

团 体 标 准

T/GDAAV 0214-2025

# 鸡球虫耐药性检测方法

Detection of Anticoccidial Drug Resistance in Chicken Coccidia

# (公开征求意见稿)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

# 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分:标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省农业科学院动物卫生研究所、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

本文件起草单位:广东省农业科学院动物卫生研究所、中农华威制药股份有限公司。

本文件主要起草人: 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、张健騑、何钦义、曾徐浩。

# 鸡球虫耐药性检测技术

# 1 范围

本文件规定了鸡球虫耐药性检测的技术要求。本文件适用于抗鸡球虫药物耐药性的动物试验检测。

# 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本使用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法. GB/T 18647—2020 动物球虫病诊断技术

# 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

# 4 符号与缩略词

下列符号和缩略词适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

ddH<sub>2</sub>O: 双蒸水 (Distillation-distillation H<sub>2</sub>O)

r/min: 离心机每分钟的转数 (Revolution per minute)

ppm: 百万分比浓度 (Parts per million)

ACI: 抗球虫指数 (Anticoccidial index)

POAA: 最适抗球虫活性百分率 (Percentage optimum anticoccidial activity)

RLS: 病变记分减少率 (Reduced lesion score)

ROP: 相对卵囊产量 (Relative oocyst production)

GI: 综合指数 (Global index)

OPG: 克粪便卵囊数 (Oocyst count per gram)

# 5 待检鸡球虫卵囊的制备

# 5.1 试剂与材料

# 5.1.1 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)。

# 5.1.2 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。

#### 5.1.3 实验动物

1日龄雏鸡、2~4周龄无球虫感染健康鸡。

# 5.1.4 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。

# 5.2 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3000r/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5min,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℃、150r/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。

# 5.3 虫种鉴定

#### 5.3.1 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  $ddH_2O$ 。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  $\mu$  L,包括:上、下游引物(10 mmo1/L)各1  $\mu$  L,2×Taq MasterMix 10  $\mu$  L,待检样品DNA 2  $\mu$  L, $ddH_2O$  6  $\mu$  L。PCR反应条件为:95°C预变性10min;95°C变性30s;56°C退火30s;72°C延伸30s;435个循环;72°C延伸10min。反应结束后,取PCR产物5  $\mu$  L,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。检测结果判定方法见附录C。

#### 5.3.2 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,结果判定方法按附录C。

#### 5.3.3 动物接种

采用血球计数板对分离卵囊进行计数,取1×10<sup>4</sup>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,根据典型病变进行虫种鉴定,结果判定方法见附录C。

# 5.4 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。

# 5.4.1 裂殖子感染法

## T/GDAAV 0214—2025

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5×10⁴~1×10⁵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 ℃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5.2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。

# 5.4.2 单卵囊分离法

#### 5.4.2.1 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5.2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。

# 5.4.2.2 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5.2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。

#### 5.5 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<sup>4</sup>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5.2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。

#### 6 耐药性检测

#### 6.1 试剂与材料

# 6.1.1 实验动物

2周龄左右的无球虫感染健康鸡。

# 6.1.2 试剂

饱和氯化钠溶液、抗球虫药物见附录A,配制用水符合GB/T 6682-2008三级水要求。

# 6.1.3 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。

# 6.1.3 仪器

显微镜。

#### 6.2 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。

#### 6.3 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。

# 6.4 待测样品卵囊接种

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5×103~1.5×105个孢子化卵囊/只。

# 6.5 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。

# 6.6 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/T18647—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。

卵囊产量 = 
$$A \times B$$
 ......(式1)

#### 6.7 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。

# 6.8 ACI 计算与判定

# 6.8.1 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 = (存活率 + 相对增重率) - (病变值 + 卵囊值).
 (式 2)

 存活率 = (试验结束存活鸡只数 ÷ 试验开始鸡只数) × 100%.
 (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

# 6.8.2 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+。

# 6.9 POAA 计算与判定

# 6.9.1 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) ÷ (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÷试验开始试验组平均体重....(式7)

