

# 柔嫩艾美耳球虫对盐酸氟乙基硫胺素 耐药性的诱导研究

覃宗华,李俊健,彭晓娟,区煜荣,李云峰\*

(广州先至饲料添加剂有限公司,广州 510663)

[收稿日期] 2015-11-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0030-05 [中图分类号] S852.7

**[摘要]** 为评估盐酸氟乙基硫胺素产生抗药性的倾向,采用药物浓度递增法,在实验条件下进行柔嫩艾美耳球虫耐药性的诱导研究。每组动物用 10 只快大黄肉鸡,每只鸡接种  $1 \times 10^5$  个孢子化卵囊,以 50 mg/kg 盐酸氨丙啉和盐酸氟乙基硫胺素为起始诱导浓度连续传代,以病变记分、存活率和卵囊数三项指标综合判定耐药性。经过 10 次传代,盐酸氨丙啉对敏感虫株的 ACI 为 192.6,而对耐药虫株的 ACI 为 109.1;经过 12 次传代,盐酸氟乙基硫胺素对敏感虫株的 ACI 为 197.5,而对耐药虫株的 ACI 为 110.6,对盐酸氨丙啉耐药虫株的 ACI 为 163.2;结果表明成功地诱导出对盐酸氨丙啉、盐酸氟乙基硫胺素完全耐药的虫株;盐酸氟乙基硫胺素产生耐药速度慢于盐酸氨丙啉,与盐酸氨丙啉有部分交叉耐药性。

**[关键词]** 艾美耳球虫;氨丙啉;盐酸氟乙基硫胺素;耐药性;鸡

## Development of *Eimeria tenella* Resistance to Fluoroethyl Thiamine Hydrochloride

QING Zong-hua, LI Jun-jian, PENG Xiao-juan, QU Yu-rong, LI Yun-feng\*

(Guangzhou Origmol Feed Additives Co. Ltd, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** The resistance of *Eimeria tenella* against the anticoccidial drug fluoroethyl thiamine hydrochloride and amprolium was induced experimentally for evaluate the resistant tendency of fluoroethyl thiamine hydrochloride. The initial concentration of fluoroethyl thiamine hydrochloride and amprolium hydrochloride was 50 mg/kg, *E. tenella* was serially passaged in chickens with gradually increasing concentration of fluoroethyl thiamine hydrochloride, The drug resistance was assessed by lesion scores, survival rate and number of oocysts, it took 10 and 12 passages to produce the drug resistant strain of *E. tenella* to 800 mg/kg hydrochloride amprolium and 800 mg/kg fluoroethyl thiamine hydrochloride, respectively. The effects of the drugs were assessed by ACI (anticoccidial index), the ACI were 109.1 and 110.6 for hydrochloride amprolium and fluoroethyl thiamine hydrochloride, respectively. the results show that the resistance of fluoroethyl thiamine hydrochloride was slower to be developed than amprolium hydrochloride, and was effective to the amprolium-resistant strain.

**Key words:** *Eimeria tenella*; amprolium; fluoroethyl thiamine hydrochloride; drug-resistance; chicken

基金项目:广州市科技企业孵化器资助项目(编号:1312000119)

