10g新鲜粪便。

(3)拧紧塑料瓶瓶盖,用力摇动1min,使粪球破碎。塑料瓶内很快变为无氧状态。

(4)将塑料瓶在20℃左右的温度下保存,不能冷藏,试验用虫卵能使用到采集后7d。

#### (四)虫卵收集

将待检粪样经80目铜筛淘洗,用自然沉淀法收集沉淀物,将沉淀物转入离心管中,以2000r/min的转速离心3min,弃上层液体,再加入饱和食盐水搅拌均匀,以1000r/min的转速离心3min,收集液面表层漂浮物,用蒸馏水稀释收集物,以2000r/min的转速离心3min,弃上层液体,收集沉淀即为虫卵悬浮液。用蒸馏水调整虫卵悬浮液浓度约为400个/mL。

### (五) 实验药液配制

A 液配制:称取 50 mg 分析纯噻苯哒唑,加入 5 mL 二甲基亚砜(DMSO)溶液混匀,备用;

B 液配制:取 1 mL A 液,加入 9 mL 二甲基亚砜备用。

实验时,将 B 液倍比稀释成 10 个浓度滴度,最终噻苯哒唑的浓度范围为 0.002~1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### (六) 虫卵孵化试验

(1) 24 孔细胞培养板在紫外线灯下照射 24 h 备用。

(2) 试验药液,自行配置的 5 个不同浓度的噻苯哒唑药液。

(3) 分组:24 孔细胞培养板按列(4 孔)分为 6 组编号,其中第 6 组为对照组,每孔加 1 mL 排出不超过 3 h 的新鲜或厌氧保存的虫卵悬浮液(约含 400 个虫卵),第 1 组至第 5 组首先加入 1 mL 虫卵悬浮液(约含 400 个虫卵),然后按组依次加入 5 个不同浓度的驱线虫药液(根据当地常用的驱线虫药物进行选择)5  $\mu\text{L}$ ,对照组只加二甲基亚砜溶液。

(4) 培养:将加液结束的细胞培养板封闭置于 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内培养,当对照孔虫卵完全孵化出第 1 期幼虫(48~60 h)时,每孔各滴 2 滴鲁哥氏碘液,终止虫卵孵化。

(5) 计数:在显微镜下观察,对各孔虫卵及幼虫进行计数,至少检测 100 条幼虫和虫卵。

(6) 统计分析:

$$\text{对照孔虫卵孵化率} = \left[ \frac{\text{幼虫数}}{(\text{虫卵数} + \text{幼虫数})} \right] \times 100\%$$

$$\text{虫卵孵化抑制数} = \text{加入虫卵数} - \text{幼虫孵化数}$$

$$\text{虫卵孵化抑制率}(\text{ED}_{50}) = \frac{\text{加入虫卵抑制数}}{\text{加入虫卵数}} \times 100\%$$

以各药物浓度作为自变量  $x$ ,以虫卵抑制率为因变量  $y$ ,建立直线回归方程,通过直线回归方程( $y = ax + b$ )计算虫卵孵化半数抑制率( $\text{ED}_{50}$ )值。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交 1 份羊线虫耐药性检测的实训报告。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握虫卵计数、虫卵孵化试验等技能操作;能认真完成并及

时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握虫卵计数、虫卵孵化试验等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握虫卵计数、虫卵孵化试验等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

武汉大学出版社

## 第三部分 猪寄生虫病实训

### 实训一 猪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,学生应能熟练掌握粪便检查的方法,并能在显微镜下辨别猪粪便中的各类蠕虫卵、球虫卵囊、结肠小袋纤毛虫包囊等,且能与粪便中的非寄生性物质相区别,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、烧杯(或塑料杯)、竹签(或火柴棍)、试管、试管架、铁丝圈、离心管、玻棒、铜筛(或纱布)、胶头滴管、瓷盆(或桶)、解剖针、剪刀、擦镜纸、载玻片、盖玻片、电磁炉、锅、10 mL 离心管、50 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、普通离心机、光学显微镜、恒温培养箱、冰箱、水浴锅、食盐、甘油、硫酸锌等。

#### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订猪消化系统寄生虫的检查方案,并经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

根据养猪场猪的数量、年龄、性别等进行猪粪便的随机采集,一般按饲养量的 30%左右随机采样。每份粪样 150 g,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采集粪样的时间,

以及待检猪的耳标号、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。

## (二)猪消化系统蠕虫的检查

### 1. 直接涂片法

(1)在清洁的载玻片上滴1~2滴50%的甘油水溶液(甘油可使标本清晰,并防止过快蒸发变干),将少量粪便加在上面,用竹签仔细混匀,并用镊子拣去大的粪渣,盖上盖玻片,于光学显微镜下观察虫卵或幼虫。

(2)回旋法,此法为直接涂片法的改良法。该方法的原理是由于回旋搅动,可使玻棒端悬液小滴中附有较多量的寄生虫卵或幼虫。取2~3g粪样加清水2~3倍,充分混匀成悬液。用玻棒搅拌0.5~1min,使之做回旋运动,在搅拌过程中迅速提起玻棒,将棒端附着的液体放于载玻片上涂开,加上盖玻片在显微镜下观察。

### 2. 沉淀法

(1)自然沉淀法。取5~10g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于另一干净的烧杯或塑料杯内,再加清水至距离杯口2cm,静置15~20min,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10~15min,如此反复进行2~3次,直至上层液体变清亮为止,最后倾去上清液,吸取沉渣涂于载玻片上,镜检。

(2)离心沉淀法。取5g被检粪便,置于烧杯中,加5倍量的清水,搅拌均匀。经粪筛和漏斗过滤到离心管中,以500r/min的转速离心2~3min,然后倾去管内上层液体,留约为沉淀物1/2的溶液量,用胶头滴管吹吸混匀后,吸取适量(1~2滴)液体置于载玻片,加盖玻片、镜检。

### 3. 漂浮法

#### (1)试管漂浮法

取粪便1g,加饱和食盐水10mL,混匀,过滤,滤液注入直立的直径1.5~2cm的平口试管中,补加饱和食盐水溶液使试管充满,然后用胶头滴管补加饱和食盐水,滴至液面凸出管口为止,管口覆以清洁盖玻片,并使液体和盖玻片接触,其间不留气泡,直立15~20min后,平移此盖玻片于载玻片上镜检。

#### (2)离心漂浮法

取5~10g粪便置于100mL烧杯中,加入少量饱和盐水搅拌混匀后,继续加入10~20倍的饱和盐水,用玻棒搅匀,通过250μm(或60目)铜筛或双层纱布过滤。将粪便滤液置离心管内,以2500~3000r/min的转速离心5~10min,取上浮物制片,镜检。

### 4. 局部剖检检查虫体

按照一般解剖方法剖开猪的腹腔。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。再将食道、胃、小肠、大肠和盲肠分段做二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。再剖开食道或用筷子将食道反转,仔细检查食道黏膜下有无筒线虫寄生。用小刀或载玻片刮取黏

膜表层,压在两块载玻片之间检查,当发现虫体时,揭开上面的载玻片,用解剖针将虫体挑出。

#### (2)胃内容物

剪开胃,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,将此刮下物放在两块载玻片之间做压片镜检。洗下物应加1%的盐水,反复多次洗涤、沉淀,等液体清亮透明后,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。

#### (3)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%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反复沉淀法处理后,检查沉淀物中所有的虫体。

#### (4)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,以反复沉淀法检查沉淀物内寄生虫。

#### (5)肝脏

首先观察肝表面有无寄生虫结节,如有,可做压片检查。然后沿总胆管剪开肝脏,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反复沉淀法检查沉淀物。

#### (6)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,黏膜上有无虫体附着,也可用水冲洗,把冲洗后的水进行沉淀,再详细检查。

猪消化系统寄生虫的蠕虫主要有华支睾吸虫、布氏姜片吸虫、克氏伪裸头绦虫、红色猪圆线虫、似蛔线虫、六翼泡首线虫、奇异西蒙线虫、颚口线虫、猪蛔虫、毛尾线虫、食道口线虫、双管鲍氏线虫、球首线虫、兰氏类圆线虫、蛭形巨吻棘头虫等。

### (三)猪消化系统原虫的检查

#### 1. 球虫卵囊的检查

取3g待检新鲜粪便于小烧杯中,加入少量饱和食盐水,搅拌均匀,再加入适量饱和食盐水,用铜筛(40目或60目)将粪便过滤到另一容器内,静置3~5min,此时比重轻的虫卵就浮到液体的表面,用细胶头滴管吸取上层液体滴加到载玻片上,置于显微镜下检查,若感染,可看到球虫卵囊。也可用直径为5~10mm的铁丝圈蘸取表面液膜,抖落于载玻片上,置于显微镜下检查。

#### 2. 结肠小袋纤毛虫的检查

##### (1)生理盐水直接涂片法检查结肠小袋纤毛虫滋养体。

在洁净的载玻片中央加一滴生理盐水,用牙签挑取少许粪便(粟米大小),均匀涂开,拣去较大粪渣,最后使玻片上留有一层均匀的粪膜,粪膜的厚度要求是将此玻片放于报纸

上,能通过粪便液膜模糊地辨认其下的字迹为合适,在粪膜上加盖玻片,置于显微镜下观察。

因取材少,容易发生漏检,所以每份样品做3片涂片较为准确。

观察时,一般先在低倍镜下观察,遇有可疑结构再转至高倍镜下仔细辨认,光线要适当,过强的光线不利于观察,应按顺序查遍盖玻片下的所有部分。

结肠小袋纤毛虫滋养体一般呈不对称的卵圆形或梨形,大小为 $(30\sim 180)\mu\text{m}\times(25\sim 120)\mu\text{m}$ ,虫体前端略尖,后端略钝。

(2) 碘液染色直接涂片法检查结肠小袋纤毛虫包囊

将碘液滴加于载玻片上,用竹签(或火柴棍)挑取被检动物粪便少许,在碘液中均匀涂开,拣去较大粪渣,加盖玻片,在显微镜下观察。可见染色后包囊呈黄色或浅棕黄色,糖原泡为棕红色,囊壁、核仁和拟染色体均不着色。

(3) 饱和硫酸锌溶液检查结肠小袋纤毛虫包囊。

取粪便约1g,加10~15倍体积的水,充分搅碎,按离心沉淀法过滤,反复离心3~4次,至清水为止,最后倒去上清液,在沉渣中加入比重1.18的硫酸锌溶液(33%的溶液),调匀后再加硫酸锌溶液至距管口约1cm处,离心1min。用金属环钩取表面的粪液置于载玻片上,加碘液1滴(查包囊),镜检。钩取标本时,用金属环轻轻接触液面即可,切勿搅动。离心后应立即取标本镜检,若放置时间超过1h以上,则会因包囊或虫卵变形而影响观察效果。

(四) 虫卵/卵囊计数

方法与实训“牛消化系统寄生虫的检查”中的方法完全相同。

## 五、实训结果与考核

(一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占30%,结果考核占70%。

(二) 实训成果

每人应提交实训报告1份,其内容如下:

- (1) 粪样采集及注意事项;
- (2) 猪消化系统蠕虫的检查;
- (3) 猪消化系统原虫的检查;
- (4) 虫卵/卵囊计数。

(三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握粪便学检查技术,完全剖检技术,虫卵、卵囊计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握粪便学检查技术,完全剖检技术,虫卵、卵囊计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握粪便学检查技术,完全剖检技术,虫卵、卵囊计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训二 猪呼吸系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握猪肺线虫的检查方法,并能在显微镜下辨别猪后圆线虫虫卵及幼虫的形态,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、烧杯或塑料杯、玻棒、离心管、试管、试管架、铁丝圈、铜筛(或纱布)、胶头滴管、瓷盆(或桶)、解剖针、剪刀、擦镜纸、载玻片、盖玻片、电磁炉、锅、10 mL离心管、50 mL离心管、普通离心机、光学显微镜、冰箱、食盐、甘油、硫酸镁等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订猪呼吸系统寄生虫的检查方案,并经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)饱和硫酸镁溶液漂浮法检查。

(3)肺脏局部剖检检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 粪便

根据养猪场猪的规模、年龄、性别等不同进行粪便的收集。每份粪样150 g,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采样信息。低温运回实验室后,置于4℃冰箱中保存待检。

## 2. 肺脏

采集待检猪的肺脏。

### (二) 饱和硫酸镁溶液漂浮法检查

将待检粪样先进行自然沉淀,再取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,吸弃上层液,在沉渣中加入饱和硫酸镁溶液,调匀后,再加硫酸镁溶液至距管口约 1 cm 处,以 3000 r/min 转速离心 21 min。离心后,再加满饱和硫酸镁溶液,液面凸出管口后加盖玻片,静置 2~5 min,取下盖玻片放在载玻片上,再在显微镜下检查。

镜检若见后圆线虫卵呈椭圆形,灰白色,外有一层稍凹凸不平的蛋白膜,内含有幼虫,即可确诊。

### (三) 肺脏局部剖检检查

首先观察肺脏表面有无寄生虫结节,如有,可做压片检查。再将肺组织在水中撕碎,用双手挤压,或将碎块置于 37 °C 温水中,待其虫体自行出来。充分水洗后,取出肺脏组织碎块,并用反复沉淀法检查沉淀物。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 样品采集及注意事项;
- (2) 饱和硫酸镁溶液漂浮法检查;
- (3) 肺脏局部剖检检查。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握饱和硫酸镁溶液漂浮检查法、肺脏局部剖检等操作技术;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握饱和硫酸镁溶液漂浮检查法、肺脏局部剖检等操作技术;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握饱和硫酸镁溶液漂浮检查法、肺脏局部剖检等操作技术;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 猪泌尿系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握猪冠尾线虫病的检查技术,并能在显微镜下正确判断有齿冠尾线虫虫卵的形态特点,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、烧杯或塑料杯、玻棒、铜筛(或纱布)、胶头滴管、瓷盆、解剖针、剪刀、擦镜纸、载玻片、盖玻片、光学显微镜等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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”理论课程的学习和查阅相关资料,制订猪泌尿系统寄生虫的检查方案,并经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)尿液检查。

(3)肝脏、肺脏或腹腔检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 尿液

收集猪清晨排出的尿液于小烧杯中。

##### 2. 肝脏、肺脏

采集待检猪的肝脏、肺脏。

#### (二)尿液检查

尿液直接沉淀30 min后,弃上清液,取沉渣置于显微镜下检查有无虫卵。

#### (三)肝脏、肺脏或腹腔检查

剪碎肝脏、肺脏等,经循序沉淀法找幼虫,或直接在腹腔找幼虫。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)尿液检查;
- (2)肝脏、肺脏或腹腔检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握猪冠尾线虫病的诊断技术,并能在显微镜下正确判断有齿冠尾线虫虫卵及幼虫的形态特点;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握猪冠尾线虫病的诊断技术,并能在显微镜下正确判断有齿冠尾线虫虫卵及幼虫的形态特点;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握猪冠尾线虫病的诊断技术,并能在显微镜下正确判断有齿冠尾线虫虫卵及幼虫的形态特点;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训四 猪肌肉寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握猪住肉孢子虫病、猪囊尾蚴病和猪旋毛虫病的检查技术,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自主学习、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:手术刀、手术剪、塑料袋、标记笔、真空采血针、真空

采血管(不含抗凝剂)、酒精棉球、灭菌 1.5 mL 离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、托盘天平、离心管、计数器、表面皿、滤纸、96 孔聚苯乙烯微量反应板、200  $\mu\text{L}$  微量移液器及配套吸头、显微测微尺、光学显微镜、高速离心机、水浴锅、冰箱、恒温培养箱、捣碎机、加热磁力搅拌器、酶标测定仪、甘油、盐酸、胃蛋白酶、PBS 缓冲液、姬姆萨染色液、吐温-20、阴性血清、阳性血清、酶标抗体、底物等。

### 三、实训内容

(1) 实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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”理论课程的学习和查阅相关资料,制订猪肌肉寄生虫的检查方案,并经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) 住肉孢子虫的检查。

(3) 猪囊尾蚴的检查。

(4) 猪旋毛虫的检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一) 取样

##### 1. 肉样

每头猪采集膈肌、肋间肌、腹斜肌、腿部肌肉、咬肌、舌肌、心肌、深腰肌等部位肉样各 70 g 左右,编号并记录详细采样信息,带回实验室,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

##### 2. 血清

采集每头待检猪的全血,常规分离血清,编号,56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 灭能,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

#### (二) 直接涂片检查住肉孢子虫滋养体

将肉样压碎,直接涂片。将姬姆萨染色液原液用  $\text{pH}=6.8\sim 7.2$  的 PBS 缓冲液按 1 : (15~20) 稀释。在涂片上滴加稀释后的姬姆萨染色液,染色 20~30 min(或在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中 15 min),用自来水轻轻冲洗,晾干后镜检。

若见许多肾形或香蕉形,长 10~12  $\mu\text{m}$ ,宽 4~9  $\mu\text{m}$ ,一端稍尖,另一端钝圆,核偏,位于钝圆一端的小体,即为住肉孢子虫的滋养体。

#### (三) 肌肉压片检查

##### 1. 肉眼检查

撕去被检样品肌膜,将肌肉拉平,在良好的光线下仔细检查其表面有无可疑病灶。未钙化的包裹呈露滴状,半透明,细针尖大小,较肌肉的色泽淡;随着包裹形成时间的增加,色泽逐步变深而为乳白色、灰白色或黄白色。若见有可疑病灶,做好记录并告知总检将可疑肉尸隔离,待压片镜检后做出处理决定。



## 2. 制片

取清洁载玻片 1 片放于检验台上,并尽量靠近检验者。用镊子夹住肉样顺着肌纤维方向将可疑部分剪下。如果无可疑病灶,则顺着肌纤维方向在肉块的不同部位剪取 12 个麦粒大小的肉粒(2 块肉样共剪取 24 个小肉粒)。将剪下的肉粒依次均匀地附贴于载玻片上,且排成两行,每行 6 粒。然后取一清洁载玻片盖在肉片的载玻片上,并适度用力捏住两端同时轻轻加压,把肉粒压成很薄的薄片,以能通过肉片标本看清下面报纸上的小字为标准。另一块膈肌按上述方法制作,两片压片标本为一组进行镜检。

## 3. 镜检

把压片标本放在低倍( $4\times 10$ )显微镜下,从压片的一端第一块肉片处开始,顺肌纤维依次检查。镜检时应注意光线的强弱及检查速度,切勿漏检。

## 4. 判定

囊尾蚴可看到虫体头节上有四个圆形吸盘,最前端的顶突上带有许多角质小钩。钙化的囊虫包囊内形成黑色团块,滴加 10% 稀盐酸溶解后,可见崩解的虫体团块和具有特征的角质小钩,包囊周围形成厚的结缔组织膜。

旋毛虫包囊呈卵圆形或橄榄形,囊壁为双层,外层薄,具有大量结缔组织,内层透明。包囊多在肌纤维之间,内含一条略弯曲似螺旋体的幼虫,蟠曲于折光性强的透明液中。钙化的旋毛虫包囊体积小,滴加 10% 稀盐酸溶解后,可见到虫体或其痕迹,与包囊毗邻的肌纤维变性,横纹消失。

住肉孢子虫是孢子囊,囊内有许多滋养体。钙化多从虫体中部开始,滴加 10% 的稀盐酸溶解后不见虫体,钙化的虫体周围不形成结缔组织包膜,与其毗邻的肌纤维横纹不消失。

## (四) 肌肉消化检查

先用机械方法将受检肉样捣碎,使其呈颗粒状或絮状,再用消化酶在最适温度和最佳酸碱度条件下进行生物化学消化。本实验采用快速集样消化法,即由磁棒转动带动杯中消化液旋转成漩涡,加速底物消化分解,同时比水重的有形物质随漩涡的力量向中心移动,但未消化的巨型肌组织残质则被集虫器外周粗筛阻留,而虫体或虫体包囊等细小物体随漩涡向中心移动进入集虫器;当转动停止,集虫器中的有形物质便随漩涡逐渐沉降于底部细筛孔漏掉,只保留虫体和包囊在筛面上供镜检。

### 1. 捣碎

取样品 20 g,置捣碎机容器中,加入 0.04% 胃蛋白酶溶液 100 mL(按每 10 g 肉样加 50 mL 酶溶液的比例),徐徐启动捣碎机,转速由 8000 r/min 逐渐变到 16000 r/min。捣碎约 30 s 至肉样成颗粒或絮状,并混悬于混浊的消化液中。

### 2. 加热、消化、集虫

取下容器将捣碎液倒入 500 mL 烧杯中,加入 2% 的热盐酸溶液 100 mL(与酶溶液等量),使温度保持在 45 °C 左右。然后将集虫器从液面上小心压入杯中,加入磁棒,将烧杯放在加热磁力搅拌器上,启动转速节柄,消化液被搅成一漩涡。在 45 °C 左右下搅拌 3~5 min 后,回转调节柄,停止搅拌,待磁棒静止后取出磁棒。取出集虫器,卸下集虫筛,用适量清水将筛面物充分冲洗入表面皿中。

### 3. 镜检

将表面皿移于镜检台的圆孔上,旋转圆盘使表面皿中心底部接物镜头下,将表面皿前后、左右晃动数次,使有形成分集中于皿底中心,用40×物镜检查。

### 4. 判定

囊尾蚴虫体较大,易看到,长径6~10 mm,短径约5 mm,明显位于肌纤维间,外观为椭圆形。包囊为单层,半透明,囊内充满液体,囊壁是一层薄膜,其上有一个小米粒大的乳白色头节。

旋毛虫虫体较小,雄虫(1.4~1.6)mm×(0.04~0.05)mm,雌虫(3~4)mm×0.06 mm,很难辨识,在肌纤维表面看到稍凸出的卵圆形、灰白色、针头大小或灰白色、浅白色的小白点,即为可疑。

住肉孢子虫虫体较大,易发现,长0.5~5 mm,呈灰色柳叶形,有时呈雪茄烟形或半月形,无包囊,明显地位于肌纤维内。

## (五)ELISA 检查

### 1. 样品制备

用1.0 cm×3.0 cm滤纸片紧贴胴体残留血液处或血凝块(若无残血,可将滤纸片紧贴肌肉组织新鲜断面,轻轻挤压断面两侧),当滤纸片全部湿润后,将其放入小玻璃瓶(装有含吐温-20的pH=7.4 PBS缓冲液1 mL)中,振摇后即成为被检样品。

纯肌肉时,可取蚕豆大肌肉置于小玻璃瓶中,剪碎,加2~3倍体积的PBS缓冲液,振摇、静置,上清液即为被检样品。

### 2. 抗原包被

将旋毛虫抗原用包被液稀释成一定浓度(抗原蛋白含量2 mg/mL),加入反应板A、B、C、D列1~10号孔内,每孔加0.2 mL;E列各孔分别为阴、阳性血清对照,每孔加0.2 mL。每列的第11孔为空白对照(每孔加稀释液0.2 mL),加毕,将反应板加盖,置于湿盒内,在37℃下孵育2 h或在4℃下过夜,使其达到最大反应强度。

### 3. 洗涤

将反应板倒空,伏置于滤纸上片刻,用洗涤液加满各孔,室温下静置3~5 min后倒空,并用滤纸吸干。再加满洗涤液,如此重复3次。

### 4. 加入被检样品

将被检样品加入预定孔内,每份加两孔,每孔加0.2 mL,包被液空白对照各孔加洗涤液0.2 mL。同时做阴、阳性标准血清对照,在37℃下孵育2 h。

### 5. 洗涤

方法同步骤3,洗涤3次,每次3~5 min。

### 6. 加酶标抗体

按照说明,用洗液稀释至最适浓度,每孔加0.2 mL,在37℃下孵育2 h(适当提高反应温度及抗原、酶结合物浓度,可缩短孵育时间)。

### 7. 洗涤

方法同步骤3,洗涤3次,每次3~5 min。

#### 8. 加底物

将新鲜配制的底物溶液加入各孔,每孔 0.2 mL,在 37 °C 湿盒中避光作用 15 min。

#### 9. 终止反应

每孔加终止液 50  $\mu$ L,静置 5 min。

#### 10. 测定 OD 值

在酶标测定仪上,于 492 nm 波长处,按仪器使用及制定标准要求调节仪器,测定各反应孔的 OD 值,记录结果。

#### 11. 结果判定

①根据反应颜色的深浅先用肉眼判定。参考阳性及阴性对照,分别判为阳性(+)、阴性(-)及可疑(±)。

②凡被检样品的 OD 值高于标准阴性血清平均 OD 值 2 倍以上的,即判为阳性反应。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)直接涂片检查住肉孢子虫滋养体;
- (2)肌肉压片检查;
- (3)肌肉消化检查;
- (4)ELISA 检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握猪住肉孢子虫病、猪囊尾蚴病和猪旋毛虫病的检查技术,对检查结果进行正确处理及判断;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握猪住肉孢子虫病、猪囊尾蚴病和猪旋毛虫病的检查技术,对检查结果进行正确处理及判断;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握猪住肉孢子虫病、猪囊尾蚴病和猪旋毛虫病的检查技术,对检查结果进行正确处理及判断;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训五 猪皮肤寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握猪疥螨、猪蠕形螨、血虱等的检查技术。对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:手术刀片、镊子、平皿(或自封袋)、记号笔、黑纸(或黑色浅盘)、试管、酒精灯、离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱、甘油、氢氧化钠等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订猪皮肤寄生虫的检查方案,并经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)直接检查。

(3)显微镜下直接检查。

(4)虫体浓集法检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

用刀片刮取猪皮肤病变交界处的皮屑,直到稍微出血为止。在刀片上沾上甘油,在刮取时可使皮屑黏附在刀上,避免被风吹走。

#### (二)直接检查

将刮下物放在黑纸上或黑色浅盘内,置于恒温培养箱(30~40℃)中或用白炽灯照射一段时间,然后收集从皮屑中爬出的黄白色针尖大小的点状物,镜检。

#### (三)显微镜下直接检查

将刮下的皮屑放于载玻片上,滴加50%的甘油溶液,覆以另一张载玻片,搓压载玻片使病料散开,置于显微镜下观察。

#### (四) 虫体浓集法

采用浓集法可以从较多的病料中检出其中较少的虫体,从而提高检出率。取较多的病料置于试管中,加 10% 的 NaOH 溶液。浸泡过夜(如亟待检查,可在酒精灯上煮数分钟),使皮屑溶解,虫体自皮屑中分离出来。待其自然沉淀(或以 2000 r/min 的转速离心 5 min),虫体即沉于管底,弃上清液,吸取沉渣,镜检。

### 五、实训结果与考核

#### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

#### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 直接检查;
- (2) 显微镜下直接检查;
- (3) 虫体浓集法检查。

#### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握猪疥螨、猪蠕形螨、血虱等检查技术;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握猪疥螨、猪蠕形螨、血虱等检查技术;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握猪疥螨、猪蠕形螨、血虱等检查技术;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训六 猪弓形虫病的诊断

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握猪弓形虫病的诊断技术,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:真空采血针、真空采血管(含抗凝剂)、标记笔、微量移液器、胶头滴管、烧杯、试管、酒精灯、离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、纱布、一次性注射器、剪刀、镊子、方盘、蛋座、灭菌培养皿、灭菌三角瓶、毛细管、血细胞计数板、细胞培养瓶、单面刀片、金属台座(或木块)、胶头滴管、G3 砂蕊漏斗(或纤维素滤膜)、96 孔 V 形反应板、3  $\mu\text{m}$  微孔滤膜、打孔器、培养皿、96 孔微量反应板、水浴锅、荧光显微镜、酶标测定仪、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱、无水乙醇、肥皂、甲醇、瑞氏染色液、姬姆萨染色液、灭菌生理盐水、青霉素、链霉素、Hank's 液、胰蛋白酶、碘酊、水解乳蛋白营养液(或 MEM 培养液)、结晶紫、柠檬酸、199 液、小牛血清、卡那霉素、氢氧化钠、猪肾细胞、金黄仓鼠肾细胞、EDTA、Bouin 氏液、Helly 氏液、甲醛、二甲苯、石蜡、荧光素标记的第二抗体液、甘油缓冲液、辅助因子、碳酸钠、四硼酸钠、美蓝、乙醚、碘酒、柠檬酸钠、鞣酸、1% 正常兔血清、绵羊红细胞、植物血凝素、灭菌双蒸水、氯化钠、苯乙烯、丙烯酸单体、过硫酸钾、烷基苯基磺酸钠、叠氮钠、间苯二酚、硫柳汞、琼脂、碳酸盐缓冲液(pH=9.6)、PBS 缓冲液(0.1 mol/L、pH=7.4)、吐温-20、酶结合物、底物、硫酸铵、羊抗人 IgG、生物素、N-羟基丁二酰亚胺、邻苯二胺、硫酸、牛血清白蛋白、兔抗人 IgG、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、小白鼠(或家兔)、鸡胚等。

## 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订猪弓形虫病的诊断方案,并经教师讲解及组内交流和讨论进行诊断方案的修订与决策。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)直接血液涂片检查。
- (3)集中检查。
- (4)动物接种。
- (5)体外培养。
- (6)血清学检查。
- (7)PCR 检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一)取样

#### 1. 全血

无菌采集猪的前腔静脉血,一部分全血加抗凝剂,混匀,编号,并记录详细信息,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存待检;另一部分不加抗凝剂,静置待凝固后分离血清,编号,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存待检。

## 2. 内脏

无菌采取被检猪只的肝脏、肺、肺门淋巴结等组织。

### (二) 直接血液涂片检查

#### 1. 血涂片的制作

取洁净载玻片 2 片,选一片边缘光滑平整者(最好是磨口边缘)作推片,另一片则平置于桌上,或以左手拇指和食指夹持其两端。从被检猪耳静脉吸取 2  $\mu\text{L}$  血液,以推片一端的中央蘸取一小滴血,使血滴与平置的载玻片接触。血滴必然沿推片边缘向两侧展开,随即将推片与载玻片保持  $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$  夹角,从右向左迅速推成薄膜。也可用载玻片直接黏取血滴,然后将推片置于血滴前方,待血液展开后再将推片迅速向前推动。

操作时,血量不宜太多或太少,两载玻片间的夹角要适当,否则血膜会过厚或过薄。推片时用力要均匀,一次推成,切勿中途停顿或重复推片。质量好的血膜应呈舌形,血细胞分布均匀。

#### 2. 染色

##### (1) 瑞氏染色

染色前用蜡笔在血膜周围画线以防染液溢满全片,滴加瑞氏染液数滴,使之布满血膜,约 1 min 后血膜已被瑞氏染液中的甲醇固定,再加与瑞氏染液等量的缓冲液或蒸馏水,轻摇载玻片,使染液与稀释液混匀。此时见有金属铜色膜上浮,3~5 min 后,用自来水从载玻片的一端冲洗(切勿先倾去染液再用水冲洗,或使自来水直接对血膜冲洗,以防染料颗粒沉着于血膜上)。染色过程中不能使染液变干,否则也会产生大量沉渣。载玻片冲洗干净后,竖立于片架上,晾干或用电风吹干,以便镜检。瑞氏染色时,温度与染色所需时间有密切关系,气温低时应适当延长染色时间。

