

鸡球虫耐药性检测方法

编制说明

一、任务来源（包括目的意义）

鸡球虫病是危害全球家禽业最严重的寄生虫病之一，尤其在集约化养殖条件下流行广泛，导致鸡只生长受阻、饲料转化率下降、甚至死亡，给养殖业造成重大经济损失。长期以来，抗球虫药物是防治该病的主要手段，但由于药物使用频繁、管理不规范，鸡球虫对多种抗球虫药物产生了不同程度的耐药性。目前，我国尚缺乏一套科学、统一、可操作的鸡球虫耐药性检测技术标准。各实验室或监测机构采用的检测方法、评价指标和判定标准不一，导致检测结果缺乏可比性和权威性，不利于行业管理和耐药防控工作的科学决策。

为落实《全国兽药残留与耐药性监测计划》及畜禽寄生虫病防控的相关要求，规范鸡球虫耐药性检测技术，以统一鸡球虫耐药性检测的技术路线、试验条件、判定标准和质量控制要求；确保不同实验室、不同地区检测结果具有可比性与可追溯性；并为国家和地方建立家禽寄生虫耐药监测网络提供技术支撑，通过耐药性数据分析，指导养殖场合理轮换或替代抗球虫药物，降低耐药风险。

为建立鸡球虫耐药性检测的统一技术标准，广东省农业科学院动物卫生研究所于 2025 年 4 月向广东省畜牧兽医学学会提出了《鸡球虫耐药性检测方法》团体标准立项申请。学会随后组织了标准预研工作，并于 2025 年 10 月 14 日召开专家论证会，对立项申请进行了审查。经充分讨论与评估，专家组一致认为，该项目资料基本齐全、论证充分，符合国家产业发展需求，所申报的团体标准立项条件完备，同意立项。目前，标准研究团队已完成主要技术参数与指标的试验验证，形成了标准文本初稿。

二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

1. 标准起草阶段

为制定本标准，项目组组织相关技术人员广泛调研和资料收集，系统查阅了国内外关于鸡球虫耐药性研究的技术专著、科研论文，以及国家、地方和行业标准等大量文献资料，并结合生产实践与检测需求，开展了多轮技术研讨与方案预讨论工作。在标准起草过程中，项目组重点围绕鸡球虫耐药性检测的关键技术参数进行了系统验证，内容涵盖待检鸡球虫卵囊的制备方法、耐药性检测流程、结果判定标准及方法适用性评估等方面，确保所提出技术指标的科学性、合理性与可操作性。截至 2025 年 11 月中旬，项目组已完成标准文本的初稿编制与修改，并组织相关领域专家进行了审查与技术论证，为标准的进一步优化和定稿奠定了基础。

2. 标准参与单位和参与人员

本文件由广东省农业科学院动物卫生研究所和中农华威制药股份有限公司联合起草。

本文件起草人为孙铭飞、游锡火、廖申权、戚南山、李娟、蔡海明、林栩慧、吕敏娜、宋勇乐、陈祥杰、朱易斌、张健骅、何钦义、曾徐浩等。

文件起草的具体分工如下：

孙铭飞：项目负责人，负责的标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订；

游锡火：负责各版本标准稿的讨论；

廖申权：负责标准中方法的建立；

戚南山：负责各版本标准稿的修订工作及征求意见后的修改工作；

李娟：负责标准中部分方法的起草和验证；

蔡海明：负责仪器设备的验证、耗材的选择；

林栩慧、吕敏娜、陈杰、宋勇乐、陈祥杰、朱易斌、邓奇精、张健骢、何钦义、曾徐浩：负责部分标准方法的验证及推广应用。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）框架的确定

根据《鸡球虫耐药性监测样品采集技术规范》的编制要求，并结合国家标准编写格式，确定本标准的总体框架结构。标准主要包括以下内容：范围、规范性引用文件、术语和定义、符号与缩略词、待检鸡球虫卵囊的制备、耐药性检测等章节。

（二）标准的编写原则

1. 标准引用

卵囊制备、鉴定过程中涉及的实验室用水，以及卵囊计数方法引用了已发布的国家标准 GB/T 6682—2008 《分析实验室用水规格和试验方法》和 GB/T 18647—2020 《动物球虫病诊断技术》。