作者简介:覃宗华,博士,从事新兽药的研发工作。

通讯作者:李云峰。E-mail: 1371575120@qq.com

鸡球虫病是由一种或多种艾美耳属球虫寄生于鸡的肠道不同部位所引起的一种肠道细胞内寄生性原虫病<sup>[1]</sup>, 是造成现代养禽业经济损失最大的疾病之一, 全球每年因球虫病引起的经济损失据估计超过 35 亿美元<sup>[2]</sup>。我国养鸡量约占世界总量的 10%, 由球虫病所致养鸡业的经济损失估计可高达 20 亿元人民币以上<sup>[3]</sup>。目前鸡球虫病的控制主要依赖抗球虫药物, 而抗球虫药物长期广泛的使用导致耐药虫株的迅速出现<sup>[4-5]</sup>, 且表现出与同类药物或作用机理相同的其他药物产生一定程度的交叉耐药性, 使药物的疗效下降<sup>[6]</sup>。盐酸氟乙基硫胺素 (Fluoroethyl Thiamine Hydrochloride, FTH) 是具有自主知识产权的新抗球虫药物, 并已获得了其研制及应用的专利<sup>[7]</sup>, 作用机理与氨丙啉相似, 取代硫胺素, 干扰虫体细胞的糖代谢。研究表明 FTH 的毒性很小, 对堆型、巨型等艾美耳球虫均有效。本试验通过在实验条件下进行柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 耐药性的诱导研究, 评估盐酸氟乙基硫胺素产生抗药性的倾向, 并比较研究其与作用机制相近的盐酸氨丙啉 (Amprolium Hydrochloride, AH) 的交叉耐药性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及饲料 1 日龄快大黄肉鸡, 购于江门市新会区大泽镇科泽家禽发展有限公司, 饲养于无球虫鸡笼内。肉鸡全价配合饲料, 江门科大饲料发展有限公司订制, 不含任何抗菌药及抗球虫药物。

1.1.2 试验药物 盐酸氟乙基硫胺素, 批号 20140605, 含量 98.0%, 广州先至饲料添加剂有限公司研制; 盐酸氨丙啉, 批号为 20140214, SIGMA 公司。

1.1.3 试验虫株 柔嫩艾美耳球虫 GN 株, 广州先至饲料添加剂有限公司保存, 自广西桂林地区某鸡场分离。试验前用鸡繁殖扩增, 收集新鲜卵囊孢子化后 4℃ 保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 耐药性虫株的诱导

1.2.1.1 试验设计 试验分批进行, 以柔嫩艾美耳球虫 GN 株开始诱导, 从低浓度到高浓度, 每次药物诱导组所收集的卵囊供下一次感染用。根据卵囊产量和耐药性程度, 逐渐提高药物浓度, 直至诱导出盐酸氟乙基硫胺素、盐酸氨丙啉耐药性虫

株。当药物浓度提高后, 若收集不到足以传代的卵囊, 则重复原药物浓度传代。以 50 mg/kg 盐酸氟乙基硫胺素、盐酸氨丙啉为起始诱导浓度, 逐渐增加药物浓度, 每次传代是以上一代所产生的卵囊供下一次继续诱导用, 每批次试验设立 2 个药物浓度组。每次试验设计如下: 试验分 4 组, 每组 10 只鸡, 第 1、2 组饲喂 FTH (或 AH), 第 3 组感染不用药组, 第 4 组空白 (不感染不用药) 对照组, 除空白对照组外, 其余 3 组均经口感染 *E. tenella* 孢子化卵囊  $1 \times 10^5$  个/只。诱导结束后进行卵囊分离并在无抗球虫药物压力下传代三次, 再进行耐药性检测, 确定其耐药性。

1.2.1.2 试验步骤 感染后, 每日观察鸡的精神状态、采食、发病、血便情况等, 记录每组鸡的发病和死亡情况。对死亡的鸡进行剖检, 观察其肠黏膜和内容物, 判定死因。若死于球虫病, 病变记分为 4 分。在感染后第 4 ~ 5 天粪便记分按 Morehouse 等<sup>[8]</sup>介绍的方法记分; 感染后第 7 天将所有鸡称重并记录, 每组各剖杀 5 只, 观察并记录每只鸡的盲肠病变, 按 Johnson 等<sup>[9]</sup>介绍的 5 级记分进行盲肠病变记分并计算病变值, 组内病变值以每组鸡平均病变记分乘以 10; 收集盲肠内容物中的卵囊, 用血球计数板计数<sup>[8]</sup>, 计算每对盲肠所含的卵囊数量, 再换算成卵囊值。

