

柔嫩艾美耳球虫甘肃株抗药性的试验研究

林 青^{1,2}, 窦永喜², 闫鸿斌², 田广孚², 才学鹏²,
张彦明¹, 景志忠², 于三科¹, 翟军军¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 甘肃 兰州 730046)

[摘 要] 用柔嫩艾美耳球虫甘肃株(*E. tenella* GS, Et GS)对15日龄雏鸡进行感染, 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, 研究了该虫株对三九球痢灵、地克珠利、氯苯胍和地克珠利氯苯胍合剂等几种常用抗球虫药的敏感性。结果表明, 该虫株对三九球痢灵有中度抗药性, 对地克珠利和地克珠利氯苯胍合剂有轻度抗药性, 对氯苯胍无抗药性。

[关键词] 柔嫩艾美耳球虫; 抗药性; 抗球虫药; 鸡

[中图分类号] S858.315.9; S859.79⁺.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)04-0005-04

鸡球虫病是严重危害养鸡业发展的一种原虫病, 可造成巨大的经济损失, 全世界每年由此所引起的直接经济损失估计高达20亿英镑^[1]。目前, 对鸡球虫病的控制仍主要依赖于在饲料中添加抗球虫药物^[2-3]。但由于球虫抗药性的不断产生, 常常使某些药物防治效果不佳, 甚至失败。孔繁瑶等^[4]研究了国内15个柔嫩艾美耳球虫株对5种抗球虫药的抗药性, 发现球虫的抗药性现象比较严重。刘群等^[5-6]研究了山东省潍坊、诸城等地鸡球虫的抗药性, 同样证实养鸡场的球虫抗药性已十分普遍。在实际生产中, 如果盲目用药则既达不到应有的防治效果, 又会造成不必要的浪费, 甚至导致球虫病的发生。为了探讨该病的防治措施, 为生产中合理选用抗球虫药提供依据, 笔者选取危害最大的柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)甘肃株进行了抗药性试验, 现将研究结果报道如下。

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种鸡场提供, 接雏前对饲养笼和所有用具严格消毒, 在无球虫的环境中饲喂, 饲料为不含任何抗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

试验虫株为中国农业科学院兰州兽医研究所动物寄生虫病研究室球虫课题组用文献^[7]的方法分离、纯化并增殖的柔嫩艾美耳球虫甘肃株(Et GS)。将该虫株置于28℃温箱中通气培养, 至卵囊孢子化后计数, 然后置4℃冰箱内短期保存备用。

1.3 试验药物及其用法与用量

三九球痢灵, 中西药复方制剂, 主要成分为球痢灵(Zoalene), 由广东惠州市龙津工业区三九新兽药开发有限公司生产, 批号20030710, 按0.5 g/kg加入饮水中; 红宝球绝, 含0.5%地克珠利(Diclazuril), 由山西省芮城县动物药厂生产, 批号20030924, 按0.1 mL/L加入饮水中; 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20040123, 按0.03 g/kg拌入饲料中; 歼球虫, 主要成分为地克珠利和氯苯胍(Diclazuril+ Robenidine), 由四川肥神集团有限公司肥神药业生产, 批号20030814, 按2.5 g/kg拌入饲料中。

1.4 试验设计

试验场地、饲养笼、饮水器等均经过严格消毒处理。选择15日龄的健康尼克红小公雏(体重相近, 试验前未检测到球虫卵囊)180羽, 随机分为6组, 每组30羽, 适当调整各组体重, 使其相近。第1组为三九

〔收稿日期〕 2002-12-07

〔基金项目〕 科技部科研院所社会公益研究专项资金项目(2001D1A10006); 甘肃省自然科学基金项目(ZS031-A25-045-D)

〔作者简介〕 林 青(1972-), 男, 陕西吴旗人, 讲师, 在读博士, 主要从事兽医寄生虫学研究。

〔通讯作者〕 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

球痢灵组,第2组为红宝球绝组,第3组为氯苯胍组,第4组为歼球虫组,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 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EtGS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,死亡鸡随时称重、剖检并记录死亡原因。1~4组于攻毒前2d开始随饲料或饮水给药,直至试验结束。

