

毒害艾美耳球虫致病性与抗药性研究^{*}

林 青, 于三科, 崔 萍^{*}, 郑亚娟^{*}, 何小刚^{*}, 张松涛^{*}

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用毒害艾美耳球虫杨凌株(YL n)感染14日龄雏鸡, 检测毒害艾美耳球虫的致病性及其对4种常用抗球虫药的敏感性。以最适抗球虫活性百分率、抗球虫指数、相对卵囊产量和病变记分减少率为指标, 进行综合评定, 其抗药程度分为无抗药性、轻度抗药性、中度抗药性和完全抗药性4个等级。结果表明, 该虫株对雏鸡有很强的致病性, 每羽鸡经口接种 1×10^5 个孢子化卵囊时, 致死率达63.3%; 该虫株对地克株利有完全抗药性, 对马杜拉霉素有轻度抗药性, 对氯羟吡啶和氯苯胍无抗药性。

[关键词] 鸡; 毒害艾美耳球虫; 抗药性; 致病性; 抗球虫药

[中图分类号] S858.315.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0027-05

鸡球虫病严重威胁着养禽业的发展, 全世界每年因此而造成的损失达20亿美元。鸡球虫病轻则造成鸡的生长发育受阻, 生产力下降, 重则造成鸡, 特别是雏鸡的大批死亡。张继亮等^[1]和于三科等^[2]分别对陕西杨凌鸡球虫的病原种类进行了调查, 发现鸡球虫病发病率为58.3%。目前, 用于预防肉仔鸡球虫病最常用的方法仍是在饲料中添加药物, 但由于对鸡球虫药抗药性的普遍存在, 该病仍然给养鸡业造成了巨大的经济损失。特别是近几年来, 毒害艾美耳球虫(*Eimeria necatrix*)引起鸡下痢、血便及死亡的病例越来越多, 而且发病后投药效果往往不理想。鉴于目前对*E. necatrix*的研究报道相对较少, 为了解鸡*E. necatrix*的致病性与抗药性情况, 指导生产合理用药, 作者对*E. necatrix*进行了致病性和抗药性研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

刚孵出的尼克红小公雏, 由西北农林科技大学动物科技学院畜牧兽医研究所种鸡场提供, 接雏前对饲养笼和所有用具均严格消毒, 在无球虫的环境中饲喂, 饲喂雏鸡用不含任何球虫药的全价配合饲料。试验前检查球虫卵囊, 未发现球虫感染。

1.2 试验虫株

由西北农林科技大学家畜寄生虫学实验室提

供, 按文献[3]的方法分离纯化并增殖*E. necatrix*杨凌株(YL n), 28℃温箱通气培养, 至卵囊孢子化时记数, 置4℃冰箱内短期保存备用。

1.3 试验药物

克球皇 主要成分为马杜拉霉素(Maduramicin), 由江西亚星抗生素总厂出品, 批号19990102, 按0.5 g/kg拌入饲料中。

红宝球绝 含0.5%地克株利(Diclazuril), 由山西省芮城县动物药厂生产, 批号20010921, 按0.1 mL/L加入饮水中。

克球粉 主要成分为氯羟吡啶(Clopidol), 由太原恒泰动物保健品厂生产, 批号20010103, 按0.5 g/kg拌入饲料中。

氯苯胍片 主要成分为氯苯胍(Robenidine), 由陕西省汉中市天汉制药厂生产, 批号20010121, 按0.03 g/kg拌入饲料中。

1.4 致病性试验

取纯化的YL n孢子化卵囊, 于3 000 r/min离心10 min, 然后水洗3次, 去除重铬酸钾, 垂悬定容, 用血球计数器计数, 并调整至含孢子化卵囊 1×10^6 /mL。选取60羽无球虫14日龄尼克红小公雏, 逐只称重, 随机分为2组, 并适当调整各组体重, 使其相近, 每组30羽。一组做不感染空白对照, 另一组每羽鸡经口一次接种感染纯化的孢子化卵囊 1×10^5 个(0.1 mL)。接种后每日观测鸡的精神状态、饮