1.2.1.3 耐药球虫株的分离和纯化 耐药球虫株的纯化和常规传代按 Wagenback 等<sup>[11]</sup>方法进行。

#### 1.2.2 诱导虫株的耐药性检测

1.2.2.1 试验设计 将 18 日龄雏鸡称重后随机分为 10 组, 每组 10 只, 第 1 组为空白对照组 (不感染不给药组), 第 2 组分别为敏感虫株 (感染不给药组), 第 3 ~ 5 组分别为 FTH 给药组 (敏感虫株用药组、FTH 耐药虫株用药组、AH 耐药虫株用药组), 第 6 ~ 8 组分别为 AH 给药组 (敏感虫株用药组、AH 耐药虫株用药组、FTH 耐药虫株用药组)。在整个试验过程中, 各组的饲料及用具均严格分开; 采用混饲法给药, 感染前一天开始连续饲喂至试验结束。除空白对照组外, 其余各组分别用滴管经口滴服耐药虫株 (或敏感虫株) 卵囊  $2 \times 10^5$  个/只, 感染后按 1.2.1.2 项操作, 分别记录盲肠病变记分、卵囊值及存活数, 并称重计算相对增重率, 详见表 1。

1.2.2.2 耐药性评价标准 本试验采用以下公式计算抗球虫指数 (ACI):  $ACI = (\text{存活率} + \text{相对增重}$

表1 诱导虫株的耐药性检测试验分组

组别	药物	药物剂量/ppm	虫株	剂量/(个·只 <sup>-1</sup> )
1	—	0	—	—
2	—	0	敏感	2 × 10 <sup>5</sup>
3	FTH	100	敏感	2 × 10 <sup>5</sup>
4	FTH	100	FTH 耐药	2 × 10 <sup>5</sup>
5	FTH	100	AH 耐药株	2 × 10 <sup>5</sup>
6	AH	125	敏感	2 × 10 <sup>5</sup>
7	AH	125	AH 耐药	2 × 10 <sup>5</sup>
8	AH	125	FTH 耐药	2 × 10 <sup>5</sup>

率) - (病变值 + 卵囊值), 其中存活率 = 试验组的存活鸡数/试验组的总鸡数 × 100%; 相对增重率 = (各试验组的平均增重/阴性对照组的平均增重)

× 100%; 病变值 = 各试验组内鸡平均病变记分 × 10。ACI 在 120 以下者为完全耐药; ACI 在 120 ~ 160 者为部分耐药; ACI 在 160 ~ 180 者为中度敏感; ACI 在 180 以上者为高度敏感<sup>[10]</sup>。

2 结果与分析

2.1 耐药性虫株的诱导 在药物剂量递增的情况下, 经过 12 次传代, 柔嫩艾美耳球虫敏感株对 800 mg/kg 盐酸氟乙基磺胺素产生了耐药性, 其中在 50、100、200、400、800 mg/kg 盐酸氟乙基磺胺素的药物压力下分别经历了 4、3、2、2、2 次传代。经过 10 次传代, 柔嫩艾美耳球虫敏感株对 800 mg/kg 盐酸氨丙啉产生了耐药性, 其中在 50、100、200、400、800 mg/kg 盐酸氨丙啉的药物压力下分别经历了 2、3、2、2、1 次传代, 见表 2。

表2 耐药性虫株诱导试验结果

代数	盐酸氟乙基磺胺素剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )																
	50			100			200			400			800				
1	1.2 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	2.6 <sup>c</sup>	0	100	0											
2	1.8	100	3.1	0	100	0											
3	2.1	100	8.6	0	100	0											
4	2.5	100	8.4	0	100	0.6											
5				0	100	1.1	0	100	0								
6				0.4	100	2.5	0	100	0								
7				1.6	100	5.2	0	100	0.8								
8							0.6	100	2.5	0	100	0					
9							1.6	100	6.1	0.6	100	1.3					
10										1.3	100	4.3	0	100	0		
11										2.4	90	10.6	0.7	100	1.5		
12													1.2	90	2.2		
13													2.3	90	3.5		

