

植物精油抗鸡球虫病研究

柯淇匀¹ 谭理¹ 甘晓辉¹ 周艳琴¹ 方瑞¹ 汪德中² 赵俊龙^{1*}

1.华中农业大学动物医学院,武汉 430070;2.山川生物科技(武汉)有限公司,武汉 430070

摘要 鸡球虫几乎存在于所有养鸡场,目前防治鸡球虫病最有效的方法仍然是药物治疗,但耐药性的广泛存在不仅影响了鸡球虫病的防治效果,而且药物残留等问题也制约了养鸡业的健康发展。植物精油具有抗菌、抗球虫等作用,而且无毒,无残留等特点,因此被认为是潜在的抗球虫药物替代物。本试验研究了植物精油对柔嫩艾美耳球虫临床分离株的防治效果,结果表明供试植物精油具有抑制鸡球虫的作用,同时具有一定的免疫增强和促生长作用,显示了植物精油作为抗球虫药替代物的美好前景。

关键词 植物精油;鸡球虫病;生长性能

鸡球虫病(Chicken coccidiosis)是由艾美耳属的一种或多种球虫引起,以罹病雏鸡血便、食欲废退、体重下降迅速为主要临床症状的原虫病。孢子化的鸡球虫卵囊从口腔进入鸡体消化道,在肠上皮细胞内繁殖,对肠道造成不同程度的损伤,继而引发机体的损伤与病变,给养鸡业带来了巨大的经济损失。目前药物预防和治疗仍然是鸡球虫病控制的主要手段,但是由于长期不合理地使用抗球虫病药物,使得其耐药性日趋严重。而且人们对食品安全的关注越来越多,因此,寻找和筛选新型的抗鸡球虫药物具有重要意义。已报道植物精油具有免疫促生长和抑菌抗菌作用,而且不会产生耐药性与药物残留,因此具有广阔的应用前景。因此,本研究探讨了植物精油的抗鸡球虫作用。

1 材料与方法

1.1 植物精油

试验所用植物精油由山川生物科技有限公司提供,武汉索尔生物科技有限公司生产,商品名为索唯香 III,所含主要成分为饲料级肉桂醛、百里香酚,以二氧化硅作为载体。保存于干燥阴凉处,避免阳光直射。产品批号为鄂饲添字(2014)247166。

1.2 鸡球虫疫苗

鸡球虫病四价活疫苗(柔嫩艾美耳球虫 PTMZ

株+毒害艾美耳球虫 PNHZ 株+巨型艾美耳球虫 PMHY 株+堆型艾美耳球虫 PAHY 株),每羽份疫苗含有孢子化卵囊 $1\ 100 \pm 10\%$ 个,佛山市正典生物技术有限公司生产,批准文号:兽药生字(2012)190462139,生产批号为 15030401。

1.3 化学药品

磺胺氯吡嗪钠可溶性粉,商品名为通扬血球净,主要成分磺胺氯吡嗪钠、二甲氧苄啶、二甲硝唑、速效止血素,江苏南农高科动物药业有限公司生产,批准文号为兽药字(2012)100172704。

1.4 虫株

由本实验室收集并纯化的鸡柔嫩艾美耳球虫株(*Eimeria tenella*)。利用饱和食盐水漂浮法收集,孢子化后计数,存放于 2.5% 的重铬酸钾溶液中,4℃ 保存备用。接种前,用生理盐水洗去重铬酸钾溶液,以免接种后重铬酸钾引起中毒,导致试验鸡的死亡。

1.5 Elisa 试剂盒

IL-2 Elisa 试剂盒, TGF-β Elisa 试剂盒, IFN-γ Elisa 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

