

斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的克隆及 PCR 检测方法的建立

闫文朝^{1,2*}, 韩利方², 张龙现^{1*}, 索 勋³, 薛帮群², 王 帅²

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003;

3. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘 要: 通过对多种鸡球虫和松鼠球虫 18S rRNA 和 28S rRNA 进行序列比对分析, 在 18S rRNA 3' 端和 28S rRNA 5' 端保守区设计艾美耳属通用引物, 以斯氏艾美耳球虫洛阳分离株 LY 卵囊基因组 DNA 为模板首次成功克隆到斯氏艾美耳球虫完整的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列, 其大小为 1 178 bp, 其中 ITS1 序列长度为 423 bp, 5.8S rRNA 为 155 bp, ITS2 为 600 bp, 斯氏艾美耳球虫 LY 株 ITS1/2 序列高度变异, 与鸡球虫、啮齿动物球虫的序列相似性低于 60%。然后在斯氏艾美耳球虫 ITS1/2 序列超变区设计种特异引物, 建立了灵敏、特异的 PCR 检测方法。本研究结果将为兔球虫强致病种的临床诊断和揭示兔球虫种群遗传特征提供有效的分子工具。

关键词: 兔; 斯氏艾美耳球虫; ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列; PCR 检测

中图分类号: S852.723

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-1003-06

Cloning and Analysis of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of *Eimeria stiedai* and Development of PCR Diagnostic Assay Based on the Fragment

YAN Wen-chao^{1,2*}, HAN Li-fang², ZHANG Long-xian^{1*}, SUO Xun³, XUE Bang-qun², WANG Shuai²

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: 18S rRNA and 28S rRNA sequences of several *Eimeria* species from chickens and squirrels were aligned to design common primers for *Eimeria* parasites from various hosts based on the conserved sequences of both 3' end of 18S rRNA and 5' end of 28S rRNA. 1 178 bp of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 complete sequence of *E. stiedai*, including 423 bp of ITS1, 155 bp of 5.8S rRNA, and 600 bp of ITS2, was firstly cloned with the common primers and genomic DNA of oocysts of LY isolate as templates. In contrast to 5.8S rRNA fragment, ITS1 and ITS2 sequences of *E. stiedai* LY isolate was more variable, and less than 60% of ITS1 and ITS2 sequences of LY isolate was identical to those of *Eimeria* species in chickens and other rodent hosts. A sensitive and specific PCR diagnostic assay based on the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequence was developed to identify *E. stiedai*, one of high pathogenic species from rabbits by designing specific primers for *E. stiedai* at the mutative sites of ITS1 and ITS2. These findings will provide a powerful tool for clinical differentiation of high pathogenic *Eimeria* species in rabbits and revealing population genetic characteristics of rabbit coccidia.

Key words: rabbits; *Eimeria stiedai*; ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequence; PCR diagnostic assay

收稿日期: 2011-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001058); 国家兔产业技术体系项目(nycytx-44)资助

作者简介: 闫文朝(1978-), 男, 河南浙川人, 博士, 副教授, 主要从事原虫分子遗传学与免疫学研究

* 通讯作者: 闫文朝, E-mail: ywchao11@126.com; 张龙现, zhanglx8999@yahoo.com.cn

球虫病是养兔生产中危害最严重的寄生虫病,是兔场必防的疫病之一。目前公认寄生于家兔的球虫有 11 种,其中肠艾美耳球虫(*Eimeria intestinalis*)、黄艾美耳球虫(*E. falvescens*)和斯氏艾美耳球虫(*E. stiedai*)为强致病种,对家兔特别是断奶到 3 月龄的幼兔危害极大^[1-2]。斯氏艾美耳球虫寄生在兔肝脏胆管上皮细胞内,引起肝脏肿大,胆囊扩张,肝脏表面和实质出现黄白色结节、黄疸和腹水等病变,临床上主要表现为食欲减退,腹围增大,消瘦,腹泻和死亡等症状^[1,3]。研究表明,幼兔接种 10 000 个斯氏艾美耳球虫孢子化卵囊,死亡率为 40%,接种 100 000 个卵囊死亡率达到 80%^[4]。另外,斯氏艾美耳球虫在兔群中流行广泛。据报道,法国肉兔斯氏艾美耳球虫感染率为 22.5%;巴西兔群中斯氏艾美耳球虫的感染率高达 64%^[5];我国兰州、重庆、江苏和河南等地区,斯氏艾美耳球虫也是兔场流行的优势虫种^[6-8]。

