

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.017

## 圈养长颈鹿线虫抗药性的初步检测

邓家波<sup>1,2#</sup>, 严慧娟<sup>1,2,3#</sup>, 杨光友<sup>3\*</sup>, 牛李丽<sup>1,2</sup>, 王强<sup>1,2</sup>, 余建秋<sup>1,2</sup>, 余星明<sup>1,2</sup>, 王帅<sup>3</sup>, 陈维刚<sup>1,2</sup>

(1. 成都动物园, 成都 610081; 2. 成都野生动物研究所, 成都 610081; 3. 四川农业大学动物医学院, 四川雅安 625014)

**摘要:**用体外虫卵孵化试验对成都动物园长颈鹿的消化道线虫抗药性进行了检测。检测药物包括丙硫咪唑、左旋咪唑和芬苯达唑 3 种药物, 测得其虫卵孵化半数抑制量 ED<sub>50</sub> 分别为 0.1303 μg/mL、0.3244 μg/mL、0.1488 μg/mL。测定结果表明长颈鹿消化道线虫对上述 3 种药物均有不同程度的抗药性。

**关键词:**虫卵孵化试验; 抗药性; 长颈鹿; 消化道线虫

**中图分类号:** Q959.8; Q959.17; S859.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)02-0258-03

## Detection on Anthelmintic Resistance for Nematodes in Alimentary Canal of Captive Giraffes

DENG Jia-bo<sup>1,2#</sup>, YAN Hui-juan<sup>1,2,3#</sup>, YANG Guang-you<sup>3\*</sup>, NIU Li-li<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1,2</sup>, YU Jian-qiu<sup>1,2</sup>,  
YU Xing-ming<sup>1,2</sup>, WANG Shuai<sup>3</sup>, CHEN Wei-gang<sup>1,2</sup>

(1. Chengdu Zoo, Chengdu 610081, China; 2. Chengdu Institute of Wildlife, Chengdu 610081, China; 3. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan Province 625014, China)

**Abstract:** The Eggs Hatch Test (EHT) was used to detect anthelmintic resistance for nematodes in the digestive canal of giraffes. The results showed that ED<sub>50</sub> of albendazole, levamisole and fenbendazole were 0.1303 μg/mL, 0.3244 μg/mL and 0.1488 μg/mL, respectively. The anthelmintic resistance of nematodes in the digestive canal of giraffes is different for albendazole, levamisole and fenbendazole.

**Key words:** EHT; anthelmintic resistance; nematode; giraffe; albendazole; levamisole; fenbendazole

20 世纪 50 年代发现家畜寄生线虫具有抗药性, 致使药物的驱虫效果大为降低, 并且线虫抗药性能遗传给后代(姜波等, 2007), 这给畜牧业带来很大的经济损失。线虫病是引起圈养野生动物消瘦、营养不良甚至死亡的病因之一。圈养野生动物饲养周期长, 长期使用驱虫药物, 可导致其消化道寄生虫产生抗药性。成都动物园在开展圈养野生动物寄生虫普查中发现, 虽然每年定期实施驱虫措施, 但长颈鹿体内寄生虫感染状况仍较严重。为此, 2008 年我们采用体外虫卵孵化试验(Egg Hatch Test, EHT)检测了成都动物园长颈鹿消化道线虫对咪唑并噻唑类(Imidazothiazoles) 3 种常用驱虫药物(丙硫咪唑、左旋咪唑和芬苯达唑)的抗药性, 并用丙硫咪唑对长颈鹿进行了临床的驱虫试验, 以期制定长颈鹿寄生虫防治技术措施提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

两只非洲长颈鹿为成都动物园圈养。雄鹿 15 岁, 体重 1500 kg, 雌鹿约 10 岁, 体重 1200 kg。采集其粪样用循序沉淀法和饱和盐水漂浮法进行寄生虫卵检测。这两头长颈鹿粪样中线虫虫卵感染率较高, 雄性单位粪量虫卵数为 EPG = 1890, 雌性为 EPG = 2340, 根据虫卵形态鉴定为毛圆线虫 *Trichostrongylus* sp. (朱朝君, 赵观禄, 1998, 1999)。

### 1.2 试验药物

丙硫咪唑(Albendazole)由常州亚邦兽药有限公司生产, 批号 20061211; 芬苯达唑(Fenbendazole)由浙江嘉善嘉生药业有限公司生产, 批号 20061206; 左旋咪唑(Levamisole)由桂林南药股份有限公司生产, 批号 20061108。每种药物初设 10 个浓度梯度, 根据每种药物不同浓度的致死率进行筛选与调整, 最终确定丙硫咪唑设置 5 个浓度梯度(0.354、0.25、0.177、0.125 和 0.0885), 芬苯达唑设置 7 个浓度梯度(0.707、0.5、0.354、0.25、0.177、0.125 和 0.0885), 左旋咪唑设置 6 个浓度梯度(1.0、0.707、

收稿日期: 2010-05-05 接受日期: 2010-07-11 基金项目: 成都市大熊猫繁育研究基金(项目编号: 06-06)