1.6 试验鸡与饲养场所

试验在华中农业大学试验鸡场进行,为期 42 d。试验鸡为科宝 500 型的 1 日龄无球虫感染的肉鸡,购自湖北省荆州市正康畜禽有限公司,鸡只健康状

收稿日期:2016-04-20

* 通讯作者

柯淇匀,男,1987 年生,硕士,研究方向:寄生虫分子生物学与基因工程。

况和生长发育状况良好。

1.7 试验饲料

本次试验中所用的饲料为本实验室自行配制,无任何抗球虫药和抗生素成分。

1.8 试验设计

将 8 日龄雏鸡,每组 8 只,随机分为 9 组,每组 2 个重复。分组情况以及各组用药量见表 1。疫苗对照组在人工感染鸡球虫前一周经口免疫球虫疫苗;大蒜、植物精油和大蒜与植物精油配伍组于 12 日龄开始拌料饲喂。接种鸡球虫 1 d 后,磺胺氯吡嗪钠组开始用药,连续用 6 d,用药剂量为说明书推荐剂量。于 16 日龄清晨,逐一对每组每只鸡称重,并记录。除空白对照外,其他每组每只鸡感染鸡柔嫩艾美尔球虫的孢子化卵囊 1×10^5 个。感染 8 d 后,对各组试验鸡进行称重,之后试验 I 组全部剖杀,计算各组的存活率、增重率、病变值、卵囊值以及抗球虫指数。试验 II 组饲喂至 40 日龄,逐只称重后剖杀。各组鸡于 16、24、32 和 40 日龄时均随机选取 4 只,翼下静脉采血 1 mL,置于含有抗凝剂 EDTA 的采血管中,采血管置于 4 °C,2 h 内 4 500 r/min 离心 5 min 制备血清,于 -20 °C 条件下保存,以备后续试验中测定血液中的细胞因子水平。

1.9 测定指标与方法

生长性能测定。试验期 42 d。测定每周各组鸡只体重,记录饲料消耗量,并计算平均日增重与饲料转化率。

1)增重率。增重率 = (试验结束后平均体重 - 试验开始时平均体重) / 试验开始时的平均体重 × 100%

2)相对增重率。相对增重率 = 感染各组鸡平均每只增重 / 不感染不给药组鸡平均每只增重 × 100%

3)存活率。存活率 = 组内鸡存活数 / 组内鸡总数 × 100%

4)粪便计分/血便计分。参照 Morehouse and Baron (1970)的方法,粪便正常 0 分;1 堆血粪 +1 分;2 堆血粪 +2 分;3 堆血粪 +3 分;4 堆血粪以上,无正常粪便 +4 分;因球虫病死亡的鸡也记 +4 分。

5)病变计分。参照 Johnson and Reid(1970)的病变记分方法记分,两侧盲肠病变不一致者以严重一侧为准。盲肠病变计分的评价标准见表 2。

6)盲肠内容物卵囊值。按麦克马斯特氏法(Mac-Master's method)测定。其中,卵囊比数 = 不感染对照组或感染用药组卵囊数 / 感染不给药组卵囊数 × 100%。卵囊比数和相应卵囊值如表 3 所示。

表 1 分组及用药剂量情况

组别	用药剂量
不感染不用药组	/
感染不用药组	/
疫苗组	/
磺胺氯吡嗪钠对照组	0.6 g/kg
大蒜组	10 g/kg
大蒜 + 植物精油 250 mg	大蒜 10 g/kg + 植物精油 250 mg/kg
大蒜 + 植物精油 500 mg	大蒜 10 g/kg + 植物精油 500 mg/kg
植物精油 250 mg	250 mg/kg
植物精油 500 mg	500 mg/kg

表 2 病变计分的评价标准

病变分值	判断标准(盲肠病变特征)
0	盲肠壁厚度正常,无肉眼可见病变,粪便正常
1	盲肠黏膜有点状出血,盲肠壁不增厚,内容物正常
2	盲肠内容物为黏液,有少许血丝,肠壁略增厚,黏膜散在出血点
3	盲肠内容物有大量血液或有盲肠芯,肠壁肥厚,盲肠变形
4	盲肠壁极度肥厚,形成干酪样肠芯,黏膜布满出血点、出血斑,黏膜脱落,死鸡亦记为 4 分

表 3 卵囊比数和卵囊值的对照表

项目	对应值				
卵囊比数	0 ~ 1%	1% ~ 25%	26% ~ 50%	51% ~ 75%	76% ~ 100%
卵囊值	0	5	10	20	40

7)抗球虫指数(ACI)。抗球虫指数(ACI)是包括存活率、增重、病变、卵囊产量和粪便记分等多项参数指标判定球虫抗药性或药物效力的综合药效指标。本研究采用 $ACI=(相对增重率 + 存活率)-(病变分值 + 卵囊值)$ 。

10)数据统计。用 Graphpad prism 5 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 抗球虫指数

抗球虫指数结果表明植物精油不同剂量组(无大蒜配伍)所获得的抗球虫指数在 120~160 之间,说明此类药物在抑制鸡球虫病过程中起到了作用(见图 1)。尤其以单独使用植物精油 250 mg/kg 饲料配伍后 ACI 最为显著,说明此类药物在综合防治