斯氏艾美耳球虫卵囊与其它球虫卵囊形态相似,仅根据卵囊形态结构很难准确区分。PCR 检测技术具有特异性强、灵敏度高等优点,可以作为兔球虫诊断和传统形态学分类的有益补充^[8-10]。目前兔球虫分子水平的研究较少,斯氏艾美耳球虫仅有 18S rRNA 和 ITS1 序列的报道^[9,11],5.8S rRNA-ITS2 序列尚未见报道。本研究通过对多种鸡球虫和松鼠球虫 18S rRNA 和 28S rRNA 进行序列相似性分析,在 18S rRNA 3'端和 28S rRNA 5'端保守区设计艾美耳属通用引物,成功克隆了斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列,并基于该序列建立了 PCR 检测方法,将为斯氏艾美耳球虫的临床诊断和探索兔球虫种群遗传特征等研究提供有效的分子工具。

1 材料与方法

1.1 球虫卵囊

2009 年 8 月从洛阳郊区一兔场的病兔胆汁中收集斯氏艾美耳球虫卵囊(图 1),孢子化培养后,利用单卵囊分离技术分离单个孢子化卵囊经口接种 40 日龄无球虫兔(25 mg·L⁻¹妥曲珠利给母兔饮水 2 d,间断 2 周后再用药,直至仔兔 30 日龄断奶;哺乳仔兔在 25 日龄开始 2 mg·L⁻¹地克珠利饮水直至 40 日龄;同时对兔舍、笼具、饲槽和饮水盆用火焰消毒^[12]),在无球虫环境下饲养,接种 14 d 后收集感染成功的兔粪便卵囊,然后用收集的孢子化卵囊接

种其它无球虫幼兔传代扩增,获得斯氏艾美耳球虫的纯种分离株 LY。

1.2 球虫卵囊和兔肠道组织基因组 DNA 的提取

用饱和氯化钠溶液漂浮法分离球虫卵囊悬液放入干净的 1.5 mL 离心管中,离心浓集后加入 300 μL PCL 细胞裂解液(植物基因组 DNA 提取试剂盒所带溶液,购自上海捷瑞生物工程有限公司)和 1/3 体积的玻璃珠(Φ=425~600 μm),用移液器反复吹打混匀后,再在漩涡振荡器剧烈振荡 15 min 使 80%以上的卵囊破碎^[13]。然后向管中补加 100 μL PCL 细胞裂解液,用胶带密封好离心管盖子,放入 65 °C 水浴锅内消化裂解 2 h,其间上下颠倒混匀 3~4 次。然后按照试剂盒操作说明提取球虫卵囊基因组 DNA。另外,按照基因组 DNA 提取试剂盒说明,提取兔肠道组织基因组 DNA。

1.3 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的 PCR 扩增、克隆和序列分析

通过对 GenBank 上已发表的多种鸡源和黑松鼠源艾美耳属球虫 18S rRNA 和 28S rRNA 基因(A Y779514、F J230381、F J230363、E U302686、E U302681 和 A Y779498)进行序列相似性分析,在 18S rRNA 3'端和 28S rRNA 5'端保守区用引物设计软件 Oligo6.0 设计艾美耳属通用引物(上游引物 EITSF: 5'-GGATGCAAACTCGTAACACG-3',下游引物 EITSR: 5'-TCCTCCGCTTAATA-ATATGCT-3'),以斯氏艾美耳球虫 LY 株基因组 DNA 为模板,用高保真 2×Pfu Master mix 扩增试剂盒(购自上海捷瑞生物工程有限公司)扩增 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列,扩增条件:94 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,扩增 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。然后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