##### (2) 姬姆萨染色

血膜用甲醇固定(吸取甲醇的吸管不能有水分)。将姬姆萨原液用  $\text{pH}=6.8\sim 7.2$  的缓冲液按 1:(15~20) 稀释。在血膜上滴加稀释的姬姆萨染液,染色 20~30 min(37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中仅需 15 min),用自来水轻轻冲洗,晾干后镜检。稀释后的染液会产生沉淀,故不宜久放,必须临用时配制。姬姆萨染液染色效果稳定,原虫色泽鲜明,且保存时间久,是目前染制血液涂片最可靠的染剂之一。

#### 3. 镜检

涂片染色后,在油镜下观察,可见月牙形或梭形虫体,核为红色,胞质为蓝色,即为弓形虫滋养体(速殖子)。

镜检时,血膜中有一些与滋养体形态类似的物质,应注意区别。如染料小渣粒有红也有蓝,可黏附于红细胞上;或有单个的血小板附着于红细胞上,易被误认为大滋养体,但这些物体均在红细胞之上,通过调节细螺旋可发现它们与红细胞不在同一水平。

### (三) 集虫检查

取被检猪只的肝脏、肺、肺门淋巴结等组织 3~5 g,研碎后加 10 倍灭菌生理盐水混匀,通过两层纱布过滤,以 500 r/min 的转速离心 3 min,取上清液以 2000 r/min 的转速离心 10 min,取其沉淀做压滴标本或涂片染色(染色方法同直接涂片法)检查。

#### (四) 动物接种

取被检猪只的肺、肝、肺门淋巴结等研碎,加 10 倍灭菌生理盐水,每毫升加青霉素 1000IU 和链霉素 100 mg,在室温下放置 1 h,接种前振荡,待重颗粒沉底后,取上清液接种于小白鼠(或家兔)腹腔,每只接种 0.5~1.0 mL。接种后观察 20 d,若小白鼠(或家兔)出现被毛粗乱、不活泼、弓背、腹部膨大、颤动或呼吸急促等症状或死亡,即剖杀取腹水或肺、肝、脾和脑等脏器做涂片,用姬姆萨染色液染色,镜检。初代接种的小白鼠(或家兔)若没发病,可取被接种的小白鼠(或家兔)的肺、肝、淋巴结、脾、脑等组织按上述方法制成悬液,再接种小白鼠(或家兔)盲传 3 代,可能从病鼠(或兔)腹腔液中发现滋养体。

#### (五) 体外培养

##### 1. 鸡胚原代细胞培养

##### (1) 配液

制备细胞前先在 Hank's 液中加入青霉素、链霉素,使其含量为:青霉素 100 IU/mL,链霉素 100  $\mu$ g/mL,调整 pH=7.2~7.4,将胰蛋白酶调整 pH=7.6(玫瑰红色)。置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中预热备用。

##### (2) 鸡胚及剪碎

将胚蛋气室端向上直立于蛋座上,用碘酊消毒气室,以镊子击破卵壳并弃之,撕破卵膜揭之,继撕破绒毛尿囊膜、羊膜,取出胚胎于灭菌平皿中。剪去头部、翅爪及内脏,用 Hank's 液洗去体表体液,移入灭菌三角瓶中,用灭菌剪刀剪碎鸡胚,使其成为约 1 mm<sup>3</sup> 大小的碎块,加 5 mL Hank's 液轻摇,静置 1~2 min,使其组织块下沉。吸去上层悬液,依同法再洗 2 次,直至上悬液不浑浊为止,吸干 Hank's 液留组织。

##### (3) 消化

自水浴锅内取出预热的胰酶,按组织块量 3~5 倍体积加入三角瓶中,1 个鸡胚约需 5 mL 胰酶,三角瓶上加塞,避免 CO<sub>2</sub> 挥发及污染。37  $^{\circ}$ C 水浴约 20 min,每隔 5 min 轻轻摇动 1 次;由于胰酶作用,使细胞与细胞之间的氨基和羧基游离,待液体变混而稍稠,此时再轻摇,可见组织块悬浮在液体内而不易下沉时,中止消化。如再继续消化,会破坏细胞膜而不易贴壁生长;如果消化不够,则细胞不易分散。

##### (4) 洗涤

取出三角瓶后静置 1 min,让组织块下沉后,吸去胰酶液,用 10 mL Hank's 液反复清洗 3 次,以吸去胰酶,吸干上清液,留组织块。

##### (5) 吹打

加 2 mL 含血清的 0.5% 水解乳蛋白营养液或 MEM 培养液,以粗口吸管反复吹吸数次,使细胞分散,此时可见营养液浑浊,即为细胞悬液。静置 1 min,使未冲散的组织块下沉后,小心地将细胞悬液吸出 1 mL 于 20 mL 营养液中,此液细胞密度为 50 万~70 万/mL。如需大量细胞,可继续加营养液冲打,1 个鸡胚约可做 100 mL 细胞悬液。

##### (6) 细胞计数

取上述细胞悬液 0.5 mL 加入 0.1% 结晶紫-柠檬酸(0.1 mol/L)溶液 2 mL,置于室温或 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中 5~10 min,充分振动混合后,用毛细管吸取滴入血细胞计数板

内,在显微镜下计数。计数方法按白细胞计数法,计算四角大格内完整细胞的总数。如3~5个聚集在一起,则按1个计数,然后将细胞总数按下述方法换算成每毫升的细胞数。

$$\text{每毫升细胞数} = \frac{4 \text{ 大格细胞总数}}{4 \times 1000 \times \text{稀释倍数}}$$

例如:4大格的细胞总数为284个,而稀释倍数为5(0.5 mL染色液),则每毫升细胞悬液的细胞数为 $284/4 \times 1000 \times 5 = 3.5 \times 10^4$ (个)。

#### (7) 稀释

按照细胞密度50万~70万/mL的标准,将细胞悬液用营养液稀释。

计数时,可见到大部分细胞完整分散,3~5个细胞成堆,且细胞碎片很少,说明消化适度;如分散细胞少,则消化不够;如细胞碎片多,则消化过度。

#### (8) 分装培养

分装于链霉素瓶中,每瓶约1 mL,瓶口橡皮塞要塞紧。不合适者弃去,避免漏气造成污染或CO<sub>2</sub>跑掉而营养液变碱。将细胞瓶横卧于培养盘中,于瓶上面画一直线,以表示直线的对侧面为细胞在瓶内的生长位置。瓶上注明组别、日期,置于37℃恒温培养箱中培养,4 h后细胞即可贴附于瓶壁,24~36 h生长单层细胞。

(9)吸去培养液,接种经无菌处理的待检动物组织悬液,加维持液,观察细胞病变及培养物中的虫体,如未发现虫体,盲传3代。涂片检查显示,早期虫体多呈卵圆形,继而出现椭圆形或新月形。

细胞培养对玻璃器皿洗涤要求严格,彻底洗涤后用蒸馏水冲洗,再用双蒸水冲洗,干燥、灭菌后备用。所有的溶液都要用双蒸水配制,所用药品试剂药用分析纯试剂,严格要求无菌操作。

### 2. 金黄仓鼠肾单层细胞培养法

采用刚断奶的幼金黄仓鼠肾,按常规的0.25%胰蛋白酶37℃一次消化法获得分散的肾细胞,加入生长液,使最终细胞密度为50万/mL。分装于培养瓶中,在37℃培养5 d,倒去生长液,接种经无菌处理的待检组织悬液,加入维持液,在37℃培养,每日观察细胞情况。一旦细胞出现病变时,即取出镜检。如未发现虫体,盲传3代。涂片检查显示,早期虫体多呈卵圆形,继而出现椭圆形或新月形。

### 3. 猪肾细胞培养法

细胞培养液用45份199液、45份Hank's液、10份小牛血清,青霉素、链霉素各200 IU/mL、卡那霉素50 IU/mL,以5.6%氢氧化钠调节pH=7.2。于37℃恒温培养箱中培养猪肾细胞,2 d可长成单层,2~3 d可传代1次。传代时,每瓶加入10 mL消化液(用90份0.02%EDTA和10份0.25%胰酶,加同抗生素,调节pH=7.8),2~3 min后,当培养瓶内细胞松散,瓶侧见到细胞界面呈不规则齿形时,立即倒去消化液;加不含猪血清的培养液清洗1次,以去除酶-EDTA的作用,后再加入少量培养液,以滴管反复搅拌细胞,让细胞均匀分散于细胞液中,根据需要分装于培养瓶中,加入培养液,在37℃培养。选择生长良好的2日龄细胞,调换新配制的培养液,接种经无菌处理的待检动物组织悬液,每日观察细胞情况。一旦细胞出现病变,即取出镜检。涂片检查显示,早期虫体多呈卵圆形,继而出现椭圆形或新月形。

## (六)组织病理学检查

### 1. 取材固定

将被检猪处死后,剪开腹腔和胸腔,依次取出肺、肝、淋巴结等,分别投入以下固定液。

Bouin 氏液:固定肺;Helly 氏液:固定肝;10%甲醛:固定淋巴结。

取材大小:0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 或 1.0 cm×1.0 cm×0.2 cm。

固定时间:12~24 h。

### 2. 洗涤

(1)Bouin 氏液固定的组织:直接投入 70%的酒精更换数次即可脱水,注意脱苦味酸。

(2)Helly 氏液固定的组织:用流水冲洗 12~24 h,至组织发白,即投入 50%的酒精脱水。

(3)10%甲醛固定的组织:直接投入 50%或 70%的酒精脱水,不经过水洗。但如果在甲醛中时间过长,则仍应当用流水冲洗。

### 3. 脱水与透明

组织水洗后即入酒精脱水,经 50%、70%、80%、90%、95%、100%的酒精脱水,其中 95%和 100%的酒精需重复两次。各级酒精的脱水时间 45~60 min,然后投入 100%的酒精二甲苯中 30~40 min,再投入二甲苯 2 次或 3 次,每次 15~20 min,至组织透明为止。

### 4. 透蜡

透明后,将组织投入二甲苯:石蜡(1:1)内 20~30 min,然后加入纯蜡。

### 5. 包埋

可用 L 形金属包埋框,但最常用的是纸盒法。

### 6. 修切蜡块、固着蜡块

把包有组织块的长条形蜡块,用单面刀片分割成以组织块为中心的正方形或长方形,然后在蜡块底面(切面)修成以组织块为中心、组织块边距为 2 mm,高 3~5 mm 的正方形或长方形蜡块,把修整齐的蜡块固定于金属台座或木块上。

### 7. 切片

切片的厚度一般为 4 μm。

### 8. 贴片、烤片

贴片可采用水内捞取法;烤片在恒温培养箱内进行。

### 9. 染色(采用间接免疫荧光法)

(1)石蜡切片经常规处理脱水,然后加入 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH=7.2)中充分洗涤。

(2)用吸管或滴管或微量移液器等滴加未标记的经适当稀释的第一抗体液,使其广布于整个组织片表面,将载玻片放入湿盒中,加盖,在 37 °C 下作用 30 min,或在 4 °C 下放置 12~24 h,使其发生抗原抗体反应,弃作用液。

(3)在室温下用 PBS 缓冲液充分洗净,换液 3 次或 4 次,每次 5 min。

(4)滴加荧光素标记的第二抗体液,将标本放入湿盒内,在 37 °C 下作用 30 min,倾去作用液。

(5)用 PBS 缓冲液冲洗 3 次或 4 次,每次 5 min。

(6)甘油缓冲液封固。

(7)用荧光显微镜观察或暂存冰箱内过夜。

#### 10. 镜检

将染色后的标本片置荧光显微镜下观察,先用低倍镜选择适当的标本区,然后换高倍镜观察。以油镜观察时,可用缓冲甘油代替香柏油。

本试验应设以下对照:①自发荧光对照;②荧光抗体对照;③阳性对照;④吸收试验;⑤阻滞试验。

结果判定标准:黄绿色闪光荧光记为“++++”,黄绿色亮荧光记为“+++”,黄绿色荧光较弱记为“++”,仅有暗淡的荧光记为“+”,无荧光记为“-”。

### (七)血清学检查

#### 1. 染色试验(Sabin-Feldman dye tesse,DT)

染色试验原理是活的弓形虫速殖子与正常血清混合,在37℃下作用1h或在室温下放置数小时后,大部分滋养体由原来的新月形变为圆形或椭圆形,细胞质对碱性美蓝具有较强的亲和力而被深染。但当弓形虫与含特异性抗体和补体(辅助因子)的血清混合时,虫体受到抗体和补体的协同作用而变性,对碱性美蓝不着色。计算着色与不着色虫体比例即可判断结果。

##### (1)辅助因子

存在于正常人新鲜血清内,不耐热。用作辅助因子的血清需预先筛选,即将候选血清与弓形虫速殖子混合,在37℃下作用1h后,有90%以上虫体经碱性美蓝染色后,着色者即含有辅助因子(AF)。含辅助因子血清可分装于-20℃下保存备用。

##### (2)抗原制备

弓形虫速殖子经腹腔感染小鼠,3d后抽取小鼠腹腔液,用生理盐水洗涤3次,每次以3000 r/min的转速离心10 min,收集纯净虫体。也可将小鼠腹腔悬液用胰酶消化,经G3砂蕊漏斗或纤维素滤膜过滤纯化,所获虫体用辅助因子血清稀释至每高倍视野50个左右虫体,即为抗原液。

##### (3)美蓝染液

美蓝10g加入95%乙醇溶液100 mL,滤纸过滤,取3 mL加pH=11的碱性缓冲液(0.53%碳酸钠9.73 mL、1.91%四硼酸钠0.27 mL)10 mL。碱性缓冲液临用前配制。

##### (4)待检血清

新鲜血清需经56℃30 min灭活,或直接用生理盐水倍比稀释后,每管0.1 mL,于4℃下保存,次日使用。

##### (5)检测

在稀释血清内每管加上上述抗原悬液0.1 mL,在37℃下孵育1h,滴加美蓝染液0.02 mL/管,继续温育15 min后,自每管取悬液1滴涂片,加盖玻片镜检。

##### (6)结果判定

计算各管不着色虫体的百分比,以50%虫体不着色管的血清稀释度为该份被检血清的最高抗体滴度。一般认为,抗体滴度1:8为隐性感染;1:956为活动感染;1:1024以上为急性感染。

DT 所测抗体是虫体表膜抗原诱导的特异性抗体。本试验易与住肉孢子虫抗血清发生交叉反应;操作中需用活虫;辅助因子血清筛选较烦琐。

## 2. 间接血凝试验(IHA)

### (1) 弓形虫抗原的制备

取小鼠,以碘酒和 70% 的酒精给小鼠腹部皮肤消毒,腹腔接种弓形虫速殖子 0.2 mL (虫数  $10^4$  /mL),4 d 后用乙醚麻醉或颈椎脱臼法处死小鼠,以碘酒和 70% 的酒精消毒腹部皮肤,向腹腔内注入无菌生理盐水(或无菌 pH=7.2 PBS 缓冲液)3~4 mL,轻柔腹壁,再抽取腹腔液,以 2500 r/min 的转速离心 15 min,倾去上清液,在沉淀中加 10 倍 pH=7.2 的 PBS 缓冲液,振荡混匀,在 4 °C 下过夜,再在 4 °C 下以 10000 r/min 转速离心 1 h,取上清液加等量 1.7% 盐水。于 -20 °C 以下保存备用。

### (2) 绵羊红细胞的鞣化

① 绵羊红细胞的采集和处理。以碘酒和 70% 酒精消毒健康绵羊颈部皮肤,用 5 mL 的一次性灭菌注射器采集全血 2~3 mL,快速注入含有 0.2~0.3 mL 5% 的柠檬酸钠的试管内,轻轻摇匀。以 2000 r/min 的转速离心 10 min,加入 0.15 mol/L pH=7.2 的 PBS 缓冲液适量进行洗涤,以 2000 r/min 的转速离心 10 min,再加入 0.15 mol/L pH=7.2 的 PBS 缓冲液适量进行洗涤。如此反复洗涤 3 次,用 PBS 缓冲液配成 2.5% 的红细胞悬液。

② 绵羊红细胞的鞣化。在 2.5% 的红细胞悬液中加入含 1% 鞣酸的 PBS 缓冲液,使鞣酸的终浓度为 1:10000 或 1:20000,在 37 °C 下水浴 15 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,再加 PBS 缓冲液配成 2.5% 鞣化红细胞。

 抗原致敏鞣化的绵羊红细胞。取 2.5% 鞣化红细胞 1 份,抗原液 1 份,pH=6.4 的 PBS 缓冲液 4 份混合,摇匀后在室温下放置 15 min,加 1% 正常兔血清(事先用绵羊红细胞吸收其非特异性凝集素)后,以 2000 r/min 的转速离心洗涤 2 次,再用 PBS 缓冲液配成 2.5% 的红细胞悬液。在 4 °C 下保存备用。

 检血清的采集与处理。取待检血清 0.5 mL 置于试管中,加入 1% 正常兔血清 1.5 mL,56 °C 灭活 30 min,加入未致敏的绵羊红细胞 2 mL,在 4 °C 下过夜。

 接红细胞凝集试验的操作步骤。取处理后的待检血清做倍比稀释,于 96 孔 V 形反应板中每孔加入上述倍比稀释的待检血清 50  $\mu$ L,然后加入致敏的绵羊红细胞悬液 50  $\mu$ L,在 37 °C 下作用 2 h 以上,观察结果。以 1:64 的稀释度出现 50% 凝集者判为阳性,同时设立阳性对照和阴性对照。

 结果判定。红细胞呈膜状均匀沉于孔底,中央无沉点或沉点小如针尖,判为“++++”;红细胞呈膜状沉着,但颗粒较粗,中央沉点较大,判为“+++”;红细胞部分呈膜状沉着,周围有凝集团点,中央沉点大,判为“++”;红细胞沉积于中心,周围有少量颗粒状沉着物,判为“+”;红细胞沉积于中心,周围无沉着物,分界清楚,判为“-”。

以出现“-”孔的血清最高稀释倍数定为本间接血凝试验的凝集效价。小于或等于 1:16 判为阴性,1:32 判为可疑,大于或等于 1:64 判为阳性。

注意事项:兔血清要事先用绵羊红细胞吸收其非特异性凝集素;抗原致敏鞣化的绵羊红细胞,在 6 个月内有效。

### 3. 乳胶凝集试验(LA)

#### (1) 弓形虫抗原的制备

①弓形虫腹水的制备。小鼠是获得弓形虫最为满意的动物模型。小鼠一般在感染速殖子后的4 d左右因发病而死亡。此时速殖子大量繁殖并分散于腹腔液中,在其病死前处死,先注入1 mL灭菌生理盐水,吸出腹腔液,再用生理盐水洗涤1~2次(有出血者弃去),这样可获得大量的速殖子。一般认为感染后3 d内收集腹水最为适宜,此时白细胞数较少,容易纯化。

#### ②速殖子纯化方法

a. 胰蛋白酶消化法。将小鼠腹水以3000 r/min转速离心5 min,弃上清液,加入20倍量体积0.25%的胰蛋白酶消化液,在37℃下消化30 min,PBS缓冲液离心、洗涤3次,沉淀再重复消化洗涤1次,取滤液置于白细胞计数板上镜检,对弓形虫速殖子、白细胞进行计数。

b. 微孔滤膜过滤法。将小鼠腹水以3000 r/min的转速离心5 min,弃上清液,加入适量PBS缓冲液,制成虫体悬液,将此悬液加入装有直径为3 μm微孔滤膜的滤器,收集滤液,取滤液置于白细胞计数板上镜检,对弓形虫速殖子、白细胞进行计数。

c. 植物血凝素(PHA-P)法。将小鼠腹水以3000 r/min的转速离心5 min,弃上清液,加入适量PBS缓冲液,制成虫体悬液,然后加入植物血凝素,使植物血凝素的终浓度为0.005%。在室温下放置30 min。尼龙纱布过滤,取滤液置于白细胞计数板上镜检,对弓形虫速殖子、白细胞进行计数。

选择虫体回收率、白细胞清除率高及非特异性可溶性蛋白少的纯化方法作为抗原纯化方法。

③弓形虫抗原的制备。取纯净的弓形虫速殖子,加灭菌双蒸水,混匀,经超声波粉碎或反复冻融5次,以10000 r/min的转速离心30 min,取上清液加等量1.7%氯化钠溶液即为可溶性抗原。

#### (2) 胶乳及胶乳抗原制备

##### ①羧化聚苯乙烯胶乳及其衍生物的制备。

a. 羧化聚苯乙烯胶乳制备。在苯乙烯的乳液聚合过程中加入丙烯酸单体,可获得带有羧基的聚苯乙烯胶乳。各组分的重量比为:水:苯乙烯:丙烯酸=180:20:0.9,引发剂为过硫酸钾,乳化剂为10~14烷基苯基磺酸钠。应用上述方法所制备的羧化胶乳的浓度约为0.5%,直径为0.5~0.6 μm,为较适宜的胶乳颗粒大小。

b. 羧化聚苯乙烯衍生物制备。为提高胶乳颗粒结合蛋白分子的反应能力,可通过碳化二亚胺反应,将ε-氨基己酸与胶乳相连接,即为羧化聚苯乙烯衍生物。

c. 胶乳抗原制备。通过碳化二亚胺反应,将弓形虫抗原的氨基与羧化聚苯乙烯胶乳衍生物的末端羧基相连接。交联时,抗原浓度为0.3 mg/mL,室温反应2 h。离心洗涤后,悬浮于含0.1%叠氮钠的0.05 mol/L pH=7.6磷酸盐缓冲液中,即为胶乳抗原。它的胶乳浓度为10 mg/mL。这种颗粒型抗原保存于4℃下备用。

②重氮胶乳抗原制备。先将5%氨基聚苯乙烯胶乳重氮化,然后使重氮胶乳在酸性条件下,加入等容积抗原。置37℃下缓慢搅拌10 h,以8000×g离心10 min,去上清液。



抗原容积 1/2 加入 20% 间苯二酚 (0.2 mol/L pH=8.3 的 GBS), 混合后, 静置 2 h, 用上述 GBS 以  $8000\times g$  离心 10 min, 共 3 次, 最后制成 2% 胶乳抗原, 并加硫柳汞防腐, 保存于 4 °C 下, 备用。临用前加等体积 pH=7.4 的 PBS, 使成 1% 浓度, 用于检测。

### (3) 操作方法

吸取已用生理盐水按 1:10 稀释的待检血清 50  $\mu\text{L}$ , 置于胶乳试验玻璃板上, 加入胶乳抗原 50  $\mu\text{L}$ , 轻轻摇动, 使其充分混匀, 5 min 后观察反应结果。每次检测时, 均用阴性和阳性参考血清做对照。凡 LA 阳性者的血清, 应进一步做倍比稀释, 以确定其抗体滴度。

### (4) 反应标准

阳性反应: 呈现清晰的凝集颗粒; 阴性反应: 不呈现凝集颗粒。

胶乳抗原保存于 4 °C 中, 避免冰冻, 有效期可达 1 年。试验时, 将反应板摇动后, 若发现待测样本相互弥混者, 需重做。观察反应结果时, 应在光亮处进行。

## 4. 琼脂扩散实验

### (1) 抗原制备

参照胶乳凝集试验弓形虫抗原的制备。

### (2) 操作方法

取琼脂 1 g, 加生理盐水 100 mL, 在沸水浴中溶解, 待稍冷时倒入玻璃培养皿, 制成 3 mm 厚度, 冷却后用打孔器在琼脂上打孔, 孔排列成梅花状, 即中间 1 个孔, 周围 6 个孔, 中央孔与周围各孔间距离均为 3 mm, 周围各孔间相互距离大致相等。然后将培养皿在酒精灯上加热, 使其底部琼脂略有溶解, 以便使孔周围琼脂与培养皿底紧密黏合。在中央孔中加满抗原, 周围孔中加满待检血清, 每孔 1 份血清, 盖上皿盖, 置于 37 °C 恒温培养箱中 1~2 d, 取出在深色背景前和斜射照明下观察中央孔与周围孔间有无白色沉淀线。

### (3) 结果判定

待检血清孔与中央孔间有白色沉淀线时, 判为阳性; 无时为阴性。

## 5. 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA)

(1) 弓形虫抗原的制备。参照胶乳凝集试验弓形虫抗原的制备。

### (2) 实验步骤

① 包被。以 pH=9.6 的碳酸盐缓冲液稀释已知抗原 (常用 5~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。每孔 100~200  $\mu\text{L}$  (包被反应板), 在 37 °C 湿盒温育 2~3 h 或在 4 °C 下过夜。

② 洗涤。弃去包被液, 反应板用 0.1 mol/L pH=7.4 的 PBS 缓冲液、吐温-20 液冲洗 3 次, 每次 3 min, 甩干。

③ 封闭。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  封闭液进行封闭, 在 37 °C 下作用 1 h, 甩去孔底液体, 用 PBST 液洗涤 3 次, 每次 3 min。

④ 加被检动物血清。用血清稀释液稀释血清 (起始浓度大于 1:100), 每孔 100~200  $\mu\text{L}$ , 在 37 °C 下孵育 1 h。弃去孔底液体, 如上洗涤。

⑤ 加酶结合物。甩干后加稀释的酶结合物, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 在 37 °C 下孵育 1 h。

⑥ 加底物显色。如上冲洗甩干反应板, 即刻加入新配制的底物溶液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 置于暗盒在 37 °C 下显色 20 min。

⑦终止反应。HRP-OPD 系统每孔加入 2 mol/L  $H_2SO_4$  50  $\mu L$ 。

⑧结果判定。目测或用酶标检测仪在 490 nm 波长段测定 OD 值。

每块板均设阳性对照、阴性对照各两孔和空白对照一孔,以空白对照孔调零,于 490 nm 波长处测定 OD 值。如样品 OD 值/阴性对照值大于或等于 2.1,则判定为阳性;如样品 OD 值/阴性对照值小于 2.1,则判定为阴性。

## 6. ABC-ELISA

### (1) 弓形虫抗原的制备

参照胶乳凝集试验弓形虫抗原的制备。

### (2) 生物素标记羊抗人 IgG

羊抗人 IgG 血清经 50% 和 33% 饱和硫酸铵各盐析一次,收集  $\gamma$ -球蛋白部分,透析后测定蛋白质含量。临用前,以 0.1 mol/L 的  $NaHCO_3$  配成 1 mg/mL 的浓度。将生物素用 N-羟基丁二酰亚胺进行酯化反应,生成酯化生物素,然后用二甲基甲酰胺配成 10 mg/mL 浓度以每毫克抗球蛋白加 0.2~0.4 mg 酯化生物素的比例,将酯化生物素二甲基甲酰胺溶液加于羊抗人 IgG 中,振荡混匀 10 min,置于室温中 3~4 h,然后用 PBS 缓冲液透析 24 h,多次换液后,即为生物素标记物,保存备用。

### (3) 生物素标记辣根过氧化物酶

按上述生物素标记羊抗人 IgG 方法,制备生物素标记酶(HRP-Bio)。

### (4) ABC 溶液配制

在 PBST 液中,分别加入生物素和 HRP-Bio,使各自的最终浓度为 8~12  $\mu g/mL$  和 3~4  $\mu g/mL$ ,置于室温中混匀 20~30 min,即可应用。通常在临用前 30 min 配制。

### (5) 操作方法

在已包被抗原的 40 孔反应板凹孔中,加待检血清,如间接 ELISA 法孵育、洗涤后,加 biotin-IgG,如上法孵育、洗涤,再加 ABC 洗涤,在 37  $^{\circ}C$  下作用 15 min,洗涤后加底物(邻苯二胺),置于 37  $^{\circ}C$  下作用 10~15 min,最后用 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应,用酶标检测仪测定待检血清 OD 值。检测时每一待检血清做 2 份,求得均值。

### (6) 反应标准

以健康人测得的 OD 均值,加 2 个标准差作为标准值(N)。求每一待检血清的 OD 值(P 值)与 N 值的比值。以  $P/N \geq 1.5 \sim 2.0$  作为阳性,否则为阴性。

## 7. 免疫金银染色法(immunogold-silver staining, IGSS)

### (1) 固相抗原制备

取弓形虫,充分洗涤后,做成石蜡切片用于试验。

### (2) 金标记抗体的制备

①金溶液制备。煮沸 220 mL 双蒸水,加入 2.8 mL 新鲜配成的 1% 柠檬酸钠溶液,然后在剧烈搅拌下加 0.5 mL 4%  $HAuCl_4$  溶液,搅拌 30 min,即可获得大颗粒(20~40 nm)金溶胶,它的最大吸收峰为 528nm。这种规格的金溶胶适用于光镜和扫描电镜。

### ②金溶胶标记兔抗人 IgG

a. 金标记兔抗人 IgG。将 10 mL 金溶胶置于容器中,在磁力搅拌下,加入 66  $\mu g$  兔抗人 IgG,10 min 后,加 5% 牛血清白蛋白(BSA)溶液 2 mL,使其最终浓度为 1%,然后将标

记物进行纯化。

#### b. 标记物纯化

(a) 凝胶过滤法。将上述标记物移入透析袋,用 PEG(相对分子质量 20000)浓缩至原容积的 1/10,置于 4 °C 下以 8000 r/min 的转速离心 15 min,将上清液装于 0.8 cm×20 cm 聚丙烯葡聚糖凝胶(sephaCrylS-400)中,用 0.02 mol/L pH=8.2 TBS 缓冲液充分平衡后,再用含 1%BSA-TBS 缓冲液洗涤,以稳定金溶胶作用。用含 0.1%BSA 的 TBS 缓冲液洗脱,流速为 2 mL/15 min,分管收集,每管 4 mL/30 min。层析柱分为 3 个区带:下端是微黄色区带,为最先流出的大颗粒聚合物杂质;中间是明亮深红色带,即为金标记抗体,上端为含未标记蛋白的黄色区带。收集中间数管深红色洗脱液,即为标记物。

(b) 离心法。先将上清液低速离心,除去在制备过程所形成的可见聚合物,然后将上清液以 60000 r/min 的转速离心 1 h,收集 5 nm 大小的金颗粒,或用 14000×g 离心 1 h,收集 20~40 nm 大小的金颗粒。用 1%BSA-TBS 缓冲液将收集的金颗粒做 1:20 稀释时,在 520 nm 波段测定不同大小金颗粒的 OD 值为:5nm、20 nm 和 40 nm 金颗粒分别为 0.25、0.35 和 0.5。用比色法可鉴定金颗粒的质量。

