

10株柔嫩艾美耳球虫对四种药物的抗药性检测

汪明 孔繁瑶 殷佩云 吴健 安健

(中国农业大学动物医学院,北京 100094)

摘要: 从4省市10个鸡场分离到10株柔嫩艾美耳球虫,使用AA肉鸡按每只鸡接种10万卵囊,对马杜霉素、百球清、盐霉素和拉沙里菌素的敏感性进行了测试。依照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,检测结果显示:30%虫株对马杜霉素和百球清有抗药性,40%虫株对拉沙里菌素有抗药性,70%虫株对盐霉素有抗药性,80%虫株对两种或两种以上的药物有抗药性。虫株的抗药谱带有明显的地方性。此外,对抗药虫株的鉴定标准进行了讨论。

关键词: 艾美耳球虫; 药物抗药性; 马杜霉素; 百球清; 盐霉素; 拉沙里菌素

中图分类号: S855.91

目前,鸡球虫病的防治仍主要依赖抗球虫药物。然而由于抗药虫株的产生,常使药物防治效果不理想,甚至失败,使养禽业蒙受损失。不仅如此,抗药性的问题还使制药厂多年研制的药物使用寿命缩短,甚至投入市场不久便失效,以致不得不退出市场。因此进行抗药性的检测,是一件重要的“摸底”工作,只有在“知己知彼”的基础上,才能“有地放矢”,达到“百战不殆”之功效。国外在球虫抗药性现场检测和实验室研究方面已有大量的文献报道,迄今已从现场分离出对几乎所有使用过的药物产生抗药性的虫株^[1~7]。国内孔繁瑶等1992年首次检测了采自各地15株柔嫩艾美耳球虫对莫能菌素、氨丙啉、克球粉,氯苯胍和杀球灵的敏感性,发现除杀球灵外,50%以上的虫株分别对上述药物产生了抗药性^[8]。3年来,国内抗球虫药市场发生了许多变化,为了进一步地了解我国鸡球虫抗药性的情况,我们于1995年从4省市10个鸡场分离到10株柔嫩艾美耳球虫,检测了每个虫株对马杜霉素、盐霉素、拉沙里菌和百球清的敏感性。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 试验用动物为AA肉鸡,购自北京华都肉鸡联营公司,出壳后饲养在严格消毒的笼舍内,饲喂肉雏鸡全价配合饲料。

1.2 试验虫株 试验用虫株分别采自北京、天津、山东和广东10个用药史不同的鸡场。从现场采集鸡粪,分离球虫虫株,在实验室经无球虫鸡增殖数代后,置4℃冰箱中保存备用。试验用虫株根据寄生部位、卵囊形态和潜隐期鉴定为柔嫩艾美耳球虫。

1.3 药物及使用浓度

1.3.1 马杜霉素 10%预混剂,河南灵宝中联发酵厂生产,商品名抗球王,测试浓度 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

收稿日期: 1995-10-05

1.3.2 盐霉素 12%预混剂,德国赫司特公司出品,商品名赛可喜,测试浓度 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.3.3 拉沙里菌素 15%预混剂,罗氏药物化学有限公司出品,商品名球安,测试浓度 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.3.4 百球清 德国拜耳药厂出品,含2.5%三嗪酮,测试浓度 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.4 试验设计 每个虫株设4个感染用药组和1个感染不给药组,每次试验均设有一个不感染不给药组。共进行2次试验,以验证试验结果的重复性。每组5~6只鸡,感染前2d(12~19日龄)逐只称重,随机分组,剔除过大过小的鸡只,并适当调整各组体重。马杜霉素、盐霉素和拉沙里菌素在感染前2d给药至试验结束,百球清组于感染后第4d给药,连续给药2~3d。所有试验鸡于感染后第8d剖杀,按Johnson与Reid描述的方法对盲肠病变记分^[9]。对感染后的死亡鸡,及时称重、剖检,查明死因。死于球虫病者,病变值判为4分。收集各组鸡盲肠及其内容物,分别置组织匀浆器中匀浆,用血球计数板计数每组鸡盲肠卵囊平均产量。

1.5 感染剂量与方法 用血球计数板计数每一虫株孢子化卵囊悬液的浓度,取所需要的卵囊量,离心水洗2~3次,去除重铬酸钾液,重悬定容到每滴含2.5万卵囊。每只鸡经口一次接种各相应虫株的孢子化卵囊4滴,即每只鸡接种量为10万。