将阳性 PCR 产物进行胶回收纯化,然后经连接、转化克隆到 T-Blunt 载体,挑取菌落 PCR 阳性克隆送往中美泰和生物技术(北京)有限公司进行测序,为了避免测序误差,将阳性克隆平行测序 3 次。用生物软件 DNASTar5.01 和 MEGA 4 对所获得斯氏艾美耳球虫 LY 株的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列与 GenBank 上已发表的鸡源、松鼠源等球虫的相关序列进行比对分析,同时在 GenBank 上进行 BLAST 搜索,综合分析斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列特征。

1.4 斯氏艾美耳球虫特异性 PCR 检测方法的建立与应用

1.4.1 特异性 PCR 检测方法的建立 根据 1.3 中所获得的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列,利用 NCBI 上 Primer-BLAST 工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在斯氏艾美耳球虫的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 可变区设计其种特异引物,再利用 Oligo6.0 软件分析验证其合理性,确定 2 对斯氏艾美耳球虫种特异性引物(表 1),由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 斯氏艾美耳球虫种特异性引物序列

Table 1 Specific primers for *E. stiedai*

引物名称 Names of primers	序列 Sequences	扩增片段长度/ bp Size of PCR products
ESITS1F	TCCCCACCATGGGTCGGTT	567
ESITS1R	TAGACCCTGCACGCCGTTGC	
ESITS2F	AGGAGCGGATGGACGTGCT	458
ESITS2R	TCGACGCCAGACGACACCA	

1.4.2 兔场粪便球虫检测的应用 为了验证本试验所建立的 PCR 检测方法的有效性,作者随机选择了 4 个兔场粪便中分离的混合球虫卵囊,用上述 1.2 方法提取其基因组 DNA 作为模板,利用优化的扩增条件进行 PCR 检测,对 PCR 产物进行测序验证;同时与显微镜观察结果比较,分析其可靠性。

2 结果

2.1 斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 的克隆与序列分析

PCR 扩增和序列分析结果显示,利用设计的艾美耳属通用引物 EITSF/EITSR 成功克隆到 1 236 bp 的 DNA 片段(图 2),已提交至 GenBank,收录号为 JQ328190。其中斯氏艾美耳球虫 LY 株 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 完整序列大小为 1 178 bp,其中 ITS1 序列长度为 423 bp,5.8S rRNA 为 155 bp,ITS2 为 600 bp。序列比对分析结果显示,斯氏艾美耳球虫 LY 株与鸡源、松鼠源艾美耳球虫 5.8S rRNA 序列相似性为 93.5%~96.1%,ITS1/2 序列相似性仅为 6.6%~15.2%。属内相对保守的 5.8S rRNA 和高度变异的 ITS1/2 序列比对结果一

以斯氏艾美耳球虫 LY 株基因组 DNA 为模板,用 $2\times$ Taq Master mix 扩增试剂盒进行退火温度和引物浓度等 PCR 扩增条件的优化,建立斯氏艾美耳球虫种特异性 PCR 检测方法。利用优化的 PCR 扩增条件,以兔源大肠杆菌、兔肠道组织、鸡柔嫩艾美耳球虫、兔其它球虫等基因组 DNA 为模版,检测该 PCR 方法的特异性。另外,取 50 000 个卵囊用上述 1.2 方法提取基因组 DNA,通过 10 倍稀释法稀释基因组 DNA 溶液,来换算 PCR 方法能检测到的最低卵囊量即敏感性试验^[11]。

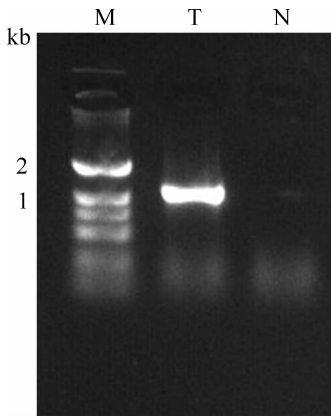
致,斯氏艾美耳球虫与松鼠源艾美耳球虫二者序列同源性较鸡源的高。

虽然斯氏艾美耳球虫 LY 株与其他虫种 ITS1/2 序列差异极大,但与目前已发表的斯氏艾美耳球虫 ITS1 序列(HM768890)相似性高达 99.3%(图 3)。说明该种球虫的 ITS1 序列种特异性比较强。