1.6 测定指标与方法

(1)相对卵囊产量(Relative oocyst production, ROP)。卵囊计数采用血球计数板法。 $ROP = (\text{感染用药组平均卵囊产量} / \text{感染不用药组平均卵囊产量}) \times 100\%$ 。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, RL S)。感染后第8天扑杀全部存活鸡,逐只称重,收集盲肠,参照Johnson等^[8]的方法对盲肠进行病变记分并计算肠内容物卵囊数。病变记分标准按5级记分:无卵囊,盲肠正常,记0分;有卵囊,盲肠黏膜稍增厚,有少量散在性出血或少量血样肠内容物,记1分;有卵囊,盲肠黏膜增厚,有明显的出血或有明显血样肠内容物,记2分;有卵囊,盲肠黏膜增厚,有大量的凝血块或血样肠芯,记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,黏膜面呈绯红色),肠管明显肿大,内容物形成明显的血样肠芯,记4分。各试验组平均每只雏鸡的病变记分 $\times 10$ 即为该组病变值。参照McDougald等^[9-10]和美国默克公司^[8]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。 $RLS = [(\text{感染不给药对照组平均病变记分} - \text{感染给药组平均病变记分}) / \text{感染不给药对照组平均病变记分}] \times 100\%$ 。RLS $\leq 50\%$ 时,判为抗药阳性;RLS $> 50\%$ 时,判为抗药阴性。

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

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

$ACI = (\text{存活率} + \text{相对增重率}) \times 100 - (\text{病变值} + \text{卵囊值})$ ^[4,11]。其中,存活率 = $(\text{存活鸡只数} / \text{试验用鸡只总数}) \times 100\%$;相对增重率 = $(\text{试验组增重} / \text{空白组增重}) \times 100\%$;病变值 = $\text{每组平均病变记分} \times 10$ 。卵囊值:当ROP $< 1\%$ 时,卵囊值为0;当ROP = $1\% \sim 25\%$ 时,卵囊值为5;当ROP = $26\% \sim 50\%$ 时,卵囊值为10;当ROP = $51\% \sim 75\%$ 时,卵囊值为20;当ROP = $76\% \sim 100\%$ 时,卵囊值为40。ACI ≥ 160 时,判为抗药阴性;ACI < 160 时,判为抗药阳性。

1.7 抗药性判定标准

按以上4项指标中出现阳性指标的数量确定抗药程度。

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 结果与分析

2.1 各组鸡的存活率、平均增重、平均病变记分及平均卵囊产量

各组鸡的存活率、平均增重、平均病变记分及平均卵囊产量见表1。由表1可知,氯苯胍组与不感染不给药组平均增重最大且两组之间差异不显著($P > 0.05$),红宝球绝组和歼球虫组差异不显著($P > 0.05$),其余各组两两之间差异显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$);病变记分结果显示,感染不给药组病变最严重,病变记分达3.55,红宝球绝组、氯苯胍组和歼球虫组三者之间差异不显著($P > 0.05$),其余各组两两之间差异显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$);卵囊数统计结果显示,感染不给药组卵囊数最多,达3598.0万/羽,氯苯胍组和不感染不给药组卵囊数最少且差异不显著($P > 0.05$),红宝球绝组和歼球虫组差异不显著($P > 0.05$),其余各组两两之间卵囊数差异显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)。

表1 各组鸡的存活率、平均增重、平均病变记分及平均卵囊产量

Table 1 Survival percentage, relative weight gain rate, lesion score, oocyst number of groups

组别 Group	鸡数 Chicken num ber	存活数 Survival num ber	存活率/% Survival percentage	平均初重/ (g·只 ⁻¹) First weight	平均末重/ (g·只 ⁻¹) Final weight	平均增重/ (g·只 ⁻¹) Weight gain	相对 增重率/% Relative weight gain rate	平均病变 记分 Lesion score (0~4)	平均卵囊数/ (万·羽 ⁻¹) Oocyst num ber
三九球痢灵 Zoalene	30	30	100 0	53 50	94 16	40 66 c	58 46	1 75 b	340 0 c
红宝球绝 Diclazuril	30	27	90 0	53 40	106 55	53 15 b	76 42	1 25 c	476 3 b
氯苯胍 Robenidine	30	30	100 0	53 34	123 35	70 01 a	100 66	1 10 c	20 5 d
歼球虫 Diclazuril+ Robenidine	30	28	93 3	53 30	107 80	54 50 b	78 36	1 30 c	460 5 b
不感染不给药 UUC	30	30	100 0	53 65	123 20	69 55 a	100 00	0 d	0 d
感染不给药 UC	30	15	50 0	53 35	86 50	33 15 d	47 66	3 55 a	3 598 0 a

注: 同列数据后标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$), 标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values within list with same letters indicated the nonsignificant difference ($P>0.05$), with the different letters indicated the significant difference ($P<0.05$).