  

代数	盐酸氨丙啉剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )																
	50			100			200			400			800				
1	1.4	100	2.8	0	100	0											
2	2.3	100	5.7	0.5	100	1.2											
3				1.2	100	1.5	0	100	0								
4				1.4	100	2.7	0	100	0.1								
5				2.2	100	6.2	0	100	1.2								
6							0.6	100	1.8	0	100	0.2					
7							1.5	100	6.4	0	100	0.8					
8										1.2	100	2.2	0	100	0.1		
9										1.8	100	5.5	0	100	0.7		
10													0.6	100	1.4		
11													1.4	100	4.4		

a 为病变计分, b 为存活率(%), c 为卵囊数量(×10<sup>6</sup>/鸡); 方框标示的虫卵为进行下一代诱导所用虫卵。

2.2 诱导球虫株的耐药性检测 结果见表3, 盐酸氟乙基硫酸胺对敏感虫株的 ACI 为 197.5, 而对 FTH 耐药虫株的 ACI 为 110.6, 产生了完全耐药性; 对 AH 耐药虫株的 ACI 为 163.2, 属中度敏感。

盐酸氨丙啉对敏感虫株的 ACI 为 192.6, 而对 AH 耐药虫株的 ACI 为 109.1, 产生了完全耐药性; 对 FTH 耐药虫株的 ACI 为 141.7, 属部分耐药。

表3 诱导球虫株的耐药性检测结果

组别	动物数/只	存活率/%	平均增重/(g·只 <sup>-1</sup> )	相对增重率/%	病变记分	病变值	卵囊数量/(×10 <sup>6</sup> )	卵囊值	ACI
1	10	100	142.8±4.7	100	0	0	0	0	—
2	10	80	108.1±3.6	75.6	3	30	11.6	40	—
3	10	100	139.3±3.2	97.5	0	0	0	0	197.5
4	10	80	122.3±2.9	85.6	2.5	25	10.2	30	110.6
5	10	90	130.2±3.5	91.2	0.8	8	3.8	10	163.2
6	10	100	132.2±4.4	92.6	0	0	0	0	192.6
7	10	80	121.5±3.7	85.1	2.6	26	10.7	30	109.1
8	10	90	128.1±3.3	89.7	1.8	18	8.7	20	141.7

### 3 讨论

自 20 世纪 50 年代以来, 通过实验室诱导球虫对某种药物的抗药性成为研究抗药性倾向的方法之一<sup>[12]</sup>。耐药性球虫株的人工诱导的重要意义之一: 在相同条件下, 对不同的药物进行球虫耐药性诱导, 比较球虫对不同药物所产生耐药性的快慢, 通过不同药物交叉耐药性的检测手段研究, 从而合理地指导用药<sup>[13]</sup>。球虫耐药性实验室诱导的方法常用 2 种, 推荐使用药物浓度大剂量感染法和药物浓度递增法, 研究表明后者更易获得耐药虫株<sup>[14]</sup>, 因此本试验采用药物浓度递增的方法进行诱导。

氨丙啉是 1959 年由美国默克公司研制开发, 因使用后不影响鸡对球虫产生免疫力而被广泛使用, 但其耐药性问题已有很多报道<sup>[15-17]</sup>, 不应长期使用, 临床上常配合乙氧酰胺苯甲酯等球虫药使用。氨丙啉的作用机理是竞争性抑制球虫对维生素 B<sub>1</sub> 的摄取, 峰期为第 3 天, 主要抑制球虫第一代裂殖体, 对有性繁殖阶段和子孢子也有抑制作用<sup>[18]</sup>。盐酸氟乙基硫酸胺的作用机理与氨丙啉相似, 取代硫酸胺, 干扰虫体细胞的糖代谢。因此本研究选择盐酸氨丙啉和氟乙基硫酸胺在实验室进行柔嫩艾美耳球虫耐药株的诱导试验, 以获得 2 个药物的耐药性差异, 并为进一步的分子机理研究提供依据; 同时为加快诱导进程, 每一批次试验设立高低 2 个药物浓度组, 结果分别经过 10、12 个代次, 成功地获得了柔嫩艾美耳球虫的盐酸氨丙啉和氟乙基硫酸胺耐药虫株。结果表明盐酸氟乙基硫酸胺作为新型抗球虫药其产生耐药性的速度明显