图 1 用于提取基因组 DNA 的斯氏艾美耳球虫孢子化卵囊(标尺=20 μm)

Fig. 1 Sporulated oocysts of *E. stiedai* used for extraction of genomic DNA (bar=20 μm)



T. 目的片段; N. 为没加模板的阴性对照; M. DL2000 250 bp Ladder-II
 T. ITS1-5.8S rRNA-ITS2 target fragment; N. Negative control; M. DL2000 250 bp Ladder-II

图 2 斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 片段 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of *E. stiedai*

2.2 斯氏艾美耳球虫 PCR 检测方法的建立

本试验利用玻璃珠破碎法成功将球虫孢子化卵囊或未孢子化卵囊破碎,然后用超消化裂解能力的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取到高纯度的球虫基因组 DNA,为下游 PCR 检测提供高质量的 DNA 模板。

根据 PCR 扩增条带的特异性和强弱,特异引物 ESITS2F/ESITS2R 更优于 ESITS1F/ESITS1R (ESITS1F/ESITS1R 引物扩增的结果未在文中显示),因此,选择 ESITS2F/ESITS2R 作为本试验 PCR 检测的最佳引物。以 ESITS2F/ESITS2R 为引物和以斯氏艾美耳球虫 LY 株的卵囊基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增退火温度和引物浓度优化结果表明,斯氏艾美耳球虫 PCR 检测的最佳退火温度为 57 °C,反应体系中最佳引物 (ESITS2F/ESITS2R)浓度为 0.5 μmol · L⁻¹(图 4)。

		相似性/% Percent identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
分歧度/% Divergence	1	■	24.6	7.9	17.7	23.3	26.5	17.3	12.4	9.6	9.4	1	<i>Eimeria_acerulina</i> AY779479
	2	94.8	■	8.7	15.5	12.1	11.8	24.0	5.3	9.7	9.7	2	<i>Eimeria_maxima</i> AF027723
	3	155.7	163.2	■	14.8	13.6	14.3	8.5	14.8	6.5	6.6	3	<i>Eimeria_tenella</i> AY779514
	4	149.5	152.7	149.0	■	43.2	20.6	11.2	11.9	13.0	13.0	4	<i>Eimeria_lancasterensis</i> EU302672
	5	136.5	142.4	180.6	64.4	■	42.4	13.2	14.0	15.2	15.2	5	<i>Eimeria_ontarioensis</i> EU302684
	6	139.0	118.5	257.1	85.5	88.0	■	14.3	14.3	11.1	13.6	6	<i>Eimeria_papillata</i> AY779498
	7	188.7	138.8	175.3	104.9	109.4	117.1	■	37.8	56.0	56.3	7	<i>Eimeria_intestinalis</i> HM768884
	8	228.3	167.9	213.5	113.9	122.7	133.7	74.0	■	19.0	19.0	8	<i>Eimeria_falvenscens</i> HM768883
	9	227.6	149.5	194.0	111.3	125.3	141.6	36.8	84.9	■	99.3	9	<i>Eimeria_stiedai</i> HM768890
	10	226.1	152.3	209.4	109.7	122.1	138.3	37.7	85.1	0.7	■	10	LY strain from rabbits
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

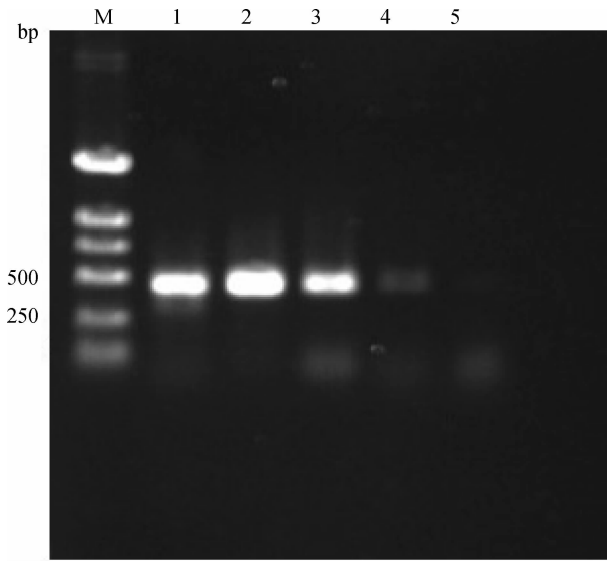
图 3 基于 ITS1 的斯氏艾美耳球虫 LY 株与其它艾美耳球虫序列相似性分析