1.6 抗药性的判定方法与标准 以最适抗球虫活性百分率(POAA)、病变记分减少率(RLS)和相对盲肠卵囊产量(ROP)3项参数综合判断球虫虫株对药物的抗药性(敏感性)。3项指标中有2项以上达到抗药水平即判定该虫株对某种药物已产生抗药性。

① $POAA = (\text{感染用药组 } GSR - \text{感染不用药对照组 } GSR) / (\text{不感染不给药对照组 } GSR - \text{感染不用药对照组 } GSR)$ 。 $GSR = \text{笼末重} \div \text{笼初重}$ 。 $POAA \leq 50\%$:有抗药性; $>50\%$:无抗药性。

② $RLS = [(\text{感染不用药对照组平均病变记分} - \text{感染用药组平均记分}) / \text{感染不用药对照组平均病变记分}] \times 100\%$ 。 $RLS \geq 50\%$:无抗药性; $<50\%$:有抗药性。

③ $ROP = (\text{感染用药组平均卵囊百万数} / \text{感染不用药组平均卵囊百万数}) \times 100\%$ 。 $ROP \geq 15\%$:有抗药性; $<15\%$:无抗药性。

2 结果

①从试验中观察到,不同来源虫株对鸡的致病性有明显差异。所有虫株均按每只鸡感染10万个卵囊,而死亡率分别从0%到60%不等,鸡只死亡多发生在感染后5~7d,死前呈现精神萎靡,翅膀下垂,闭眼缩脖,卧地昏睡,畏寒颤抖及血便等典型症状。所有虫株的感染不给药组均出现血便等症状,说明感染是成功的。

②从表1可见,10株柔嫩艾美耳球虫对4种药物的抗药性明显带有地区性的特点。来自北京种鸡场和肉鸡场的2个虫株,对以上4种药物均表现敏感,天津虫株除对拉沙里菌素有抗性外,对其他3种药均敏感;而来自山东的3个虫株,均对盐霉素表现抗药性,而对马杜霉素和拉沙里菌素表现敏感,2株对百球清敏感,1株表现抗性;来自广东的4个虫株,4/4对盐霉素有抗药性,3/4对马杜霉素和拉沙里菌素有抗药性,2/4对百球清有抗药性。

③从表2可见,4种药物对10株球虫的抗药性差异明显,7/10虫株对盐霉素有抗药性,4/10虫株对拉沙里菌素有抗药性,3/10虫株对马杜霉素和百球清有抗药性,没有一种药物对上述10株球虫均表现敏感。

④从表3可见,10株球虫均表现不同程度的复合抗药性,其中广州竹料、广东南海对4种药物均产生抗药性,广东肇庆、广东中山和山东维坊肉鸡场1对2种药物有抗药性。

表1 3项参数对4种药物的检测结果*

Table 1 POAA, RLS and ROP tests of different isolates to four coccidiostats

虫株来源 Geographic origin of isolates	POAA ^① /RLS ^② /ROP ^③ /mg·kg ⁻¹			
	马杜霉素 5 Maduramicin	盐霉素 60 Salinomycin	拉沙里菌 75 Lasalocid	百球清 25 Toltrazuril
北京华都种鸡场	---	--+	--+	---
北京华都肉鸡场	--+	--+	---	---
天津富源肉肉鸡场	---	---	+++	---
山东维坊种鸡场	--+	+--+	+--	+--
山东维坊肉鸡场 1	--+	+++	+--	+++
山东维坊肉鸡场 2	--+	+++	+--	---
广州竹料肉鸡场	+++	+++	+++	+++
广东南海肉鸡场	+++	+++	+++	+++
广东肇庆肉鸡场	--+	--+	--+	---
广东中山肉鸡场	+++	+++	--+	+--

* 根据两次试验汇总 From two experiments +: 抗药阳性 Positive resistance -: 抗药阴性 Negative resistance

① POAA ≤ 5%, 判为 +; > 50%, 判为 -; ② RLS < 50%, 判为 +; ≥ 50%, 判为 -; ③ ROP ≥ 15%, 判为 +; < 15%, 判为 -。