慢于氨丙啉, 且对氨丙啉耐药株中度敏感。盐酸氟乙基硫酸胺与其他抗球虫药的化学结构和作用峰期不同, 可定期或季节性地与其他性质不同的抗球虫药穿梭使用, 这样不仅减少或避免耐药性的产生, 而且可提高药物的防治效果<sup>[19]</sup>。

对于球虫耐药性的判定, 不同的研究者所采用的标准和指标都不尽相同。孔繁瑶等<sup>[20]</sup>以 RLS、ROP 和 POAA 3 个指标对国内 15 个鸡场的球虫株进行了耐药性检测。于咏兰等<sup>[21]</sup>以 ACI 指标为主, 辅以 RLS、ROP 和 POAA 3 个指标对复方抗球虫制剂诱导的球虫株进行了耐药性综合判定。潘虹等<sup>[22]</sup>以 ACI、RLS 和 POAA 3 个指标对癸氧喹酯诱导的球虫株进行了耐药性综合判定。本试验采用了 ACI 对诱导虫株进行耐药性判断, 诱导的柔嫩艾美耳球虫虫株对 7 倍推荐用量即 800 mg/kg 的盐酸氟乙基硫酸胺产生了明显的耐药性, 可作为耐药株做进一步的分子机理及检测研究。

### 参考文献:

- [1] Del Cacho E. Effect of the quinolone coccidiostat decoquinate on the rearrangement of chromosomes of eimeria tenella [J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36 (14): 1515 - 1520.
- [2] Dalloul A A, Lillehoj H S. Avian coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development [J]. Expert Review of Vaccines, 2006, 5: 143 - 163.
- [3] 陈玉婷, 彭新宇, 袁明贵, 等. 3 株柔嫩艾美耳球虫野外分离株的药物敏感性试验研究[J]. 广东农业科学, 2013, 22: 125 - 128.
- [4] 顾有方, 郭广富, 陈会良. 5 株柔嫩艾美耳球虫对 4 种抗球

虫药的抗药性[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35 (6): 727 - 730.

[5] Williams R B. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens [J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28 (7): 1089 - 1098.

[6] 李佩国, 李蕴玉, 张香斋, 等. 我国鸡球虫耐药性现状及其对策[J]. 河北科技师范学院学报, 2006, 20 (3): 70 - 74.

[7] 彭险峰, 覃宗华, 刘起军. 氟乙基硫胺素或其盐及其在制备抗球虫药物中的应用 [P]. 中国, 发明专利, ZL201210151345.8.

[8] Morehouse N F, Baron R R. Coccidiosis: Evaluation of coccidiostats by mortality, weight gains and fecal scores [J]. Exp Parasitol, 1970, 28; 25 - 29.

[9] Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor - open experiments with chickens [J]. Exp Parasitol, 1970, 28; 30 - 36.

[10] 索 勋, 李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 298.

[11] Wagenback G F, Challey J R, Burns W C. A methods for purifying coccidial oocysts employing chlorox and sulfuric aciddichromate solution[J]. J Parasitol, 1966, 52; 1222 - 1223.

[12] Cuckler A C, Malanga C M. Studies on drug resistance in coccidian [J]. Journal of Parasitology, 1955, 41; 302 - 311.