Fig. 3 Homologous analysis of ITS1 of *E. stiedai* LY isolate with other *Eimeria* species

PCR 特异性试验表明,利用 ESITS2F/ES-ITS2R 引物和优化的 PCR 扩增条件,以斯氏艾美耳球虫 LY 株基因组 DNA 为模板能有效扩增出大小为 458 bp 的目的条带,而以肠艾美耳球虫、黄艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫、兔肠道组织等基因组 DNA 为模板均不能扩增出阳性条带(图 5),说明该 PCR 检测方法具有很好的特异性。另外,敏感性检测结果显示,基于 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的 PCR 方法能有效检测出 50 个斯氏艾美耳球虫卵囊(图 6)。

以 4 个兔场分离的粪便球虫混合种基因组 DNA 为模板,用上述建立的 PCR 方法,其中 3 个兔

场能有效扩增出斯氏艾美耳球虫大小为 458 bp 的目的条带,另外一个兔场扩增结果为阴性(图 7);显微镜检查结果显示,4 个兔场混合球虫样品中有 3 个均含有斯氏艾美耳球虫卵囊,PCR 检测结果与镜检结果一致。另外,对 3 个阳性样品的 PCR 产物进行测序分析,发现与斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 部分序列(包括 90 bp 的 ITS1 序列、155 bp 的 5.8S rRNA 完整序列和 165 bp 的 ITS2 序列,共计 410 bp)相似性为 100%,进一步说明基于斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的 PCR 检测方法能准确、可靠地检测出临床兔粪便中斯氏艾美耳球虫卵囊。

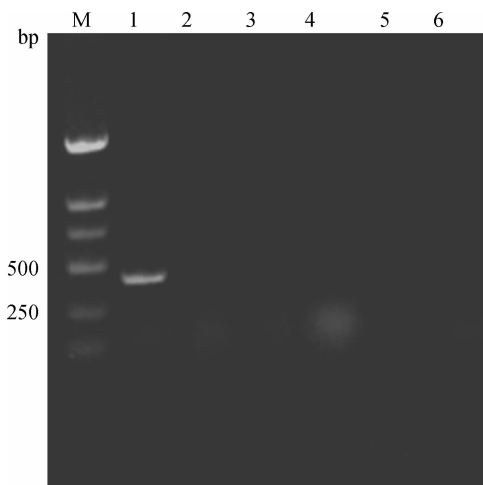


1~4. 对应退火温度分别为 53、57、58.8 和 61 °C; 5. 阴性对照; M. DL2000 250 bp Ladder-II。其中 57 °C 为最佳退火温度, 目的片段长度为 458 bp

The anneal temperature of lane 1-4 were 53, 57, 58.8 and 61 °C; 5. Negative control; M. DL2000 250 bp Ladder-II. 57 °C was the optimal anneal temperature, the size of target products was 458 bp

图 4 斯氏艾美耳球虫特异性 PCR 扩增退火温度的优化结果

Fig. 4 Optimization of the anneal temperature of the specific PCR for *E. stiedai*

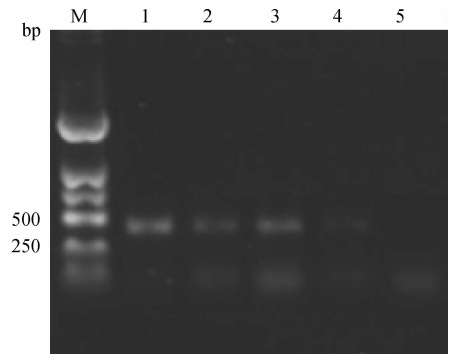


1~5. 对应 DNA 模板分别为 *E. stiedai*、*E. intestinalis*、*E. falvescens*、*E. tenella* 和兔肠组织; 6. 阴性对照; M. DL2000 250 bp Ladder-II