2.2 Et GS 的抗药性

Et GS 对4种抗球虫药的抗药性(或敏感性), 以POAA, RLS, ROP 和ACI等4项指标进行综合评定, 结果见表2。由表2可知, Et GS 对氯苯胍未产生

抗药性, 4项指标均达到无抗药性标准, 这种药对Et GS 纯种株完全有效; 三九球痢灵组有2项指标达到抗药性, 综合评定为中度抗药; 红宝球绝组和歼球虫组均有1项达到抗药性, 综合评定为轻度抗药。

表2 Et GS 抗药性测定结果

Table 2 Results of the resistance experiment with Et GS strain

组别 Group	ROP/%	RLS/%	POAA/%	ACI	判定结果 Result
三九球痢灵 Zoalene	95(-)	507(-)	209(+)	1355(+)	中度抗药 MR
红宝球绝 Diclazuril	132(-)	648(-)	537(-)	1489(+)	轻度抗药 LR
氯苯胍 Robenidine	06(-)	690(-)	1030(-)	1897(-)	无抗药性 S
歼球虫 Diclazuril+ Robenidine	128(-)	634(-)	597(-)	1537(+)	轻度抗药 LR

注: “+”表示抗药阳性; “-”表示抗药阴性。

Note: “+” means resistant to coccidiostat; “-” means sensitive to coccidiostat

3 讨论

1) 在地克珠利大规模商业应用以前, 其抗球虫效果良好^[4, 12]。而本试验的Et GS 已对地克珠利产生轻度抗药性, 进一步说明球虫产生抗药性很快, 应引起足够重视, 在临床上一一定要注意抗药性问题。

2) 球痢灵于20世纪80年代开始在我国普遍使用, 从本试验结果来看, Et GS 对球痢灵已产生中度抗药性, 建议该地区在防治球虫病中慎用该药。

3) 由于抗药性的出现, 氯苯胍在甘肃省大部分地区已停用多年, 这使得球虫对其敏感性得以恢复, 或因敏感虫株进入使抗药虫数相对减少而呈现敏感

性增高。本试验结果表明, 目前氯苯胍对甘肃省鸡球虫的防治效果显著, 在全部的4项指标中, 无1项指标呈抗药阳性, 建议该地区在临床中选用此药。

4) Et GS 对地克珠利氯苯胍合剂表现轻度抗药, 故临床在用配合药物时, 也应该考虑其实际效果, 合理使用, 避免不必要的浪费和损失。

5) 笔者曾采用POAA, RLS, ROP 和ACI等4项指标对球虫的抗药性进行过判定, 发现效果很好。其中ACI为一综合性指标, 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, 故在本次试验中仍然采用这4项指标进行判定。

[参考文献]

[1] William S B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry[J]. Int J Parasitol, 1999, 29: 1209-1229

[2] Jooyner I P, Norton C C. The immunity arising from continuous low level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*[J]. Parasitology, 1976, 22: 115-125

- [3] 彼得 L·朗 球虫生物学[M]. 蒋金书, 刘钟灵, 陆信武, 等译. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990.
- [4] 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.
- [5] 刘群, 韩谦, 蒋金书, 等. 山东潍坊地区肉鸡球虫的抗药性调查[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(2): 187-192.
- [6] 韩谦, 刘群, 张荣春. 山东省诸城肉鸡球虫的抗药性调查[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(1): 40-42.
- [7] 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.
- [8] Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floorpan experiments with chickens [J]. Exp Parasitol, 1970, 28(1): 30-36.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 黄兵, 吴薛忠, 史天卫, 等. 5 种抗球虫药防治鸡 *Eimeria tenella* 的疗效对比试验[J]. 中国兽医寄生虫病, 1995, 3(2): 19-23.

Studies on drug resistance of *Eimeria tenella* Gansu strain

L IN Qing^{1,2}, DOU Yong-xi², YAN Hong-bing², TIAN Guang-fu², CAI Xue-peng²,
ZHANG Yan-ming¹, JING Zhi-zhong², YU San-ke¹, ZHAI Jun-jun¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: Chicken were inoculated with *Eimeria tenella* Gansu strain (Et GS), the assay of drug resistance of Et GS to 4 coccidiostat (Zoalene, Diclazuril, Robenidine and Diclazuril + Robenidine) were conducted. Reduction of lesion scores (RLS), relative oocysts production (ROP) and percent of optimum anticoccidial activity (POAA) were assessed by anticoccidial index (ACI). The experiment results revealed that the strain was intermediately resistant to Zoalene, high resistant to Diclazuril and Diclazuril + Robenidine, sensitive to Robenidine.

Key words: *Eimeria tenella*; drug resistance; coccidiostat; chicken