# 6.9.2 POAA 判定标准

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

# 6.10 RLS 计算与判定

# 6.10.1 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)÷ 感染不用药对照组平均病变记分.....(式 8)

# 6.10.2 RLS 判定标准

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

# 6.11 ROP 计算与判定

# 6.11.1 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÷感染不用药对照组卵囊数量×100%.....(式9)

# 6.11.2 ROP 判定标准

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

# 6.12 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

# 附 录 A (规范性) 试剂及其配制

# A. 1 2.5%重铬酸钾溶液

称取25.00g重铬酸钾  $(K_2Cr_2O_7)$ ,置于1000mL1烧杯中,加入约800mL蒸馏水,搅拌使其完全溶解。转移溶液至1000mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,混匀,即为2.5%重铬酸钾溶液。

# A. 2 饱和氯化钠溶液

称取过量(500g)氯化钠(NaC1)固体,置于2000mL 烧杯中,加入1000 mL蒸馏水1,在恒温条件下(25℃)搅拌1使其充分溶解。当溶液中有少量固体NaC1不再溶解时,说明溶液已达饱和。静置使未溶解的固体沉淀。将上层清澈的饱和溶液取出或过滤,置于密闭瓶,即为饱和氯化钠溶液。

# A. 3 PBS缓冲液 (pH 7.4)

精密称取NaCl 8.00g、KCl 0.20g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g,置于1000mL烧杯中,加约800 mL蒸馏水溶解。于25℃下测定并调节pH至7.40,用蒸馏水定容至1000mL,混匀。经0.22  $\mu$  m滤膜过滤灭菌,贮于4℃。

# A. 4 1.5% 胰蛋白酶溶液 (pH 7.4)

精密称取胰蛋白酶1.50g,置于烧杯中,加入约80 mL的PBS缓冲液(pH7.4),搅拌溶解。调节pH至7.40,用PBS缓冲液(pH7.4)定容至100.0mL,混匀。经0.22  $\mu$  m滤膜除菌过滤,无菌分装,于 – 20  $\mathbb C$  保存。

# A. 5 常见抗球虫药物

# A. 5.1 用法用量

表A1 常见抗球虫药物的用法用量

抗球虫药物名称	分子式	使用剂量(ppm)	给药方式
磺胺氯吡嗪钠	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	300/600	饮水/拌料
尼卡巴嗪	$C_{19}H_{18}N_6O_6$	125	拌料
地克珠利	$C_{17}H_9Cl_3N_4O_2$	1	饮水
妥曲珠利	$C_{18}H_{14}F_3N_3O_4S\\$	25	饮水
沙咪珠利	$C_{18}H_{16}N_4O_4$	10	饮水
癸氧喹酯	$C_{24}H_{35}NO_5$	15~30	饮水
二硝托胺	$C_8H_7N_3O_5$	50~125	拌料
氯羟吡啶	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> NO	125~250	拌料

盐酸氯苯胍	$C_{15}H_{14}C_{13}N_5$	30~60	拌料
马杜霉素	$C_{47}H_{80}O_{17}.H_3N$	5	拌料
盐霉素	$C_{42}H_{70}O_{11}$	50~70	拌料
甲基盐霉素	$C_{43}H_{72}O_{11}$	60~80	拌料
氨丙啉	$C_{14}H_{20}C_{12}N_4$	125~250	拌料
莫能菌素	$C_{36}H_{62}O_{11}$	100~120	拌料
拉沙洛西钠	$C_{34}H_{53}NaO_8$	75~125	拌料
常山酮	$C_{16}H_{17}BrClN_3O_3\\$	3	拌料