^{*} [收稿日期] 2003-05-15

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项资助项目

[作者简介] 林 青(1972-), 男, 陕西吴旗人, 讲师, 在读博士, 主要从事家畜寄生虫学研究。

^{*} 西北农林科技大学2002届本科毕业生

食欲和粪便情况,记录并剖检死亡鸡。感染后第 8 天剖杀全部试验鸡,按 Johnson 等^[4]所描述的方法进行肠道病变记分。对感染后死亡的鸡,随时称重,剖检,查明死亡原因。收集各组鸡的肠道及其内容物,分别置于组织匀浆器内匀浆,然后用血球计数器计数每组每羽鸡的平均肠道卵囊产量(Oocysts per gram feces,OPG)^[5,6]。

1.5 抗药性试验

1.5.1 试验准备与分组 试验场地、饲养笼、饮水器等均经过严格消毒处理。选用 14 日龄的健康尼克红小公雏,试验前检查小公雏未见有球虫卵囊,分别称量雏鸡的体重,尽量挑选体重接近的雏鸡 120 羽,随机分为 6 组,每组 20 羽,适当调整各组体重,使其相近。第 1 组为克球皇组,第 2 组为红宝球组,第 3 组为克球粉组,第 4 组为氯苯胍组,第 5 组为空白对照组(不感染不给药组),第 6 组为阳性对照组(感染不给药组)。

1.5.2 感染与给药 除第 5 组空白对照组外,其余各组每只雏鸡接种 1×10^5 个 YL_n 孢子化卵囊。然后按组隔离饲养于严格消毒的笼中,器皿、饲料、饮水均按要求严格消毒。试验期间观察记录各组鸡的精神状况、食欲、饮水及排泄物状况,对死亡鸡随时称重、剖检,并记录死亡原因。1~4 组于攻毒前 2 d 给药,直至试验结束。

1.5.3 测定指标 (1) 相对卵囊产量(Relative oocyst production,ROP)。卵囊计数采用血球计数板法。 $ROP/\% = (\text{感染用药组平均卵囊产量} \div \text{感染不用药组平均卵囊产量}) \times 100\%$; $ROP \geq 15\%$ 时,判为抗药阳性(+); $ROP < 15\%$ 时,判为抗药阴性(-)。

(2) 病变记分减少率(Reduction of lesion scores,RLS)。感染后第 8 天捕杀全部存活鸡,逐只称重,收集肠道及其内容物,参照 Johnson 等^[4]所述的方法,记录肠道病变记分,同时计算肠内容物中的卵囊数。病变记分标准按 5 级划分:无卵囊,肠正常,为 0 分;有卵囊,肠黏膜稍增厚,有少量散在性出血或少量血样肠内容物,为 1 分;有卵囊,肠黏膜增厚,有明显的出血或有明显血样肠内容物,为 2 分;有卵囊,肠膜增厚,有大量的凝血块或血样肠芯,为 3 分;鸡因球虫病死亡或有大量卵囊,外观盲肠呈酱油色(或小肠中部变粗,从浆膜面可见许多暗红色的淤血斑和灰白色点状坏死灶,黏膜面呈猩红色),肠管明显肿大,内容物形成明显的血样肠芯,

为 4 分。将各试验组平均每只雏鸡的病变记分 $\times 10$,即为该组病变扣分数。参照 McDougald 等^[7,8]和美国默克公司的方法,计算各药物组的病变记分减少率,判定球虫对药物的抗药性或敏感性。 $RLS/\% = ((\text{感染不给药对照组平均病变记分} - \text{感染给药组平均病变记分}) \div \text{感染不给药对照组平均病变记分}) \times 100\%$ 。若 $RLS \leq 50\%$,判为抗药性阳性; $RLS > 50\%$,则判为阴性。

(3) 最适抗球虫活性百分数(Percent of optimum anticoccidial activity, POAA)。 $POAA/\% = ((\text{感染用药组 GSR} - \text{感染不用药组 GSR}) \div (\text{不感染不用药组 GSR} - \text{感染不用药组 GSR})) \times 100\%$; $GSR = \text{笼末重} \div \text{笼初重}$ 。 $POAA \leq 50\%$ 时,判为抗药阳性; $POAA > 50\%$ 时,判为阴性。