#### (3) 操作方法

将切片抗原置于 0.5 mol/L、pH=7.4 的 TBS 中作用 200 min,洗涤后,加 10%兔血清 A 液,10 min 后弃去,加入已稀释的待检血清,置于 37 °C 下作用 2 h 或 4 °C 下作用 20 h,用 0.5 mol/L、pH=7.4 的 TBS 液洗涤 3 次,每次 5~10 min,用 0.02 mol/L、pH=8.2 的 TBS 液洗涤 5~10 min。再加 10%兔血清 B 液,5~10 min 后弃去,加 1:10 稀释的金标记抗体,于 37 °C 下作用 1 h,用 0.02 mol/L、pH=8.2 的 TBS 液洗涤 3 次,每次 5~10 min,再用双蒸水如上法洗涤 3 次。然后在避光条件下,于显影液 A 液中作用 3~5 min,再于混合液(显影液 A 液 85 mL 加 B 液 15 mL)中染色 5~10 min,用蒸馏水冲洗,吹干后,在光镜下检查反应结果。

#### (4) 反应标准

虫体切面呈无色或淡棕色即为阴性反应;虫体切面呈褐黑色即为阳性反应。

### 8. 间接辣根过氧化物酶免疫组化方法

#### (1) 病料采集

采集心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、肺门淋巴结、肠系膜淋巴结等组织,厚度 3~4 cm,置于 10%中性福尔马林中固定。

#### (2) 石蜡切片的制作

组织块经过修整、70%~100%系列酒精脱水、二甲苯透明、透蜡和包埋,制成蜡块后进行切片,切片厚度约 5 μm。

#### (3) 兔抗弓形虫抗体的制备

①参照胶乳凝集试验弓形虫抗原的制备。

②家兔免疫。取健康家兔,首次在家兔两后脚足垫部注射 0.5 mL 弗氏完全佐剂进行基础免疫,2 周后进行抗原免疫,每只家兔用抗原 0.4 mL 加等体积弗氏完全佐剂充分乳化后,在家兔两后脚足垫部注射。1 周后,进行第 2 次免疫,每只家兔用抗原 0.4 mL 加等体积弗氏不完全佐剂充分乳化后,在家兔踝淋巴结注射免疫。又过 1 周后,进行第 3 次

免疫,操作与第2次免疫相同,免疫1周后,取兔耳静脉血1 mL离心。分离血清,用琼脂扩散试验测定免疫血清效价,若血清效价在1:8以上,最后在兔耳静脉注射0.2 mL抗原进行强化免疫,4 d后,心脏采血,分离血清,于-20℃下保存。

③抗体粗提。免疫血清加等量pH=7.0~7.2的0.01 mol/L PBS缓冲液,滴加饱和硫酸铵溶液至50%浓度,静置3~4 h后,以4000 r/min的转速离心15 min,倾去上清液,沉淀物加PBS缓冲液至原血清量,再以33%饱和硫酸铵重复离心3次,每次静置30 min,以4000 r/min的转速离心15 min,最后的沉淀物加少量的PBS缓冲液洗涤,装入透析袋中,袋口严密扎紧,先用自来水流动透析5 min左右,再置于生理盐水或pH=7.4的0.01 mol/L PBS缓冲液中透析72 h,透析液的量至少相当于蛋白溶液的100倍以上,期间换透析液3次。透析情况以1%氯化钡溶液和纳氏试剂检查,要求完全去除硫酸盐和铵离子,必要时可通过葡聚糖G50去除。粗提后血清在-20℃下保存备用。

#### (4) 苏木素-伊红染色(HE染色)

切片烘烤后,经过二甲苯脱蜡,高浓度到低浓度系列酒精脱二甲苯,水洗,再用HE染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察结果。

#### (5) 组织切片辣根过氧化物酶染色方法操作步骤

采集组织,置于10%福尔马林中固定,梯度酒精脱水(浓度由高到低),二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片4 μm,烘片,脱蜡,水洗后在4℃下保存备用。用含0.5%过氧化氢的甲醇处理30 min,0.1%胰蛋白酶消化10 min,滴加1%BSA封闭液,37℃湿盒内封闭30 min,加兔抗弓形虫抗体,37℃湿盒温育1 h,洗涤3次,每次5 min,加酶标记二抗,37℃湿盒温育1 h,洗涤3次,每次5 min,加DAB避光显示反应5~8 min,置于蒸馏水浸洗,苏木素衬染,中性树脂封片,光镜下观察结果。

#### (6) 结果判定

在被检动物的多个组织内观察到被染成棕褐色弓形虫速殖子存在于巨噬细胞或组织细胞中,形成假包裹。在组织的坏死区内或周围可见散在的游离于组织内被染成棕褐色的单个或成对存在的弓形虫速殖子。

切片经烘片、脱蜡、水洗后置于4℃下保存备用;滴加封闭液,置于湿盒内封闭后,只将封闭液甩掉,但不进行洗涤。

### 9. 荧光抗体试验(FA)

#### (1) 直接荧光抗体试验

##### ① 标本制备

a. 切片制备。取被检动物腹股沟淋巴结压印片,冷丙酮在4℃下固定10 min。

b. 洗涤。将固定好的压印片用0.01 mol/L、pH=7.2~7.4的PBS缓冲液漂洗5次,每次3 min,吹干。

##### ② 直接染色

a. 在压印片上滴加用0.01 mol/L、pH=8.0的PBS缓冲液稀释的1:16荧光标记的特异抗体。

b. 放于湿盒内,在37℃下孵育30 min。

c. 用0.01 mol/L、pH=7.2~7.4的PBS缓冲液漂洗5次,每次3 min,吹干。

d. 用 0.01%伊文思兰液复染,在滴加后立即洗去,并吹干。

e. 载玻片上加缓冲甘油并覆以盖玻片封片。

f. 置于荧光显微镜下立即观察。

g. 结果判定标准:黄绿色闪光荧光记为“++++”,黄绿色亮荧光记为“+++”,黄绿色荧光较弱记为“++”,仅有暗淡的荧光记为“+”,无荧光记为“-”。

(2)间接荧光抗体试验。

#### ①标本制备

a. 切片制备。将冰冻的被检动物腹股沟淋巴结进行切片,冰冻切片置载玻片上,以

-30℃丙酮在 4℃下固定 30 min。

b. 洗涤。将固定好的切片以 PBS 缓冲液漂洗 5 次,每次 3 min。

#### ②间接染色

a. 一抗作用。在晾干的标本片上滴加弓形虫抗体,置于湿盒中,在 37℃下作用 30 min。

b. 洗涤。以吸管吸取 PBS 缓冲液冲洗标本片上的弓形虫抗体,后置于大量 PBS 缓冲液中漂洗 5 次,每次 3 min。

c. 二抗染色。滴加荧光抗体,置于湿盒中,在 37℃下染色 30 min。

d. 洗涤。以吸管吸取 PBS 缓冲液冲洗标本片上的荧光抗体,后置于大量 PBS 缓冲液中漂洗 5 次,每次 3 min。

e. 晾干。将标本片置于晾片架上晾干。

f. 镜检。将染色后的标本片置荧光显微镜下观察,先用低倍镜选择适当的标本区,然后换高倍镜观察。以油镜观察时,可用缓冲甘油代替香柏油。

本试验应设以下对照:①自发荧光对照;②已知阳性对照;③已知阴性对照。

结果判定:同直接荧光抗体试验。

### 10. 皮内试验

(1)弓形虫变应原的制备。用人工感染弓形虫的小白鼠,收集其含有弓形虫的腹水,以离心法将虫体浓集,将虫体充分洗净,冷冻干燥,研磨成粉,加生理盐水 100 倍稀释,加入防腐剂(0.01%硫柳汞)。浸液应不断搅动,在冰箱中冷浸需 3~7 d,而后离心沉淀,取其上清液,用蔡氏滤器除菌或间歇法灭菌。滤出液即可作为变应原。

(2)皮内反应。用灭菌生理盐水将干燥的弓形虫变应原稀释成 300~500 倍后,以 1 mL注射器注射于猪的耳根部皮内 0.2 mL,同时于另一侧耳根部皮内注射生理盐水 0.2 mL作对照;在注射后的 48 h 观察其皮肤反应,当红肿面直径超过 15 mm 时为阳性,10~15 mm 时为疑似,9 mm 以下时为阴性。

本反应只在猪患本病的晚期才呈现,因此本法仅适用于流行病学调查,以查出慢性及隐性弓形虫病。

## (八)聚合酶链式反应(PCR)

### 1. 被检动物血清和组织样品的采集

采集肺和肺门淋巴结。

## 2. 被检动物组织内模板 DNA 的制备

取肺和肺门淋巴结组织各 1 g, 去掉筋膜, 剪碎, 加入 1 mL SDS 裂解液, 以匀浆器研磨成细胞匀浆, 加入蛋白酶 K 使其终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 55  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 2 h, 不时地摇振。取出水浴中的指形管, 加等体积饱和酚-氯仿-异戊醇, 上下缓慢颠倒 10 次, 室温下, 以 12000 r/min 的转速离心 5 min。吸取上层液, 置于另一指形管中, 加入等体积氯仿-异戊醇, 轻轻混匀, 以 12000 r/min 的转速离心 5 min。吸取上层液, 置于另一指形管中, 加入等体积氯仿, 轻轻混匀, 以 12000 r/min 的转速离心 5 min。吸取上层液, 置于另一指形管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下作用 15 min 以上, 沉淀 DNA。取出指形管, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 12000 r/min 的转速离心 2 min, 吸出上清液, 加入 70% 乙醇至管的 2/3 体积, 轻弹指形管混匀。在 4  $^{\circ}\text{C}$  下, 以 12000 r/min 的转速离心 2 min, 吸去上清液。将 DNA 沉淀溶于 30  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液中, 加 1  $\mu\text{L}$  RNA 酶。此 DNA 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  在保存备用。

## 3. 引物设计

(1) 据 Burg 提供的 B1 基因设计并合成引物: 上游引物 1: 5'-GGAAGTGCAT CCGTTCATGAG-3' (694~714bp) 和下游引物 2: 5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3' (887~868bp)。该引物扩增片段长度为 194bp。

(2) 据 Ellis JT 的报告设计并合成引物: 上游引物为 5'-CGCTGCAGGGA GGAAGACGAAAGTTG-3'; 下游引物为 5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'。该引物来自弓形虫基因组 DNA, 具有 200~300 个拷贝的片段, PCR 产物的长度为 529bp。

## 4. 双重 PCR 扩增

先用 3.1 引物扩增, 然后以 3.1 引物扩增出的 DNA 片段为模板, 3.2 为引物, 继续扩增。

(1) PCR 反应体系总体积 50  $\mu\text{L}$ , 内含 10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , 补充去离子水至 50  $\mu\text{L}$ 。

(2) 反应参数。上述反应混合物于 94  $^{\circ}\text{C}$  下作用 7 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  下作用 45 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  下作用 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  下作用 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  下作用 7 min。

(3) 反应完毕, 取 7  $\mu\text{L}$  PCR 反应液于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。每次试验分别设置阳性对照, 即模板 DNA 是已知弓形虫 DNA, 阴性对照即模板 DNA 是已知非弓形虫 DNA, 以及空白对照即不加任何模板 DNA。用凝胶成像系统观察记录结果。观察有无目的条带存在。

# 五、实训结果与考核

## (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分, 其中过程考核占 30%, 结果考核占 70%。

## (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握弓形虫的直接血液涂片检查技术、集中检查技术、动物接种、体外培养、血清学检查技术、PCR检查技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握弓形虫的直接血液涂片检查技术、集中检查技术、动物接种、体外培养、血清学检查技术、PCR检查技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握弓形虫的直接血液涂片检查技术、集中检查技术、动物接种、体外培养、血清学检查技术、PCR检查技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 第四部分 禽寄生虫病实训

本实训中禽以家禽(鸡)为例。

### 实训一 禽消化系统寄生虫的检查

#### 一、实训目的及要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握粪便检查的方法,并能在显微镜下辨别家禽粪便中的各类蠕虫卵、球虫卵囊、隐孢子虫卵囊、组织滴虫等,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告;同时培养学生自我学习、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、烧杯(或塑料杯)、眼科镊(或竹签或火柴棍)、试管、试管架、直径5~10 mm的铁丝圈、离心管、玻棒、40目(或60目、100目、150目、200目)铜筛(或纱布)、胶头滴管、瓷盆、解剖针、毛笔、黑色浅盘、培养皿、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、1.5 mL离心管、10 mL离心管、50 mL离心管、100 mL球状烧瓶、100 mL量筒、200  $\mu$ L微量移液器及配套吸头、Stool DNA Kit全粪便DNA提取试剂盒、麦克马斯特氏虫卵计数板、计数器、托盘天平、显微测微尺、特制球状烧瓶(或大的试管或小三角烧杯)、300 mL容量瓶、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、碳酸盐缓冲液(CB)、牛血清白蛋白、生理盐水、液氮、氯化钠、Tris、盐酸、十二烷基硫酸钠(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、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、上下游引物、TaqDNA聚合酶、灭菌双蒸水、硫酸锌、碘、碘化钾、伊红等。

#### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订禽消化系统寄生虫的检查方案,并经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) 家禽消化系统蠕虫的检查。
- (3) 家禽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

根据养禽场禽的规模、年龄等不同进行粪便的采集。采样时根据其饲养密度每架采集 3 份样品, 每份样品包含粪板四边及中间 5 个部分的粪便。每份采集 100 g, 装入干净塑料袋中, 做好标记和编号后, 带回实验室, 置于 4 °C 冰箱中保存待检。

### (二) 家禽消化系统蠕虫的检查

#### 1. 直接涂片法

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。

#### 2. 沉淀法

##### (1) 自然沉淀法

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 处, 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, 最后倾去上清液, 吸取沉渣涂于载玻片上, 镜检。

##### (2) 离心沉淀法

取 5 g 左右被检粪便, 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 1500 r/min 的转速离心 3 min, 最后倾去管内上层液体, 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。

#### 3. 漂浮法

##### (1) 试管漂浮法

取新鲜待检粪便 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

取新鲜待检粪便约 5 g, 置于烧杯内, 加入少量饱和食盐水, 充分搅拌; 待粪与食盐水

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,则虫卵上浮;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. 淘虫法和虫体观察法

对于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。对于较小的虫体或节片,可将粪便置于瓷盆中,加入 5~10 倍量的自来水或生理盐水,彻底搅拌后静置 10 min,然后倾去上层透明液体,重新加入清水搅拌,静置,如此反复数次,直到上层液体透明为止。最后倾去上层透明液体,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。

#### 5. 局部剖检检查

把消化道分为食管、嗉囊、肌胃、腺胃、小肠、盲肠、直肠等部位,各段进行两端结扎,分别进行寄生虫的检查。

嗉囊的检查:剪开囊壁后,倒出内容物做一般眼观检查,然后把囊壁拉紧透光检查。

肌胃的检查:切开胃壁,倒出内容物,做一般检查后,剥离角质膜再做眼观检查。

小肠的检查:剪开肠壁后,洗出内容物,反复沉淀后取沉渣做眼观检查。

盲肠的检查:剪开肠壁后,洗出内容物,反复沉淀后取沉渣做眼观检查。

禽类消化系统的蠕虫主要有棘口科吸虫、台湾次睾吸虫、东方次睾吸虫、鸭对体吸虫、鸡后口吸虫、四角赖利绦虫、棘沟赖利绦虫、有轮赖利绦虫、节片戴文绦虫、鸡蛔虫、异刺线虫、毛细线虫、小钩锐形线虫等。

图 4-1-1 所示为鸡肠道中的绦虫虫体示意图。



图 4-1-1 鸡肠道中的绦虫虫体

### (三)禽消化系统原虫的检查

#### 1. 球虫卵囊的检查

(1)分离粪便中的卵囊较多采用饱和食盐水溶液漂浮法和离心法,也可用饱和硫酸镁

溶液和饱和蔗糖溶液。

(2)用铬硫酸分离法分离肠内容物、肠黏膜组织、肾组织中的卵囊。

①铬硫酸溶液的制备。先配好20%的重铬酸钠溶液100 mL于500 mL锥形瓶中,然后在冰浴条件下逐渐加入浓硫酸100 mL,边加边充分搅拌。用玻璃过滤器或离心方法除去其他结晶,即为所需铬硫酸溶液。

②卵囊的分离

a. 将组织或肠内容物放在研钵中充分研碎,加水充分搅拌后以1500 r/min的转速离心5 min。

b. 向沉淀物中加入4~5倍铬硫酸溶液,冰浴条件下充分搅拌,然后立即以1500 r/min的转速离心5 min。

c. 将浮液中的卵囊用胶头滴管吸出,加入20倍以上的冰水,以1500 r/min的转速离心5 min,沉淀物即为卵囊。

(3)蛋白酶消化法

在分离组织中的卵囊时,常有许多组织碎块或细胞团块混杂于卵囊中或黏附在卵囊壁上。在捣碎的组织中加入0.5%~1%胃蛋白酶,将pH值调到8.0,在39℃下消化20 min;或者加入0.2%胃蛋白酶,将pH值调至2.0,在39℃下消化1 h,使卵囊分散游离出来,再依次用200目、300目和400目网筛过滤,滤液以2000 r/min的转速离心10 min,倾去上层液体,在沉淀中加入1 mol/L蔗糖溶液,以2000 r/min的转速离心10 min,离心管上层漂浮的白色似“塞子状”的物质即为卵囊。将其移入装有0.5 mol/L蔗糖溶液的小离心管中,以2000 r/min的转速离心10 min,重复几次充分洗涤除去密度较小的杂质,然后加入5%次氯酸钠,在4℃下作用10 min,最后在0.5 mol/L蔗糖溶液中离心洗涤,除去小的杂质和次氯酸钠,即可得纯化的未孢子化卵囊。

若要对不同种类的球虫进行鉴别,需孢子化后再行观察。可取5~10 g新鲜待检粪便,加适量饱和食盐水,充分搅拌均匀,用40目(或60目)铜筛或双层纱布过滤,将滤液倒入离心管中,置于离心机内,以2000 r/min的转速离心6 min,吸取上层液体到另一干净烧杯中,加入10倍体积以上的自来水,混匀,以3000 r/min的转速离心6 min,弃上清液,加2.5%的重铬酸钾溶液,在25~28℃的恒温培养箱中培养1~7 d,待其孢子化。此间每日应对培养液轻轻搅拌3~5次,并观察孢子发育情况,当有80%以上的卵囊完成孢子化时,停止培养。

依据资料进行球虫种类鉴定。取孢子化后的卵囊液制片后,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。每份粪样测量50个卵囊。

2. 隐孢子虫的检查

(1)虫体检查

①饱和蔗糖离心漂浮法

每份待检粪样取5~10 g,加适量自来水,搅拌均匀,用80目铜筛过滤,将滤液倒入离心管中,以3000 r/min的转速离心10 min,倾去上层液体,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检查。

火鸡隐孢子虫(*Cryptosporidium meleagridis*)卵囊近似圆形,大小为 4~5  $\mu\text{m}$ ,卵囊形态指数为 1.10 左右,卵囊壁薄、光滑、透明无色,内有 1 个残体和 4 个呈淡黄色的香蕉状子孢子,无微孔和极粒。

贝氏隐孢子虫(*Cryptosporidium baileyi*)卵囊呈长椭圆形、近圆形等,大小为(5.5~7.7) $\mu\text{m}$ ×(4.2~5.5) $\mu\text{m}$ ,形状指数为 1.31。

### ②改良抗酸染色法

为了进一步验证隐孢子虫检查的准确性,对于饱和蔗糖溶液漂浮法检查阳性的样品,取 5 g 被检新鲜粪样于烧杯中,加入 10 倍体积的水,搅拌均匀,经双层纱布过滤,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 1 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 10 min,自然干燥后滴加石碳酸复红溶液于粪膜上,染色 5~10 min,清水冲洗,滴加 10% 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,自然干燥后在油镜下检查。

经染色后,隐孢子虫卵囊呈鲜艳的玫瑰红色,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。子孢子呈月牙形,但排列多不规则。

### ③结果判定及标准

镜检过程中无隐孢子虫卵囊为阴性,记为“—”;见隐孢子虫卵囊者为阳性并判定其感染强度。饱和蔗糖溶液漂浮法 400× 镜检 30 个视野,隐孢子虫卵囊不足 5 个为“+”,5~10 个为“++”,超过 10 个为“+++”。

1000× 油镜下,用显微测量尺测量 50 个隐孢子虫卵囊大小,以长轴与短轴长度的比值计算卵囊指数。同时根据隐孢子虫卵囊形态、结构和大小进行虫种初步鉴定。

### (2)PCR 检查

#### ①卵囊的初步纯化

采用饱和蔗糖溶液漂浮法富集隐孢子虫卵囊。向阳性样品中加入适量的水,搅拌均匀,用 80 目铜筛过滤,滤液分装至 50 mL 的离心管中,以 3000 r/min 的转速离心 10 min;弃上清液,留沉淀,向离心管中加入适量的饱和蔗糖溶液,将沉淀与饱和蔗糖溶液充分混匀,以 3000 r/min 的转速离心 10 min;用自制的铁丝环蘸取蔗糖表面漂浮液,在装有自来水的烧杯中涮洗,如此反复操作数次,尽可能地将表层富集的卵囊全部收集至烧杯中,将烧杯中的卵囊悬浮液分装至离心管中,以 3500 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液,留沉淀;将沉淀保存于 2.5% 的重铬酸钾溶液中,放置在 4 °C 冰箱,待用。

#### ②卵囊的纯化

将保存在 2.5% 的重铬酸钾溶液中的隐孢子虫卵囊从 4 °C 冰箱中取出,分装至 50 mL 的离心管中,加入适量的蒸馏水,以 3000 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液,留沉淀,反复操作 2~3 次,直至把重铬酸钾洗净。对阳性样品分离株卵囊进行蔗糖密度梯度离心。在 50 mL 离心管中加入 15 mL 1:2 蔗糖溶液,在其上面小心加入 15 mL 1:4 蔗

糖溶液,再按同样的方法加 5 mL 的卵囊溶液,以 3500 r/min 的转速离心 15 min;用微量移液器小心吸取最上层的水层和 1:4 蔗糖溶液层,弃去,将 1:2 蔗糖溶液与 1:4 蔗糖溶液交界处的卵囊层吸取至另一个新离心管;加入足量的蒸馏水,以 3000 r/min 的转速离心 10 min,重复操作 2~3 次,直至把蔗糖溶液洗尽。

### ③卵囊基因组提取

将纯化的卵囊液装入冻存管内,放入液氮中冻融 5 min,然后迅速转移至 65 °C 的水浴锅内,如此反复操作 3 次。将冻融后的卵囊液以 12000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,留沉淀用试剂盒进行基因组提取。加入 180  $\mu$ L 的 Buffer GL,20  $\mu$ L 的蛋白酶 K 和 10  $\mu$ L 的 RNaseA(10 mg/mL),于 56 °C 下水浴 3 h,在水浴过程中常将样品取出进行振荡以加速裂解,直至组织完全裂解。向裂解液中加入 200  $\mu$ L Buffer GB,充分混匀。将溶液移收集管中,以 12000 r/min 的转速离心 1 min,弃滤液;将 500  $\mu$ L 的 Buffer WA 加入至收集管中,以 12000 r/min 的转速离心 1 min,弃滤液;将 500  $\mu$ L 的 Buffer WB 沿收集管管壁四周加入至收集管中,以 12000 r/min 的转速离心 1 min,弃滤液;重复上一步操作 1 次,将收集管安置于 1.5 mL 离心管上,以 12000 r/min 的转速离心 2 min;将收集管安置于新的 1.5 mL 离心管上,在收集管膜的中央处加入 50~200  $\mu$ L 的灭菌水或 EB,室温静置 5 min;以 12000 r/min 的转速离心 2 min,以洗脱 DNA。离心管中的液体即为提取到的基因组 DNA。

### ④引物设计

根据隐孢子虫 GP20 基因序列设计保守引物 GP20F(5'-CAATCGAATTGGA TTCTTTGGT-3')/GP20R(5'-CACCTTCAAATACTTGAATAAGT-3')和禽源隐孢子虫特异性引物 GP20S(5'-GCTACTGGACATCGGGTTGGAGTAC-3')/GP20N(5'-CATTTCGAACTCCCCAAACC-3')。预期内套扩增片段大小为 496bp。

### ⑤巢氏 PCR 退火温度的优化

第 1 次 PCR 反应(引物对 GP20F/GP20R),以提取的基因组 DNA 为扩增模板,按 25  $\mu$ L 反应体系进行扩增,反应参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,循环 39 次;最后 72 °C 延伸 5 min。第 2 次 PCR 反应(引物对 GP20S/GP20N)50  $\mu$ L 体积反应体系,反应参数:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,50~60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,32 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

### ⑥结果检测

取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,观察有无目的条带存在。

## 3. 组织滴虫的检查

### (1)盲肠黏膜刮取物检查

剪开盲肠除去内容物及肠黏膜的坏死痂皮,取盲肠黏膜表面刮取物于载玻片上,滴加 38~40 °C 的生理盐水稀释,盖上盖玻片后显微镜下检查,观察到虫体即可确诊。

组织滴虫虫体呈不规则圆形,直径为 5~30  $\mu$ m,胞质中央或偏侧有一层折光性的囊泡状核。有 1 根鞭毛,做钟摆样运动。

### (2)肝组织涂片检查

取肝组织涂片,用姬姆萨染液染色,干燥,镜检。阳性样本可见虫体呈圆形,淡玫瑰

色,有细胞质和细胞核。大小为 15~20  $\mu\text{m}$ 。

### (3)组织学观察

将死禽剖检后取出有典型病变的肝脏、盲肠置 10% 的中性福尔马林液中固定 48 h,经流水冲洗、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、透蜡、常规石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  切片,HE 染色,脱蜡,封固,显微镜检查,观察到虫体即可确诊。

阳性样品可见盲肠黏膜充血、出血,上皮细胞脱落,有纤维素性物质渗出,固有层可见有红色圆形或椭圆形虫体,并见淋巴细胞、异嗜粒细胞和巨噬细胞浸润。病变严重部位,可在肌层内发现含虫体的病灶。肝脏可见坏死灶中心部的肝细胞坏死、崩解形成均质团块,外围区域的肝细胞排列紊乱,肝细胞变性、坏死和崩解,其间有大量虫体分布和巨噬细胞,并有淋巴细胞浸润,巨噬细胞的胞浆内有组织滴虫。

### (4)PCR 检查。

#### ①DNA 提取。

在无菌条件下,将肝脏、盲肠内容物研磨,纱布过滤除去未研磨碎的组织块,用常规方法提取鸡组织滴虫 DNA。测定浓度后置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

#### ②PCR 检测。

根据鸡组织滴虫 18S rRNA 序列,设计引物序列。P1:5'-GAAAGCATCTATCAAG TGGAA-3';P2:5'-CATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA-3'。扩增体系为 20  $\mu\text{L}$ :双蒸水 13.05  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$  buffer 2  $\mu\text{L}$ , $\text{Mg}^{2+}$  3  $\mu\text{L}$ ,dNTP 0.4  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶 0.15  $\mu\text{L}$ ,鸡肝脏组织 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  下作用 2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  下作用 35 s,43  $^{\circ}\text{C}$  下作用 35 s,72  $^{\circ}\text{C}$  下作用 45 s,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  下作用 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,观察在 570bp 处有无目的条带存在。

## (四)虫卵/卵囊计数

### 1. 麦克马斯特氏法

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)。

### 2. 斯陶尔氏法

先加入 0.1 mol/L(或 4%)NaOH 溶液至特制球状烧瓶(或大的试管、小三角烧杯,事先标好 56 mL 和 60 mL 两个刻度的)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 对玻璃小珠,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 $\times$ 40 mm 的盖玻片镜检计数。所见虫卵总数乘以 100,即为每克粪便中的虫卵数。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

## (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1) 粪样采集及注意事项;
- (2) 家禽消化系统蠕虫的检查;
- (3) 家禽消化系统原虫的检查;
- (4) 虫卵/卵囊计数。

## (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、PCR 技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、PCR 技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、PCR 技术、虫卵/卵囊计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

# 实训二 禽呼吸系统寄生虫的检查

## 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握禽呼吸系统寄生虫检查的方法,并能在显微镜下辨别比翼线虫虫卵、贝氏隐孢子虫卵囊的形态,对检查结果能进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告;同时培养学生自我学习、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、烧杯(或塑料杯)、胶头滴管、平口试管、试管架、离心管、玻棒、40 目(或 60 目)铜筛(或纱布)、竹签(或火柴棍)、擦镜纸、载玻片、盖玻片、电磁炉、锅、托盘天平、显微测微尺、普通离心机、光学显微镜、冰箱、食盐、蔗糖、甲醇、石碳酸复红溶液、硫酸、孔雀绿、香柏油等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订禽呼吸系统寄生虫的检查方案,并经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)漂浮法检查。

(3)改良抗酸染色检查。

(4)局部剖检法。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 粪便

根据养禽场禽的规模、年龄等不同进行粪便的采集。采样时根据其饲养密度每架采集3份粪样,每份粪样包含粪板四边及中间5个部分的粪便。每份粪样采集20g,装入干净塑料袋中,做好标记和编后,带回实验室,置于4℃冰箱中保存待检。

##### 2. 内脏器官

取出现伸颈、张口呼吸、甩头、尖叫等症状的鸡的喉头、气管、法氏囊、泄殖腔等器官检查。

#### (二)漂浮法检查

##### 1. 饱和食盐水漂浮法

取新鲜待检粪便2~5g,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15~30min后,取下盖玻片,以湿面覆于载玻片上,镜检。

禽比翼线虫卵呈卵圆形,两端有厚的卵盖,内含16个胚细胞。

##### 2. 饱和蔗糖离心漂浮法

每份待检粪样取20g,加适量自来水,搅拌均匀,过滤,将滤液倒入离心管中,以3000 r/min的转速离心10min,弃上层液体,往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1cm处,以3000 r/min的转速离心10min。离心后再加饱和蔗糖溶液,使液面凸出管口后加盖玻片,静置2~5min后取下盖玻片放在载玻片上检查。

贝氏隐孢子虫(*Cryptosporidium baileyi*)卵囊呈长椭圆形、近圆形等,大小为(5.5~7.7) $\mu\text{m}$ ×(4.2~5.5) $\mu\text{m}$ ,形状指数为1.31。

#### (三)改良抗酸染色检查

取5g被检新鲜粪样于烧杯中,加入10倍体积的水,搅拌均匀,经双层纱布过滤,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 1 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,自然干燥后滴加石碳酸复红溶液于粪膜上,染色 5 min,清水冲洗,滴加 10% 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,自然干燥后油镜检查。

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。子孢子呈月牙形,但排列多不规则。

#### (四)局部剖检检查

打开病禽口腔,检查喉头附近,若有禽比翼线虫寄生,则可见雌虫呈淡红色,长约 2 cm,雄虫小,长度约 0.5 cm。

同时刮取喉头、气管、盲肠和法氏囊黏膜按 1:1 与甘油混合,涂片,镜检。若发现大量呈浅红色的隐孢子虫卵囊,并用显微测微尺测量卵囊大小,根据寄生部位和大小,可做初步判定。