# A. 5. 2 制法

按A1中药物的用法用量进行配制。

# 附 录 B (资料性) 鸡球虫虫种鉴定 PCR 方法

# B. 1 鸡球虫虫种鉴定的PCR引物和扩增产物片段大小见表B1。

表B1 鸡球虫虫种鉴定的PCR引物和扩增产物片段大小

鸡球虫虫种	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
로바 꾸 건 자 나	ETF	AATTTAGTCCATCGCAACCCT	071
柔嫩艾美耳球虫	ETR	CGAGCGCTCTGCATACGACA	271
毒害艾美耳球虫	ENF	TACATCCCAATCTTTGAATCG	285
母古义天斗坏虫	ENR	GGCATACTAGCTTCGAGCAAC	283
巨型艾美耳球虫	EMaF	GTGGGACTGTGGTGATGGGG	205
已至义天斗坏虫	EMaR	ACCAGCATGCGCTCACAACCC	203
堆型艾美耳球虫	EAF	GGCTTGGATGATGTTTGCTG	321
<b>地</b> 空义天 <b>斗</b>	EAR	CGAACGCAATAACACACGCT	321
早熟艾美耳球虫	EPF	CATCATCGGAATGGCTTTTTGA	368
	EPR	AATAAATAGCGCAAAATTAAGCA	300
和缓艾美耳球虫	EMiF	TATTTCCTGTCGTCGTCTCGC	306
	EMiF	GTATGCAAGAGAGAATCGGGA	300
<b>右氏</b> 世羊耳球山	EBF	GATCAGTTTGAGCAAACCTTCG	310
布氏艾美耳球虫	EBR	TGGTCTTCCGTACGTCGGAT	310

# 附 录 C (资料性) 鸡球虫卵囊形态与病理变化

# C. 1 鸡球虫的卵囊形态与病理变化见表C1。

表C1 鸡球虫卵囊形态与病理变化

鸡球虫虫种	卵囊形态	病理变化
柔嫩艾美耳球虫	19.5~26 μm×16.5~22.8 μm	盲肠显著肿胀(可肿大数倍),肠壁增厚、 出血;盲肠内充满血液或血凝块,后期形成 干酪样坏死物。
毒害艾美耳球虫	13.2~22.7 μm×11.3~18.3 μm	小肠中段肠壁增厚、苍白,浆膜面可见白色 斑点或红色出血点;肠腔内有血性内容物, 黏膜面呈"血肿样"病变。
堆型艾美耳球虫	17.7~20.2 μm×13.7~16.3 μm	十二指肠肠壁变薄,黏膜面出现白色横向条纹(呈梯状排列);肠道内容物稀薄,呈灰白色或水样。
巨型艾美耳球虫	21.5~42.5 μm×16.5~29.8 μm	小肠中段肠管扩张,肠壁增厚、充血,黏膜表面可见针尖状出血点;肠内容物呈橙色黏液或血性分泌物。
布氏艾美耳球虫	20.7~30.3 μm×18.1~24.2 μm	小肠后段至直肠肠壁黏膜严重出血、溃疡, 覆盖黄白色坏死物;肠道内容物含黏液和血 液,后期肠壁增厚、僵硬。
和缓艾美耳球虫	11.7~18.7 μm×11~18μm	小肠后段肠壁轻度充血,黏膜水肿;肠内容 物稀薄,偶见少量出血点。
早熟艾美耳球虫	19.8~24.7 μm×15.7~19.8 μm	十二指肠肠壁轻度增厚,黏膜表面有黏液性 渗出物;肠内容物水样,无明显出血或坏 死。