(4) 抗球虫指数(Anticoccidial index,ACI)。ACI 包括存活率、增重、病变、卵囊产量、粪便记分等多项参数指标。

$ACI = (\text{存活率} + \text{相对增重率}) \times 100 - (\text{病变值} + \text{卵囊值})$ ^[6,9]; $\text{存活率}/\% = (\text{存活鸡数} \div \text{试验用鸡总数}) \times 100\%$; $\text{相对增重率}/\% = (\text{试验组增重} \div \text{空白组增重}) \times 100\%$; 病变值= 每组平均病变记分 $\times 10$ 。卵囊值:当 $ROP < 1\%$ 时,卵囊值为 0;当 ROP 值为 $1\% \sim 25\%$ 时,卵囊值为 5;当 ROP 值为 $26\% \sim 50\%$ 时,卵囊值为 10;当 ROP 值为 $51\% \sim 75\%$ 时,卵囊值为 20;当 ROP 值为 $76\% \sim 100\%$ 时,卵囊值为 40。当 $ACI \geq 160$ 时,判为抗药阳性。

1.5.4 抗药性判定标准 按以上 4 项指标中出现阳性指标的数量来确定抗药程度。

无抗药性(Sensitive, S): ACI, RLS, ROP, POAA 中 4 项指标均为阴性。

轻度抗药(Light resistant, LR): ACI, RLS, ROP, POAA 中只有 1 项指标为阳性。

中度抗药(Middle resistant, MR): ACI, RLS, ROP, POAA 中有 2 项指标为阳性。

完全抗药(Complete resistant, CR): ACI, RLS, ROP, POAA 中有 3 项及以上指标为阳性。

2 结果

2.1 致病性试验结果

用 YL_n 做致病性试验,结果见表 1。从表 1 可以看出,YL_n 毒力很强。每羽鸡感染 1×10^5 个 YL_n 孢子化卵囊,感染组相对增重率降低 36.4%,病变记分达 3.2 分,且死亡率可达 63.3%。

表 1 YL n 致病性试验结果

Table 1 The result of the pathogenic assay with YL n strain

组别 Group	试验鸡数 Chicken number	存活数 Survival number	存活率/% Survival percent- age	初重/g First weight	末重/g Final weight	增重/g Weight gain	相对增重/% Relative weight gain rate	病变记分 Lesion score (0- 4)	卵囊数/ (万·羽 ⁻¹) Oocyst number
感染组 Challenged group	30	11	36.7	52.9	77.4	24.5	63.6	3.2	2 940.0
对照组 Control group	30	30	100	52.5	91.0	38.5	100	0	0

感染后第 4 天鸡开始出现死亡, 鸡群出现粪便带血, 精神倦怠, 双翅下垂, 卧地弓背或尾羽上翘, 肛门周围和后覆尾羽粘有红褐色血性粪便。食欲、饮欲下降, 严重的甚至废绝, 并很快死亡。剖检病死鸡, 取出整条肠管观察, 可见小肠气肿, 黏膜增厚, 肠腔充满液体、血液和组织碎片; 从浆膜面观察, 可见到这段肠管的血管丛高度充血, 空肠下段至回肠上、中段有大量密集的、分布均匀的、直径在 0.5~1.5 mm 的黄白色圆形斑块(图 1)。肉眼观察十二指肠、盲肠及直肠无明显变化, 其他脏器也未见异常变化。剪开整条肠管, 空肠至回肠中段有多量粘稠的红褐色腥臭液体, 肠黏膜覆有粘稠的绿褐色稀便; 2 条盲肠与直肠内粪便较干。十二指肠黏膜轻度充血; 空肠和回肠黏膜增厚, 黏膜层可见到大量黄白色点状病灶, 并与许多小出血点相间杂; 盲肠及直肠黏膜未见异常。



图 1 感染 YL n 的雏鸡小肠病变结果

Fig 1 Lesions in the small intestine of chicken was challenged with YL n

2.2 抗药性试验结果

各试验组鸡的存活率、增重、平均病变记分及平均卵囊产量见表 2。

表 2 各试验组鸡的存活率、增重、平均病变记分及平均卵囊产量

Table 2 Survival percentage/Relative weight gain rate/Lesion score/Oocyst number of group