鸡球虫病过程中具有积极作用。

2.2 卵囊和存活率相关指标

卵囊排出的结果见图 2。从图 2 可以看出,磺胺氯吡嗪钠作为常规抗鸡球虫病药物,仍然在抑制虫卵产量过程中具有较好作用;植物精油虽没磺胺氯吡嗪钠抑制率高,但也具有一定的抑制虫卵产出能力,而大蒜组作用不明显。

肉鸡存活率结果如图 3 所示。大蒜单独使用以及大蒜与植物精油配伍,感染鸡球虫后 8 d,都出现了死亡,且存活率维持在 70%;而单独使用植物精油,成活率都维持在 8 成以上,其中 250 mg/kg 组成活率更为 100%。分析认为,植物精油,在鸡球虫入侵宿主细胞过程中,对宿主抵御其入侵和繁殖,起到了重要的作用。同时,大蒜与植物精油配伍效果不明显。

抗球虫指数

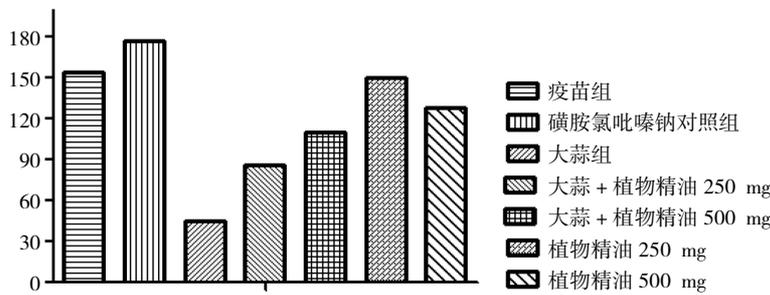


图 1 植物精油抗鸡球虫病试验指数结果

卵囊产量下降率

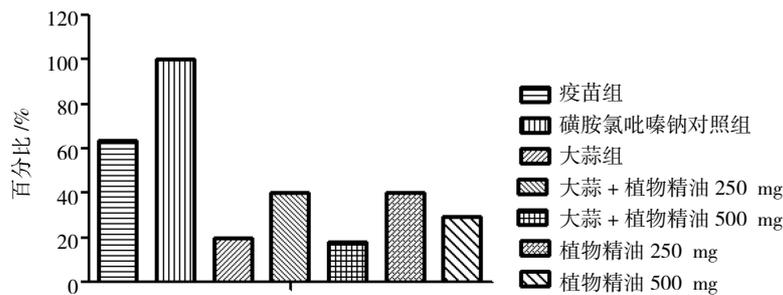


图 2 植物精油抗鸡球虫病相对卵囊产量下降率

存活率

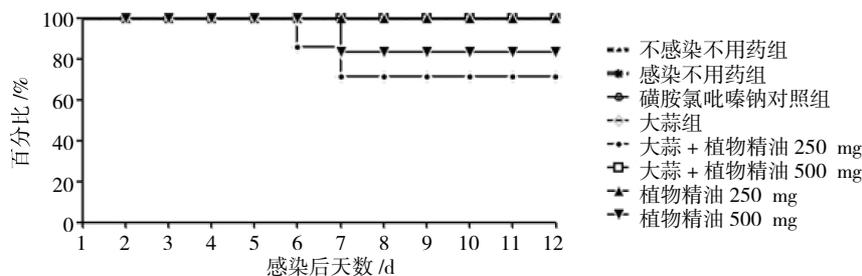


图 3 肉鸡存活率试验结果

2.3 饲料转化与体重增长相关指标

图 4 和图 5 显示了整个试验期间 3 个不同周期的饲料转化率和体重增长率情况,从结果看,植物精油的效果都相对较好,说明植物精油在促进鸡体对饲料的转化能力上具有积极的作用,从而加速了机体体重增长。并且,24 日龄时(感染鸡球虫 8 d),单独添加植物精油的 2 个不同剂量组效果相当,而后 2 个周期,植物精油 500 mg/kg 剂量组的效果较好。

2.4 细胞因子水平

通过对不同时期鸡体细胞因子的检测,在鸡球虫感染前、中以及感染后 2 周不同细胞因子水平出现不同变化,分析认为,植物精油可使动物体在感染鸡球虫病过程中,促进动物体产生免疫应答作用,细胞因子水平上升,IFN- γ 含量提高,而 IFN- γ 能够抑制艾美耳球虫的生长发育。感染鸡球虫病后,植物