作者简介: 邓家波(1974~), 男, 硕士, 兽医师, 主要从事野生动物疾病防治及相关研究工作 #为同等贡献第一作者

\* 通讯作者 Corresponding author, 博士, 教授, 从事动物寄生虫病学研究, E-mail: guangyou1963@yahoo.com.cn

0.5、0.354、0.25 和 0.177), 单位均为  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 试验方法

依据世界兽医寄生虫促进协会(WAAVP)对蠕虫抗药性检测方法,采用体外虫卵孵化试验进行检测(Coles *et al.*, 1996;王权,沈杰,1997)。

1.3.1 粪样采集 采集长颈鹿新鲜粪便,过滤处理,取滤液置于带盖瓶中,加满自来水盖紧,使其处于无氧状态,然后送检。

1.3.2 虫卵收集 采用循序沉淀法处理滤液,收集最终沉淀物,沉淀物离心(2000 r/min,4 min)后,弃上清液,再加入饱和食盐水进行漂浮(漂浮 0.5~1 h),收集液面表层漂浮物,用水稀释收集物,离心(1000 r/min,4 min),弃上层液体,收集底层液体即为虫卵悬浮液。调整虫卵悬浮液浓度为 100 个/mL 左右。

1.3.3 虫卵孵化试验 24 孔培养板于紫外灯下照射 24 h 消毒,备用。自行配置的 Egerl's 液(培养平衡液),每孔添加试验药物后使其总量为 200  $\mu\text{L}$  并达到相应的药物浓度,每种药物设置相应浓度梯度。对照孔添加相应的药物溶剂(丙酮或 DMSO)。每孔加入 1 mL 虫卵悬浮液(约 100 个虫卵),27 $^{\circ}\text{C}$  培养

48 h 后,每孔加 2 滴 Lugol 氏碘溶液,终止虫卵孵化。

1.3.4 观察和统计方法 每孔在显微镜下最少计数 10 个残存虫卵(死卵和胚卵)和已孵出的幼虫。用对数概率分析法进行虫卵  $\text{ED}_{50}$  值的计算。

1.4 药物驱虫试验 选用丙硫咪唑按 8 mg/kg,对长颈鹿投喂一次,在投药前和投药 10 d 后分别采集粪样,采用麦氏虫卵计算数法(McMaster's Method)测定粪便的克粪虫卵数(EPG)。

2 试验结果

2.1 抗药性—— $\text{ED}_{50}$

在长颈鹿消化道线虫对丙硫咪唑、左旋咪唑和芬苯达唑抗药性虫卵孵化试验中,分别选取了 5 个、6 个以及 7 个药物浓度组,其虫卵抑制率丙硫咪唑为 96%、89%、75%、50%、27%,左旋咪唑为 91%、84%、73%、55%、39%、27%,芬苯达唑为 98%、94%、85%、77%、62%、39%、26%。用对数概率分析法处理后,3 种药物的  $\text{ED}_{50}$  值分别为:丙硫咪唑 0.1303  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,左旋咪唑 0.3244  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,芬苯达唑 0.1488  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表)。

表 长颈鹿消化道线虫对丙硫咪唑、左旋咪唑和芬苯达唑抗药性虫卵孵化试验  
Table EHT on nematodes of giraffe for Albendazole, Levamisole and Fenbendazole

	虫卵孵化抑制率(%) Rate of restrained eggs		
	丙硫咪唑 Albendazole	左旋咪唑 Levamisole	芬苯达唑 Fenbendazole
1.000	—	91.00	—
0.707	—	84.00	98.00
0.500	—	73.00	94.00
0.354	96.00	55.00	85.00
药物浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	0.250	39.00	77.00
	0.177	27.00	62.00
	0.125	50.00	39.00
	0.0885	—	26.00
空白对照 Untreated	7.00	4.00	3.00
对数概率 $\text{ED}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$y = 0.3777x + 1.6104$ 0.1303	$y = 0.2879x + 0.9675$ 0.3244	$y = 0.2497x + 1.1864$ 0.1488

2.2 驱虫效果

两只长颈鹿在投药前的克粪虫卵数分别为  $\text{EPG} = 1890$ 、 $\text{EPG} = 2340$ ,用丙硫咪唑按 8 mg/kg 剂量,投喂一次,投药 10 d 后采集粪样检查,两只长颈鹿粪样中虫卵全部转为阴性。

3 分析与讨论

3.1 体外虫卵孵化试验是利用苯并咪唑类药物具

有抑制线虫卵孵化的特点,在线虫孵化培养基中加入一定量的苯并咪唑类药物,如能抑制虫卵孵化则说明虫卵对该药敏感,反之则是虫卵对该药物产生了抗药性。该法操作方便、敏感、快速、结果客观,可用于检测虫株抗药性的发生和抗药性的动态变化规律分析,可为预防寄生虫抗药性提供有效依据(Coles *et al.*, 1996;顾越星等,1999)。