# 附 录 D (资料性)

# 鸡球虫感染的肠道病变记分

D. 1 鸡球虫纯种卵囊感染的肠道病变记分见表D1;混合卵囊感染的肠道病变见表D2。

表D1 鸡球虫纯种卵囊感染的肠道病变记分

鸡球虫虫种	病变分值	病理变化
	0 分	无肉眼可见病变。
	+1 分	盲肠壁有很多散在的淤点,肠壁不增厚,内容物正常。
柔嫩艾美耳	+2 分	病变数量较多,盲肠内容物明显带血,盲肠壁稍增厚,内容物正常。
球虫	+3 分	盲肠内有多量血液或有盲肠芯,盲肠壁肥厚明显,盲肠中粪便含量少。
	+4 分	因充满大量血液或肠芯而盲肠肿大,肠芯中含有粪渣或不含,因柔嫩艾美耳球虫感染死亡鸡只也记+4分。
	0 分	无肉眼可见病变。
	+1 分	从小肠中段浆膜面看有散在的针尖状出血点或白色斑点,黏膜损伤不明显。
	+2 分	从小肠中段浆膜面看有多量的出血点,也可见中段肠管稍充气。
毒害艾美耳 球虫	+3 分	小肠肠腔有大量出血,浆膜面见有红色或白色斑点;黏膜面粗糙、增厚,有许多针尖状出血点;肠内容物含量少;充气达小肠后段,小肠粗度明显加大但长度明显缩小。
	+4 分	小肠因严重出血而呈暗红色、褐色,大部分肠管气胀明显,黏膜增厚加剧,肠腔内充满血液和黏膜组织的碎片;从浆膜面看,在感染部位组织见到白色或红色病灶,在死亡鸡只病灶为白色和黑色,呈"白盐与黑胡椒"外观;也可见寄生虫性肉芽肿,肠管增粗一倍,长短缩短一倍。因毒害艾美耳球虫感染死亡鸡只也记+4分。
	0 分	无肉眼可见病变。
	+1 分	仔细观察时疑有病变。
布氏艾美耳球虫	+2 分	小肠后段增厚,肠壁呈灰色,可剥离下橙红色物质。
	+3 分	小肠壁增厚,有带血的卡他性渗出物,直肠段有横向的红色条纹,病变发生 在盲肠扁桃体时,有软的粘液栓。
	+4 分	小肠后段可出现广泛的凝固性坏死;病变可扩展到小肠中段或前段;部分鸡 小肠黏膜面的干性坏死膜可能使小肠出现皱痕及干酪样盲肠芯;因布氏艾美

# 耳球虫感染死亡鸡只也记+4 分。

	0 分	无肉眼可见病变。
巨型艾美耳	+1 分	小肠中段浆膜面隐约可见出血点,肠腔内有少量桔黄色粘液,肠壁增厚。
	+2 分	小肠中段浆膜面有多量出血点,肠腔内有多量桔黄色粘液,肠壁增厚。
球虫	+3 分	小肠充气,肠壁增厚,黏膜面粗糙,小肠内容物含有小血凝块和粘液。
	+4 分	小肠充气明显,肠壁高度增厚,肠内容物含有大量血凝块和红褐色血液;因 巨型艾美耳球虫感染死亡鸡只也记+4分。
-	0 分	无肉眼可见病变。
	+1 分	十二指肠浆膜面有散在白色斑点。
堆型艾美耳 球虫	+2 分	白色斑点增多但不融合,形成白色梯形条纹状外观,3周龄以上鸡,病变可扩展到十二指肠下段20cm,肠壁不增厚,内容物正常。
	+3 分	白色病灶增多且融合成片,小肠壁增厚;内容物呈水样,病变蔓延到卵黄囊 憩室之后。
	+4 分	被感染的肠绒毛缩短融合,是十二指肠和小肠黏膜呈灰白色,肠壁高度肥厚,肠内容物呈奶油状;因堆型艾美耳球虫感染死亡鸡只也记+4分。

表D2 鸡球虫混合卵囊感染的肠道病变记分

鸡球虫虫种	病变分值	病理变化
	0 分	无肉眼可见病变。
	+1 分	有少量散在病变。
混合卵囊	+2 分	有较多稀疏的病变,如多处肠区被感染和由柔嫩艾美耳球虫感染引起 的盲肠出血。
	+3 分	有融合性大面积病变,一些肠壁增厚。
	+4 分	病变广泛融合,肠壁增厚。柔嫩艾美耳球虫感染,可见大型肠芯,巨型艾美耳球虫感染,可见肠内容物带血。