### 五、实训结果与考核

#### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

#### (二)实训成果

每人提交 1 份实训报告。

#### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握漂浮法检查技术、改良抗酸染色检查技术和局部剖检检查技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握漂浮法检查技术、改良抗酸染色检查技术和局部剖检检查技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握漂浮法检查技术、改良抗酸染色检查技术和局部剖检检查技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 禽血液原虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握禽血液原虫的血液涂片技术和染色方法,并能在显微镜下正确判断各种常见血液原虫的形态特点,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告,同时培养学生自我学习、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:一次性注射器、消过毒的针头、擦镜纸、载玻片、盖玻片、染色缸、酒精棉球、脱脂棉、灭菌平皿、放大镜、灭菌玻璃匀浆器、灭菌离心管、显微测微尺、漩涡式混合机、水浴锅、光学显微镜、冷冻高速离心机、冰箱、PCR 扩增仪、电泳仪、紫外灯、甲醇、姬姆萨染色液、瑞氏染色液、香柏油、蛋白酶 K、虫体裂解液、WizardTMDNA Clean up system 试剂盒、10×PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、上下游引物、TaqDNA 聚合酶、琼脂糖、电泳缓冲液、灭菌去离子水等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订禽血液原虫的检查方案,并经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)虫体检查。

(3)PCR 检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 全血

每只待检鸡的翅下静脉采血,编号并记录详细采样信息。

##### 2. 脏器

采集待检鸡的肌肉组织、心脏、肝脏、肺脏、脾脏及肾脏等内脏器官。

#### (二)虫体检查

##### 1. 血液涂片染色检查

取采集的每只鸡 1 滴血液推片,每只鸡推 2 张血片,自然干燥,滴加 2~3 滴甲醇固定 2~3 min,自然干燥后,用姬姆萨染色液染色 1 h,水洗,干燥后在显微镜下检查,观察到虫

体即可确诊。对阳性样品进行虫体计数和测量。每只阳性鸡测量 100 个配子体。

沙氏住白细胞虫雄配子体呈长圆形,大小为  $17.5\ \mu\text{m}\times 11.5\ \mu\text{m}$  [ $(10.5\sim 23.5)\ \mu\text{m}\times (5.0\sim 14.0)\ \mu\text{m}$ ],着淡蓝色,色素颗粒稀疏,核仁不明显,其宿主细胞呈两端尖的纺锤形,大小为  $30.0\ \mu\text{m}\times 11.0\ \mu\text{m}$  [ $(28.0\sim 33.5)\ \mu\text{m}\times (8.0\sim 15.0)\ \mu\text{m}$ ],淡红色,宿主细胞核呈长圆形位于细胞一侧,呈深红色。雌配子体呈长圆形,大小为  $17.95\ \mu\text{m}\times 11.6\ \mu\text{m}$  [ $(14.0\sim 25.0)\ \mu\text{m}\times (8.0\sim 17.5)\ \mu\text{m}$ ],略大于雄配子体,着色深蓝,色素颗粒致密,核仁明显,呈淡红色,较透明,其宿主细胞与雄配子体寄生的一致,大小为  $38.5\ \mu\text{m}\times 10.8\ \mu\text{m}$  [ $(27.5\sim 42.0)\ \mu\text{m}\times (6.5\sim 15.5)\ \mu\text{m}$ ]。

卡氏住白细胞虫雄配子体呈深蓝色,核较小,呈深粉红色,大小为  $11.27\ \mu\text{m}\times 11.10\ \mu\text{m}$  [ $(12.2\sim 13.9)\ \mu\text{m}\times (9.9\sim 10.15)\ \mu\text{m}$ ];雌配子体为淡蓝色,核较大,染色较雌配子体浅,大小为  $16.56\ \mu\text{m}\times 15.79\ \mu\text{m}$  [ $(16.05\sim 17.8)\ \mu\text{m}\times (15.63\sim 15.75)\ \mu\text{m}$ ]。

## 2. 脏器涂片染色检查

挑取肝、肺、脾及肾断面触片,染色后镜检。阳性样品可见配子生殖各期虫体。

挑取腿肌上的黄白色小结节压片,用姬姆萨染色液染色后镜检。阳性样品可见裂殖生殖的裂殖子。

## (三) PCR 检查

(1) 从病死鸡的肌肉组织及心脏等部位采集卡氏住白细胞虫巨型裂殖体材料,经灭菌水反复冲洗后,置于  $-70\ ^\circ\text{C}$  下冻存。

### (2) 虫体基因组 DNA 的制备

将冻存的虫体材料取出,用流水迅速融化。然后用灭菌去离子水反复吹打冲洗 2 次,置于灭菌平皿中在放大镜下将虫体间相互剥离。然后收集虫体,并用去离子水冲洗,离心沉淀 3 次以上。将上述虫体沉淀物置于灭菌的玻璃匀浆器中,匀浆至糊状后转至一灭菌离心管中,加入  $250\ \mu\text{L}$  SDS-蛋白酶 K 裂解缓冲液 ( $20\ \text{mmol/L}$  Tris-HCl,  $\text{pH} = 8.0$ ;  $100\ \text{mmol/L}$  EDTA;  $1\%$  SDS;  $200\ \mu\text{g}$  蛋白酶 K),轻轻混匀后,置于  $37\ ^\circ\text{C}$  下过夜。将上述悬液用漩涡式混合机彻底混匀,以  $12000\ \text{r/min}$  的转速离心  $2\ \text{min}$ ,上清液用 Wizard (TM) DNA Clean up system 试剂盒进行抽提。将回收的模板 DNA 溶液保存于  $-20\ ^\circ\text{C}$ ,备用。

### (3) 虫体 ITS-2 片段的 PCR 扩增

以通用引物 ITS3、ITS4 为扩增卡氏住白细胞虫 ITS2 的引物,序列如下。ITS3(正向):  $5'-\text{GCATCGATGAAGAACGCACC}-3'$ ; ITS4(反向):  $5'-\text{TCCTCCGCTTATTGATATGC}-3'$ 。取  $1\ \mu\text{L}$  模板 DNA 加入  $49\ \mu\text{L}$  PCR 扩增反应液 ( $10\ \text{mmol/L}$  Tris-HCl;  $50\ \text{mmol/L}$  KCl;  $3.0\ \text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $250\ \mu\text{mol/L}$  dNTP;  $50\ \text{pmol}$  引物,  $3\ \text{U}/\mu\text{L}$  Taq 酶)中,同时以健康鸡肌肉组织基因组 DNA 作为对照。PCR 反应条件为:  $94\ ^\circ\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ;  $94\ ^\circ\text{C}$  变性  $40\ \text{s}$ ,  $53\ ^\circ\text{C}$  退火  $40\ \text{s}$ ,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸  $1\ \text{min}$ ,共 30 个循环;  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸  $10\ \text{min}$ 。将扩增产物经  $1.7\%$  的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人提交 1 份实训报告。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握血液涂片染色检查技术、脏器涂片染色检查技术、PCR 检查技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握血液涂片染色检查技术、脏器涂片染色检查技术、PCR 检查技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握血液涂片染色检查技术、脏器涂片染色检查技术、PCR 检查技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训四 鸡球虫抗药性的检测

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握鸡球虫抗药性检测技术,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告;同时培养学生自我学习、分析问题、解决问题及与人合作等能力。

检测鸡球虫抗药性最常用的方法是鸡体测定法,但不同学者在测定球虫抗药性时所采用的标准不尽相同。

将供试药物按规定浓度与饲料混合均匀,饲喂雏鸡,经一定时间后接种待检球虫卵囊,最后通过观察某些指标和标准判定球虫对该种药物有无耐药性。

### 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:记号笔、手术剪、方盘、镊子、擦镜纸、载玻片、盖玻片、托盘天平、离心管、计数器、麦克马斯特氏计数板、培养皿、胶头滴管、纱布、烧杯、鸡笼、料槽、饮水器、冰箱、恒温培养箱、光学显微镜、普通离心机、1日龄雏鸡、食盐、重铬酸钾、抗球虫药物(地克珠利、氨丙啉、磺胺氯吡嗪等,选择当地养殖户常选用的抗球虫药物)等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订鸡球虫抗药性检测的方案,并经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)鸡体测定法检测鸡球虫抗药性。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)动物及分组

购买无球虫感染的1日龄雏鸡,所饲养的鸡数量应为所需数量的2倍以上。将购买的1日龄雏鸡饲养于无球虫环境中至13日龄开始分组。每只鸡分别称重,随机分组并调整各组间的个体,使组间总重量较为一致。

试验中应设感染不给药对照组和不感染不给药对照组。每组鸡数为10只。试验开始至试验结束均在严格隔离消毒的环境中饲养,严防球虫污染。笼具、饲料及饮水均应严格消毒。饲养过程中每天更换垫料,保持环境清洁,鸡只自由采食饮水。

#### (二)药物准备

根据当地鸡场常用的抗球虫药物进行选择。供试药物在感染前1~2d或当天,按规定浓度均匀地混入饲料中饲喂直至试验结束。

测定球虫对药物是否产生耐药性或寻找有效药物,可只用标准推荐剂量;如欲测定抗药程度,则以标准推荐剂量为最小浓度,再以比较小的等级差设数个较高的浓度。

#### (三)供试球虫

被测定的球虫,一般均从现场鸡的粪便或肠道中收集,其中含有数种不同的球虫,但各种球虫所占比例不同。

#### (四)感染剂量和方法

一般以每只鸡感染 $(5\sim 10)\times 10^4$ 个卵囊较为适宜。如果收集的卵囊量不足,可经无球虫雏鸡继代繁殖后,自肠道或粪便中收集卵囊,孢子化后供试验用。

对单个种球虫进行耐药性测定时,每只鸡的适宜接种剂量为柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*), $(5\sim 10)\times 10^4$ 个;堆型艾美耳球虫(*E. acervulina*)、早熟艾美耳球虫(*E. praecox*)、和缓艾美耳球虫(*E. mitis*)和变位艾美耳球虫(*E. mivati*), $1\times 10^6$ 个;巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)和布氏艾美耳球虫(*E. brunetti*), $(1\sim 2)\times 10^5$ 个;毒害艾美耳球

虫(*E. necatrix*),  $(2\sim3)\times 10^4$ 个;卵囊混悬液量以每只鸡 0.2~0.3 mL 为宜。若以卵囊产量作为耐药性判定指标时,接种量为每只鸡  $5\times 10^2$  个或  $1\times 10^3$  个。

单卵囊分离:将粪便或组织捣碎物混匀在 20 倍体积的 2.5% 重铬酸钾溶液中,置于 25~27 °C 下培养 2~7 d,至 95 °C 的卵囊孢子化;培养物经 3 层纱布或 50 目网筛过滤;用干净的滴管吸取滤过物一小滴于载玻片上,并加 1 滴生理盐水稀释,使在低倍显微镜下观察时,一个视野只有 1 或 2 个卵囊;在显微镜下,右手持玻璃毛细吸管的尖端正对视野中的一个卵囊时,将吸管向卵囊直伸过去,卵囊随溶液吸入毛细吸管内;把毛细吸管中的液体吹落到铺有薄层琼脂的载玻片上,在显微镜下观察,确证是一个卵囊;用细的解剖刀将玻片上含有单卵囊小滴液的琼脂周围划破,以小滴液为中心,将前后左右的琼脂薄膜摺叠覆盖起来或放在胶囊内。

### (五) 抗药性判定指标及标准

#### 1. 卵囊产量

(1) 以每克粪便卵囊数(oocysts per gram feces, OPG)为指标:用药组 OPG 值不小于 50000 判为具有耐药性,小于 50000 为敏感。

(2) 以感染用药组排出的卵囊总数与感染不给药组排出卵囊总数的比率为指标:以感染后第 4~11 d 的卵囊产量比率来评价。如果

$$\frac{\text{感染用药组排出的卵囊总数}}{\text{感染不用药对照组排出卵囊总数}} \times 100\% \geq 5\%$$

则判为球虫具有抗药性,小于 5% 为敏感。

(3) 以用药组 2 倍推荐量用药后有无卵囊产生为指标:以 2 倍推荐量用药,不论服药的试验鸡有无球虫病症状和肠道病变,凡有卵囊排出则判定球虫具有抗药性,无卵囊排出则判定为敏感。

(4) 以不同处理组间卵囊产量的差异显著性为指标:计数感染用药组和感染不用药对照组接种后第 4~8 d 粪便中的卵囊数,对感染用药组与感染不用药对照组的卵囊产量做方差分析,差异不显著则判定球虫具有抗药性,反之则判定为敏感。

#### 2. 病变记分

(1) 病变记分减少率(Reduction of Lesion Scores, RLS)。

以感染给药组与感染不用药组的病变记分之比,计算出病变记分减少率(RLS)。

$$RLS = \frac{\text{感染不用药对照组平均变记分} - \text{感染用药组平均病变记分}}{\text{感染不用药对照组平均病变记分}} \times 100\%$$

感染后第 6 天或第 7 天扑杀试验鸡,按 Johnson 等所述方法进行病变记分。药组平均 RLS  $\leq 30\%$  时球虫具有抗药性,RLS 为 31%~49% 时为部分抗药性,RLS 为  $\geq 50\%$  时为对药物敏感。

(2) 感染用药平均病变记分与感染不用药组平均病变记分的比率:Jeffers 以感染用药组的平均盲肠病变记分大于或等于感染不用药对照组的 50% 作为抗药性的标准。

混合感染情况下肠道病变记分:0 分,无肉眼可见病变;1 分,有少量散在病变;2 分,有较多稀疏的病变,如多处肠区被感染和由柔嫩艾美耳球虫感染引起的盲肠出血;3 分,有融合性大面积病变,一些肠壁增厚;4 分,病变广泛融合,肠壁增厚。柔嫩艾美耳球虫感

染,可见大型盲肠芯;巨型艾美耳球虫感染,可见肠内容物带血。

单个虫种感染情况下肠道病变记分:

①柔嫩艾美耳球虫(感染后 5~7 d)。两侧盲肠病变不一致时,以严重的一侧为准。0分,无肉眼病变;1分,盲肠壁有少量分散的瘀点,肠壁不增厚,内容物正常;2分,病变数量较多,盲肠内容物明显带血,盲肠壁稍增厚,内容物正常;3分,盲肠内有多量血液或有盲肠芯(血凝块或灰白色干酪样的香蕉型块状物),肠壁肥厚明显,盲肠中粪便含量少;4分,因充满大量血液或肠芯而盲肠肿大,肠芯中含有粪渣或不含,死亡鸡只也计4分。

②毒害艾美耳球虫(感染后 5~7 d)。0分,无肉眼病变;1分,从小肠中部浆膜面看有散在的针尖状出血点或白色斑点,黏膜损伤不明显;2分,从小肠中部浆膜面看有多量的出血点,也可见到中部肠管稍充气;3分,小肠腔有大量出血,浆膜面见有红色或白色斑点。黏膜面粗糙,增厚,有许多针尖状出血点。肠内容物含量少;充气达小肠下半段,小肠粗度明显加大但长度明显缩小;4分,小肠因严重出血而呈暗红色、褐色,大部分肠管气胀明显,黏膜增厚加剧,肠腔内充满血液和黏膜组织的碎片,从浆膜面看,在感染部位组织见到白色或红色病灶,在死亡鸡只病灶为白色和黑色,呈“白盐与黑胡椒”之外观,有些情况下可见到寄生虫性肉芽肿,肠壁增粗1倍,长度就缩短1倍。死亡鸡只也计4分。

③布氏艾美耳球虫(第 6~7 d)。0分,无肉眼可见病变;1分,仔细观察时疑有病变;2分,小肠下段增厚,肠壁呈灰色,从其上可剥下橙红色物质;3分,小肠壁增厚,有带血的卡他性渗出物,直肠段有横向的红色条纹,病变发生在盲肠扁桃体时,有软的黏液栓;4分,小肠下段可能出现广泛的凝固性坏死。病变可能扩展到小肠中段或上段。部分鸡小肠黏膜面的干性坏死膜可能使小肠出现皱痕及干酪样盲肠芯。病死鸡只也计4分。

④巨型艾美耳球虫(第 6~7 d)。0分,无肉眼可见病变;1分,小肠中段浆膜面隐约可见出血点,肠腔中有少量橘黄色黏液,肠管形状不见异常;2分,小肠中段浆膜面有大量出血点,肠腔中间有大量橘黄色黏液,肠壁增厚;3分,小肠充气,壁增厚,黏膜面粗糙,小肠内容物含有小血凝块和黏液;4分,小肠充气明显,肠壁高度增厚,肠内容物含有大量血凝块和红褐色血液。病死鸡只也计4分。

⑤堆型艾美耳球虫(第 5~7 d)。0分,无肉眼可见病变;1分,十二指肠浆膜面有散在的白色斑,每平方厘米不超过5处;2分,白色斑增多但不融合,形成白色梯形条纹状外观,3周龄以上的鸡,病变可扩展到十二指肠下20 cm,肠壁不增厚,内容物正常;3分,白色病灶增多且融合成片,小肠壁增厚。内容物呈水样,病变蔓延到卵囊囊憩室之后;4分,被感染的肠绒毛缩短融合,使十二指肠和小肠黏膜呈灰白色,肠壁高度肥厚,肠内容物呈奶油状。死亡鸡只也计4分。

### 3. 增重

(1)以感染用药组与感染不用药对照组之增重比率为指标:接种后6 d 试验期内感染用药组和感染不用药对照组的增重。

$$\frac{\text{感染用药组增重}}{\text{感染不用药对照组增重}} \times 100\% \geq 75\%$$

则为球虫对药物敏感,反之,为具有抗药性。

(2)以感染用药组与不感染不用药对照、感染不用药对照组增重的差异显著性(方差

分析)为指标:计算接种前 2 d 到接种后 8 d 的增重或接种后 3~8 d 的增重进行 t 检验。以感染用药组与不感染不用药对照组增重无显著性差异则判定为敏感;与感染不用药对照组增重无显著性差异判定为抗药,与不感染不用药对照组和感染不用药对照组增重均有显著性差异则判为部分抗药。

#### 4. 粪便记分比率

Jeffers 以感染用药组与感染不用药对照组的平均粪便记分比率作为判定 *E. tenella* 和 *E. necatrix* 抗药性的指标。

观察接种后 4~6 d 的粪便,参考 Morehouse 等的方法,按以下标准进行粪便记分:0 分,粪便正常;1 分,25%的粪便带血;2 分,50%的粪便带血;3 分,75%的粪便带血;4 分,100%的粪便带血。

$$\frac{\text{感染用药组的平均血便记分}}{\text{感染不用药组平均血便记分}} \times 100\% \geq 50\%$$

则判为抗药,反之,则为敏感。这种方法局限于有明显拉血的球虫感染,诸如 *E. tenella* 和 *E. necatrix* 的感染。

对于其他不造成肠道出血形成血便的球虫感染,诸如堆型、巨型、早熟与和缓艾美耳球虫的感染,按以下标准进行粪便记分:0 分,粪便正常;1 分,25%的粪便不正常;2 分,50%的粪便不正常;3 分,75%的粪便不正常;4 分,100%的粪便不正常。

#### 5. 最适抗球虫活性百分率(Percent of Optimum Anticoccidial Activity, POAA)

$$\text{增重与存活率(Growth and Survival Ratio, GSR)} = \frac{\text{笼末重}}{\text{笼初重}}$$

$$\text{POAA} = \frac{(\text{感染用药组 GSR} - \text{感染不用药对照组 GSR})}{(\text{不感染不用药对照组 GSR} - \text{感染不用药对照组 GSR})} \times 100\%$$

以  $\text{POAA} \leq 50\%$  判定球虫具有抗药性,反之则判定球虫对药物敏感。

#### 6. 以抗球虫指数(Anticoccidial Index, ACI)评价

ACI 是包括增重、存活率、病变、卵囊产量、粪便记分等多项参数指标的判定球虫抗药性或药物效力的综合药效指标,但不同研究者在计算 ACI 时所采用的参数指标、计算方法和判定标准不尽相同。

(1)  $\text{ACI} = \text{存活率} + \text{相对增重率} - (\text{病变值} + \text{卵囊值})$ 。

$$\text{存活率} = \frac{\text{试验结束时存活鸡只数}}{\text{试验组鸡总只数}} \times 100\%$$

$$\text{相对增重率} = \frac{\text{试验组增重率}}{\text{不感染不给药组增重率}} \times 100\%$$

$$\text{病变值} = \text{各试验组平均病变记分} \times 100\%$$

卵囊值按下法计算:*E. tenella* 和 *E. necatrix*, 每只试验鸡盲肠匀浆中卵囊百万数 小于 0.1、0.1~1.0、2.0~5.0、6.0~10.0 和大于 11.0 的,卵囊值分别为 0、1、10、20 和 40。对于小肠球虫有 2 种方法,第 1 种方法:粪便匀浆中卵囊值占感染不给药对照组的比例(%)小于 1.0、1~25、26~50、51~75、76~100 的,卵囊值分别为 0、1、10、20 和 40。第 2 种方法:卵囊值 = 每只鸡卵囊百万数 ÷ 感染不给药对照组卵囊的百万数 × 0.4。

若  $\text{ACI} \geq 180$ , 则判定球虫对药物敏感;  $\text{ACI} = 160 \sim 179$ , 则判定球虫部分抗药;  $\text{ACI}$

<160,则判定球虫抗药。

(2)  $ACI = \text{存活率} + \text{增重率} - (\text{平均病变记分} \times 10 + \text{卵囊百分数} \times 0.4)$ 。

肠道病变记分按 Johnson 等的方法,卵囊数为接种后第 6~10 d 的卵囊产量。以  $ACI \geq 160$ ,则判定球虫对药物敏感; $ACI = 120 \sim 159$ ,则判定球虫部分耐药; $ACI < 120$ ,则判定球虫抗药。

7. 以 POAA、RLS 和相对卵囊产量(ROP)3 项指标综合判定

POAA、RLS 和 ROP 分别以鸡体增重、肠道病变、卵囊产量为标准评价耐药性。POAA > 50% 为无抗药性,即为阴性;POAA ≤ 50% 为有抗药性,即为阳性;RLS ≥ 50% 为无抗药性,即为阴性;RLS < 50% 为有抗药性,即为阳性;ROP < 15% 为无抗药性,即为阴性;ROP ≥ 15% 为有抗药性,即为阳性。

若以 3 项指标综合评价,其中 1 项达到抗药为轻度抗药;2 项达到抗药为中度抗药;3 项达到抗药为重度抗药。

8. 以 POAA、RLS、ROP 和 ACI 4 项指标综合判断

其中 POAA、RLS、ROP 的判定指标同 7。 $ACI \geq 160$  为敏感, $ACI < 160$  为抗药。在 POAA、RLS、ROP 和 ACI 4 项指标中,均为阴性时为无抗药性;有 3 项指标为阴性时为轻度抗药;有 2 项指标为阳性时为中度抗药;3 项及以上指标为阳性时为完全抗药。

9. 综合抗药性指数(GI)

GI 是以死亡率、增重率、饲料转化率、病变记分和半数卵囊指数 5 项指标综合评价鸡球虫耐药程度。

$GI = \%WG_{NNC} - (F_G - F_{NNC}) \times 10 - (OI_G - OI_{INC}) - (PI_G - PI_{INC}) \times 2 - (\text{死亡率}/2)$

式中 WG——增重率;  
F——饲料转化率;  
PI——病变记分;  
OI——半数卵囊指数;  
G——治疗组;  
NNC——健康对照组;  
INC——感染对照组。

判定标准为  $GI_G \geq 90\%GI_{NNC}$ ,非常有效; $GI_G \geq 80\%GI_{NNC}$ ,有效; $GI_G \geq 70\%GI_{NNC}$ ,低效; $GI_G \geq 50\%GI_{NNC}$ ,部分抗药; $GI_G < 50\%GI_{NNC}$ ,有抗药性。

不同地区,甚至不同鸡场的地理环境、鸡体状况、虫株活力、用药历史及方式的不同,因此难以评价上述不同检测方法的优劣。应用时可依据具体条件和目的,选择适当的判定指标和标准。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

## (二)实训成果

每人提交 1 份实训报告。

## (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握球虫抗药性检测技术;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握球虫抗药性检测技术;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握球虫抗药性检测技术;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 第五部分 马属动物寄生虫病实训

### 实训一 马属动物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,学生应能熟练掌握粪便检查的方法,并能在显微镜下辨别马属动物粪便中的各类蠕虫卵、球虫卵囊等,且能与粪便中的非寄生性物质相区别;熟练掌握虫卵计数的方法及球虫的孢子化等技术,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,能够规范书写检查原始记录及实训报告。同时培养学生自我学习、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、记号笔、眼科镊(或竹签)、烧杯(或塑料杯)、试管、试管架、离心管、玻棒、40目(或60目)铜筛(或纱布)、胶头滴管、5~10 mm铁丝圈、瓷盆、黑色浅盘、放大镜、解剖针(或毛笔)、擦镜纸、载玻片、盖玻片、电磁炉、锅、玻璃珠、三角小烧瓶、100 mL球状烧瓶、100 mL量筒、200  $\mu$ L微量移液器及配套吸头、麦克马斯特氏虫卵计数板、计数器、托盘天平、普通离心机、光学显微镜、冰箱、甘油、食盐、氢氧化钠、重铬酸钾等。

#### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订马属动物消化系统寄生虫的检查方案,并经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)球虫的检查。

(4)虫卵/卵囊计数。

## 四、实训步骤与方法

### (一) 取样

根据马的数量、年龄、性别等进行马粪便的随机采集,一般按饲养量的30%左右随机采样。每份粪样150g,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采集样品的时间,以及待检马的年龄、性别、采食情况、膘情和驱虫情况等。将粪样低温运回实验室,置于4℃冰箱中保存待检。

### (二) 马属动物消化系统蠕虫的检查

#### 1. 直接涂片法

在洁净的载玻片上滴1~2滴50%的甘油水或自来水,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。

#### 2. 漂浮检查法

##### (1) 试管漂浮法

取新鲜被检粪便2~5g,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15~30min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

取新鲜待检粪便约5g,置于烧杯内,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倍量饱和食盐水,并搅拌均匀;用40目(或60目)铜筛或双层纱布过滤,滤液静置30min左右,则虫卵上浮;用直径5~10mm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。

#### 3. 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倍体积的自来水或生理盐水,彻底搅拌后静置10min,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(或衬以黑色纸片或黑布的玻璃)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。

#### 4. 局部剖检检查

按照一般解剖方法剖开马的腹腔。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。再将胃、小肠和大肠分段做二重结扎后分离依次检查。

##### (1) 胃

可沿胃大弯剪开,将内容物倒在指定的容器内,检出较大的虫体。然后用1%的盐水

将胃壁洗净,并刮取胃壁黏膜的表层,把此刮下物放在两块载玻片之间做压片镜检。洗下物应加1%的盐水,反复多次洗涤,沉淀,等液体清亮透明后,分批取少量沉淀,放入大培养皿中,先后放在白色或黑色的背景上,仔细观察并检出所有虫体。

在胃内寄生的有马的胃线虫、胃蝇蛆及马副蛔虫。

#### (2) 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,仔细观察有无虫体的寄生。若有,则检出残留在肠黏膜面上的虫体。洗下物和沉淀物分别用反复沉淀法处理后,检查沉淀物中有无虫体。

#### (3) 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,以反复沉淀法检查沉淀物内寄生虫。

### (三) 马属动物球虫的检查

采取待检新鲜粪便,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鉴别,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;弃上层液体,加适量饱和食盐水后静置20 min,以2000 r/min的转速离心6 min;取上层液体,加入10倍体积以上的自来水,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%的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后,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。

### (四) 麦克马斯特氏法虫卵计数

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,后边摇晃边用吸管吸出少量滤液滴入计数室内,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)。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占30%,结果考核占70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告1份,其内容如下:

- (1) 粪样采集及注意事项；
- (2) 消化系统蠕虫的检查；
- (3) 球虫的检查；
- (4) 麦克马斯特氏法虫卵计数。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、麦克马斯特氏法虫卵计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、麦克马斯特氏法虫卵计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握粪便学检查技术、局部剖检技术、麦克马斯特氏法虫卵计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训二 马属动物呼吸系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握马属动物呼吸系统寄生虫检查的方法,并能在显微镜下辨别安氏网尾线虫第一期幼虫的形态,使所学理论知识与实践相结合,巩固和加深对新知识理解,增强动手能力,同时培养学生自我学习、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、记号笔、烧杯、试管、试管架、离心管、玻棒、纱布、漏斗、漏斗架、乳胶管、止水钳、胶头滴管、剪刀、瓷盆、离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、平皿、电磁炉、锅、温度计、酒精灯、普通离心机、光学显微镜、冰箱、生理盐水、碘液等。

### 三、实训内容

- (1) 实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订马属动物呼吸系统寄生虫的检查方案,并经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)贝尔曼氏法。

(3)局部剖检法。

#### 四、实训步骤与方法

##### (一)取样

(1)采集粪便

采集待检马属动物新鲜粪便 50 g,编号后,装入干净塑料袋中,并详细记录采集样品的时间、地点、年龄、性别、采食情况、膘情及驱虫情况等。低温运回实验室后,置于 4 °C 冰箱中保存待检。

(2)摘取马的气管及肺脏。

##### (二)检查

1. 贝尔曼氏法

贝尔曼氏法,又称漏斗幼虫分离法,取被检粪便约 20 g,置于漏斗内的纱布中,漏斗下连接一长为 10~20 cm 的乳胶管,并用止水钳夹住胶管的游离端。然后向漏斗内慢慢加入 40 °C 左右的温水,以刚淹没粪便为宜,静置 1 h 后,松开止水钳,将乳胶管下面液体放入试管内,静置 30 min,或离心沉淀 2 min,倒掉上清液,将沉淀全部倒入小表面皿内,或用胶头滴管吸取后滴在载玻片上,然后在显微镜下检查。

安氏网尾线虫第一期幼虫长 0.42~0.48 mm,尾端有一小刺。

2. 局部剖检法

按一般解剖法切开马胸壁,连同食管、气管将胸腔内的全部脏器摘出。从喉头沿气管、支气管剪开,注意不要把管道内的虫体剪坏,发现虫体即应直接采取。将肺组织在水中尽量撕碎,用手挤压组织,充分水洗后,取出肺组织碎块并用反复沉淀法检查沉淀物。若肺脏上有结节,则把结节取出放在盛有温生理盐水的平皿内,然后分离结节的结缔组织,仔细取出虫体。