2. 实际科研和采样工作经验

标准编写人员孙铭飞、游锡火、廖申权、戚南山、李娟、蔡海明、林栩慧、吕敏娜、宋勇乐、陈祥杰、朱易斌、张健骢、何钦义、曾徐浩等，长期从事鸡球虫耐药性监测及综合防控技术研究与推广工作，具备丰富的理论基础和实践经验。在本标准的编制过程中，结合实验室的实际工作情况，对鸡球虫耐药检测所需卵囊的制备和耐药性检测的技术要点和操作细节进行了系统总结与规范化编写。

项目组在鸡球虫病综合防控技术领域积累了深厚的研究基础，依托建设的畜禽寄生虫病诊断与防控工程技术研究中心，持续开展鸡球虫的耐药性监测、敏感药物筛选及防控技术创新与应用研究。团队集成的“鸡球虫病综合防控技术”已连续5年入选广东省农业主推技术，并被评为广东省十大农业主推技术，为鸡球虫病的科学防控提供了有力的技术支撑。此外，项目组的相关研究成果在学术期刊上发表，其中《Inhibitory effect of morin on aldolase 2 from *Eimeria tenella*》、《3株柔嫩艾美耳球虫广东地区临床分离株的耐药性分析》分别于2022年8月发表在 *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* (SCI 二区)，以及2024年9月发表在畜牧与兽医，体现团队在鸡球虫耐药性评估及敏感药物筛选方面的进展。

（三）主要内容及其确定依据

1 待检鸡球虫卵囊的制备

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂

饱和氯化钠溶液、2.5%重铬酸钾溶液、PBS 缓冲液 (pH 7.4) 配制方法见附录 A，配制用水符合 GB/T 6682—2008 三级水要求。粪便基因组 DNA 提取试剂盒（市售产品）、PCR 扩增试剂盒（市售产品）、引物（见附录 B）、DNA 分子量标准品、琼脂糖（电泳级）。

1.1.2 材料

粪便收集桶、玻璃棒、50 目筛网、100 目筛网、量筒、烧杯、血球计数板、微量移液器及配套吸头等。

1.1.3 实验动物

1 日龄雏鸡、2~4 周龄无球虫感染健康鸡。

1.1.4 仪器

高速离心机、低速大容量离心机、显微镜、恒温水浴培养箱、PCR 扩增仪、核酸电泳仪、核酸电泳槽、凝胶成像系统等。

1.2 卵囊分离

卵囊分离采用饱和氯化钠溶液漂浮法。将粪便样品按体积比 1:5 加入清水混匀，经 50 目和 100 目筛网过滤后，滤液以 3000 r/min 离心 5 min，弃上清。沉淀以 10 倍体积饱和氯化钠溶液混匀，再离心 5 min，取上层悬浮液，加入 4 倍体积水稀释，离心 5 min，弃上清。所得沉淀以 2.5%重铬酸钾溶液重悬，在 25~28 ℃、150 r/min 条件下震荡培养 1~3 天，显微镜（10×10 倍）检查卵囊孢子化情况，当 80%以上卵囊完成孢子化时，停止培养，将孢子化卵囊样品置 4 ℃冷藏保存，保存时间应不超过 6 个月。

1.3 虫种鉴定

1.3.1 PCR 检测

按商品化粪便样品基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作，提取待检卵囊样品的基因组 DNA，作为 PCR 反应模板。阴性对照为鸡球虫阴性粪便样品 DNA，阳性对照为鸡球虫卵囊 DNA，空白对照为无菌 ddH₂O。以鸡球虫 7 个虫种的特异性基因为靶标基因进行扩增，PCR 引物序列见附录 C。PCR 反应体系总体积为 20 μL，包括：上、下游引物（10 mmol/L）各 1 μL，2× Taq MasterMix 10 μL，待检样品 DNA 2 μL，ddH₂O 6 μL。PCR 反应条件为：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 30 s；56 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 30 s；共 35 个循环；72 ℃延伸 10 min。反应结束后，取 PCR 产物 5 μL，于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳，电泳结束后在凝胶成像系统中观察条带（图 1）。