[13] 侯 杰, 李仁良, 潘 虹, 等. 鸡艾美耳球虫耐药性的人工诱导及检测方法的研究进展[J]. 中国家禽, 2010, 32 (19): 49 - 51.

[14] 王慧珍, 沈祥广, 刘雅红. 柔嫩艾美耳球虫地克珠利抗药株的实验室诱导[J]. 中国动物传染病学, 2009, 17 (3): 62 - 64.

[15] 黄 兵, 赵其平, 吴薛忠, 等. 上海地区球虫对 6 种抗球虫药的抗药程度研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2001, 9(2): 1 - 7.

[16] 金光明, 程从升, 顾有方, 等. 2 株柔嫩艾美耳球虫对 5 种抗球虫药的抗药性[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 40 - 42.

[17] 张香斋, 李佩国, 李蕴玉, 等. 秦皇岛株和唐山株柔嫩艾美耳球虫对 5 种抗球虫药的抗药性检测[J]. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(5): 1 - 4.

[18] 陈杖榴, 朱蓓蕾, 佟恒敏, 等. 兽医药理学第 2 版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008; 286 - 287.

[19] 赵洪梅. 鸡球虫病及抗球虫药的临床应用综述 [J]. 养殖与饲料, 2008, 11; 52 - 54.

[20] 孔繁瑶, 宁长巾, 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[J]. 北京农业大学学报, 1994, 20 (3): 302 - 308.

[21] 于咏兰, 汪 明. 柔嫩艾美耳球虫对复方抗球虫制剂抗药性的诱导[J]. 中国兽医科技, 2005, 35 (6): 476 - 479.

[22] 潘 虹, 林瑞庆, 舒 丽, 等. 柔嫩艾美耳球虫癸氧喹酯耐药株的诱导研究[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 (9): 191 - 194.

(编辑:陈 希)

(上接第 15 页)

自 1999 年开始,农业部每年组织实施动物及动物产品兽药残留监控计划,年均抽检动物产品 1.4 万余批,检测包括肉、蛋、奶等 9 种动物组织样品,检测的兽药共计 24 种(类)。检测结果显示,兽药残留超标率从 1999 年的 1.43% 降至 2015 年底的 0.11%,2015 年共检测畜禽及其产品兽药残留样品 16462 批次,合格率 99.89%。畜禽产品兽药残留合格率连续多年保持在较高水平。

### 抗生素允许在动物产品中微量存在

记者:儿童时期抗生素暴露是否可能是儿童肥胖的因素?

徐士新:目前,没有任何确凿的证据证明儿童肥胖的产生是因动物产品中抗生素残留所致。如果不排查其他主要因素,如家庭的饮食结构、遗传因素、生活方式、个体饮食量等,仅用尿中抗生素的残留检测值就作出与肥胖相关的结论,不科学也不严肃。任何危害与剂量之间都存在相互关系,离开剂量就无从谈起。人们因暴露于食品中极低浓度的药物残留而使健康面临可察觉的不良风险的可能性非常低。

记者:动物源性食品中含有抗生素残留是否意味对人体产生危害?

徐士新:抗生素残留量只有达到一定程度,即超过规定的安全限量,才会对人体健康产生危害。CAC 及欧美发达国家根据抗生素的种类、使用目的等制定了肉蛋奶等畜禽产品中抗生素残留的安全限量标准,即最高残留限量(MRL)。这个安全限量是假设人一生中每天都摄入这个量也不引起任何危害。农业部参照国际标准和欧美标准,也制定发布了我国《动物源性食品中兽药残留最高限量》标准。

根据 MRL 标准,抗生素允许在动物产品中微量存在,人们食用含抗生素残留低于 MRL 标准的动物源性食品是安全的,这是严格按科学程序进行风险评估得出的结论。在实际生产中,只要动物源性食品中抗生素残留量低于规定的安全限量标准,该产品就视为安全,可以放心食用。有些人认为只要动物源性食品中检出抗生素残留,就是不安全的,这是一种误解。