#### 五、实训结果与考核

##### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

##### (二)实训成果

每人提交 1 份实训报告。

##### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪

器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术的技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术的技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握贝尔曼氏法检查技术和局部剖检技术的技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 马属动物血液原虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握马属动物血液原虫的血液涂片技术和染色方法,并能在显微镜下正确判断各种常见血液原虫的形态特点,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告,同时培养学生自我学习、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:标记笔、真空采血管(含抗凝剂)、真空采血管(不含抗凝剂)、真空采血针、一次性注射器、消过毒的针头、灭菌1.5 mL离心管、擦镜纸、载玻片、盖玻片、离心管、染色缸、酒精棉球、脱脂棉、96孔U形微量反应板、试管、试管架、微量移液器、酒精灯、三角烧瓶、打孔器、解剖针、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱、水浴锅、酶标检测仪、紫外分光光度计、电泳仪、PCR扩增仪、凝胶成像系统、甲醇、姬姆萨染色液、瑞氏染色液、甘油、香柏油、马巴贝斯虫抗体ELISA试剂盒和弩巴贝斯虫抗体ELISA试剂盒(美国VERD公司)、马伊氏锥虫病抗体平板凝集试剂盒(比利时热带医学研究所)、马伊氏锥虫标准强阳性血清、马伊氏锥虫标准弱阳性血清、标准阴性血清、液体伊氏锥虫抗原、溶血素原液、补体原液、生理盐水、绵羊全血(选健康成年绵羊1只,颈静脉无菌采血,1份绵羊全血与1.2份阿氏液混匀,4℃保存备用)、2.8%的柠檬酸钠生理盐水、琼脂粉、氯化钠、硫柳汞、甲基橙、马巴贝斯虫重组蛋白抗原(BeEMA2t或BcP48)、碳酸盐缓冲液(pH=9.6)、脱脂奶粉、PBS缓冲液、酶标羊抗马IgG、ABTS、溶菌酶、蛋白酶K、CTAB、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、TE缓冲液、10×PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、上下游引物、Taq DNA聚合酶、琼脂糖、电泳缓冲液、小白鼠等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订马属动物血液原虫的检查方案,并经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)虫体检查。
- (3)动物接种。
- (4)血清学检查。
- (5)PCR 检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### 1. 全血

无菌采集颈静脉血,编号,并记录其详细信息,带回实验室后,置于4℃冰箱中保存待检。

##### 2. 血清

采集3~5 mL 每头待检马属动物的颈静脉血液,待血液凝固析出血清后,以2500 r/min的转速离心5 min,分离血清,编号,置于-20℃中保存待检。

#### (二)虫体检查

##### 1. 鲜血压滴检查

将采出的血液滴1滴于载玻片上,加1滴2.8%的柠檬酸钠生理盐水,混合均匀后,加盖玻片,立即放在显微镜下用低倍镜检查,发现有运动的可疑虫体时,可再换高倍镜检查。冬季室温过低,应先将载玻片在酒精灯上或炉旁略加热,以保持虫体的活力。

##### 2. 涂片染色检查

将采集的血液滴1滴于载玻片的一端,用另一块载玻片推片,使血液均匀地涂在载玻片上,自然干燥后用甲醇固定,再用瑞氏染色液或姬姆萨染色液染色,染色完毕后镜检,见到虫体即可确诊。

弩巴贝斯虫为大型虫体,有椭圆形和环形,其大小为2.13~2.84 μm;梨籽形虫体占绝大多数,大小为2.28~4.25 μm;成对的梨籽形虫体以尖端相连成锐角,其长度超过红细胞半径。虫体内有两个染色质团,位于虫体的两端,梨籽形和圆形虫体之比为1:0.73,在一个红细胞里可能有1~4个虫体。

马巴贝斯虫:小型虫体,绝大多数虫体直径均小于红细胞的半径,有环形、圆形、梨籽形、椭圆形等,其中以圆形的为最多,梨籽形少见。

伊氏锥虫:寄生于马、骡、驴等动物的血浆中,虫体平均大小为24 μm×2 μm,呈纺锤状或柳叶状,后端较钝,体内原生质较多,呈淡蓝色。细胞核大,呈淡紫色,居虫体中央。

动基体在虫体后部,其中生毛体位于副基体之前,鞭毛沿虫体部分与波动膜联系着,见图 5-3-1和图 5-3-2。

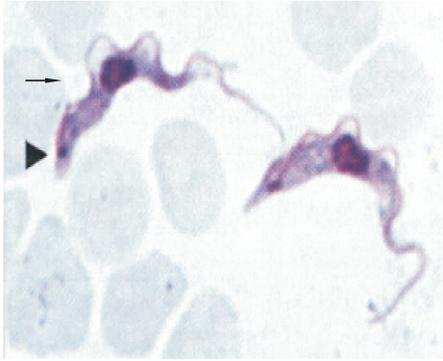


图 5-3-1 伊氏锥虫的姬姆萨染色(细长型)

注:细胞核和动基体 DNA 的位置分别用箭头和三角标出。

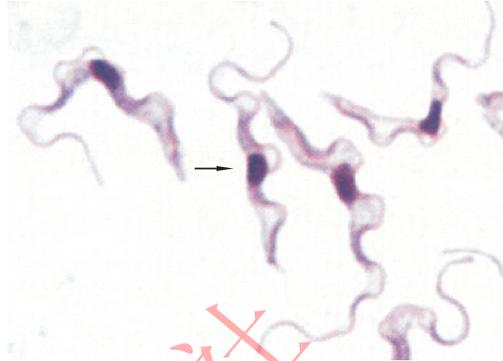


图 5-3-2 伊氏锥虫的姬姆萨染色(无动基体株)

注:细胞核的位置分别用箭头和三角标出。

血涂片染色镜检方法已经作为马梨形虫病最好的标准诊断技术而得到广泛应用,但该方法也有很多缺点,当大量血涂片需要同时量化时,显得相对困难,而且在检测染虫率很低的血涂片时有一定的困难。同时,由于染料浓度,血涂片的质量、染色时间等一些人为因素的存在,也可能会影响检测的效果。

### 3. 淋巴结穿刺检查法

检查时,选择被检动物体表下肿大的淋巴结进行穿刺,抽取内容物,涂片,甲醇固定,姬姆萨染色镜检,只要在涂片中发现裂殖体就可确诊。

裂殖体检查呈阳性的时间较难把握,只能作为辅助性诊断方法。目前该方法在马梨形虫病的诊断应用中报道较少。

### 4. 虫体浓集法

#### (1) 自然沉淀法

在试管中加入 3 mL 2.8% 的柠檬酸钠生理盐水,采集 6 mL 病马血液于试管中充分混合,静置 6~8 h,然后用胶头滴管吸取红细胞上层液,滴于载玻片上,盖上盖玻片后镜检,见到虫体即可确诊。

#### (2) 离心沉淀法

在离心管中加入 3 mL 2.8% 的柠檬酸钠生理盐水,采集 6 mL 病马血液于该离心管中,充分混合后,以 1500 r/min 的转速离心 5 min,用胶头滴管吸取上层血浆,滴 1 滴于载玻片上后镜检,见到虫体即可确诊。

### (三) 动物接种

伊氏锥虫的试验动物可选用小白鼠、大白鼠、豚鼠和犬等,但常用小白鼠。

抽取病马血液 0.5~1 mL,经小白鼠腹腔接种。从接种后第 3 天起,每天采集小白鼠的尾血镜检,连续检查一个月,如仍不见虫体则可判定为阴性。

#### (四) 血清学检查

##### 1. 直接凝集试验

###### (1) 虫悬液的制备

自感染有伊氏锥虫的试验动物采血,在血液中见有大量虫体时,将所采血以改良阿氏液稀释。以在显微镜下 $400\times$ 观察,每个视野中含虫体 $30\sim 50$ 个,并见虫体运动活跃,无自然团聚现象为准。

###### (2) 检测

取被检血清1滴于载玻片上,再加入1滴上述活虫,混匀,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中, $20\sim 30\text{ min}$ 后取出镜检。

###### (3) 判定标准

虫体后端相互靠拢,成菊花状排列,但虫体仍保持活动者即为阳性反应。

##### 2. 琼脂扩散试验

(1) 抗原。用液体伊氏锥虫抗原或伊氏锥虫的补体结合反应抗原的原液。

(2) 标准阳性和阴性血清。用生物制品厂生产的标准锥虫-马阴性和阳性血清。

(3) 琼脂凝胶平板的制备。取精制琼脂粉 $1.2\text{ g}$ ,氯化钠 $0.9\text{ g}$ ,蒸馏水 $100\text{ mL}$ , $1\%$ 硫柳汞 $1\text{ mL}$ ( $0.01\text{ g}$ )及 $1\%$ 甲基橙 $4\sim 15$ 滴,放入三角烧瓶内,沸水中加热溶化后即成为 $1.2\%$ 的生理盐水琼脂凝胶。将降温到 $50\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的凝胶小心地倒在培养皿内,制成约 $5\text{ mm}$ 厚的琼脂层即为凝胶平板。制凝胶平板时尽量一次倒成,使表面平整,厚薄均匀。待琼脂层凝固后,以直径 $5\sim 8\text{ mm}$ 的打孔器在琼脂平板上打孔,周孔距中央孔 $5\sim 6\text{ mm}$ 。打孔后,用尖头镊子或解剖针挑出孔中的琼脂块。将平板在酒精灯上不停转动,适当加热,使底部凝胶溶化,封闭孔底即成。暂时不用的平板,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。

(4) 操作方法与结果判定。

将平板上各孔编号。用微量加样器将抗原加入中央孔内,然后向周围4孔分别加入待检血清,留下2孔分别加标准阳性和阴性血清。各孔滴加量以加满但不溢出为宜。将平板放在室温( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上)或 $25\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中, $24\text{ h}$ 后取出观察。

在抗原孔与被检血清孔之间出现白色沉淀线者为阳性反应,无沉淀线者为阴性反应。

##### 3. ELISA 检测

马巴贝斯虫重组蛋白抗原(BeEMA2t 或 BeP48)用 $50\text{ mmol}$ 碳酸盐缓冲液( $\text{pH}=9.6$ )稀释,使抗原终浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,加于ELISA反应板孔内,每孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;用含 $0.05\%$ 吐温-20的PBS洗涤液洗涤3次后,每次 $3\text{ min}$ ;每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 封闭液(含 $3\%$ 脱脂奶粉的PBS缓冲液),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中 $1\text{ h}$ ;用洗涤液洗涤3次,每次洗涤 $3\text{ min}$ ;每孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 被检血清(用封闭液稀释100倍),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中 $1\text{ h}$ ;用洗涤液洗涤3次,每次洗涤 $3\text{ min}$ ;每孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 酶标羊抗马IgG(用封闭液稀释4000倍),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中 $1\text{ h}$ ;用洗涤液洗涤3次,每次洗涤 $3\text{ min}$ ;每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$  $0.03\%$ ABTS,置于室温下避光 $1\text{ h}$ ;用ELISA检测仪测定OD值( $\lambda=415$ )。

结果判定:以样本OD值大于阴性对照OD值的平均数加上3个标准差( $X+3\text{SD}$ )作为阳性结果的阈值。

## 4. 马梨形虫病的微量补体结合试验

## (1) 预备试验

## ① 3% 红细胞悬浮液的制备

绵羊全血充分混匀后,取所需量用稀释液洗 3 次,每次以 2000 r/min 的转速离心 5 min,最后一次离心 10 min。

取 1 份下沉血泥加入到 24 份稀释液中,充分混匀,制成红细胞悬浮液。

取出 250  $\mu\text{L}$  红细胞悬浮液加入到 4.75 mL 蒸馏水中,使红细胞充分破解(液体清亮)。

取 100  $\mu\text{L}$  加入到平底微量板孔内,平行加 8 个孔。

用 ELISA 读板仪在 540 nm 处读 OD 值,算出平均 OD 值,代入校正红细胞浓度公式:

$$\text{稀释液加入量} = \text{平均 OD 值} \times \text{红细胞悬液量} / 0.115 - \text{红细胞悬液量}$$

取校正红细胞浓度时所需的稀释液量加入红细胞悬浮液中即得 3% 红细胞悬浮液。

## ② 溶血素效价的测定

## a. 稀释溶血素

取 0.2 mL 溶血素原液,加入 19.8 mL 生理盐水中,制成 1 : 100 稀释的溶血素,然后将溶血素稀释成 1 : 500、1 : 1000、1 : 1500、1 : 2000、1 : 3000、1 : 5000、1 : 10000 七个稀释度。

## b. 制备不同稀释倍数的溶血素致敏红细胞

取 7 个试管,每管加 1.5 mL 3% 的红细胞悬浮液,然后分别缓慢加入不同稀释倍数的溶血素 1.5 mL,混匀,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 15 min,制成不同稀释倍数的致敏红细胞。

## c. 溶血素效价的确定

将补体原液预稀释至 1 : 150,按表 5-3-1 进行测定。

表 5-3-1 溶血素效价测定 (单位:mL)

	试管号						
	1	2	3	4	5	6	7
生理盐水	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1 : 150 补体	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
致敏红细胞	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
溶血素稀释倍数	500 $\times$	1000 $\times$	1500 $\times$	2000 $\times$	3000 $\times$	5000 $\times$	10000 $\times$
感作	37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30 min(每间隔 5 min 振荡 1 次)						
冷生理盐水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

将各管以 2000 r/min 的转速离心 3 min,取上清液 100  $\mu\text{L}$  分注到平底微量板,在波长 540 nm 处读 OD 值。按公式(OD 值 $\times$ 100/0.115)算出各管溶血度,在普通坐标纸上以溶血素的稀释度为横坐标,溶血度为纵坐标,绘制曲线,确定出现平高线的点,比此浓度高 25% 的稀释度定为溶血素的工作效价(为 1.25 倍,溶血素稀释倍数 $\times$ 80% = 溶血素工作效价)。

## ③ 制备致敏红细胞悬浮液

按测定的溶血素效价稀释溶血素,缓慢加入等量的 3% 绵羊红细胞悬浮液中,混合均

匀,在 37 °C 下水浴 15 min,即成。

#### ④补体效价的测定

补体预稀释至 1 : 150,做 2 个重复管,按表 5-3-2 测定补体效价。

表 5-3-2 补体效价测定 (单位:mL)

	试管号					
	1	2	3	4	5	6
1 : 150 补体	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
生理盐水	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7
第一次感作	37 °C 下振荡 30 min					
致敏红细胞	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
第二次感作	37 °C 下振荡 30 min					
冷生理盐水	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

将各管以 2000 r/min 的转速离心 3 min,取上清液,在波长 540 nm 处读 OD 值,按公式(平均 OD 值 $\times$ 100/0.115)计算出各管的溶血度(Y),在双对数坐标纸上以 Y/(100 - Y)为横坐标,补体用量为纵坐标,制成一直线,找出 50%溶血时补体用量(含 1 个 C'H50 单位),代入公式:补体稀释倍数/10 $\times$ 50%溶血时补体用量,即得出本试验补体工作效价(含 5 个 C'H50 单位)。

#### ⑤抗原效价的测定

标准阳性血清和标准阴性血清分别用稀释液做 1 : 5 稀释,置于 62 °C 下灭活 30 min。然后将标准阳性血清做 2 倍倍比稀释(1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 和 1 : 160)。将抗原从 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128、1 : 256 做倍比稀释。建立方阵试验,在 U 形微量反应板中进行。

试验程序:25  $\mu$ L 血清+25  $\mu$ L 抗原+25  $\mu$ L 补体 $\rightarrow$ 37 °C 振荡感作 40 min $\rightarrow$ 加 25  $\mu$ L 致敏红细胞 $\rightarrow$ 37 °C 振荡感作 30 min,同时设立血清对照、抗原对照、补体对照,见表 5-3-3。

表 5-3-3 方阵试验 (单位: $\mu$ L)

项目	抗原稀释度							血清对照	抗原对照	补体对照	红细胞对照
抗原	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256				
阳性血清	1 : 5	25	25	25	25	25	25	—	25	—	—
	1 : 10	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
	1 : 20	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
	1 : 40	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
	1 : 80	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
	1 : 160	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
1 : 5 阴性血清	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
补体工作效价	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
稀释液	—	—	—	—	—	—	—	25	25	50	75
第一次振荡感作	37 °C 下振荡 40 min										
致敏红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
第二次振荡感作	37 °C 下振荡 30 min										

注:抗原对照为 100%溶血,补体对照为 100%溶血,红细胞对照为不溶血,血清对照为 100%溶血时,试验成立。

⑥记录测定结果

取出微量反应板,与标准比色孔比较,观察溶血度,记录结果。

(2)正式试验

①溶血素、抗原、补体按预试验测定的工作效价稀释。

②被检血清和标准强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清做 1 : 5 稀释,置于 62 °C 下灭活 30 min。

③将灭活后的标准强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清在 U 形微量反应板中进行倍比稀释。一般标准强阳性血清做 6 个稀释度,弱阳性血清和阴性血清可做 3 个稀释度。

25  $\mu$ L 血清 + 25  $\mu$ L 抗原 + 25  $\mu$ L 补体  $\rightarrow$  37 °C 振荡感作 40 min  $\rightarrow$  加 25  $\mu$ L 致敏红细胞  $\rightarrow$  37 °C 振荡感作 30 min,同时设立标准强阳性血清对照、弱阳性血清对照、阴性对照、抗原对照、补体对照和红细胞对照(表 5-3-4)。

表 5-3-4 血清效价的测定 (单位:  $\mu$ L)

项目	血清试验孔						血清抗补体对照 1 : 5	抗原对照	补体对照			红细胞对照
	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160			2.5 个补体单位	1.25 个补体单位	0.625 个补体单位	
血清	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—	—	—
抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—	—
稀释液	—	—	—	—	—	—	25	25	50	50	50	75
补体	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—
第一次振荡感作	37 °C 下振荡 40 min											
致敏红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
第二次振荡感作	37 °C 下振荡 30 min											

④取出微量反应板,比照标准比色孔,记录结果。

⑤判定

a. 被检血清效价的确定。比照标准比色孔判读,达到 50% 抑制溶血时血清的最高稀释度为该血清的效价。

b. 结果判定。各对照的结果成立时,可进行判定。否则,补体的效价应重新判定,并重新做试验。

标准阳性血清对照:标准阳性血清效价与已知效价或预测效价变化范围不超过一个滴度。

阴性血清对照:100% 溶血。

血清抗补体对照:抗补体对照孔 100% 溶血(如果抗补体对照孔与试验孔的抑制溶血程度相同,则说明该血清为抗补体)。

抗原对照:100% 溶血。

补体对照:2.5 个单位补体对照,100%溶血;1.25 个单位补体对照,部分溶血;0.625 个单位补体对照,不溶血。

红细胞对照:不溶血。

阳性判定:一般被检血清稀释 1:5 以上达到 50%抑制溶血时判为阳性。

阴性判定:一般被检血清稀释 1:5 小于 50%抑制溶血时判为阴性。

### (五)马属动物血液原虫的 PCR 检查

#### 1. 马属动物梨形虫的 PCR 检查

##### (1)马属动物梨形虫 DNA 的提取

取 150  $\mu\text{L}$  抗凝血加入 15  $\mu\text{L}$  溶菌酶(100 mg/mL),在 37  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 1 h;然后加入 9  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K(10 mg/mL)、105  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaCl、240  $\mu\text{L}$  5%CTAB,在 65  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 10 min;取出后加等体积酚-氯仿抽提;最后将抽提的 DNA 用 20  $\mu\text{L}$  TAE 溶解。用紫外分光光度计测 DNA 的含量,置于-20  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

##### (2)引物设计。

根据 GenBank 上登录的马巴贝斯虫和驽巴贝斯虫的 18S rRNA 基因序列设计引物。引物序列见表 5-3-5。

表 5-3-5

马巴贝斯虫和驽巴贝斯虫的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	备注
Bab-F	TGCCAGTAGTCATATGCT	马巴贝斯虫、驽巴贝斯虫通用引物
Bab-R	ACGATCAGATACCGTCGTAGTC	
Equi-R	CTTCCTTGCGATTTATGACCGCA	马巴贝斯虫特异性引物
Com-Bec	ACGATCAGATACCGTCGTAGTC	马巴贝斯虫和驽巴贝斯虫共用特异引物
Cab-R	ACTAGGCATTCCTCGTTCATGA	驽巴贝斯虫特异性引物

##### (3)PCR 扩增

PCR 反应在 25  $\mu\text{L}$  体系中进行,其中 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ ,2.5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 1 $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ ,加灭菌去离子水至终体积 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,通用引物退火温度为 58  $^{\circ}\text{C}$ ,特异性引物退火温度为 58.5  $^{\circ}\text{C}$ ,退火时间均为 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。观察有无特异性条带。

Bab-F 和 Bab-R 引物对为马属动物巴贝斯虫检测的通用引物,可以同时检测感染的两种虫体。此对引物扩增马巴贝斯虫和驽巴贝斯虫的目的片段分别为 960bp 和 906bp。Com-Bec 和 Cab-R 为驽巴贝斯虫特异性引物对,目的片段约为 589bp,Com-Bec 和 Equi-R 为马巴贝斯虫特异性引物,目的片段约为 420bp。

#### 2. 马属动物伊氏锥虫的 PCR 检查

##### (1)锥虫基因组 DNA 的提取

所用锥虫虫株在小鼠中增殖后收集血液,利用二乙氨基(DEAE)纤维素-52(DE-



52) 分离法纯化虫体。将纯净虫体加入虫体裂解液和 10 mg/mL 蛋白酶 K, 55 °C 过夜; 以等量酚-氯仿法抽提 DNA, 乙醇沉淀, 最后用 TE 缓冲液 (pH=8.0) 溶解, 用分光光度仪 260 nm 测定其浓度, 于 -20 °C 下保存备用。

(2) PCR 扩增。

根据伊氏锥虫 18S rDNA 序列设计一对引物, 上游引物为: 5'-CAAGACGTGGAG CGTGCGG-3', 下游引物为 5'-TGTAGTGCGCGTGTGCGCC-3'。PCR 反应按常规方法进行, 总体积为 50 μL, 反应参数为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μL PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。观察有无特异性条带。

目的条带为 373bp。

## 五、实训结果与考核

### (一) 考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分, 其中过程考核占 30%, 结果考核占 70%。

### (二) 实训成果

每人应提交实训报告 1 份, 其内容如下:

- (1) 样品采集及注意事项;
- (2) 虫体检查;
- (3) 动物接种;
- (4) 血清学检查;
- (5) PCR 检查。

### (三) 成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级, 标准如下。

优秀 (85~100 分): 熟练掌握血液涂片技术及染色技术、动物接种技术、微量补体结合试验技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作; 能认真完成并及时提交实训报告; 有严格的组织纪律性, 爱护公物。

良好 (70~84 分): 能较为熟练掌握血液涂片技术及染色技术、动物接种技术、微量补体结合试验技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作; 能较认真完成并及时提交实训报告; 有较强的组织纪律性, 爱护公物。

及格 (60~69 分): 基本掌握血液涂片技术及染色技术、动物接种技术、微量补体结合试验技术、ELISA 技术、PCR 技术等技能操作; 能完成实训操作, 提交实训成果, 但完成质量一般; 组织纪律性和工作态度一般。

不及格 (60 分以下): 操作步骤不合理, 有明显的操作失误; 实训报告完成质量差; 组织纪律性和工作态度差, 不爱护公物。

## 实训四 马属动物生殖系统原虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握马媾疫的诊断技术,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:真空采血针、真空采血管(含抗凝剂)、标记笔、灭菌试管、一次性注射器、阴道扩张器、长柄锐匙、灭菌纱布、敷料钳、载玻片、盖玻片、剪刀、镊子、方盘、擦镜纸、采样管、试管、恒温培养箱、光学显微镜、普通离心机、水浴锅、冰箱、PCR扩增仪、凝胶成像系统、电泳仪、甲醇、姬姆萨染色液、2%柠檬酸钠生理盐水、30%奴佛卡因液、1%无水碳酸钠、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、TE 缓冲液、10×PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、上下游引物、TaqDNA 聚合酶、琼脂糖、电泳缓冲液、小白鼠等。

### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订马属动物生殖系统原虫的检查方案,并经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)虫体检查。
- (3)动物接种。
- (4)血清学检查。
- (5)PCR 检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

##### (1)采血

无菌采集颈静脉血,编号,并记录其详细信息,带回实验室后置于4℃冰箱中保存待检。

##### (2)抽取浮肿液、皮肤丘疹液

用无菌的一次性注射器抽取浮肿液和皮肤丘疹液,为了防止吸入血液发生凝固,注射器可先吸入适量的2%柠檬酸钠生理盐水。

### (3) 母马阴道黏膜刮取物

用阴道扩张器扩张母马阴道,再用长柄锐匙在其黏膜有炎症的部位刮取,刮时应稍用力,使刮取物微带血液,以便在其中检测到锥虫。

### (4) 公马尿道刮取物

先将公马保定,左手伸入包皮内,以食指插入龟头窝中,徐徐用力以牵出阴茎。当阴茎牵出困难时,可用30%奴佛卡因液在坐骨切迹部做阴内神经的传导麻醉,即先以触诊法在肛门下,通过会阴部的软组织确定坐骨结节阴茎脚间隙的位置,然后用手指将尿道和通过脚间隙的阴茎血管推向侧方,将注射针头于会阴中线侧方直对触知的坐骨切迹缘刺入,如术者站立右侧,则针头由上向下及由右向左的与会阴表面成 $60^{\circ}\sim 70^{\circ}$ 刺入,深度一般不超过2.5 cm,如此,针头正好避开血管在两阴茎脚间直达坐骨切迹中央,然后注入30%奴佛卡因液20 mL,经5 min后,阴茎即由包皮内脱出,此时可用消毒的长柄锐匙插入尿道中,刮取病料。

(5)将灭菌纱布用生理盐水浸湿,用敷料钳夹持,插入公马尿道或母马阴道擦洗后,取出纱布,洗入无菌生理盐水中,将盐水离心沉淀,取沉淀物检查。

## (二) 虫体检查

### 1. 血涂片检查

采集的血液涂片,用甲醇固定,姬姆萨染色液染色,镜检。

### 2. 压滴标本检查

上述所采的病料均可加适量的生理盐水,置载玻片上,覆以盖玻片,制成压滴标本检查。

### 3. 抹片标本染色检查

可将所采的病料制成抹片,充分干燥、甲醇固定,自然晾干后用1%无水碳酸钠溶液处理3~5 min,水洗、甲醇处理、姬姆萨染色液染色后镜检。

如果在片中有较多轮廓清晰、鲜明的淡蓝色虫体,呈细长纺锤形,扁而弯曲,1根游离鞭毛呈红色,即为马媾疫锥虫。

## (三) 动物接种

实验动物可选用小白鼠、大白鼠、豚鼠和犬等,但常用小白鼠。

抽取病马血液0.5~1 mL,经小白鼠腹腔接种。从接种后第3天起,每天采集小白鼠的尾血镜检,连续检查1个月,如仍不见虫体可判为阴性。

## (四) 血清学检查

方法同实训“马属动物血液原虫检查”中血清学检查的方法。

## (五) PCR 检查

### 1. 锥虫基因组DNA的提取

用酚-氯仿法进行提取。

### 2. 引物设计

根据GenBank登录的马媾疫锥虫MaxicircleDNA基因序列,选择保守区域,利用DNASTar软件设计一对PCR的引物。D1:5'-TGGGTTTATATCAGGTTTCATTTAT-3'和

D2:5'-CCCTAATAATCTCATCCGCAGT-3',扩增目的片段长度为 395bp。

### 3. PCR 扩增

以马媾疫锥虫基因组为模板,采用上述引物进行 PCR 扩增。反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。反应完毕,取5 μL 扩增产物,经 1%琼脂糖凝胶进行电泳,用凝胶成像系统观察记录结果,观察有无目的条带存在。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)样品采集及注意事项;
- (2)虫体检查;
- (3)动物接种;
- (4)血清学检查;
- (5)PCR 检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握样品采集、涂片技术及染色技术、动物接种技术、血清学检查技术、PCR 技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握样品采集、涂片技术及染色技术、动物接种技术、血清学检查技术、PCR 技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握样品采集、涂片技术及染色技术、动物接种技术、血清学检查技术、PCR 技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 第六部分 犬、猫寄生虫病实训

### 实训一 犬、猫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,学生应能熟练掌握粪便检查的方法,并能在显微镜下辨别犬、猫粪便中的各类蠕虫卵和球虫卵囊等,且能与粪便中的非寄生性物质相区别,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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、烧杯或塑料杯、眼科镊(或竹签或火柴棍)、试管、试管架、直径5~10 mm的铁丝圈、离心管、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、培氏皿、滤纸、培养皿、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、40孔反应板、200  $\mu$ L微量移液器及配套吸头、Stool DNA Kit全粪便DNA提取试剂盒、Eppendorf管、麦克马斯特氏虫卵计数板、计数器、托盘天平、显微测微尺、特制球状烧瓶(或大的试管或小三角烧杯)、300 mL容量瓶、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、EDTA、PBS缓冲液、CB、牛血清白蛋白、生理盐水、液氮、NaCl、Tris、HCl、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、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、上下游引物、TaqDNA聚合酶、灭菌双蒸水、硫酸锌、碘、碘化钾、伊红等。

#### 三、实训内容

(1)实训前的准备工作。实训前要做好动员工作,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,制订犬、猫消化系统寄生虫的检查方案,并经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

采集新鲜粪样。每份粪样 150 g, 编号后, 装入干净塑料袋中, 并详细记录采集样品的时间, 待检犬、猫的年龄、性别、驱虫情况及全身状况等。低温带回实验室后, 置于 4 °C 冰箱中保存待检。

### (二) 犬、猫消化系统蠕虫的检查

#### 1. 直接涂片法

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。

还可使用回旋法, 即取 2~3 g 粪便加到 3 倍左右的清水中, 然后用玻棒回旋搅拌 0.5~1 min, 使之充分混匀。在搅拌过程中迅速提起玻棒, 将玻棒上附着的液体放在载玻片上, 加盖玻片, 置于显微镜下观察。

#### 2. 沉淀检查法

##### (1) 自然沉淀法

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 倍量的清水, 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 处, 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, 最后倾去上清液, 吸取沉渣涂于载玻片上, 镜检。

##### (2) 离心沉淀法

取 5 g 左右被检新鲜粪便, 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, 如此重复 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。

沉淀法对各种蠕虫卵及幼虫均可查到, 特别适用于检查比重大的虫卵(如吸虫卵等), 表 6-1-1 为常见几种吸虫卵的鉴别。

表 6-1-1 常见几种吸虫卵的鉴别

虫卵名称	大小	色彩	形状及构造	其他特征
卫氏并殖吸虫	(75~118) $\mu\text{m}$ × (48~67) $\mu\text{m}$	金黄色	椭圆形, 不太对称, 卵盖大, 常略有倾斜	卵内含一个胚细胞和 10 余个卵黄细胞
华支睾吸虫	(27~35) $\mu\text{m}$ × (12~20) $\mu\text{m}$	黄褐色	前端较窄, 具卵盖, 卵盖周围的卵壳形成肩峰; 后端钝圆, 有一逗点状小突起	卵内含有一成熟毛蚴

### 3. 漂浮检查法

#### (1) 试管漂浮法

取新鲜待检粪便 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, 加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

取新鲜被检粪便约 5 g, 置于烧杯内, 加入少量饱和食盐水, 充分搅拌; 待粪与盐水充分混匀后, 再加入粪便的 10~12 倍的饱和食盐水, 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, 则虫卵上浮; 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. 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。对于较小的虫体或节片, 可将粪便置于瓷盆中, 加入 5~10 倍体积的自来水或生理盐水, 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。