精油有使动物体逐渐恢复的能力,如各项水平在感染鸡球虫后 2 周,平稳下降。如图 6 所示。

3 小结与讨论

鸡球虫病是一类严重危害鸡肠道的原虫疾病。在鸡球虫病不同种类中,以柔嫩艾美耳球虫危害能力最强,其主要通过对宿主肠上皮细胞进行入侵和掠夺繁殖所需的营养物质,从而进行无性生殖和有性生殖。当前,药物防控,仍然是抗鸡球虫病的主要措施。不同的药物,有着不同的药物靶点,针对于球虫生活周期的不同阶段作用,进而对虫体进行杀灭。但是随着人们生活水平与观念的改变,人们对抗生素导致的耐药性与药物残留问题的关注越来越多,许多国家已经制定并正在制定法律严格限制抗生素的运用,因此人们开始寻求抗生素的替代产

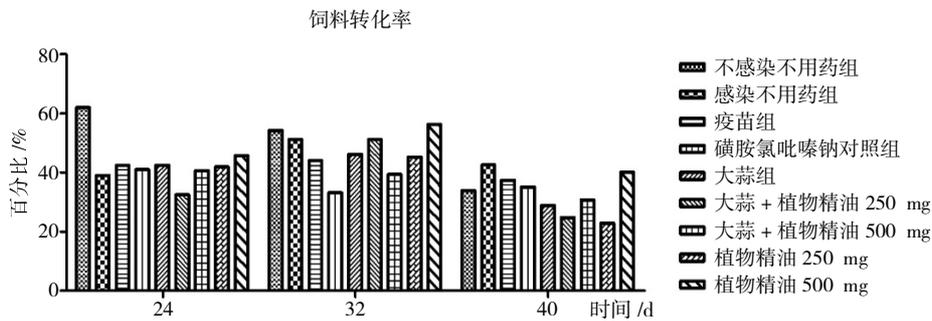


图 4 不同阶段饲料转化率

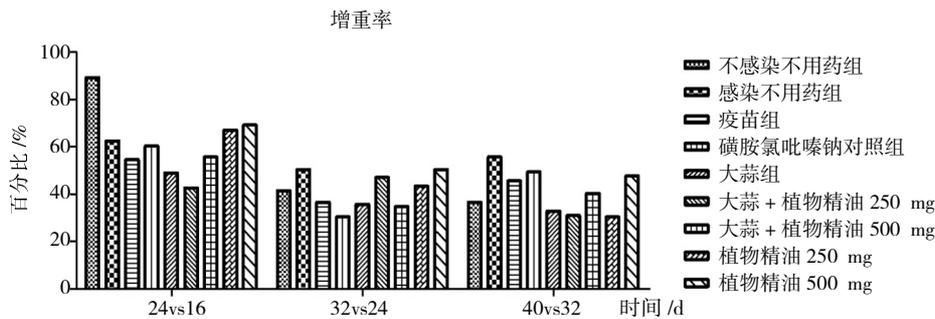


图 5 不同阶段体重增重率变化情况

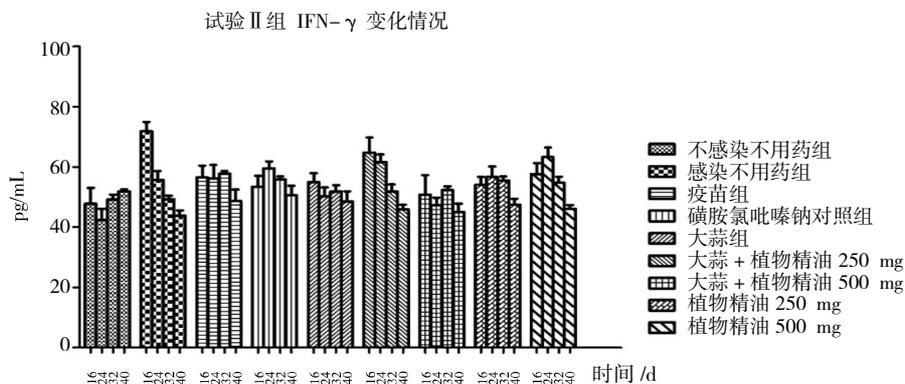


图 6 不同日龄 IFN- γ 水平

品。在这些研究中,植物精油被认为是潜在的抗生素替代产品,用于提高畜禽的生长性能。

本试验所选取的试验药物,是一类从植物中萃取的天然植物精油,具有潜在的药物治疗作用。抗球虫指数结果显示,植物精油在抗球虫能力上具有积极作用,其中以植物精油 250 mg/kg 剂量组效果较为明显。在卵囊下降率方面,磺胺氯吡嗪钠仍然具有较好的作用,而植物精油,也展示出了一定的抑制能力;较好的饲料转化率与动物体增长率成正比。这说明,植物精油不仅在抗鸡球虫病方面有积极作用,而且在促进肠营养吸收和促生长方面也有一定的作用。大蒜素,作为潜在的抑菌物质,在本试验中对防控鸡球虫病的效果一般,为探究其是否对鸡球虫有抑制作用,仍需深入试验论证。