1-5. Templates of *E. stiedai*, *E. intestinalis*, *E. falvescens*, *E. tenella* and intestinal tissues of rabbits, respectively; 6. Negative control; M. DL2000 250 bp Ladder-II

图 5 斯氏艾美耳球虫 PCR 特异性试验结果

Fig. 5 The specific test of PCR amplification for *E. stiedai*

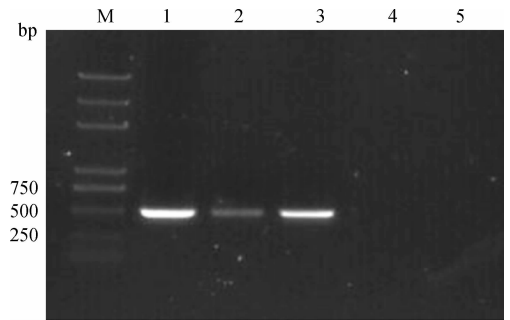


1~4. 对应 DNA 模板稀释倍数分别为 10×(相当于 5 000 个卵囊)、100×(相当于 500 个卵囊)、1 000×(相当于 50 个卵囊)、10 000×(相当于 5 个卵囊); 5. 阴性对照; M. DL2000 250 bp Ladder-II

1-4. Genomic DNAs of 5 000, 500, 50, 5 oocysts; 5. Negative control; M. DL2000 250 bp Ladder-II

图 6 斯氏艾美耳球虫 PCR 敏感性试验

Fig. 6 The sensitive test of PCR amplification for *E. stiedai*



1~4. 扩增模板为 4 个兔场混合兔球虫卵囊基因组 DNA; 5. 阴性对照; M. DL2000 plus

1-4. Templates were genomic DNAs of mix *Eimeria* species from four rabbit farms; 5. Negative control; M. DL2000 plus

图 7 斯氏艾美耳球虫 PCR 方法在检测临床兔粪便混合球虫的初步应用

Fig. 7 Application of PCR diagnostic assay to examine *E. stiedai* from fecal mixture of four rabbit farms

3 讨论

本研究成功克隆了斯氏艾美耳球虫完整的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列, 并以该序列为目的基因, 建立了灵敏、特异的 PCR 检测方法。Kvicerova 等^[9]与 Oliveira 等^[11]分别报道了斯氏艾美耳球虫的 18S rRNA 和 ITS1 序列, 本试验中兔球虫的 5.8S rRNA-ITS2 序列为国内外首次报道。另外, 本课题组也成功克隆到肠艾美耳球虫和黄艾美耳球虫完整的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列(数据待发表), 斯氏艾美耳球虫 LY 株与肠艾美耳球虫、黄艾

美耳球虫、其它宿主源(包括鸡和松鼠)艾美耳球虫的 ITS1 序列同源性为极低,而与 GenBank 上已发表的斯氏艾美耳球虫捷克分离株的 ITS1 序列相似性高达 99.3%,说明 ITS1 序列虽然在属内种间差异非常明显,但其在种内相对比较保守即种特异性很强。这些分子数据将为兔球虫分类和强致病种的鉴别诊断提供重要依据。