## (三) 犬、猫消化系统原虫的检查

### 1. 球虫卵囊的检查

采取待检新鲜粪便, 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鉴别, 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, 加入适量饱和食盐水, 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后, 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。每份粪样测量 50 个卵囊。

### 2. 隐孢子虫的检查

#### (1) 饱和蔗糖离心漂浮法

每份待检粪样取 10~15 g, 加 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,内有一团残体和4个呈淡黄色的香蕉形孢子。隐孢子虫的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。

#### (2)改良抗酸染色法

取10~15 g被检新鲜粪样于烧杯中,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1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,自然干燥后滴加石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×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待检粪便样品,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,清水冲洗,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,用蔗糖漂浮法,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)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,碾碎后过滤备用;

② $2C_3$ 单克隆抗体用0.01 mol/L pH 9.72 CB稀释后,包被40孔反应板在4℃下过夜,第二天取出用3%BSA封闭30 min;

③在反应体系中加入被检样品,40℃反应一定时间;

④取出加入适当浓度的单克隆抗体酶结合物,反应一定时间后取出洗涤;

⑤加入底物溶液,用2 mol/L  $H_2SO_4$ 溶液终止反应;

⑥酶标光度计测定492 nm处的OD值。

### 3. 猫粪便中弓形虫卵囊的检测

#### (1)饱和盐水浮聚法

实验方法 1:取被检动物粪便约 1 g 置于青霉素瓶内,加少许饱和食盐水充分调匀,又加饱和盐水至大半瓶,挑去上浮的粗渣,再用滴管加饱和盐水至液面略高于瓶口而不外溢为止。在瓶口上轻轻覆盖一洁净的载玻片,使其勿产生气泡。如有较大气泡产生,应揭开载玻片加满饱和盐水后再覆盖。静置 15~20 min,接着将载玻片向上提起并迅速翻转,置于镜下观察是否有弓形虫卵囊存在。

实验方法 2:取被检动物粪便 10 g,加饱和食盐水 100 mL,混合,通过 250  $\mu\text{m}$ (60 目)铜筛过滤,滤液收集于烧杯中,静置 30 min。用一直径 5~10 mm 的铁丝圈,与液面平行接触以蘸取表面液膜,抖落于载玻片上,置于镜下观察是否有弓形虫卵囊存在。

#### (2) 35%蔗糖溶液浮聚法

挑取被检猫粪便 5 g 放入 50 mL 离心管,加 10 倍自来水混匀,经铜筛过滤,以 1000 r/min 的转速离心 10 min,弃尽上层液体,沉渣加入 35%蔗糖溶液(含 0.8%石碳酸)混匀,再以 1000 r/min 的转速离心 10 min。用金属圈蘸取液面 2 次或 3 次,置载玻片上,加盖玻片镜检。观察是否有弓形虫卵囊存在。

弓形虫卵囊呈椭圆形,大小为(11~14) $\mu\text{m}$ ×(7~11) $\mu\text{m}$ ,在 400×显微镜下,可见其有两层囊壁,其内充满均匀小颗粒;卵囊孢子化后每个卵囊内有 2 个孢子囊,大小为 3~7  $\mu\text{m}$ ,每个孢子囊内有 4 个呈新月形的子孢子,子孢子一端尖,另一端钝,其胞浆内有暗蓝色的核,靠近钝端。

猫等孢球虫的卵囊呈长椭圆形,大小为(20~33) $\mu\text{m}$ ×(10~19) $\mu\text{m}$ ,孢子化的卵囊内含有 2 个椭圆形孢子囊,无卵囊残体。

图 6-1-1 为弓形虫卵囊与猫等孢球虫卵囊的对比。

注意:弓形虫卵囊极具传染性,特别是成熟的卵囊,一定要注意杀灭,防止传播。所有实验用品实验结束后,都要放入锅中加水浸没,放在电磁炉上加热沸腾 30~60 min。

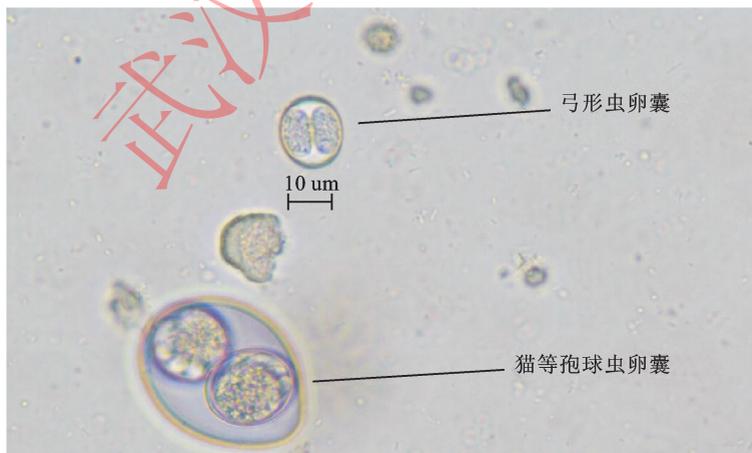


图 6-1-1 弓形虫卵囊与猫等孢球虫卵囊对比(400×)

#### (四) 麦克马斯特氏虫卵计数

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)。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)犬、猫消化系统蠕虫的检查;
- (2)犬、猫消化系统原虫的检查;
- (3)麦克马斯特氏虫卵计数。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握粪便学检查技术、麦克马斯特氏虫卵计数技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握粪便学检查技术、麦克马斯特氏虫卵计数技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握粪便学检查技术、麦克马斯特氏虫卵计数技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训二 犬循环系统寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握犬恶丝虫(也称心丝虫)微丝蚴和血液原虫病的血液涂片技术和染色方法,并能在显微镜下正确判断各种常见血液原虫的形态特点,对检查结果进行正确处理及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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:真空采血针、真空采血管(含抗凝剂)、标记笔、酒精棉球、干棉花、300目网筛、定性滤纸、擦镜纸、载玻片、盖玻片、离心管、100 mL量筒、200  $\mu$ L微量移液器及配套吸头、1.5 mL离心管、托盘天平、显微测微尺、普通离心机、光学显微镜、冰箱、甲醇、甲醛、醋酸、稀盐酸、美蓝(亚甲蓝)、瑞氏染色液、姬姆萨染色液等。

### 三、实训内容

(1)实训前准备。实训前要做好动员工作,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,制订犬、猫循环系统寄生虫的检查方案,并经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)血液涂片法检查。

(3)离心集虫法检查。

(4)过滤法检查。

### 四、实训步骤与方法

#### (一)取样

用于血液涂片法的血液直接采集动物末梢血置于载玻片上,用于离心集虫法和过滤法的血液需采集1 mL于试管中。

采样过程中要注意:①采血前先用酒精棉给动物末梢消毒待干,以免皮屑污染血片和酒精溶血。②取血滴时必须用玻片迅速蘸取在针头刺破后流出的表层血液,以免血液凝固。③注意在出现高温期、未做药物处理前采血,以提高虫体检出率。

#### (二)检查

##### 1. 血液涂片法

##### (1)血液涂片的制作

薄片法适合于观察红细胞中的虫体(如巴贝斯虫):用洁净载玻片的一端从动物末梢穿刺处接触血滴表面,蘸取少量血液;另取一块边缘光滑的载玻片,置于血滴前方,然后稍向后移,触及血滴,使血液均匀分布于两载玻片之间形成一条直线;两载玻片成 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ ,平稳地向前推进,使血液接触面散布均匀,即成薄的血片;抹片完成后置于流动空气中干燥,以防血球皱缩或破裂,并加甲醇固定,待干。

厚滴法适于观察血浆内的虫体(如微丝蚴、附红细胞体等):取血液1~2滴置于洁净载玻片上,用另一载玻片之角,将血滴涂散至直径1 cm即可。检查犬恶丝虫病时可直接血片置于显微镜下观察活的微丝蚴,或待血片干燥以蒸馏水溶解红细胞,趁湿片时镜检。若需染色,则置于室温中自然干燥(至少静置1 h,否则血膜附着不牢,染色时易脱落);染色前先将血片置于蒸馏水中,使红细胞溶解,血红蛋白脱落,血膜呈灰白色为止,再进行染色。

## (2) 血涂片的染色

瑞氏染色方法简单、省时、易于推广,且染色较清晰,特别是胞浆及其中颗粒受染良好,除个别情况外,瑞氏染色液基本可解决绝大部分常见疾病的诊断问题。其具体染色步骤为:

将已编号的涂片水平置于染色板或者染色架上,涂片两端各划一道蜡笔线,主要防止染液外溢;滴加瑞氏染色液(其多少依标本所占面积而定,一般为4~8滴,至染液将标本完全盖住为止。染液不宜过少,否则,甲醛挥发后,易产生沉淀;不可过多,以免因过剩而流失,影响染色);1~2 min后,滴入缓冲液(染液与缓冲液的比例约为1:1.5,冬季为1:1,夏季为1:2)。以气囊向载玻片上轻轻打气,使染液和缓冲液混合均匀,一般不宜口吹气,以免呼出二氧化碳改变缓冲液酸碱度而影响染色;自缓冲液滴入10~15 min后,用自来水冲洗,冲洗时应将载玻片持平,滴入流水,使染液及缓冲液自载玻片边缘溢出,染料沉淀即随水浮去。冲洗时,切忌水力过大,以免将标本和染液同时冲走;冲洗前切不可先将染液倾去,否则沉淀将附于标本上无法除去,染色时间与染液的性质、酸碱度、气温等关系甚大,因此应灵活掌握。最好先冲洗一片载玻片,于低倍镜下进行初步检查,如细胞核浆分明、颗粒清楚,表示染色满意,此时,才可将其余涂片全部冲洗。如染色过浅,则需延长染色时间;冲洗、待干、镜检,如天冷或空气湿度大,可用吸水纸吸水加快干燥速度。但切忌用力重压或擦拭,以免将标本中的细胞成分擦去或破坏。

姬姆萨染色原理和结果与瑞氏染色法基本相同,但其对细胞核和寄生虫着色较好,结构更清晰,而胞质和中性颗粒则着色较差。其具体染色步骤为:

血片用甲醇固定2 min;将血片浸于用10份蒸馏水加1份染液稀释的染色液缸中30 min(过夜最好),或将蒸馏水与染液按2:1稀释好的染色液直接滴加于血片上,染色10 min;血片取出后,用洁净的水冲洗;待干、镜检。

### 2. 离心集虫法

此方法适用于血液中微丝蚴的检查。采静脉血1 mL置于试管内,加入2%甲醛溶液9 mL,或7%醋酸5 mL,亦或1%稀盐酸5 mL,混合均匀以裂解红细胞。将混合液以2500 r/min的转速离心20 min,弃上清液。取沉渣涂片镜检。或涂片后用0.1%美蓝液混合,加盖玻片镜检。

该方法最好使用稀盐酸和醋酸,甲醛溶液可使沉淀物混浊,不易挑取;涂片后最好染色后镜检,虫体较为清楚。

### 3. 过滤法

此方法适用于血液中微丝蚴的检查,观察虫体最为直接。采血1 mL,加入2.5%柠檬酸钠5 mL,将混合液倒入300目筛网中进行过滤。用定性滤纸蘸干筛网背面的血液后直接镜检。由于抗凝血中的红细胞可通过筛网滤掉,因此只有虫体留在筛网网格中,低倍镜下很容易观察。

犬恶丝虫的微丝蚴约为0.3 mm,在新鲜血液中看到其做蛇形和环形运动并经常与红细胞碰撞。染色可见体态弯曲柔和,无鞘膜。

吉氏巴贝斯虫:虫体很小,多位于红细胞边缘或偏中央,呈环形、椭圆形、圆点形、小杆形等。

犬巴贝斯虫:虫体很大,最长的可达 $7\mu\text{m}$ ,在红细胞中多成双梨形排列,两个虫体的尖端以锐角相连。在红细胞中虫体数目较多。

附红细胞体:呈球形、卵圆形、月牙形或逗点状、短杆状等多形态,虫体多位于红细胞边缘,被寄生的红细胞变形为齿轮状、星芒状或不规则形。如在涂片上加1滴0.1%稀盐酸,则可见虫体运动增强。虫体对各类染色均易着色,瑞氏染色液染色时红细胞呈淡紫红色,附红细胞体呈淡天蓝色。姬姆萨染色液染色时,红细胞呈紫红色,附红细胞体有折光性,外围有白色。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占30%,结果考核占70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告1份,其内容如下:

- (1)血液采集及注意事项;
- (2)犬、猫循环系统寄生虫的检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握血液涂片技术、染色液的配制技术、瑞氏染色技术、姬姆萨染色技术、离心集虫法、过滤法等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握血液涂片技术、染色液的配制技术、瑞氏染色技术、姬姆萨染色技术、离心集虫法、过滤法等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握血液涂片技术、染色液的配制技术、瑞氏染色技术、姬姆萨染色技术、离心集虫法、过滤法等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 实训三 犬皮肤寄生虫的检查

### 一、实训目的与要求

通过实际操作训练,学生应能熟练掌握犬螨病的诊断技术,对检查结果进行正确处理

及判断,能够规范书写实训报告。同时培养学生自我学习、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

各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:手术刀片、镊子、擦镜纸、载玻片、盖玻片、平皿、表面皿、光学显微镜、普通离心机、恒温培养箱(或水浴锅)、解剖镜、碘酊、氢氧化钠(或甘油、液体石蜡)等。

## 三、实训内容

(1)实训前准备。实训前要做好动员工作,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,制订犬皮肤寄生虫的检查方案,并经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)犬皮肤寄生虫的采样。

(3)犬皮肤寄生虫的检查。

## 四、实训步骤与方法

### (一)采样

采集部位:对于蚤、虱、蜱,可在体表观察到虫卵或虫体,并直接采集;对于螨,应从患部刮取皮屑;甚至挤压或切破皮肤上的结节或脓疱,取其内容物作涂片。

刮取皮屑:选择患部皮肤和健康皮肤交界处,先剪毛,然后用经火焰消毒的小刀与皮肤呈垂直角度用力刮取,直至皮肤微有出血痕迹为止,刮破处用碘酊消毒,将刮取物收集到容器内待检。

### (二)犬皮肤寄生虫的检查

#### 1. 直接观察法

在没有显微镜的情况下可将刮下的干燥皮屑,放于平皿或黑纸上,在日光下暴晒或用热水或炉火等对平皿底或底面给以 40~50℃ 的加温,经 30~40 min 后,移出皮屑,这时可看到白色虫体在黑色背景上移动。

或者将皮屑浸入 40~45℃ 的温水中,置于恒温培养箱或水浴锅中 1~2 h,将其倾入表面皿内,用解剖镜检查。此时由于温热作用,螨由皮屑内爬出,集成团,沉于水底。

#### 2. 显微镜直接检查

将皮屑置于载玻片上,加数滴 5% 的甘油水(或液体石蜡、10% 的氢氧化钠溶液、煤油,加盖载玻片后搓压,使病料散开,然后分开载玻片,加盖玻片后置于显微镜下,检查。

若病料为结节或脓疱内容物,则直接涂片镜检。

#### 3. 虫体浓集法

为了在较少的病料中检出其中较多的虫体,提高检出率,可采用此法。先取病料置于

大试管内,加入 10%的氢氧化钠溶液浸泡过夜或于酒精灯上煮沸 3~5 min,使皮屑溶解。然后待其自然沉淀或离心沉淀,虫体即沉于管底,弃上层液,吸取沉渣,制成涂片,镜检。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占 30%,结果考核占 70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告 1 份,其内容如下:

- (1)犬皮肤寄生虫病病料采集及注意事项;
- (2)犬皮肤寄生虫的检查。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100 分):熟练掌握犬皮肤寄生虫病病料采集方法、犬皮肤寄生虫的检查技术等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84 分):能较为熟练掌握犬皮肤寄生虫病病料采集方法、犬皮肤寄生虫的检查技术等技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69 分):基本掌握犬皮肤寄生虫病病料采集方法、犬皮肤寄生虫的检查技术等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60 分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。

## 第七部分 其他综合实训

### 实训 动物驱虫试验及其效果评定

驱虫是寄生虫病防治的重要措施,通常是指用药物将寄生于动物体内外的寄生虫杀灭或驱除。这种措施具有双重意义:一方面,在宿主体内或体表驱除或杀灭寄生虫,使宿主得到康复;另一方面,杀灭寄生虫就是减少病原体向自然界的散布,也就是对健康动物的保护或预防。驱虫可分为治疗性驱虫和预防性驱虫两种类型。治疗性驱虫是指当动物感染寄生虫之后出现明显的临床症状时要及时用特效驱虫药对患病动物进行治疗。预防性驱虫是指按照寄生虫病的流行规律,定时投药,而不论其发病与否。防治蠕虫病常采用定期预防性驱虫,防治球虫病常采用长期给药预防。通常,在选择用药或实施大规模驱虫之前都要对动物进行驱虫试验。

#### 一、实训目的及要求

熟悉动物驱虫试验的方法步骤,掌握驱虫试验的效果评定方法。

#### 二、实训条件配备要求

各小组制订动物驱虫试验的设计方案。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:猪、羊、牛等;铅笔、记号笔、盆、盘、不同容量的玻璃缸、平皿、量筒、刀、小解剖刀、标本针、镊子、解剖针、棉花、纱布、放大镜、毛巾、肥皂、载玻片、盖玻片、麦克马斯特氏虫卵计数板、试管、小标本瓶、注射器、显微镜、伊维菌素注射液、生理盐水、饱和食盐水等。

#### 三、实训步骤与方法

##### (一)动物的分组

选择性别相同、体重相近的试验动物 20 头,经粪便检查自然感染线虫。将试验动物随机分成两个组,每组 10 只,使每组之间体重大致相当。

##### (二)驱虫前检查

投药前 1~2 d,每天逐头收集粪便两次,混匀,采用饱和食盐水漂浮法检查试验动物感染数,用麦克马斯特氏法检查各组每头试验动物粪便中虫卵的数量,计算每克粪便中线虫卵的数量(EPG)。

### (三)投药

第一组按 0.3 mL/10 kg 体重注射 1% 的伊维菌素。第二组为对照组。

### (四)驱虫后检查

(1)观察试验动物的食欲、精神状况和粪便状况等。

(2)用药后 3~5 d,将试验动物所排出的粪使用粪兜全部收集起来,进行水洗沉淀,计算并鉴定驱出虫体的数量和种类。

(3)用药后第 6 天,剖检各组中一半试验动物,收集并计算残留在试验动物体内各种线虫的数量,鉴定其种类。

(4)其他试验动物在用药后 15~20 d,每天逐头两次收集粪便,混匀,采用饱和食盐水漂浮法检查试验动物感染数,用麦克马斯特氏法检查各组每头试验动物粪便中虫卵的数量,计算每克粪便中线虫虫卵的数量(EPG)。

### (五)驱虫效果的判定

采用虫卵减少率、虫卵消失率、精计驱虫率和粗计驱虫率几种指标来判定驱虫效果。驱虫试验的结果可按表 7-1-1 和表 7-1-2 处理。

$$\text{虫卵减少率}(\%) = \frac{(\text{驱虫前平均虫卵数/g} - \text{驱虫后平均虫卵数/g})}{\text{驱虫前平均虫卵数/g}} \times 100\%$$

$$\text{虫卵消失率}(\%) = \frac{(\text{驱虫前动物感染数} - \text{驱虫后动物感染数})}{\text{驱虫前动物感染数}} \times 100\%$$

$$\text{精计驱虫率}(\%) = \frac{\text{驱出虫数}}{(\text{驱出虫数} + \text{残留虫数})} \times 100\%$$

$$\text{粗计驱虫率}(\%) = \frac{[\text{对照动物荷虫总数} - \text{驱虫后试验动物(体)内残留活虫数}]}{\text{对照动物荷虫总数}} \times 100\%$$

表 7-1-1 试验动物粪便中虫卵变化

检查项目	伊维菌素处理组		对照组	
	驱虫前	驱虫后 20 d	驱虫前	驱虫后 20 d
阳性动物头数				
阴性动物头数				
克粪便虫卵数				
虫卵转阴率	—		—	
虫卵减少率	—		—	

注：“—”为无数据。

表 7-1-2 驱出虫数与体内残留虫数

检查项目	伊维菌素处理组	对照组
驱出虫数		
残留虫数		
精计驱虫率		
粗计驱虫率		

## (六) 驱虫试验实例

### 1. 材料和方法

(1) 试验药物。1%伊维菌素注射液、1%阿维菌素注射液。

(2) 试验动物。猪, 21头, 系某养殖场饲养, 经检验自然感染线虫。

(3) 试验方法

①分组和投药。第一组7头(1头育肥猪、3头哺乳猪、3头怀孕母猪), 注射1%阿维菌素0.3 mL/10 kg体重。第二组7头(4头哺乳猪、3头怀孕母猪), 注射1%伊维菌素0.3 mL/10 kg体重。第三组7头, 对照组。

②驱虫效果观察。试验过程中观察猪的食欲、精神状况和粪便状况等, 用药前1 d、用药后1~15 d, 每天逐头收集粪便两次, 混匀, 用沉淀法检查体内线虫的排出情况, 用麦克马斯特氏法检查各组每头猪粪便中虫卵的数量, 计算每克粪便中线虫虫卵的数量(EPG)和虫卵减少率, 用饱和盐水漂浮法检查每组每头猪粪便中虫卵的有无, 计算虫卵转阴率, 公式如下:

$$\text{虫卵转阴率}(\%) = \frac{\text{驱虫后虫卵转阴猪头数}}{\text{驱虫前虫卵阳性猪头数}} \times 100\%$$

$$\text{虫卵减少率}(\%) = \frac{(\text{驱虫前 EPG} - \text{驱虫后 EPG})}{\text{驱虫前 EPG}} \times 100\%$$

### 2. 试验结果

(1) 阿维菌素试验组, 在驱虫前平均 EPG 为 132, 在注射阿维菌素后 9 d, 麦克马斯特氏法检查未发现虫卵, 饱和盐水漂浮法检查, 粪便中无线虫虫卵检出, 虫卵转阴率为 100%, 虫卵减少率为 100%(表 7-1-3)。

表 7-1-3 不同时间猪粪便中虫卵变化

检查项目	处理组				对照组	
	阿维菌素		伊维菌素		驱虫前	驱虫后 9 d
	驱虫前	驱虫后 9 d	驱虫前	驱虫后 9 d		
阳性猪头数	7	0	7	0	7	7
阴性猪头数	0	7	0	7	0	0
克粪便虫卵	132	0	97	0	115	121
虫卵转阴率	—	100%	—	100%	—	0
虫卵减少率	—	100%	—	100%	—	-4%

注: “—”为无数据。

(2) 伊维菌素试验组, 在驱虫前平均 EPG 为 97, 在注射伊维菌素后 9 d, 麦克马斯特氏法检查未发现虫卵, 饱和盐水漂浮法检查, 也未发现虫卵, 虫卵转阴率为 100%, 虫卵减少率为 100%(表 7-1-3)。

(3) 对照组, 在驱虫前平均 EPG 为 115, 9 d 后阳性猪头数为 7 头, 平均 EPG 为 121, 虫卵转阴率为 0, 虫卵减少率为 -4%(表 7-1-3)。

(4) 试验组在使用阿维菌素和伊维菌素后, 第 1 天猪就有虫体排出, 2~4 d 为排虫高

峰,7 d后无虫体排出,对照组在此时间内无虫体排出(图 7-1-1)。EPG 在两种药物驱虫后 4 d 明显减少,9 d 后无虫卵排出,对照组虫卵变化不明显(图 7-1-2)。

(5)根据粪便检查中发现的虫卵特点和排出的虫体,初步确定本群猪感染的线虫主要为蛔虫、食道口线虫和鞭虫,并且为混合感染。

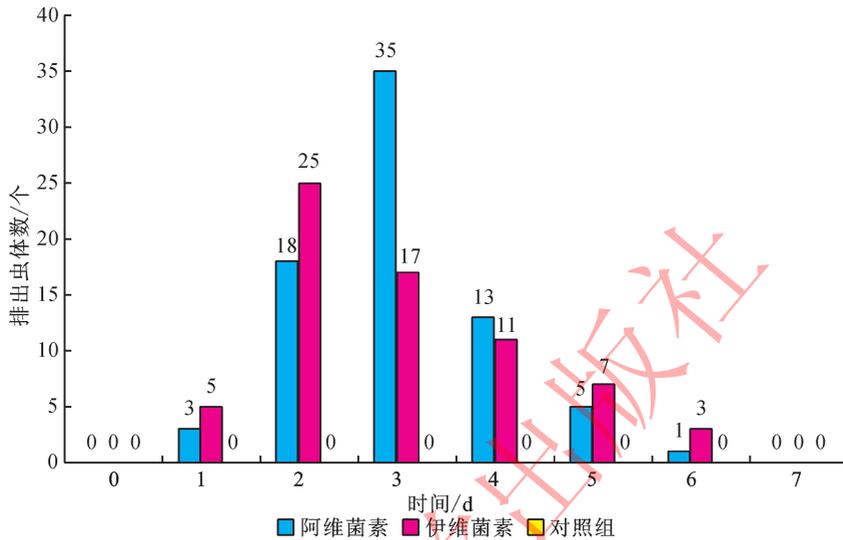


图 7-1-1 虫体排出数和时间关系图

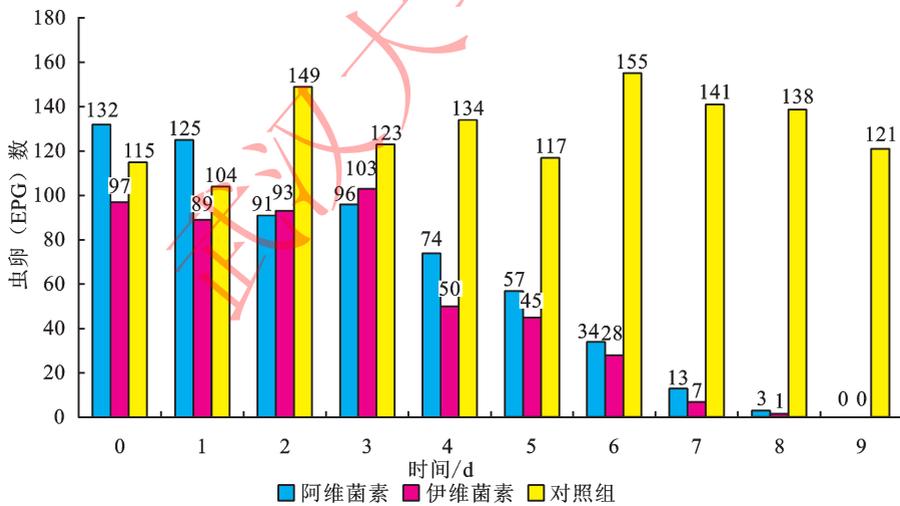


图 7-1-2 虫卵 (EPG) 和时间变化关系图

#### 四、实验注意事项

##### (一) 选准驱虫时机

对于定期驱虫而言,驱虫效果的好坏与驱虫时机选择得合适与否密切相关。驱虫的

具体日期,应根据各种蠕虫的发育史,尤其是在宿主体内发育至成熟的时间、感染的季节、动态等来决定,如条件允许选择在“成熟前驱虫”最好。因为这样可以在产卵之前驱除虫体而彻底消灭病原。一般对仔猪蛔虫可于2.5~3月龄和5月龄各进行一次驱虫,对犊牛、羔羊的绦虫,应于当年开始放牧后的1个月内即进行驱虫。

## (二)确定驱虫对象

(1)根据寄生虫病流行病学资料,同时结合临床症状,抽检一定数量的病畜,以了解群体中寄生虫病感染率及感染强度,然后做出决定。

(2)根据动物体质的强弱、有无其他严重疾病及怀孕与否等情况来确定。一般对于有严重疾病或正处在高热期的患畜,先进行适当的处理,待好转以后进行驱虫。孕畜在怀孕期间不能驱虫的,应加强管理,于适当时期补行驱虫。对多宿主寄生虫而言,所有带虫动物均应同时驱虫,如肝片吸虫寄生于牛羊,在给牛驱虫的同时,应对附近的羊进行驱虫。

## (三)驱虫动物的管理

最主要的是在投药后排虫期间的管理,在排虫期间应设法控制所有动物排出的成虫、幼虫或虫卵的散布,并加以杀灭。

(1)一般在动物驱虫后5d内,应集中管理,及时清扫其所排出的粪便,利用堆积发酵的办法杀死粪便内的寄生虫。

(2)5d后应把驱虫动物驻留过的场地彻底清扫、消毒,以消灭残留的寄生虫卵或卵囊。

(3)在驱虫期间应加强对动物的看管和必要的护理,供给充足的清洁饮水,注意适当的运动,如发现较严重的副作用或中毒现象,应及时抢救。

(4)役畜在驱虫期间最好停止使役。

## 五、实训结果与考核

### (一)考核方式

本实训考核方式包括过程考核和结果考核两部分,其中过程考核占30%,结果考核占70%。

### (二)实训成果

每人应提交实训报告1份。

### (三)成绩评定

实训结束后根据学生的实践操作熟练程度及实训成果、组织纪律、工作态度、爱护仪器设备五个方面由指导教师综合评定成绩。通过综合评分划分优秀、良好、及格、不及格四个等级,标准如下。

优秀(85~100分):熟练掌握动物驱虫操作要领、驱虫效果判定等技能操作;能认真完成并及时提交实训报告;有严格的组织纪律性,爱护公物。

良好(70~84分):能较为熟练掌握动物驱虫操作要领、驱虫效果判定技能操作;能较认真完成并及时提交实训报告;有较强的组织纪律性,爱护公物。

及格(60~69分):基本掌握动物驱虫操作要领、驱虫效果判定等技能操作;能完成实训操作,提交实训成果,但完成质量一般;组织纪律性和工作态度一般。

不及格(60分以下):操作步骤不合理,有明显的操作失误;实训报告完成质量差;组织纪律性和工作态度差,不爱护公物。



### 拓展阅读

#### 1. 几种动物的估重法

体测估重计算公式:

$$\text{黄牛体重(kg)} = (\text{胸围})^2 \times \text{体斜长(cm)} \div 10800$$

$$\text{水牛体重(kg)} = (\text{胸围})^2 \times \text{体斜长(cm)} \div 12700$$

$$\text{成年猪体量(kg)} = (\text{胸围})^2 \times \text{体长(cm)} \div 14085$$

胸围是从肩胛后围绕胸廓一周的长度;体斜长是从肩端到坐骨端的直线长度,两侧同时测量取其平均值;体长是指从猪两耳根连线的中点,沿背脊线到尾根的距离。

#### 2. 驱虫药物的选择标准

驱虫药种类很多,应合理选择,正确应用,以便更好地发挥药物的作用。广谱、高效、安全、投药方便、价格低廉、无残留、不易产生耐药性、药源丰富等条件是衡量抗寄生虫药物临床价值的标准,也是驱虫药物的选择标准。