本试验中,无球虫感染的空白对照,饲料转化率和增长率都较高。同时磺胺氯吡嗪钠组的饲料转化率与增长率也较为明显,说明磺胺氯吡嗪钠仍然是控制球虫病的重要手段。随着人们观念的进步,人们对抗生素产生的耐药性与药物残留的关注越来越多,因此寻求抗生素的替代产品就尤为重要。植物精油作为天然产品,被认为是安全有效的产品,不会产生抗药性与药物残留,在本研究中植物精油显示了很好的抗球虫作用,在未来鸡球虫病防控药物中,将会占有重要的一席之地。植物精油的抗鸡球虫病机理有待进一步探讨。

本试验也对动物体不同时期各项细胞因子水平进行了检测,结果反映了植物精油作用后不同日龄机体各项细胞因子水平,在鸡球虫感染前、感染中以及感染后 2 周不同细胞因子水平出现不同变化。鸡球虫在入侵宿主细胞过程中,机体会产生保护性免疫应答,药物本身也会对细胞免疫应答产生影响,本试验结果显示,植物精油在感染鸡球虫病过程中,对机体保护性免疫应答产生了影响,其机理有待进一步试验探究。

参 考 文 献

- [1] 安健,王黎霞.鸡柔嫩艾美耳球虫与球虫病[M].北京:中国农业出版社,2008.
- [2] 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.
- [3] 何国声,陈贵才.中国畜禽球虫病防治研究进展[M].杭州:浙江大学出版社,2005.
- [4] 李亚林.湖北省不同地区柔嫩艾美耳球虫的抗药性调查 [D].武汉:华中农业大学,2014.
- [5] 龙良启,孙中武,宋慧,等.生物化学[M].北京:科学出版社,2005.
- [6] 索勋,李国清.鸡球虫病学[M].北京:中国农业大学出版社,1998:1-2.
- [7] CHENG G,HAO H,XIE S,et al.Antibiotics alternatives:thesubstitution of antibiotics in animal husbandry [J].Front Microbiol,2014(5):217.
- [8] GIANNENAS I,FLOROU PANERI P,PAPAZAHARIADOU M,et al.Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella* [J].Archives of Animal Nutrition,2003,volume57(2):99-106.
- [9] JEFFERS T K,CHALLEY J R. Collateral sensitivity to 4-hydroxyquinolines in *Eimeria acervulina* strains resistant to meticlorpindol[J].J Parasitol,1973:624-630.
- [10] JEFFERS T K.Genetic transfer of anticoccidial drug resistance in *E.tenella*[J].J Parasitolo,1974(60):900-904.
- [11] MCDUGALD L R,SILVA J M,SOLIS J A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chicken in Brazil and Argentina [J].Avian Dis,1987,31(2):287-292.
- [12] MCDONALD V,SHIRLEY M W.Past and future:vaccination against *Eimeria*[J].Parasitolo Rec,2009,136(12):1477-1489.
- [13] MCLOUGHLIN D K,GARDINER J L Drug resistance in *Eimeria tenella*.VI.The experimental development of an amprolium-resistant strain[J].J Parasitol,1968:582-584.
- [14] MCMANUS E C,CAMBELL W C,CUCKLER A C. Development of resistance to quinoline coccidiostats under field and laboratory conditions[J].J Parasitol,1968:1190-1193.
- [15] YANG Y, IJI P A, CHOCT M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens:a review of the role of six kinds of alternatives to feed antibiotics [J].Worlds Poult Sci,2009(65):97-114.
- [16] ZHU G,JOHNSON J K,MCDUGALD L R.Peptides associated with monensin resistance in sporozoites of *Eimeria tenella*(coccidia)[J].J Parasitolo,1994:284-287.
- [17] ZHU G, MCDUGALD L R. Variant proteins associated with ionophore resistance in sporozoites of *Eimeria tenella*(Coccidia) [J].Parasitolo Res,1993,79(6):480-484.
- [1] 安健,王黎霞.鸡柔嫩艾美耳球虫与球虫病[M].北京:中国农业出版社,2008.