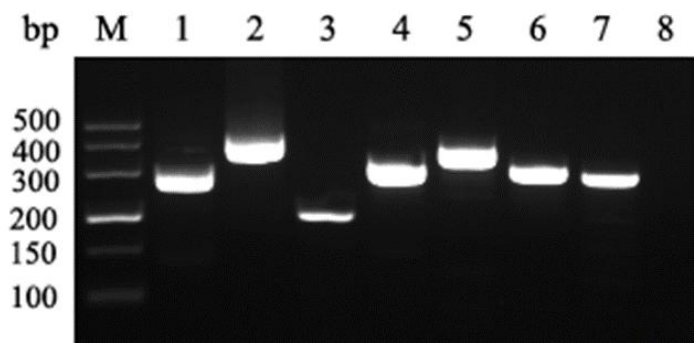


图1 鸡球虫虫种鉴定PCR扩增电泳结果

M: DNA 分子质量标准 (DL500) 1: 柔嫩艾美耳球虫 PCR 扩增产物；2: 毒害艾美耳球虫 PCR 扩增产物；3: 巨型艾美耳球虫 PCR 扩增产物；4: 堆型艾美耳球虫 PCR 扩增产物；5: 早熟艾美耳球虫 PCR 扩增产物；6: 和缓艾美耳球虫 PCR 扩增产物；7: 布氏艾美耳球虫 PCR 扩增产物；8: 阴性对照

1.3.2 直接镜检

取卵囊悬液样品，在显微镜（10×10 倍）下随机检查 100 个孢子化卵囊的形态特征，根据卵囊形态特征进行虫种判定（图 2）。

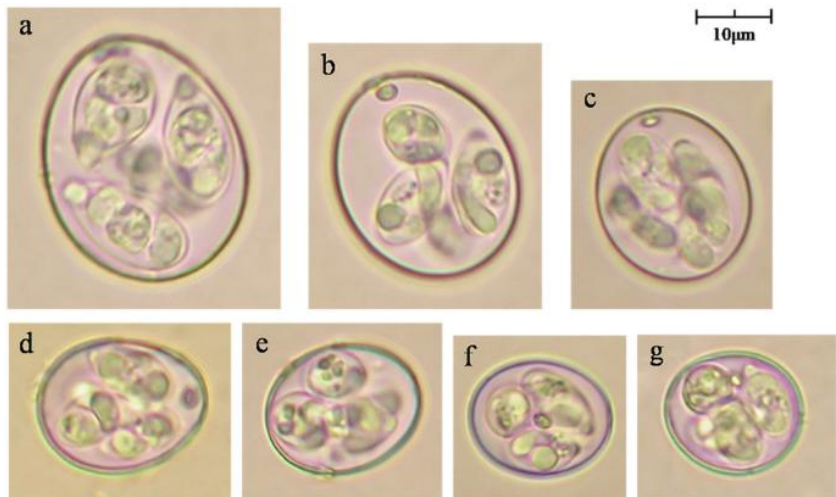


图2 鸡球虫卵囊的显微形态

a: 巨型艾美耳球虫卵囊; b: 布氏艾美耳球虫卵囊; c: 柔嫩艾美耳球虫卵囊; d: 毒害艾美耳球虫卵囊; e: 早熟艾美耳球虫卵囊; f: 堆型艾美耳球虫卵囊; g: 和缓艾美耳球虫卵囊

注: 引自 (He et al; 2022)

1.3.3 动物接种

采用血球计数板对分离卵囊进行计数, 取 1×10^4 个孢子化卵囊经口感染 10 只 2~4 周龄、无球虫感染的健康鸡。感染后第 7 天, 剖检全部鸡只, 观察肠道病变部位及病理特征, 根据典型病变部位及特征进行虫种鉴定 (图 3)。

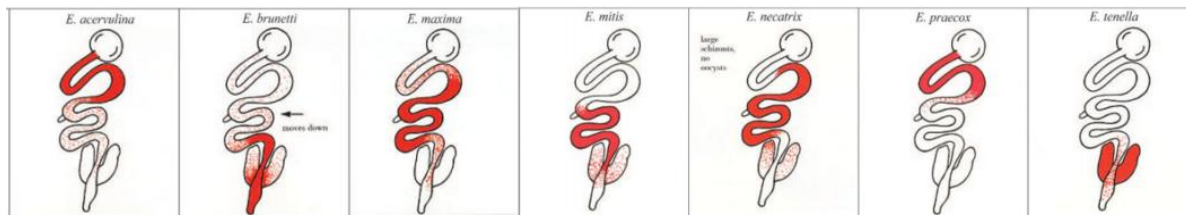


图3 鸡球虫病病变部位图示

注: 引自 (Conway DP and McKenzie ME, 2007)