(1)广谱是指驱虫范围广。动物往往受到多种寄生虫的感染,仅对某种或某一类寄生虫有特效的驱虫药已不能满足生产发展的要求,因此要注意选择广谱驱虫药或采取两种以上驱虫药的复合疗法,以期达到一次投药即能驱除多种寄生虫的目的。如害获灭既能驱除蜱、螨等外寄生虫,又能驱除消化道线虫;硝氯酚与左咪唑的复合疗法可以驱除牛的胃肠道线虫、肺线虫和肝片吸虫;伊维菌素对线虫和体外寄生虫均有效。

(2)高效。良好的驱虫药应该是使用小剂量即能达到满意的驱虫效果。所谓高效的驱虫药,即对成虫、幼虫,甚至虫卵都有很好的驱杀作用,且使用剂量小。一般来说,其虫卵减少率应达95%以上,若小于70%则属较差;使用剂量应小于10 mg/kg,若剂量太大,会给使用带来不便,造成推广困难。

(3)安全。抗蠕虫药应该对虫体有强大的驱杀作用,而对宿主无毒性或毒性很小。安全范围大小的衡量标准是化疗指数[半数致死量(LD<sub>50</sub>)/半数有效量(ED<sub>50</sub>)],化疗指数越大,表示药物对有机体的毒性越小,越安全。一般认为化疗指数必须大于3,才有临床应用意义。

(4)投药方便。驱虫药应无味或无特殊气味,又能溶于水,这样可通过饮水、混饲或喷雾给药,也可以节约人力、物力,提高工作效率。

(5)价格低廉。畜禽属经济动物,在防治寄生虫病时,必然要考虑到经济核算问题,尤其是在牧区和集约化养殖场,牲畜多,用药量大,应有较低廉的价格。

# 附 录

## 附录一 常用试剂及其配制

1. 石复红溶液  
碱性复红 4 g、95%乙醇 20 mL、苯酚 8 mL、蒸馏水 100 mL。
2. 10%硫酸溶液  
纯硫酸 10 mL,蒸馏水 90 mL(边搅拌边将硫酸缓慢倒入水中)。
3. 2%孔雀绿水溶液  
孔雀绿 2 g,95%乙醇 100 mL。使用时,取 2%孔雀绿水溶液 1 mL,加蒸馏水 10 mL 稀释成 0.2%后使用。
4. 饱和食盐溶液  
在 1000 mL 烧开的蒸馏水中加入食盐 380 g,待其完全溶解后,趁热用纱布过滤,待其凉后即可使用。
5. 饱和硫酸锌溶液  
硫酸锌 400 g,蒸馏水 1000 mL。配制方法同饱和食盐溶液。
6. 饱和硫酸镁溶液  
硫酸镁 440 g,蒸馏水 1000 mL。配制方法同饱和食盐溶液。
7. 饱和蔗糖溶液  
蔗糖 1280 g,蒸馏水 1000 mL,5%苯酚 21 mL。配制方法同饱和食盐溶液。
8. 福尔马林溶液  
福尔马林 50 mL,蒸馏水 450 mL。
9. 卢戈氏碘液  
碘 1 g,碘化钾 2 g,蒸馏水 300 mL。配制时,将碘和碘化钾混合,加蒸馏水少许,充分振摇,溶解后再加入蒸馏水至 300 mL。配成后存储于棕色瓶内备用,如变为浅黄色,即不能使用。
10. 伊红溶液  
伊红 1 g,加蒸馏水至 100 mL。
11. DNA 裂解液  
500 mmol/L NaCl 60  $\mu$ L、100 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0) 30  $\mu$ L、50 mmol/L EDTA(pH=8.0)150  $\mu$ L、10%SDS 30  $\mu$ L 和 50  $\mu$ g/ $\mu$ L 蛋白酶 K30  $\mu$ L。
12. 清洁液  
重铬酸钾 2 份,硫酸 3 份,水 25 份。

### 13. 瑞氏染色液试剂

(1) 瑞氏试剂: 瑞氏染料(粉) 1 g, 加不含醋酮的甲醇 600 mL 溶解过滤后即成。混合方式可将瑞氏染料置于研钵内, 加适量甲醇混合研磨, 使染料溶解, 将已溶解的液体倒入洁净玻璃瓶, 再放入甲醇继续溶解剩余染料, 直至染料及甲醇均用完为止, 然后过滤, 以深色中性的玻璃瓶储备待用。亦可将 1 g 染料一次性加入 600 mL 甲醇中, 盛入深色玻璃瓶内, 塞好瓶口, 置于温暖而黑暗的环境下或 37 °C 恒温培养箱内, 每日振荡 5 min, 连续 7 天以上, 然后过滤储备用。染液宜久置后使用, 通常存放愈久, 染色效果愈好。

(2) 缓冲液: 由 1% 的磷酸氢二钠和 1% 的磷酸二氢钾各 30 mL 加蒸馏水 1000 mL 配成, 或取以上两药各 1 g 加 2500 mL 左右蒸馏水制成。以石蕊试纸检验、调整酸碱度, 使 pH 值为 6.5~7.0 即可。

缓冲液亦可用新鲜蒸馏水或煮沸后密闭保存的蒸馏水。如蒸馏水与空气过多接触, 则可因吸收空气中的二氧化碳而使 pH 值变低, 影响染色, 故不宜使用。

### 14. 姬姆萨染色液原液

(1) 先将姬姆萨染色粉置于研钵中, 加少量甘油充分研磨, 再加甘油研磨, 直至甘油全部加完为止。将其倒入棕色小口试剂瓶中, 在研钵中加入少量甲醇以冲洗甘油染液, 冲洗液仍倒入上述瓶中, 再加甲醇再洗再倒入, 直至 25 mL 甲醇全部用完为止。

(2) 塞上瓶盖, 充分摇匀, 而后将瓶置于 65 °C 恒温培养箱中 24 h 或室温 3~5 d, 并不时摇动, 然后过滤到棕色小口试剂瓶中, 即为原液。

### 15. 布勒氏液

福尔马林原液 7 mL, 70% 酒精 90 mL, 临用前加入冰醋酸 3~5 mL。

### 16. 胎儿毛滴虫运输培养基(TFTM)

硫乙醇酸盐培养基 29.8 g, 蒸馏水 1000 mL, 115 °C 高压后, 冷却至 56 °C 加入灭能牛血清 100 mL, 青霉素 100000 U, 链霉素 1 g, 真菌抑制剂 2 mL, 将培养基混匀后分装到 10 mL 的灭菌试管中, 每管 5 mL, 置于冰箱中冷藏, 应在 2 周内使用。

### 17. 改良 Diamond 培养基

胰蛋白胨 2 g, 酵母提取物 1 g, 麦芽糖 0.5 g, 盐酸半胱氨酸 0.1 g, 抗坏血酸 0.02 g, 磷酸氢二钾 0.08 g, 磷酸二氢钾 0.08 g, 蒸馏水 90 mL, 调 pH 值为 7.2~7.4, 再加 0.05 g 琼脂糖, 121 °C 高压灭菌 10 min, 降至 49 °C, 然后加灭活牛血清 10 mL, 青霉素 G 粉 100000 U、硫酸链霉素 0.1 g, 按每管 10 mL 分装, 在 4 °C 保存备用。

### 18. 3 mol/L 乙酸钠

称量 40.8 g NaAc · 3H<sub>2</sub>O 置于 100~200 mL 烧杯中, 加入 40 mL 的去离子水搅拌溶解; 加入冰乙酸调节 pH 值至 5.2, 加去离子水将溶液定容至 100 mL。高温高压灭菌后, 在室温下保存。

### 19. Lugol 氏液

称取碘 5 g, 碘化钾 10 g, 用蒸馏水溶解, 再加水定容至 100 mL。

### 20. 改良阿氏液

葡萄糖 2.05 g, 柠檬酸钠 0.8 g, 氯化钠 0.42 g, 柠檬酸 0.055 g, 蒸馏水 1000 mL。

## 21. Bouin 氏液

苦味酸饱和水溶液(0.9%~1.2%)75 mL;甲醛(37%~40%)25 mL;冰醋酸 5 mL。

## 22. Helly 氏液

升汞 5 g;重铬酸钾 2.5 g;蒸馏水 100 mL;甲醛(40%)5 mL。配制时先将升汞、重铬酸钾溶于水中,加湿使之溶解,冷却后过滤,储于棕色瓶中。临用使取此液 95 mL,加甲醛 5 mL,即可。

## 23. Hank's 液

(1)原液甲:氯化钠 8 g、氯化钾 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2 g、2.8%氯化钙 100 mL,双蒸水加至 1000 mL。先将固体成分加于 800 mL 双蒸水中,加温到 50~60 °C 加速溶解;再加入氯化钙溶液,最后加双蒸水补足到 1000 mL。加氯仿 2 mL,摇匀后于 4 °C 贮存。

(2)原液乙: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  1.2 g、 $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.2 g、葡萄糖 20 g、0.4%酚红 100 mL,双蒸水加至 1000 mL。将上列各物混合后使其溶解,加氯仿 2 mL,摇匀后于 4 °C 下贮存。

(3)Hank's 工作液:原液甲 1 份、原液乙 1 份、双蒸水 18 份。工作液分装于 100 mL 或 500 mL 瓶中,115 °C 下灭菌 10 min,使用前以 7%碳酸氢钠调节 pH 值为 7.2~7.6。

## 24. 0.4% 酚红溶液

酚红 0.4 g、0.1%氢氧化钠溶液 11.28 mL。将酚红置于研钵中,边磨边缓缓加碳酸氢钠溶液,直到所有颗粒完全溶解,置于 100 mL 量杯中,最后加双蒸水 100 mL,摇匀后,保存于 4 °C 冰箱内备用。

## 25. 0.5% 乳蛋白水解物溶液

胰蛋白水解物 5 g,Hank's 液 1000 mL。将乳蛋白水解物放入 1000 mL Hank's 液中,待完全溶解后,摇匀分装于 100 mL 的瓶中,每瓶 95 mL,在 115 °C 下灭菌 10 min,于 4 °C 下贮存备用。

## 26. 营养液(生长液)

0.5%乳蛋白水解物 95 mL、犊牛血清 5 mL、青霉素和链霉素共 1 mL。将上述溶液混合后,以 7%碳酸氢钠适量调节 pH 值为 7.2~7.4。维持液按上述方法,加犊牛血清 2.5 mL 即成。

## 27. MEM 培养液

EME 培养基 1 袋,加 1000 mL 双蒸水,过滤除菌或高压灭菌,分装于 100 mL 瓶中,每瓶 90 mL,用前以 7%碳酸氢钠调节 pH 值为 7.2~7.4,并加 10%犊牛血清。

## 28. 双抗

青霉素 100 万 IU,链霉素 1 g,Hank's 液 100 mL。将青霉素、链霉素溶解于 100 mL Hank's 溶液中,此为双抗溶液,无菌操作,分装小瓶,每瓶 1 mL,内含青霉素 1 万 IU、链霉素 10000  $\mu$ g,低温冻结保存。

使用时每 100 mL 营养液中加双抗 1 mL,即每毫升营养液中含青霉素 100IU,链霉素 100  $\mu$ g。

29. 7%的碳酸氢钠溶液

碳酸氢钠 7 g, 双蒸水 100 mL。将碳酸氢钠溶于双蒸水中, 置水浴锅中加热溶解, 在 115 °C 下, 灭菌 10 min 后, 进行无菌操作, 再分装于小瓶, 每瓶 1 mL, 在 4 °C 下保存。

30. 0.25%胰蛋白酶

胰蛋白 0.25 g、Hank's 液 100 mL。将胰蛋白酶溶于 Hank's 液中, 待完全溶解后, 用 0.2 μm 滤膜过滤, 检验无菌后才能使用。无菌分装小瓶, 每瓶 5 mL, 低温冻结保存。使用时, 以 7% 碳酸氢钠调节 pH 值为 7.6~7.8。

31. 0.02 mol/L、pH=8.2 TBS 缓冲液

Tris 4.84 g, 氯化钠 17.5 g, 蒸馏水 1500 mL。混匀后用浓盐酸调节 pH 值为 8.2, 加蒸馏水至 2000 mL。

32. 0.05 mol/L、pH=7.4 TBS 缓冲液

Tris 12.1 g, 氯化钠 17.5 g, 蒸馏水 1500 mL。混匀后用浓盐酸调节 pH 值为 7.4, 加蒸馏水至 2000 mL。

33. 10%健康兔血清

A 液: 9 mL 0.05 mol/L pH7.4 TBS + 1 mL 兔血清 + 200 mg BSA。

B 液: 9 mL 0.02 mol/L pH8.2 TBS + 1 mL 兔血清 + 200 mg BSA。

34. 显影剂

A 液: 对苯二酚 850 mg、柠檬酸 2.55 g、柠檬酸钠 2.35 g、双蒸水 85 mL。

B 液: 硝酸银 95 mg、双蒸水 15 mL。

## 附录二 显微镜测微器在寄生虫学方面的使用方法

通常的目镜测微尺是一块圆形玻片, 在玻片中央把 5 mm 长度刻成 50 等份、把 10 mm 长度刻成 100 等份或将 1 mm 长度刻成 100 等份。测量时, 将其放在接目镜中的隔板上(此处正好与物镜放大的中间像重叠)来测量经显微镜放大后的细胞物像。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同, 目镜测微尺每格实际表示的长度也不一样, 因此, 目镜测微尺测量微生物大小时须先用置于镜台上的镜台测微尺校正, 以求出在一定放大倍数下, 目镜测微尺每小格所代表的相对长度。

通常的镜台测微尺是中央部分刻有精确等分线的载玻片, 一般将 1 mm 等分为 100 格, 每格长 10 μm(0.01 mm), 是专门用来校正目镜测微尺的。校正时, 将镜台测微尺放在载物台上, 由于镜台测微尺与细胞标本是处于同一位置, 都要经过物镜和目镜的两次放大成像进入视野, 即镜台测微尺随着显微镜总放大倍数的放大而放大, 因此从镜台测微尺上得到的读数就是细胞的真实大小, 所以用镜台测微尺的已知长度在一定放大倍数下校正目镜测微尺, 即可求出目镜测微尺每格所代表的长度, 然后移去镜台测微尺, 换上待测标本片, 用校正好的目镜测微尺在同样放大倍数下测量微生物大小。

目镜测微尺的校正: 把目镜的上透镜旋下, 将目镜测微尺的刻度朝下轻轻地装入目镜的隔板上, 把镜台测微尺置于载物台上, 刻度朝上。先用低倍镜观察, 对准焦距, 视野中看清镜台测微尺的刻度后, 转动目镜, 使目镜测微尺与镜台测微尺的刻度平行, 移动推动器, 使两尺重叠, 再使两尺的“0”刻度完全重合, 定位后, 仔细寻找两尺第二个完全重合的刻

度,计数两重合刻度之间目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。因为镜台测微尺的刻度每格长  $10\ \mu\text{m}$ ,所以由下列公式可以算出目镜测微尺每格所代表的长度。

目镜测微尺每格刻度值(mm)=台尺重合格数 $\times$ 0.01 mm/目尺重叠的格数

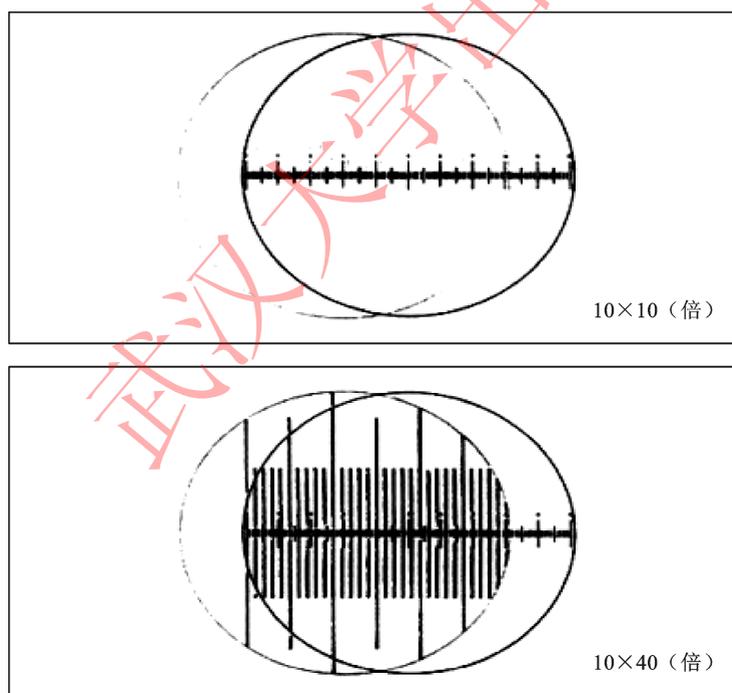
例如,目镜测微尺5小格正好与镜台测微尺5小格重叠,已知镜台测微尺每小格为  $10\ \mu\text{m}$ ,则目镜测微尺上每小格长度= $5\times 10\ \mu\text{m}/5=10\ \mu\text{m}$ 。用同样的方法分别校正在高倍镜下和油镜下目镜测微尺每小格所代表的长度。

不同显微镜及附件的放大倍数不同,因此,校正目镜测微尺必须针对特定的显微镜和附件(特定的物镜、目镜、镜筒长度)进行,而且只能在特定的情况下重复使用,当更换不同放大倍数的目镜或物镜时,必须重新校正目镜测微尺每格所代表的长度。

注意,这样测出的目镜测微尺每格的长度只适用于一定的显微镜,一定的目镜倍数,一定的物镜倍数。更换其中任一因素,其每格的长度必须重新测量换算。此外,如需要用油镜时,必须在物镜测微尺上加盖玻片后再测量,以免损坏格线。

用目镜测微尺测量虫卵大小时,一般是测量虫卵的最长和最宽处,圆形虫卵则是测量直径;测量幼虫和某些成虫时,是测量虫体的长度、宽度及各部构造的尺寸大小;虫体弯曲时,可通过旋转目镜测微尺的办法,来进行分段测量,最后将数据加起来即可。

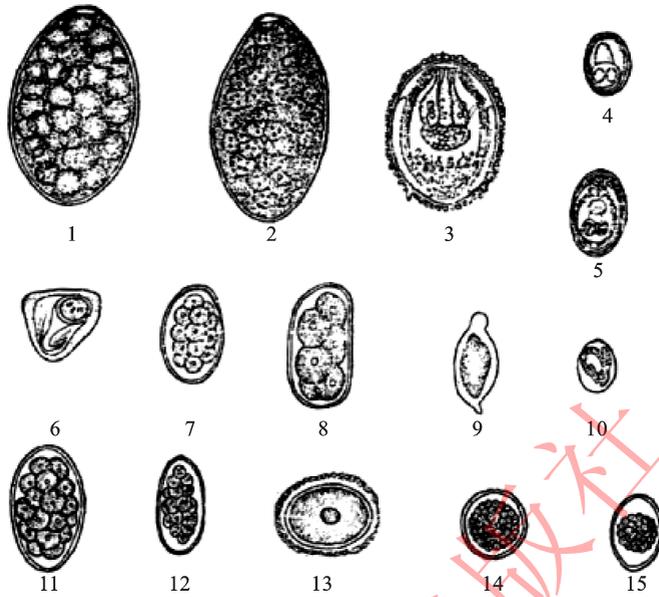
附图 1-2-1 为显微镜测微器示意图。



附图 1-2-1 显微镜测微器示意图

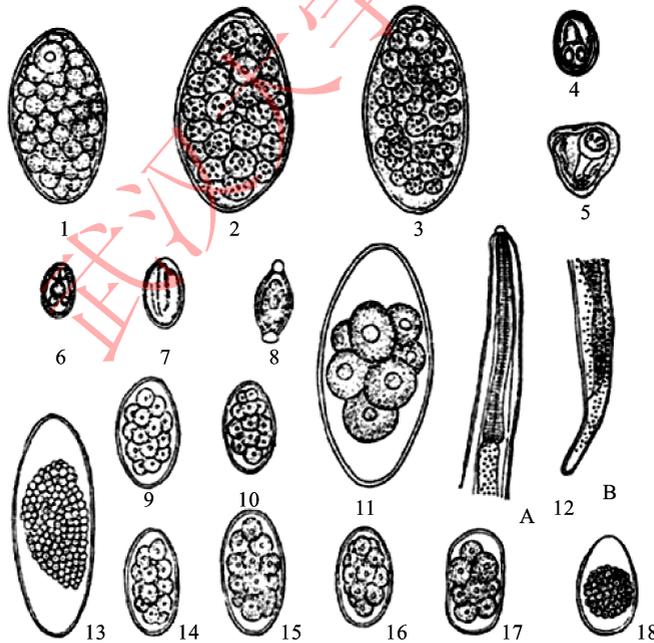
### 附录三 动物常见寄生虫虫卵图谱

动物常见寄生虫虫卵图谱见附图 1-3-1~附图 1-3-7。



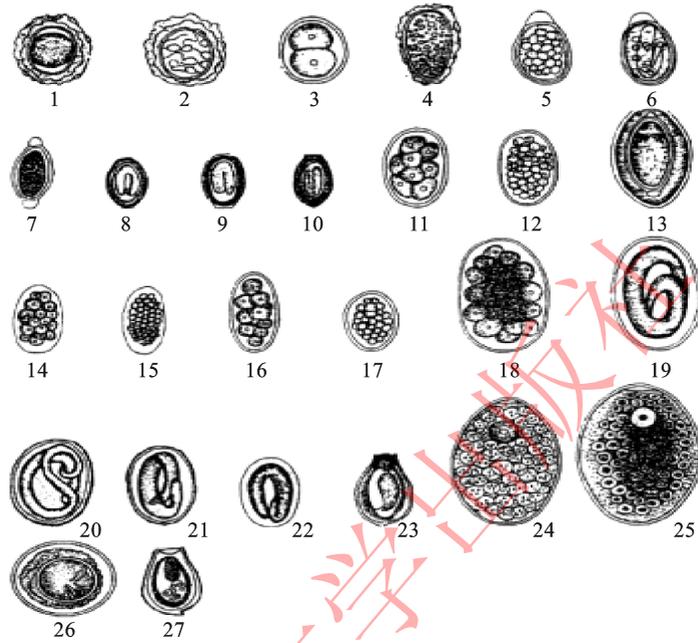
附图 1-3-1 牛体寄生虫卵

1—大片吸虫卵;2—前后盘吸虫卵;3—日本分体吸虫卵;4—双腔吸虫卵;5—胰阔盘吸虫卵;  
6—莫尼茨绦虫卵;7—食道口线虫卵;8—仰口线虫卵;9—东毕吸虫卵;10—吸吮线虫卵;  
11—指形长刺线虫卵;12—古柏线虫卵;13—犊新蛔虫卵;14—牛艾美耳球虫卵囊



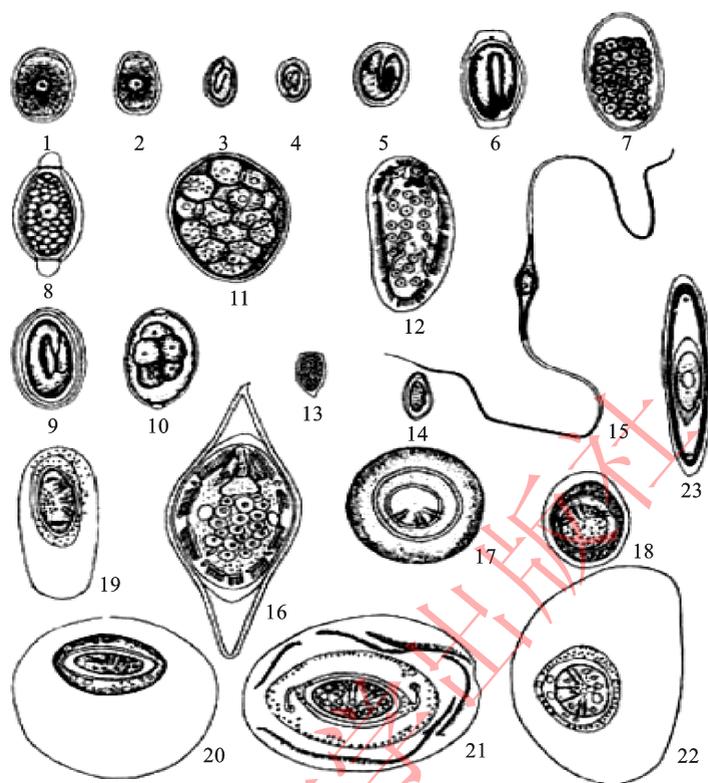
附图 1-3-2 羊体寄生虫卵

1—肝片吸虫卵;2—大片吸虫卵;3—前后盘吸虫卵;4—双腔吸虫卵;5—莫尼茨绦虫卵;6—胰阔盘吸虫卵;  
7—乳突类圆线虫卵;8—毛尾线虫卵;9—奥斯特线虫卵;10—捻转血矛线虫卵;11—细颈线虫卵;  
12—丝状网尾线虫幼虫(A为前端,B为尾端);13—马歇尔线虫卵;14—毛圆线虫卵;15—夏伯特线虫卵;  
16—食道口线虫卵;17—仰口线虫卵;18—小型艾美耳球虫卵囊



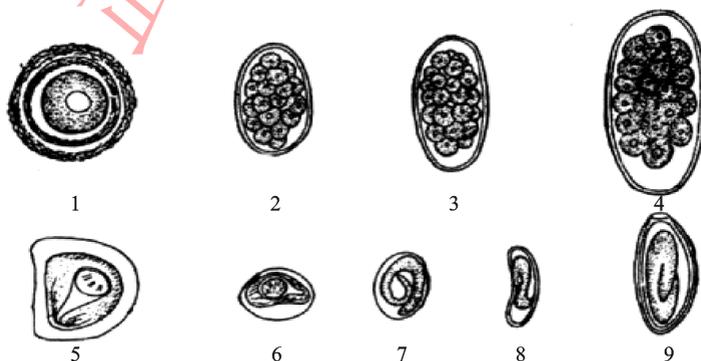
附图 1-3-3 猪体寄生虫卵

- 1—蛔虫卵;2—猪蛔虫卵表面观;3—猪蛔虫卵蛋白膜脱落分裂至两个细胞阶段;  
 4—猪蛔虫未受精卵;5—刚棘颚口线虫卵(新鲜虫卵);6—刚棘颚口线虫卵(已发育虫卵);  
 7—猪鞭虫卵;8—圆形蛔状线虫卵(未成熟虫卵);9—圆形蛔状线虫卵(成熟虫卵);  
 10—六翼泡首线虫卵;11—结节虫卵(新鲜虫卵);12—结节虫卵(已发育虫卵);  
 13—猪棘头虫卵;14—球首线虫卵(新鲜虫卵);15—球首线虫卵(已发育虫卵);  
 16—红色猪圆线虫卵;17—鲍杰线虫卵;18—猪肾虫卵(新鲜虫卵);19—猪肾虫卵(含幼虫的卵);  
 20—野猪后圆线虫卵;21—复阴后圆线虫卵;22—兰氏类圆线虫卵;23—华支睾吸虫卵;  
 24—姜片吸虫卵;25—肝片吸虫卵;26—长膜壳绦虫卵;27—截形微口吸虫卵



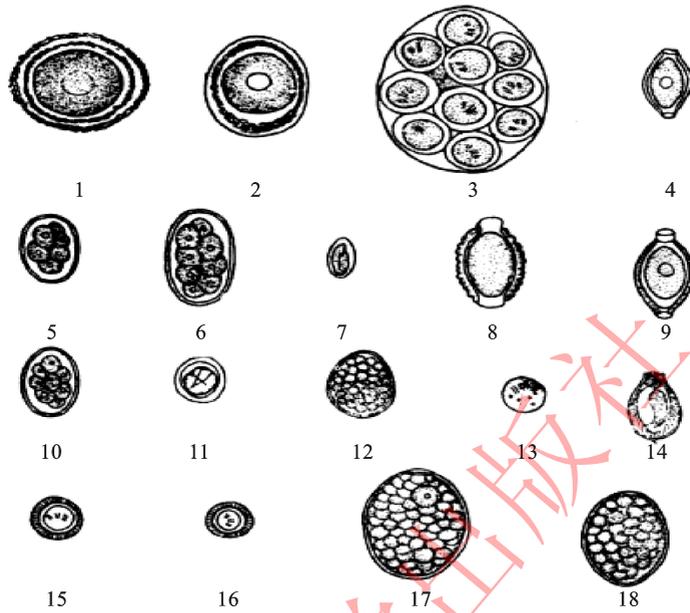
附图 1-3-4 家禽体寄生虫卵

- 1—鸡蛔虫卵；2—鸡异刺线虫卵；3—类圆线虫卵；4—孟氏眼线虫卵；5—螺旋咽带线虫卵；  
6—四棱线虫卵；7—鹅裂口线虫卵；8—毛圆线虫卵；9—鸭束首线虫卵；10—比翼线虫卵；  
11—卷棘口吸虫卵；12—嗜眼吸虫卵；13—前殖吸虫卵；14—次睾吸虫卵；15—背孔吸虫卵；  
16—毛毕吸虫卵；17—楔形绦虫卵；18—有轮赖利绦虫卵；19—鸭单睾吸虫卵；20—膜壳绦虫卵；  
21—矛形剑带绦虫卵；22—片形皱褶绦虫卵；23—鸭多型棘头虫卵



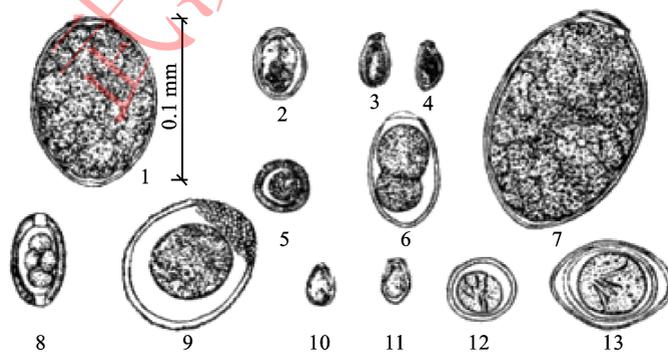
附图 1-3-5 马体寄生虫卵

- 1—马副蛔虫卵；2—圆线虫卵；3—毛细虫卵；4—细颈三齿线虫卵；5—裸头绦虫卵；  
6—侏儒副裸头绦虫卵；7—韦氏类圆线虫卵；8—柔线虫卵；9—马尖尾线虫卵



附图 1-3-6 犬体寄生虫卵

- 1—犬弓首蛔虫卵；2—狮弓蛔虫卵；3—犬复孔绦虫卵；4—毛细线虫卵；5—巴西钩口线虫卵；  
6—犬钩口线虫卵；7—血色食道线虫卵；8—肾膨结线虫卵；9—毛尾线虫卵；  
10—美洲板口线虫卵；11—犬胃线虫卵；12—裂头绦虫卵；13—中线绦虫卵；14—华枝睾吸虫卵；  
15—泡状带绦虫卵；16—细粒棘球绦虫卵；17—抱茎棘隙吸虫卵；18—并殖吸虫卵