表2 对4种药物10株柔嫩艾美耳球虫的敏感性*

Table 2 Sensitivity of 10 isolates to 4 coccidiostats

药物 Coccidiostats	药物浓度/mg·kg ⁻¹ Concentrations	检测虫株 Number of isolates tested	敏感虫株 Number of Sensitive isolates	抗药虫株 Number of resistance isolates
马杜霉素 Maduramicin	5	10	7	3
盐霉素 Salinomycin	60	10	3	7
拉沙里菌素 Lasalocid	75	10	6	4
百球清 Toltrazuril	25	10	7	3

* 根据 POAA, RLS 和 ROP3 项参数, 有 2 项或 3 项达抗药水平判虫株为抗药阳性, 1 项或 0 项达抗药水平判为抗药阴性。According to POAA, RLS and ROP, isolate with more than two positive parameters was identified to be positive drug-resistance, and isolate with one positive or all negative parameters was identified to be negative drug-resistance.

表3 10株球虫对4种药物的抗药性和复合抗药性

Table 3 Drug-resistance of 10 isolates to 4 coccidiostats, and complex drug-resistance of the four kinds of coccidiostats

检测虫株数 Isolates tested	完全敏感虫株数 Number of isolates sensitive to all 4 coccidiostats	对不同药物有抗药性的虫株数 Number of isolates resistance to different coccidiostats				
		马杜霉素 Maduramicin	盐霉素 Salinomycin	拉沙里菌 Lasalocid	百球清 Toltrazuril	总数 Total
10	2					
	对 1 种药物有抗性的虫株数 Resistance to 1 drug		2	1		3
	对 2 种药物有抗性的虫株数 Resistance to 2 drugs	1	3	1	1	3
	对 4 种药物有抗性的虫株数 Resistance to 4 drugs	2	2	2	2	2

3 讨论

①从四省市采集的10株艾美耳球虫对4种药物的抗药性显示出明显的地方性特点,这是与采集地的用药史有关。北京华都肉鸡联营公司养鸡场1993年开始使用国产马杜霉素(抗球王),1993年以前使用美国氰胺公司的马杜霉素(加福),近5年来几乎没有使用过其他药物。测试表明北京虫株对盐霉素、拉沙里菌素和百球清均敏感,而马杜霉素在该公司至少已连续使用了5年,本次测试仍呈敏感。作者曾先后多次在该肉鸡场收集7,10,28和32日龄肉鸡的粪便,均没有分离到球虫卵囊,最后在48日龄肉鸡的粪便中才分离到供测试卵囊,也说明该虫株对马杜霉素的确敏感。天津富源肉鸡场过去长期以使用莫能菌素为主,近2年来开始使用马杜霉素,测试结果表明,除对拉沙里菌素不敏感外,对其他3种药物均敏感,而拉沙里菌素在该地从未使用,为何不敏感,尚值得探讨。山东潍坊1994年开始以使用马杜霉素为主,或与盐霉素交替使用,1994年以前以盐霉素为主,测试结果显示,3/3虫株对盐霉素有抗药性,而对马杜霉素和拉沙里菌素均敏感,2/3虫株对百球清敏感。广东地区用药背景最复杂,几乎进入中国市场上的所有抗球虫药都使用过,目前仍以盐霉素、马杜霉素为主流药,百球清和拉沙里菌素进入较晚,该地区球虫病四季发生,鸡场和饲料厂换药较频,仍不能完全控制球虫病。此次测试的结果与生产单位反映的情况相符合,该地区球虫抗药性的问题值得深入研究。

②同一地区的种鸡场与肉鸡场比较,种鸡场抗药性问题的压力似乎低于肉鸡场,主要原因是种鸡场一般不采用连续给药的办法。试验结果还显示种鸡场与肉鸡场球虫的抗药谱较为一致,说明两者间可能有一定关联,应进一步研究抗药虫株在种鸡场与肉鸡场之间的联系。