1.4 卵囊纯化

当需以单一虫种卵囊进行耐药性检测时, 可采用裂殖子感染法或单卵囊分离法进行卵囊纯化。若检测对象为混合球虫卵囊, 可直接用于耐药性检测, 无需进一步纯化。

1.4.1 裂殖子感染法

本方法适用于毒害艾美耳球虫和柔嫩艾美耳球虫的纯化。将混合球虫卵囊孢子化后, 以 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清。沉淀用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 3 次, 每次离心条件同上, 弃上清。洗涤后的沉淀以 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 重悬, 计数后按 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个孢子化卵囊/只的剂量, 经口感染约 2 周龄无球虫感染的健康鸡。感染后第 5 天剖杀鸡只: 毒害艾美耳球虫取空肠中段; 柔嫩艾美耳球虫取盲肠。用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 冲净肠内容物, 剪开肠壁, 用无菌玻片刮取肠黏膜浅层。将刮取物加入含 1.5% 胰蛋白酶的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 于 37 °C 水浴消化 1 h。消化液经 0.42 mm 金属筛网过滤, 滤液以 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀再用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 3 次, 最终以 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 重悬, 得到裂殖子悬液。将裂殖子悬液经肛门注入约两周龄无球虫感染的健康鸡。感染后 2~3 天剖杀鸡只, 从盲肠内容物中分离卵囊, 分离参照 1.2 方法, 并以 2.5% 重铬酸钾溶液进行孢子化, 完成孢子化后, 孢子化卵囊样品置于 4 °C 冷藏保存, 保存时间应不超过 6 个月。

1.4.2 单卵囊分离法

1.4.2.1 稀释法

用干净滴管吸取孢子化卵囊悬液, 在载玻片上滴加一小滴悬液, 再加一滴生理盐水稀释。在 10×40 倍显微镜下观察, 调整至每个视野仅含 1~2 个孢子化卵囊。在显微镜下, 用右手操作玻璃毛细吸管, 吸取单个孢子化卵囊。将吸管内液体滴加于铺有薄层琼脂的载玻片上, 显微镜下确认仅含 1 个孢子化卵囊后, 将该琼脂块经口感染 1 日龄雏鸡。雏鸡隔离饲养, 于感染后第 5 天起每日检查粪便, 观察卵囊排出情况并收集粪便卵囊, 分离参照 1.2 方法, 并以 2.5% 重铬酸钾溶液进行孢子化, 完成孢子化后, 孢子化卵囊样品置于 4 °C 冷藏保存, 保存时间应不超过 6 个月。

1.4.2.2 显微操作分离法

借助显微操作仪, 在显微镜视野下直接吸取所需的单个孢子化卵囊。将单个孢子化卵囊经口感染 1 日龄雏鸡, 雏鸡隔离饲养。感染后第 5 天起每日检查粪便, 观察卵囊排出情况并收集粪便卵囊, 分离卵囊参照 1.2 方法, 并以 2.5% 重铬酸钾溶液进行孢子化, 完成孢子化后, 孢子化卵囊样

品置于 4℃ 冷藏保存，保存时间应不超过 6 个月。

1.5 卵囊增殖

采用血球计数板对分离卵囊进行计数。当卵囊数量满足后续动物试验要求时，无需扩增。当卵囊数量不足时，可取 1×10^4 个孢子化卵囊经口感染 2~4 周龄、无球虫感染的健康鸡。感染后 5~7 天收集粪便样品，按 1.2 步骤分离卵囊，完成孢子化后，孢子化卵囊样品置于 4℃ 冷藏保存，保存时间应不超过 6 个月。

2 耐药性检测

2.1 试剂与材料

2.1.1 实验动物

2 周龄左右的无球虫感染健康鸡。

2.1.2 试剂

饱和氯化钠溶液，配制用水符合 GB/T 6682—2008 三级水要求。

2.1.3 材料

粪便收集桶、玻璃棒、吸管、量筒、烧杯杯、血球计数板、麦克马斯特计数板、微量移液器及配套吸头等。

2.1.4 仪器

显微镜。

2.2 试验分组

选取约 2 周龄、无球虫感染的健康鸡，随机分为药物组（感染给药组）、阳性对照组（感染不给药对照组）和阴性对照组（不感染不给药对照组），每组设 2 个重复，每个重复 10 只鸡。