准确鉴定出强致病种对控制家兔球虫病更为重要。家兔球虫种类多达 11 种,并且部分种间卵囊形态结构非常相似,仅根据卵囊形态结构很难准确区分,分子标记技术可以作为家兔球虫鉴别诊断和传统形态学分类的有效补充^[2,8]。PCR 分子检测方法在鸡球虫种类鉴定中有不少成功报道和应用^[10,13]。18S rRNA 基因序列高度保守,是家兔球虫属内分类的“黄金标准”^[8,12],但是基于该序列不能鉴定出更多强致病种,需要利用变异性较强的序列如 ITS1/2 作为理想标记分子,建立特异性 PCR 或多重 PCR 检测方法来准确鉴定家兔粪便中强致病种如肠艾美耳球虫、黄艾美耳球虫和斯氏艾美耳球虫等。本研究克隆了斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列,并在 ITS1 和 ITS2 超变区分别设计上下游引物,成功建立了种特异性 PCR 检测方法,进一步验证了分子鉴定家兔强致病种的可行性。从建立多重 PCR 检测家兔球虫多种强致病种角度考虑,以 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 为目的片段来设计特异引物比单独 ITS1 或 ITS2 的选择余地大,而且扩增片段大小差别明显,琼脂糖凝胶电泳检测更容易辨别^[10]。另外,作者借鉴鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法^[13],通过用玻璃珠破碎卵囊,然后用离心柱吸附法成功提取到高纯度的兔球虫卵囊基因组 DNA,该方法操作简便,结果稳定,为进一步 PCR 检测提供了优质 DNA 模板。

家兔球虫病控制目前还没有疫苗可用,生产中主要靠药物来预防,而球虫对地克珠利或氯苯胍等药物产生耐药性现象非常普遍^[2,14-15],定期对兔场球虫感染情况的检测和有针对性的药物预防是控制兔球虫病的有效措施。因此,有效的诊断方法(如分子鉴定)显得尤为重要。另外,分子标记技术对揭示兔球虫的种群遗传特征和耐药性的分子机理等问题也是一种有效的分子工具。

参考文献:

[1] TAYLOR M A, COOP R L, WALL R L. *Veterinary Parasitology* [M]. Third edition. Blackwell Pub-

lishing Company, 2007: 901.

- [2] PAKANDL M. Coccidia of rabbit: a review[J]. *Folia Parasitol (Praha)*, 2009,56(3):153-166.
- [3] 索 勋,孔繁瑶,李安兴,等. 斯氏艾美耳球虫孢子的移行途径[J]. *畜牧兽医学报*, 1994, 25(3): 252-255.
- [4] AL-RUKIBAT R K, IRIZARRY A R, LACEY J K, et al. Impression smear of liver tissue from a rabbit [J]. *Vet Clin Pathol*, 2001, 30(2):57-60.
- [5] VARGA I. Large-scale management systems and parasite populations: coccidian in rabbits [J]. *Vet Parasitol*, 1982, 11:69-84.
- [6] 乔 军,才学鹏,田广孚,等. 兰州地区兔球虫种类调查[J]. *中国兽医杂志*, 2008,44(8): 43-44.
- [7] 荆 安,李 铭,杨长玉,等. 重庆市江津地区家兔球虫种类的形态学观察[J]. *中国兽医寄生虫病*, 2002, 10:35-37.
- [8] 闫文朝,王天奇,索 勋,等. 家兔球虫病的研究进展 [J]. *中国兽医科学*, 2010,40(11):1200-1205.
- [9] KVICEROVA J, PAKANDL M, HYPASA V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features[J]. *Parasitology*, 2008,135(4):443-452.
- [10] SU Y C, FEI A C, TSAI F M. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1(ITS-1) sequence[J]. *Vet Parasitol*, 2003,117(3):221-227.
- [11] OLIVEIRA U C, FRAGA J S, LICOIS D, et al. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. *Vet Parasitol*, 2011,176(2-3):275-280.
- [12] 崔 平,顾小龙,方素芳,等. 肠艾美耳球虫纯种分离及 18S rDNA 部分序列测定[J]. *中国动物检疫*, 2010, 27(8): 40-43.
- [13] HAUG A, THEBO P, MATTSSON J G. A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples [J]. *Vet Parasitol*, 2007, 146: 35-45.
- [14] SINGLA L D, JUYAL P D, SANDHU B S. Pathology and Therapy in Naturally *Eimeria stiedae*-Infected Rabbits[J]. *J Protozool Res*, 2000,10:185-191.
- [15] 尹秀凤,薛家宾. 兔球虫病免疫研究进展[J]. *中国养兔杂志*, 2008,6:28-30.