③关于球虫抗药性的指标,孔繁瑶等进行过综述,共列出6个方面指标,共12项参数^[10]。孔繁瑶等在对莫能菌素、氨丙啉、克球粉、氯苯胍和杀球灵五种药物进行抗药性检测时,使用最适抗球虫活性百分率(*POAA*)、病变记分减少率(*RLS*)和相对卵囊产量(*ROP*)3项参数作为综合判断指标,把1项达到抗药指数定为“+”,2项达到抗药指数定“++”,3项达到抗药指标定为“+++”,分别表述为轻度抗药、中度抗药和严重抗药^[8]。本次检测也使用*POAA*,*RLS*和*ROP*3项参数作为判定指标,鉴于每项参数代表药物抗球虫效力在某一方面表现,因此在综合判断时,把2项以上参数达到抗药指数的虫株,定性为抗药虫株。此外,Warren等把*ROP*≥5%定为有抗药性<5%定为敏感;孔繁瑶*ROP*≥15%定为有抗药性,<15%定为敏感,这一修定更符合生产实际。

④比较4种药物在各单项指标上的表现可见:在控制死亡和增重效果方面,马杜霉素明显优于其他3种药,在每只鸡10万卵囊的攻击下,感染不给药组平均死亡率为16%,百球清组平均死亡率为10%,盐霉素组和拉沙里菌素组为8%,马杜霉素组为0;在减少盲肠病变方面,马杜霉素、拉沙里菌素和百球清组相近,均优于盐霉素组;在减少卵囊产量方面,百球清要明显优于拉沙里菌素、马杜霉素和盐霉素组,这是由于百球清对球虫配子生殖有抑制作用,而其他3种离子载体类药物只作用于球虫生活史的早期阶段。

⑤从本次调查的结果看,球虫抗药性的问题在我国确实是一个非常严重的问题,对我国养禽业构成了极大的威胁,应加强球虫抗药性研究和检测工作,克服用药的盲目性。在科学原则指导下和摸底的情况下,有的放矢地使用抗球虫药,适时轮换用药或穿梭用药是防止抗药虫株产生、控制球虫病和延长抗球虫药使用寿命的良策。

参 考 文 献

- 1 Cuckler A C, et al. Studies on drug resistance in coccidia. J Parasitol, 1955,41:302~311
- 2 Hamet N. Resistance to anticoccidial drugs in poultry farms in France from 1975 to 1984. Proc Georgia Coccidiosis Conf Univ Georgia Athens. 1986. 415~421
- 3 Oikawa H, et al. A survey of drug resistance of coccidia in broilers. Jap J Ver Sci, 1975, 37: 357~362
- 4 McDougald L R, et al. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. Avian Diseases, 1987, 31: (2)287~292
- 5 McDougald L R, et al. Drug-sensitivity of 99 isolates of Coccidia from Broiler Farms. Avian Diseases, 1986, 30(4):690~694
- 6 Stallbaumer M, Daisy K J. The effects of monensin, narasin, salinomycin and nicarbazine on field strains of chicken coccidia. Avian Pathology, 1988, 17:793~801
- 7 Chapman H D, et al. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* species to monensin and lasalocid in the chicken. Res Vet Sci, 1989, 46:114~117
- 8 孔繁瑶, 宁长申, 殷佩云. 15株柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)对五种抗球虫药的抗药性调查研究, 北京农业大学学报, 1994, 20(3):302~307
- 9 Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pan experiments. Exp Parasitol, 1970, 28:30~3
- 10 孔繁瑶, 宁长申, 殷佩云. 鸡球虫抗药性现场测定方法综述. 中国兽医学报, 1994, 14(1):90~94

Assay of Drug Resistance to Coccidiostats of 10 Field Isolates of *Eimeria tenella* in China

Wang Ming Kong Fangyao Yin Peiyun Wu Jian An Jian
(College of Animal Science and Technology, CAU, Beijing 100094)

Abstract: The sensitivity of 10 field isolates of *Eimeria tenella* from four provinces or cities to Maduramicin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Toltrazuril ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Salinomycin ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Lasalocid ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was tested in AA broiler chickens inoculated with a dosage of 100 000 oocysts each bird. By the parameters of optimum anticoccidial activity, relative oocyst production of ceca and reduction of ceca lesion scores, the experiments revealed that 30% the isolates were resistant to Maduramicin and Toltrazuril, 40% to Lasalocid, 70% to Salinomycin and 80% to two or more coccidiostats. The drug resistance spectrum of the isolates was characterized by endemicity. The criterion for identification of drug resistance of coccidia was discussed.

Key words: *Eimeria*; drug resistance; Maduramicin; Toltrazuril; Salinomycin; Lasalocid