2.3 给药

分组当天开始，按各推荐抗球虫药物的推荐剂量和给药途径进行给药，直至试验结束。

2.4 待测鸡球虫卵囊接种

给药后第 2 天，各药物组及阳性对照组鸡只经口接种待测卵囊，剂量为 $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ 个孢子化卵囊/只。

2.5 观察

经口感染后第 7 天结束试验，试验期间持续观察鸡只的精神状态、粪便变化及病死情况，并监测饲料消耗量和体重增重情况。在感染后第 5~7 天收集各组鸡只的粪便样品。

2.6 卵囊计数

收集各试验组鸡只的粪便于收集桶中，称取粪便重量 A (g)，搅拌均匀后，每份粪样取 3 个重复样。每个重复样的克粪便卵囊数 (OPG，记为 B) 按 GB/T 18647—2020 的方法进行。卵囊产量按式 (1) 计算，并取 3 个重复的平均值。

$$\text{卵囊产量} = A \times B \dots\dots\dots (式1)$$

2.7 病变记分

接种后第 7 天剖检肠道，观察小肠、盲肠及直肠病变，并根据附录 D 进行病变记分。

2.8 ACI 计算与结果判定

2.8.1 ACI 计算

抗球虫指数 (ACI) 综合考察存活率、相对增重率、病变值和卵囊值等多项参数，按式 (2) 进行计算。各参数计算方法：存活率按式 (3) 计算；相对增重率按式 (4) 计算；病变值 (0~40) 按式 (4) 计算。卵囊值 (0~40) 根据试验组卵囊产量占感染不给药对照组卵囊产量的比例换算，方法见表 1。

$$ACI = (\text{存活率} + \text{相对增重率}) - (\text{病变值} + \text{卵囊值}) \dots\dots\dots (式 2)$$

$$\text{存活率} = (\text{试验结束存活鸡只数} \div \text{试验开始鸡只数}) \times 100\% \dots\dots\dots (式 3)$$

相对增重率 = (试验组平均增重 ÷ 不感染不给药对照组平均增重) × 100%.....(式 4)

病变值 = 各试验组平均病变记分 (0~4) × 10.....(式 5)

表1 鸡球虫卵囊值换算表

卵囊产量比例 (%)	卵囊值
< 1	0
10~25	1
26~50	10
51~75	20
76~100	40

2.8.2 ACI 判定标准

ACI 的判定标准: ACI ≥ 180, 敏感, 记为一; 160 ≤ ACI ≤ 179, 部分耐药, 记为+; ACI < 160, 完全耐药, 记为+。

2.9 POAA 计算与结果判定

2.9.1 POAA 计算

最适抗球虫活性百分率 (POAA) 反映药物对增重的综合影响, 按式 (6) 进行计算。参数 GSR 按式 (7) 计算。

$$POAA = (感染用药组 GSR - 感染不用药对照组 GSR) \div (不感染不用药对照组 GSR - 感染不用药对照组 GSR).....(式 6)$$

$$GSR = 试验结束试验组平均体重 \div 试验开始试验组平均体重.....(式 7)$$

2.9.2 POAA 判定标准

POAA 的判定标准: POAA > 50%, 敏感, 记为一; POAA ≤ 50%, 耐药, 记为+。

2.10 RLS 计算与结果判定

2.10.1 RLS 计算

病变记分减少率 (RLS) 考察药物对肠道病变的影响, 按式 (8) 进行计算。

$$RLS = (感染不用药对照组平均病变记分 - 感染用药组平均病变记分) \div 感染不用药对照组平均病变记分.....(式 8)$$

2.10.2 RLS 判定标准

RLS 的判定标准: RLS ≥ 50%, 敏感, 记为一; RLS < 50%, 耐药, 记为+。

2.11 ROP 计算与结果判定

2.11.1 ROP 计算

相对卵囊产量 (ROP) 反映药物对卵囊排出的抑制作用, 按式 (9) 进行计算。

$$ROP = 感染用药组卵囊产量 \div 感染不用药对照组卵囊数量 \times 100%.....(式 9)$$

2.11.2 ROP 判定标准

ROP 的判定标准: ROP < 15%, 敏感, 记为一; ROP ≥ 15%, 耐药, 记为+。

2.12 耐药性判定标准

综合 ACI、POAA、RLS、ROP 四项指标的结果判定药物耐药性, 标准见表 2。

表2 鸡球虫耐药性判定标准

判定结果	四项指标测定结果	说明
敏感	— — — —	四项指标均为敏感

轻度耐药	— — — +	四项指标中有1项为耐药
中度耐药	— — + +	四项指标中有2项为耐药
严重耐药	+ + + / + + + +	四项指标中有3项或4项为耐药