组别 Group	鸡数 Chicken number	存活数 Survival number	存活率/% Survival percentage	初重/g First weight	末重/g Final weight	增重/g Weight gain	相对增重率/% Relative weight gain rate	病变记分 Lesion score (0-4)	卵囊数/ (万·羽 ⁻¹) Oocyst number
克球皇 Madura- micin	20	20	100	51.60	107.41	55.81	82.74	1.80	40.6
红宝球绝 Diclazuril	20	18	90	51.27	94.01	42.74	63.37	2.50	1 460.2
克球粉 Clopidol	20	20	100	51.28	108.82	57.54	85.31	0.95	20.3
氯苯胍 Robenidine	20	20	100	51.43	118.60	67.17	99.58	0.60	0.2
不感染 不给药UUC	20	20	100	51.75	119.20	67.45	100	0	0
感染不给药 UUC	20	10	50	51.44	92.24	40.80	60.49	3.20	2 028.0

由表 2 可以看出, 相对增重率除氯苯胍组(99.58%)与空白对照无明显差异外, 其余各药物试验组均不同程度有所降低, 其中红宝球绝组的相对增重率与阳性对照组的接近; 除空白对照组外, 其余各组均发现不同程度的病变和数量不等的卵囊, 其中红宝球绝组病变最严重, 病变记分为 2.50, 克球粉组与氯苯胍组病变轻微, 病变记分分别为 0.95 和 0.60。各药物试验组均查出了卵囊, 其中红宝球绝组

卵囊数最多, 达到了 1 460.2 万/羽, 而氯苯胍组卵囊数最少, 仅为 0.2 万/羽。

YL n 对 4 种抗球虫药的抗药性(或敏感性), 以 POAA、RLS、ROP、ACI 等 4 项参数指标进行综合评定, 结果见表 3。综合测定结果表明, 该 YL n 对克球粉和氯苯胍未产生抗药性, 4 项指标均达到无抗药性标准, 这 2 种药对该虫株完全有效; 而红宝球绝的 4 项指标全部达到抗药程度, 已完全无效; 克球皇

有 1 项指标达到抗药程度,且ACI和 POAA 2 项值 临近抗药指数数,综合评定为轻度抗药.

表 3 YL n 抗药性测定结果

Table 3 Result of the resistance experiment with YL n strain

组别 Group	ROP /%	RL S /%	POAA /%	ACI	判定结果 Result
克球皇 Maduramicin	0.8(-)	43.8(+)	56.7(-)	164.7(-)	轻度抗药 LR
红宝球绝 Diclazuril	25.0(+)	21.9(+)	8.0(+)	123.4(+)	完全抗药 CR
克球粉 Clpidol	6.3(-)	70.3(-)	64.5(-)	170.8(-)	无抗药性 S
氯苯胍 Robenidine	0.5(-)	81.3(-)	100.6(-)	193.6(-)	无抗药性 S

3 讨 论

3.1 毒害艾美耳球虫有很强的致病性

从本试验结果来看,每羽鸡经口感染 1×10^5 个 YL n 的孢子化卵囊,其死亡率可达63.3%,相对增重率也减少了36.4%。说明毒害艾美耳球虫株毒力很强,对养鸡业危害很大,应该引起人们的足够重视.

3.2 几种药物对 *E. necatrix* 杨凌株(YL n)的抗药性不同

(1)本试验的 YL n 已对地克株利(红宝球绝)产生了完全抗药性,说明在临床上一定要注意抗药性问题. 只有加强对球虫抗药性的监测,合理轮换用药,才能延缓抗药性的产生,延长药物的使用寿命;同时应结合其他防治手段,如疫苗、消毒等措施进行综合防治.

(2)马杜拉霉素(克球皇)在全国各地已有较广泛的应用,陕西省各地区也已使用多年. 从本项试验判定结果分析,YL n 对克球皇有 1 项指标呈抗药阳性,表现为轻度抗药. 目前虽在多数鸡场仍可合理使用,但需慎重,最好用于穿梭计划中.

(3)氯苯胍是我国研制的第 1 个专用抗球虫药,该药不仅对鸡球虫有效,而且对兔球虫的效果也很突出. 由于对氯苯胍的使用范围较广,在许多地区已表现出较严重的抗药性,加之人们总喜欢用新药的原因,近年各地区对氯苯胍的使用大大减少,或者已

停用,陕西也不例外,这使得球虫对其敏感性得以恢复,或由于敏感虫株进入,使抗药虫数相对减少而呈现敏感性增高. 从本项试验结果可见,目前氯苯胍对杨凌球虫的防治效果显著,在全部的 4 项指标中,无 1 项指标呈抗药性. 这表明该药当前仍有很好的抗球虫效果.