附图 1-3-7 猫体寄生虫卵

- 1—叶状棘隙吸虫卵；2—前并睾吸虫卵；3—华枝睾吸虫卵；4—猫后睾吸虫卵；5—肥颈带绦虫卵；  
6—多棘颚口线虫卵；7—真缘吸虫卵；8—肝毛细线虫卵；9—猫弓蛔虫卵；10—异形吸虫卵；  
11—横川后殖吸虫卵；12—少钩双殖孔绦虫卵；13—多钩莓头绦虫卵

## 附录四 显微镜下所能见到的动物粪便中常见的其他物体

### 1. 食物残余

(1)植物细胞:有的为螺旋形,有的为小的双层环状物,有的像铺石状的上皮,均有明显的细胞壁。这类细胞有时易被误认为寄生虫卵。在温暖季节,有时在粪中发现花粉颗粒,有时被误认为蛔虫卵,但无卵壳,且表面常呈网状,故仔细观察时,不难将二者分开。

(2)植物毛与植物纤维,常被误认为线虫的幼虫。但植物毛的外壁是均一而具有极强的折光力的,中间有明显的管道自此端通向彼端,无活动力。

(3)淀粉粒:淀粉的形态、大小,因其来源的不同而不同。马铃薯淀粉粒是无色半透明的小块,略似粟米粒或似黏液片。豆类的淀粉粒外被粗糙的植物纤维,颇似绦虫卵。但不论其为何种淀粉粒,用卢戈氏碘液可将二者区分开来。

(4)肌肉纤维:若消化不良,则为黄、短而有横纹的圆柱体,常见于肉食动物的粪中。通常两端略呈圆形,横纹不甚明显,或仅成形状不规则的卵黄色块,若在盖玻片下加入少量伊红染液,则肌肉纤维被染成红色,不难分辨。

### 2. 体细胞

(1)上皮细胞:有扁平上皮细胞与柱状上皮细胞。有一个大核。但它们常以不同的损坏程度出现。故常不易被认出。在消化道有炎症的动物粪便中可以找到。

(2)大吞噬细胞及脓球:常在患痢疾的动物粪便中找到。大吞噬细胞已或多或少地发生变性,有时在细胞里尚可见到被吞噬的红血球;有时可以看到透明的伪足。

(3)红细胞:正常的红细胞不常见,一般均已变性。

### 3. 酵母菌和霉菌

出芽或成链的酵母菌常可在粪便中找到。霉菌的孢子常易被误认为蛔虫卵或鞭虫卵;但其内部无明显的胚胎,折光性与虫卵不同,可据此与虫卵相区别。

### 4. 细菌

正常粪便中有很多种非病原性细菌。大肠杆菌最为常见。

### 5. 结晶

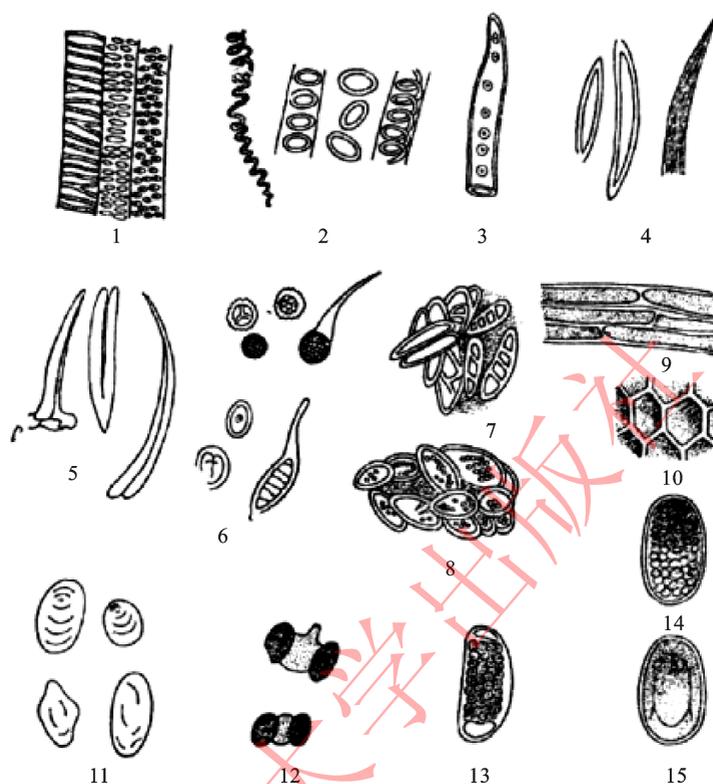
在粪便中常常可以看到脂肪酸和肥皂的细长针形结晶和三联磷酸盐的结晶。胃肠出血后,可以在粪便中找到黄色或褐色针形或斜方形的结晶。吃了某些蔬菜后,可以看到草酸钙的结晶。有时在粪便中还可以看到棱形针状的夏科雷盾氏结晶(常常是肠道有溃疡和大量蠕虫寄生的象征)。

### 6. 其他

在做粪便虫卵检查时,需注意某些动物常有食粪癖(如犬、猪),因此,在它们的粪便中,除寄生于其本身的寄生虫和虫卵外,还可以发现被吞食的其他寄生虫卵,慎勿误认为是由寄生于其本身的寄生虫所产生者。在粪便中,有时还可以看到螨和它们的卵;有时还可以找到纤毛虫,易被误认为吸虫卵。

在用显微镜检查粪便的过程中,如对某些物体和虫卵分辨不清,可用解剖针轻轻推动盖玻片,使盖玻片下的物体转动。利用这个简单的方法,常常可以把虫卵和其他物体区分开来。

附图 1-4-1 为畜禽粪便中常见的其他物体。



附图 1-4-1 畜禽粪便中常见的其他物体

1,10—植物细胞和孢子(1—植物的导管:梯纹、网纹、孔纹;2—螺旋和环纹;3—管胞;  
4—植物纤维;5—小麦颖毛;6—真菌孢子;7—谷壳部分;8—稻米胚乳;9、10—植物薄皮细胞);  
11—淀粉粒;12—花粉粒;13—植物线虫卵;14—螨卵(未发育的卵);15—螨卵(已发育的卵)

## 附录五 蠕虫标本采集、保存及标本制作

### 一、吸虫和绦虫的整体染色装片制作方法

#### 1. 吸虫类

##### (1) 吸虫的采集

在各脏器或其冲洗物沉淀中,如发现吸虫时,应以弯头解剖针或毛笔将虫体挑出(注意不要采用镊子夹取,否则镊子夹住的部位,会使虫体损坏变形,影响以后的观察)。挑出的虫体,虫体表面常附有粪渣、黏膜等污物,应先用生理盐水洗净。较小的虫体,可和盐水一起放入小试管中,加塞塞紧,充分振荡将污物除去洗净。较大的虫体可用毛笔刷洗。有些虫体的肠管内含有大量的食物,可在生理盐水中放置过夜,等其食物消化或排出。然后投入常水中,使其伸展并逐渐死亡。

## (2) 吸虫的固定

从水中将吸虫取出,放在滤纸上吸干。对于较大较厚的虫体,为了以后制作压片标本的方便,可用两片载玻片将虫体压薄,为了不使虫体压得过薄,可在玻片两端垫以适当厚度的纸片,玻片两端用棉线或胶皮圈绑扎扎紧,在玻片间夹的小纸片上写明动物编号等资料。对于较小的虫体,可先在薄荷脑溶液[配制方法:取薄荷脑(Menthol) 24 g 溶于 10 mL 95% 酒精中,即为薄荷脑饱和酒精溶液,使用时将此液一滴,加入 100 mL 水中即可]中使虫体松弛。然后将虫体投入固定液中固定。固定吸虫时常用的固定液有如下各种。

### ① 劳氏(Looss)固定液

其适用于小型吸虫。取饱和升汞溶液(约含升汞 7%) 100 mL,加冰醋酸 2 mL,混合即成。固定虫体时,将虫体放于一小试管中,加入盐水,达试管的 1/2 处,充分摇洗,再加入劳氏固定液摇匀,12 h 后,将虫体取出移入加有 0.5% 碘的 70% 酒精中,并更换溶液数次,直到碘酒精溶液不再褪色为止,再将虫体移到 70% 酒精溶液中保存,若要长期保存,应在酒精中加 5% 甘油。

### ② 酒精-福尔马林-醋酸固定液(A. F. A 固定液)

其以 95% 酒精 50 份、福尔马林(含甲醛 40%) 10 份、醋酸 2 份、水 40 份混合而成。大型的已夹于玻片间的虫体,可浸入此固定液中过夜。小的虫体可先放于充满 2/3 生理盐水的小瓶内,用力摇振,待虫体疲倦而伸展时,将盐水倾去 1/2,再加入本固定液(投入时应慢慢由一端先投入,便于将空气赶出),视虫体大小至少固定 24 小时以上。次日将虫体取出,保存于加有 5% 甘油的 70% 酒精中。

### ③ 福尔马林固定液

其一般用 10% 甲醛(取福尔马林 1 份与水 9 份混合即得)或 4% 甲醛作固定液。将小型吸虫虫体或夹于玻片间的虫体投入固定液中,经 24 h 即固定完毕。较大的夹于两玻片间的吸虫,固定液较难渗入,可在固定数小时后,将两玻片分开,这时虫体将贴附于一玻片上,将附有虫体的玻片继续投入固定液中过夜。最后将虫体置于 3%~5% 福尔马林溶液中保存或用于制片。

### ④ 酒精固定液

用 70% 酒精固定 0.5~3 h,视虫体大小而定,再移至新的 70% 酒精中保存。

经以上几种方法中任何一种固定的标本,在保存时均应给以标签。标签应用较硬的纸片(如道林纸)和铅笔书写,书写内容应包括标本编号、采集地点、宿主及其产地、寄生部位、虫名、保存液种类和采集时间,以上内容一式两份,一份与虫体一同放于瓶内,一份贴于瓶外。

## (3) 吸虫的染色和制片

吸虫标本的形态观察常需制成染色装片标本或切片标本。切片标本的制作与组织切片相同。如需要做成染色整体装片标本,则把投入上述酒精福尔马林溶液内固定的夹于两玻片之间的虫体取出,经水洗后进行染色、调色、脱水、透明、封固、干燥,制成永久性玻片标本。整体装片标本的制片方法有以下数种。

### ① 苏木素法

常用的德氏(Delafield)苏木素染液,其配法如下:先将苏木素 4 g 溶于 25 mL 95% 的

酒精中,再向其中加入 400 mL 饱和铵明矾(Ammonium Alum)溶液(约含铵明矾 11%)。将此混合液暴晒于日光及空气中 3~7 d(或更长时间),待其充分氧化成熟,再加入甘油 100 mL 和甲醇 100 mL 保存,并待其颜色充分变暗,滤纸过滤,装于密闭的瓶中备用。

染色步骤如下:

a. 将保存于福尔马林溶液中的虫体,取出以流水冲洗。如虫体原保存于 70% 的酒精中,则先后将虫体移至 50%、30% 的酒精中各 1 h,再移入蒸馏水中。

b. 将德氏苏木素染液加蒸馏水 10~15 倍,使呈浓葡萄酒色。将以上虫体移入此稀释的染液内,染色过夜。

c. 取出染色后的虫体,在蒸馏水中除去多余的染液,再依次通过 30%、50%、70% 的酒精各 0.5~1 h。

d. 虫体移入酸酒精中褪色(酸酒精是在 80% 的酒精 100 mL 中加入盐酸 2 mL),待虫体变成淡红色。

e. 将虫体移回 80% 的酒精中,再循序通过 90%、95% 和 100% 的酒精中各 0.5~1 h。

f. 将虫体由 100% 的酒精中移入二甲苯或水杨酸甲酯(亦称冬绿油或冬青油)中,透明 0.5~1 h。

g. 将透明的虫体放于载玻片上,滴一滴加拿大树胶,加盖玻片封固,待干,即成。

## ②卡红染色法

以卡红为原料,常用的染色液有盐酸卡红和硼砂卡红等。

盐酸卡红的配制是以蒸馏水 15 mL 加盐酸 2 mL,煮沸,趁热加入卡红染粉 4 g,再加入 95 mL 85% 的酒精,再滴加浓氨水以中和,等出现沉淀,放凉,过滤,滤液即为盐酸卡红染液。

硼砂卡红是以 4% 硼砂( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )溶液 100 mL,加入卡红染粉 1 g,加热使其溶解,再加入 70% 酒精 100 mL,过滤,滤液即为硼砂卡红染液。

染色步骤如下:

a. 原保存于 70% 酒精内的标本,可直接取出投入染色液中染色。保存于福尔马林液内的虫体标本,应先取出水洗 1~2 h,而后循序通过 30%、50%、70% 的酒精各 0.5~1 h,再投入染液中,在染液中过夜使虫体染成深红色。

b. 自染液中取出虫体,放入酸酒精中褪色,使颜色深浅分明,即虫体外层呈淡红色,内部构造呈深红色。

c. 虫体移入 80%、95% 的酒精和纯酒精中各 0.5~1 h。

d. 移入二甲苯或水杨酸甲酯中透明。

e. 已透明的虫体移置载玻片上,加一滴加拿大树胶,加盖玻片封固。

## 2. 绦虫类

### (1) 绦虫的采集

大部分绦虫寄生于肠管中,并以头节牢固地附着于肠壁上。采标本时为了保证虫体的完整,切勿用力猛拉,而应将附着有虫体的肠段剪下,连同虫体浸入清水中。5~6 h 后,虫体会自行脱落,体节也自行伸直。

## (2) 绦虫的固定

将收集到的完整绦虫(有头节)虫体用生理盐水洗净后,浸入劳氏固定液或70%的酒精或5%的福尔马林液中固定。

如欲做瓶装陈列标本,以福尔马林溶液固定为好。在固定之前,必须将虫体放在1%的盐水中充分洗净,为了使虫体松弛,也可将其放入含1%氨基甲酸乙酯的生理盐水中一定时间,有利于虫体充分伸展,便于以后观察。绦虫有时很长(可达数米),易于断裂而又易于相互缠结,故固定时应注意,可将虫体排列在玻璃板上,用线扎起来,或者将虫体缠绕在玻璃瓶上。也可在大烧杯中,先放入以固定液浸润的滤纸一张,提取虫体后端,使虫体由头节始逐步放落在滤纸上,加盖一层湿滤纸;再以同样操作,放上第2条虫体;如是操作,放好所有虫体,最后将固定液轻轻注满烧杯内,固定24 h后取出。不太长的虫体,可提住虫体后端,将虫体悬空伸长,而后将虫体下放,逐步浸入固定液内。保存于瓶内的标本应登记并加标签,其注意事项同吸虫。

如要制作染色标本,用劳氏固定液或70%的酒精固定为好。挑选绦虫的头节(连同后方的若干颈节)、虫体前1/3的成熟节片及虫体后部的孕卵节片,剪成若干段,每段的长为2~4 cm。将此片段放在吸水纸上吸干水分,再如前述吸虫一样压薄、固定,以至封固成永久保存标本。绦虫头节是决定绦虫种类的重要依据,应选为装片标本的材料。因其太小,无须用大的压力压薄,可将它放在载玻片上,加盖普通小玻片之后,由一端滴入固定液,另一端以吸水纸吸出固定液,如此反复使固定液通过数次,即可达到固定的目的,不必绑扎。约1 h之后即可放在水中将头节从玻片上取下,然后进行染色。

## (3) 染色程序与制片

绦虫头节和节片标本固定1~2 d后,经过水洗即可染色,不论什么染液都要着染半小时至数天,再进行调色数秒至数分钟,然后转入脱水阶段,用70%的酒精脱水2次,每次15 min,80%酒精脱水30 min,95%酒精脱水1 h,纯酒精脱水3次,每次15 min;经过修整后,放入二甲苯中透明,用加拿大树胶封固。

用福尔马林固定的标本,必须在染色前充分水洗,才能着色均匀,染好的标本必须经水洗后才进行调色(脱色剂)。染色、调色中都应随时翻动标本,使其着色均匀,透明时不宜时间过长,观察到已透明即可,然后立即用树胶封固;封固时切忌留有气泡在内,修整后选用适当虫体或虫段制出来的标本,应达到上下左右排列对称,标本虫体宜放置在载玻片的右1/3与中1/3交界处,而且应该将虫体的前端向下,便于在玻片左端贴标签后,镜检时为正像,显得美观、大方,而且便于观察绘图。

## 二、线虫的透明观察法

### 1. 线虫的采集

在剖检家畜时,按上节寻找虫体的方法,发现虫体后,以弯头解剖针或分离针(将缝衣针绑扎在竹签上即可代用),或毛笔将虫体挑出,大型的线虫如蛔虫(含棘头虫),收集后在生理盐水中仔细洗净,除去虫体上的粪便和黏液后,投入固定液;寄生于肺部的线虫、丝虫目的线虫和马、牛、羊胃肠道内的各种线虫,用分离针小心地挑出,用生理盐水反复振荡洗净后即应尽快地放于固定液中固定,否则虫体易于破裂。线虫雌雄异体,雌虫一般较雄虫

大,在虫体鉴定时,常需依雄虫的某些形态特征作为依据,因此,采集虫体时不可忽视较小虫体的采集。一些有较大口囊的线虫(如圆线虫、夏伯特线虫、钩口线虫等)和有发达交合伞的线虫,其口囊或交合伞中,常包含有大量杂质,妨碍以后的观察,应在固定前用毛笔洗去,或充分振荡以洗去,而后固定。

## 2. 线虫的固定

可采用酒精或福尔马林固定。

### (1) 用甘油酒精固定

把虫体投入煮沸的甘油酒精(5%甘油 5.0 mL、80%酒精 95.0 mL)中,使虫体伸直,然后保存在甘油酒精内。或先把 70%酒精加热到 70℃左右(在火焰上加热时,酒精中有小气泡升起时即约为 70℃),将洗净的虫体移入,虫体在热固定液中伸直而固定,待酒精冷后,将虫体移入甘油酒精中,加标签保存。标签的书写内容与吸虫相同。

### (2) 4%的福尔马林固定液固定

先将福尔马林固定液加热到 70℃,再投入虫体,虫体即保存于福尔马林固定液内。或把虫体投入 30℃左右的生理盐水中约 30 min,虫体伸展后再保存于福尔马林固定液内,也可以移入含 5%甘油的 80%的酒精中加标签保存。

大型线虫(如马副蛔虫)采取后,应用生理盐水洗净,以 4%的福尔马林或巴氏液固定保存。为了获得最好的固定,更宜保存在 10 mL 福尔马林、10 mL 冰醋酸加 80 mL 蒸馏水中。

小型线虫采取后,用生理盐水洗净,并计算虫体数目,为以后透明虫体方便计算,可用热的 5%的甘油酒精固定后保存。

## 3. 线虫的透明与制片

线虫经固定后,是不透明的,要进行线虫形态的观察,必先进行透明或装片。为了能从不同的侧面对虫体形态进行观察,以不做固定装片为好,这样可以在载玻片上将虫体翻动,观察得仔细。虫体的透明方法,常用的有以下几种。

### (1) 甘油透明法

将保存于含 5%甘油的 80%酒精中的虫体,连同保存液倾入蒸发皿中,置温箱中,并不断滴加少量甘油,直到酒精蒸发殆尽,此时留于残存甘油中的虫体即已透明,可供检查。

如欲在短时间内完成这一透明过程,可将蒸发皿放于一加有热水的烧杯上,以酒精灯加热,促使蒸发皿中的酒精在短时间内挥发,以达到虫体透明的目的。此法透明后的标本,即可保存于甘油内。

### (2) 乳酸酚(Lacto-phenol)法

乳酸酚又称乳酚油(阿曼氏液),即由甘油 2 份、乳酸 1 份、石炭酸 1 份和蒸馏水 1 份混合而成,是一种良好的透明液。虫体自保存液中取出后,应先移入乳酚油与水的等量混合液中,半小时后再移入乳酚油中,数分钟后虫体即透明,可供检查。检查后,虫体应自透明液中取出,移回原保存液中保存。

### (3) 石炭酸透明法

虫体自保存液中取出,放于纯石炭酸溶液中(石炭酸原为针状结晶,纯溶液指含水 10%的溶液),虫体很快即透明。若透明过度,可于检查时,在盖玻片边缘处(盖玻片下是

浸在石炭酸中的虫体)滴加无水酒精一滴,此法透明快。透明液对人有腐蚀性,对虫体也有损害,故观察后应立即将虫体移回原保存液中,并在短期内更换保存液3次,以除去残留的石炭酸,否则虫体将变为棕褐色。

大型和中型的线虫即可用苯酚酒精混合液进行透明,将固定好的虫体放在载玻片上,滴加此混合液加盖玻片,移到显微镜下观察;也可用甘油乳酸等量混合液透明。如需虫体更为透明可滴加少量乳酚油,即可观察。一般不做成玻片封片标本。

小型线虫如仅有少数虫体,可在采集标本后即行观察,把已洗净的虫体放在玻片上,滴加数滴乳酚油(阿曼氏液),加盖片经数分钟待其透明后,便可镜检观察。对已固定保存的虫体可将其保存液(甘油酒精)一起倒入已盛有甘油酒精的蒸发皿内;如用4%的福尔马林或巴氏液固定的虫体,须先用蒸馏水充分冲洗除去福尔马林后再放入甘油酒精内,置于水浴锅上加热。使水分和酒精渐渐蒸发,并慢慢滴加甘油,透明过程中务必使甘油混合液没过全部虫体,以防虫体干枯,直到虫体完全透明为止。经过这样处理的虫体可长期保存在原甘油内。鉴定时可逐条取出虫体滴加少量甘油加上盖片,即可镜检观察,十分方便。

小型线虫也可用棉兰乳酚装片。将松弛的小型线虫置于福尔马林醋酸溶液中固定,再将虫体转移到一张滴有冷的含有0.01%棉兰的乳酚剂的载玻片上,然后微微加热,直至液体冒气为止。或者将虫子放入乳酚剂中,在60~70℃下保持2~3 min,然后在含有0.0025%棉兰的乳酚剂中封片,在盖玻片周围用沥青封固。本法中所用棉兰也可用其他染料代替。如需要观察时,可取出镜检。

有时为了某种需要,也可将小型线虫制成不染色装片标本。制作时虫体不染色,直接循序通过70%、80%、90%、100%的酒精各0.5 h脱水,最后在水杨酸甲酯或二甲苯中透明,透明后移于载玻片上,滴加拿大树胶,拨正所需位置,加盖玻片封固。

如在虫体脱水前,按吸虫制片的方法,将虫体先以苏木素或卡红染色,而后制成装片标本,则效果更好。

## 参考文献

- [1] 杨红玉. 检测隐孢子虫卵囊的单抗介导 IFA 和夹心 ELISA 方法的建立和初步应用[D]. 郑州:河南农学大学,2009.
- [2] 尹继刚,张西臣,陈建宝,等. 双抗夹心-ELISA 快速诊断隐孢子虫病[J]. 中国兽医寄生虫病,1999,7(2):1-3.
- [3] 张龙现,蒋金书,刘群,等. 巢式 PCR 检测隐孢子虫卵的研究[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(5):509-514.
- [4] 冯超. 河南省部分地区奶牛贾第虫病流行病学调查及分离株分子特征研究[D]. 郑州:河南农学大学,2010.
- [5] 肖淑敏,李国清,杨建伟,等. 牛源贾第虫的形态学观察与纯化[J]. 中国兽医杂志,2007,43(12):25-26.
- [6] 肖淑敏,李国清,杨建伟,等. 牛源贾第虫套式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报,2008,24(1):26-29.
- [7] 张香斋,陈丽凤,陈娟,等. 河北省滦县牛梨形虫的分子检测[J]. 河北科技师范学院学报,2012,26(4):20-23.
- [8] 黄德生,解天珍,郭正. 间接血凝试验诊断牛住肉孢子虫病的研究[J]. 云南畜牧兽医,1990(2):1-2.
- [9] 包玉杰,周晓玲,杨丽丽,等. 应用琼脂凝胶双扩散试验诊断牛住肉孢子虫病的研究[J]. 畜牧兽医科技信息,2008(5):34.
- [10] 周望平,肖兵南,张长弓. 应用快速 ELISA 诊断家畜住肉孢子虫病[J]. 中国兽医科技,2004,34(1):77-78.
- [11] 丁德,贾立军,田万年,等. 吉林株犬新孢子虫的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报,2009,29(4):423-425.
- [12] 张昌盛. 奶牛新孢子虫病流行病学调查及病原的分离鉴定[D]. 北京:中国农业大学,2004.
- [13] 杜长春,王仲兵,丁玉林,等. 山西黄土高原地区羊鼻蝇蛆病流行病学调查和病理学观察[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(8):161-166.
- [14] 尕松代吉. 青海省玉树州羊泰勒虫感染血清学调查[J]. 中国动物保健,2014,16(8):26-27.
- [15] 向金波,邱正良. 北京市房山区羊梨形虫病流行病学调查[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2014,21(2):81-84.
- [16] 肖芳萍,徐洪忠,岑足英,等. 4 种常见山羊皮肤型疾病的鉴别诊断[J]. 贵州农业科学,2009,37(6):158-160.
- [17] 陈志蓉,连宏军,徐雪平,等. 绵羊痒螨病诊断方法研究[J]. 中国兽医杂志,2008,38(7):19-21.

- [18] 徐洪忠,肖芳萍,吴位珩. 山羊蠕形螨病的早期免疫学诊断试验[J]. 中国兽医科技, 2002,32(6):28-30.
- [19] 赵江山,蒲文兵,詹作勇,等. 毛圆科线虫对苯并咪唑类药物的抗药性[J]. 中国兽医科学,2010,40(5):528-531.
- [20] 王小波,许益民. 免疫辣根过氧化物酶染色法诊断猪弓形虫病的研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2006,27(1):19-23.
- [21] 邓茂刚. 猪弓形虫间接红细胞凝集试验[J]. 山东畜牧兽医,2008,29(2):1-3.
- [22] 代娟,闫文朝,王天奇,等. 洛阳地区规模化鸡场隐孢子虫流行病学分析[J]. 河南科技大学学报:自然科学版,2012,33(1):63-66.
- [23] 王冷眉. 浙江部分地区鸡源隐孢子虫病流行病学调查及其分子种系发育分析[D]. 杭州:浙江大学,2013.
- [24] 姜健阁,许褪森. 山东德州市鸡源隐孢子虫种类的分子鉴定[J]. 德州学院学报,2013,29(2):45-49.
- [25] 郝景峰,吴斌,蔡华东,等. 鸡组织滴虫病病理学诊断[J]. 中国兽医杂志,2012,48(4):43-45.
- [26] 曲昌宝,王尚尚,侯照峰,等. 鸡组织滴虫病 PCR 病原学诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(2):160-163.
- [27] 杨建伟,刘霞,李国清. 雏鸡贝氏隐孢子虫与柔嫩艾美耳球虫混合感染的诊治[J]. 中国兽医杂志,2008,44(8):80.
- [28] 孙彦平,张龙现,菅复春,等. 河南省规模化鸡场隐孢子虫感染情况调查[J]. 中国家禽,2008,30(4):49-52.
- [29] 刘毅,曹小明,谭美英,等. 湖南省鸡沙氏住白细胞虫感染和分布调查[J]. 中国兽医杂志,2004,40(10):24-25.
- [30] 殷中琼,汪开毓,贾仁勇,等. 鸡卡氏住白细胞虫原虫各期虫体形态结构的观察研究[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(5):513-516.
- [31] 李国清,薛红,朱兴全. 卡氏住白细胞虫 rDNA ITS-2 的 PCR 扩增与测序[J]. 中国农业科学,2003,36(5):573-576.
- [32] 顾有方,郭广福,陈会良. 鸡球虫抗药性测定法与判定标准[J]. 畜禽业,2004(1):60-62.
- [33] 李蕴玉,李佩国,张艳英,等. 鸡球虫耐药性检测研究进展[J]. 中国兽医学报,2011,31(3):449-452,456.
- [34] 方超,王玮,李永畅,等. 伊犁昭苏县舍饲马常见消化道寄生虫感染情况的动态观察[J]. 新疆畜牧业,2013(7):20-21.
- [35] 熊焕章,刘冰,张守发. 马巴贝斯虫 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 延边大学农学学报,2007,29(2):129-133.
- [36] 熊焕章,张守发,刘冰. 应用 PCR 对吉林省部分地区马巴贝斯虫病的调查[J]. 中国兽医杂志,2009,45(9):40-41.
- [37] 于龙政,孙福余,张守发. 以重组蛋白作为诊断抗原用 ELISA 方法对马梨形虫病调查[J]. 中国兽医杂志,2006,42(8):27-28.

- [38] 王玉玲,董志珍. 马巴贝斯虫病微量补体结合试验的改良[J]. 中国兽医杂志,2002,38(8):19-21.
- [39] 龚真莉,刘光远. 马属动物梨形虫病的 PCR 鉴别诊断方法研究[J]. 中国动物检疫,2014,31(5):74-77.
- [40] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1526-2005. 马巴贝斯虫病检测方法微量补体结合试验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [41] 周勇志,周金林,沈杰,等. 伊氏锥虫、马媾疫锥虫、布氏锥虫、刚果锥虫的 18S rDNA 部分序列测定与系统发育关系[J]. 中国预防兽医学报,2006,28(2):178-180.
- [42] 王玉玲. 马媾疫微量补体结合的改良试验[J]. 中国动物检疫,2003,20(6):23-25.
- [43] 郑小龙,王群,朱来华,等. 马媾疫锥虫 PCR 检测方法的研究[J]. 中国动物检疫,2013,30(8):75-77.
- [44] 于丽萍,李培英,顾有方,等. 合肥地区犬隐孢子虫病流行病学调查[J]. 安徽科技学院学报,2009,23(10):15-18.
- [45] 王力光,董君艳,温海,等. 新编犬病临床指南[M]. 长春:吉林省科学技术出版社,2000.
- [46] 陈杨传,杨文清,林恒雄. 台北市犬血丝虫病[J]. 动物医学,1983(20):62-67.
- [47] 杨清林,徐萌,边东升,等. 动物血液原虫病诊治[J]. 疫病诊治,2001,22(12):24.
- [48] 花琴,陈江,张库食,等. 犬寄生虫性皮肤病的诊治体会[J]. 养殖技术顾问,2015(5):101.
- [49] 李成梅,古飞霞,许丹宁,等. 犬皮肤病的诊断与防治措施[J]. 广东畜牧兽医科技,2009,34(2):45-47.
- [50] 王传峰,匡存林. 宠物寄生虫病实训(高等职业教育规划教材)[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2006.
- [51] 周晓农. 寄生虫病检测技术(第六分册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
- [52] 许金俊. 动物寄生虫病学实验教程[M]. 南京:河海大学出版社,2007.
- [53] 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,2005.
- [54] 刘胜利. 动物虫媒病与检验检疫技术[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [55] 李培英,魏建忠. 动物医学实验教程(预防兽医学手册)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2009.