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

(一) 技术经济分析论证

鸡球虫病是影响我国养鸡业生产效益和食品安全的重要寄生虫病之一，常年发病率高、经济损失大。长期依赖化学抗球虫药物进行防控，导致耐药株快速扩散，药效下降，严重影响养殖效益和防控效果。本标准在编制过程中，充分参考了国内外鸡球虫耐药性研究成果与现行检测技术规范，结合我国养禽业生产特点与实验室检测条件，经过多轮试验验证与专家论证，所提出的检测流程、技术参数及判定方法科学、合理、可操作性强。标准在技术路径上采用成熟可靠的实验方法，能够在现有实验设备条件下直接应用，无需高额投入即可开展常规检测，具备良好的技术普及与推广基础。其次，本标准的实施不依赖昂贵仪器设备，主要使用现有的显微检测、定量分析等常规实验室设施，配套试剂和材料可在国内稳定供应，检测成本低、重复性好。通过标准化操作规程，可显著提高检测效率、降低误差与重复试验成本，从而提升整体经济效益。对于各级动物疫病预防控制中心、科研机构及大型养殖企业而言，执行本标准的经济投入较小、见效快、可持续性强。目前我国多地已建立禽病防控和药物耐药监测体系，具备一定的实验检测能力。随着本标准的发布与实施，可直接纳入现有监测网络，应用于抗球虫药物耐药监测、药效评价及生产指导。标准推广后可实现检测数据的统一与共享，形成全国性监测数据库，为行业政策和技术决策提供数据支撑。

(二) 预期的经济效益

通过统一的采样技术标准，可显著提高不同监测机构间数据的可比性与一致性，为建立国家级鸡球虫耐药性监测数据库提供技术支撑，减少重复采样与无效检测，降低监测成本。标准化的耐药性监测数据有助于科学评估药物敏感性变化趋势，指导饲料企业、养殖场选择高效药物与合理用药方案，从源头上减少抗球虫药物的滥用，降低耐药风险和药残隐患。通过科学监测和精准防控，可有效减少鸡球虫病的发生率和死亡率。据估算，标准实施后，在规模化养殖场应用可使球虫病造成的经济损失降低约 20%~30%，提高饲料转化率和产蛋率，带来显著经济收益。标准的实施将推动我国鸡球虫病防控体系由经验防治向科学防控转变，提升畜禽寄生虫病监测与防控的整体水平，为畜禽产品质量安全、畜牧业绿色发展及兽药监管提供重要技术支撑。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

目前，国内外虽已发布部分与鸡球虫病相关的技术标准，但尚缺乏专门针对鸡球虫耐药性检测的技术规范。世界动物卫生组织（WOAH）发布的《陆生动物诊断与疫苗手册》中，尚未单独制定鸡球虫耐药性检测方法；国家标准 GB/T 18647—2020《动物球虫病诊断技术》亦未涵盖动物球虫的耐药性检测内容。本标准针对上述空白，系统规范了鸡球虫耐药性检测的关键技术环节，包括：鸡球虫卵囊制备、虫种鉴定与纯化、耐药性检测与判定标准等内容。本标准的制定，不仅补充和完善了我国在鸡球虫耐药性检测领域的技术规范体系，为临床制定精准用药方案提供了科学依据，同时也为抗球虫药物的合理使用与耐药性监测提供了关键技术支撑，对提升我国家禽养殖业防控水平与科学用药管理具有重要意义。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

本标准与现行的法律、行政法规、部门规章、国家和行业标准总体一致，并在现有规范的基础上补充和细化了针对鸡球虫耐药性检测的专门技术要求，弥补了现行标准在耐药性检测技术方面的空白，且不与上位法律法规相抵触。

七、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可通过相关部门组织的政策引导、技术培训、示范带动等多种措施，推动标准在监测机构、科研院所、兽医实验室及规模化养殖场中的全面落实，促进鸡球虫病防控工作的科学化、标准化和精准化。

八、其它应予说明的事项

无。