(4)对于现场鸡球虫的抗药性,不同研究者采用的抗药性判定指标和标准不尽相同,孔繁瑶等^[10]对此作过综述. 由于药物在实用条件下不可能完全排除卵囊产生,而且目前还没有一种药物在养禽场按规定浓度能完全阻止卵囊产生,所以,若以卵囊产量为标准判定球虫的抗药性,很可能产生抗药虫株比率增高的结果. 由表 3 可以看出,虫株在用药情况下虽仍有一定量的卵囊产生,但并不影响增重,而且少量虫体的存在还会有益于鸡免疫力的产生. 所以,如因为有卵囊排放而判为有抗药性并否定药物效用,似乎欠妥;但另一方面,如用药后虽增重正常,但有大量卵囊产生,则存在着病原散播、污染环境的潜在威胁,则增重与卵囊产量二者应作为 2 个药效指标综合评定. 因此,许多学者建议以最适抗球虫活性百分率、相对卵囊产量和病变记分减少率 3 项指标综合判定球虫的抗药性,并制订了判定标准. 在本试验中,笔者采用 4 项指标——POAA,RLS,ROP 和 ACI 对 YL n 的抗药性进行判定,其中 ACI 为一项综合性指标,它囊括了死亡率、增重、病变、卵囊值等多项参数,使得结果更直观.

[参考文献]

- [1] 张继亮,王 凯,杨战胜,等. 西北农业大学畜牧站鸡群寄生虫的调查[J]. 畜牧兽医杂志,1986,(1): 16- 21.
- [2] 于三科,林 青,冯 凯,等. 陕西省杨陵区鸡球虫病病原种类的调查研究[J]. 动物医学研究进展,1999,(3): 39- 41.
- [3] 林 青,于三科,陈秀荔,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的构建及致病性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(3): 35- 37.
- [4] Johnson J,Reid W M. Anticoccidial drugs; lesion scoring techniques in battery and floorpan experiments[J]. Exp Parasitol,1970,28: 30-

- [5] 汪 明, 孔繁瑶, 殷佩云, 等. 10 株柔艾美耳球虫对四种药物的抗药性检测[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5): 110- 114
- [6] 孔繁瑶, 宁长申, 殷佩云, 等. 15 株柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 对五种球虫药的抗药性调查[J]. 北京农业大学学报, 1994, 20(3): 302- 307.
- [7] McDougald L R, D'Silva M L, Solis J, et al. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidian from broiler chickens in Brazil and Argentina[J]. Avian Dis, 1987, 31(2): 287- 292
- [8] McDougald L R, Fuller A L, Solis J. Drug sensitivity of 99 isolates of coccidian from broiler flocks[J]. Avian Dis, 1986, 30: 690- 694
- [9] 甘德培, 汪 明, 龙光宗, 等. 柔嫩艾美耳球虫对四种抗球虫药的交叉抗药性试验[J]. 中国兽医寄生虫病, 1999, 7(1): 12- 14
- [10] 孔繁瑶, 宁长申, 殷佩云, 等. 鸡球虫抗药性现场测定方法综述[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(1): 90- 94

Study on the pathogenicity and drug resistance of *Eimeria necatrix*

L IN Qing, YU San-ke, CUI Pin*, ZHENG Ya-juan*,
HE Xiao-gang*, ZHANG Song-tao*

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Chicken were inoculated with *Eimeria necatrix* Yangling strain (YL n), the assay of pathogenicity and drug resistance of YL n were conducted. Four grades of the sensitivity of drugs, including sensitive (S), light resistant (LR), middle resistant (MR) and complete resistant (CR), were assessed by anticoccidial index (ACI), reduction of lesion scores (RLS), relative oocysts production (ROP) and percent of optimum anticoccidial activity (POAA). The experiment results revealed that the strain was high pathogenic, and its mortality to chicken can reach as high as 63.3% when chicken are inoculated with a dosage of 1×10^5 sporulated oocysts each bird. The strain was completely resistant to Diclazuril, light resistant to Maduramicin, sensitive to Clopidol and Robenidine.

Key words: chicken; *Eimeria necatrix*; drug resistance; pathogenicity; coccidiostat