根据 WAAVP 推荐方法采用的是噻苯咪唑

(Thiabendazole), 由于国内使用该药较少, 根据以往我国一些作者所做的虫卵孵化试验结果, 认为丙硫咪唑等药物作为虫卵孵化抑制剂可达到相同效果(顾越星等, 1999; 何国声等, 1999; 赵月兰等, 2004; 蔡葵蒸等, 2007)。因此, 我们在本试验中采用了丙硫咪唑、左旋咪唑和芬苯达唑作为虫卵孵化的抑制剂, 并且取得了较为理想的效果。

**3.2** 由虫卵孵化试验结果可以看出, 丙硫咪唑、左旋咪唑及芬苯达唑 3 种药物对长颈鹿消化道线虫虫卵的  $ED_{50}$  值分别为  $0.1303 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.3244 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1488 \mu\text{g/mL}$ 。蔡葵蒸等(2007)提出鉴于我国家畜线虫的抗药性与国外相比不是十分严重, 与 WAAVP 提出的线虫抗药性临界值 ( $0.1 \mu\text{g/mL}$ ) (Coles *et al.*, 1996) 相比, 当受检虫卵的  $ED_{50}$  达到  $0.08 \mu\text{g/mL}$  (ALB 或 TBZ) 以上时应判为该蠕虫对苯并咪唑类药物有抗药性。据此我们的检测结果可初步判定成都动物园长颈鹿感染的毛圆线虫对本试验中的 3 种药物都不敏感, 其中以左旋咪唑较为严重, 可能产生了抗药性。

**3.3** 成都动物园自 20 世纪 90 年代以来, 主要采用丙硫咪唑作为长颈鹿的驱虫药物, 每年定期驱虫两次。丙硫咪唑与芬苯达唑同属苯并咪唑类药物, 在动物园被长期使用, 使得长颈鹿体内毛圆线虫对这类药物产生一定的抗药性。

虫卵孵化试验结果显示长颈鹿毛圆线虫对左旋咪唑的抗药性比其他两种药物更强, 究其原因可能是成都动物园的长颈鹿是在 20 世纪 90 年代初从其他动物园引入, 在引入前由于当地使用的是左旋咪唑类驱虫药物, 而在动物园的圈养环境中线虫多是反复循环感染, 导致该类线虫已经对左旋咪唑产生了抗药性。虽然, 成都动物园已多年未使用左旋咪唑进行草食动物线虫病的防治, 但在本次实验中仍然检测出线虫对该药具有较强的抗药性, 这可能与线虫抗药性能遗传给后代有关。

**3.4** 在药物驱虫试验中, 两只长颈鹿按丙硫咪唑 ( $8 \text{ mg/kg}$ ) 投喂 1 次后, 投药后 10 d 粪样中虫卵全部转为阴性, 这与体外虫卵孵化试验的结果有一定的差异, 其原因可能是因为该线虫对丙硫咪唑产生的抗药性并不强, 虫株表达的抗药性基因未达到稳定状态 (Martin *et al.*, 1988)。此外, 不同阶段的线虫对

试验结果有较大影响, 粪便虫卵减少试验 (FECRT) 评估的是驱虫药对线虫成虫的驱杀效果, 而孵化试验检测的是驱虫药对线虫虫卵的杀灭效果, 因此二者的试验结果不可能完全一致 (蔡葵蒸等, 2007)。

**3.5** 有关家畜线虫抗药性问题的国内外已有较多的报道, 但少见对圈养野生动物线虫抗药性的研究, 仅 Young 等 (2000) 报道采用虫卵减少试验和幼虫发育试验评价抗线虫药物的驱虫活性。我们结合虫卵孵化试验与药物驱虫试验结果分析认为, 成都动物园长颈鹿消化道线虫对苯并咪唑类药物具有一定的抗药性, 但抗药性程度较低。而由于野生动物的特殊性, 实验对象 (宿主) 的数量太少, 未能将另外两种药物 (左旋咪唑和芬苯达唑) 作驱虫效果的检测试验, 故只能根据虫卵孵化试验结果得出初步的结论。

## 4 参考文献

- 蔡葵蒸, 杨晓野, 杨春生, 等. 2007. 用丙硫咪唑检测羊线虫抗药性的体外虫卵孵化试验[J]. 中国兽医科学, 37(8): 721~725.
- 顾越星, 何国声, 曹杰, 等. 1999. 用虫卵孵化试验对江苏某羊场线虫抗药性的检测[J]. 中国兽医寄生虫病, 7(3): 1~4.
- 何国声, 顾越星, 曹杰, 等. 1999. 用虫卵孵化试验检查羊捻转血矛线虫的抗药性[J]. 中国兽医寄生虫病, 7(1): 8~11.
- 姜波, 杨光友, 邓家波. 2007. 动物线虫抗药机制研究进展[J]. 安徽农业科学, 35(29): 9255~9257.
- 王权, 沈杰. 1997. 寄生线虫抗药性检测技术研究进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 4(5): 50~53.
- 赵月兰, 冯雪领, 秦建华, 等. 2004. 河北省坝上地区绵羊消化道线虫对丙硫咪唑抗药性的检测[J]. 中国兽医寄生虫病, 12(1): 4~5.
- 朱朝君, 赵观禄. 1998. 长颈鹿蛇形毛圆线虫的综合防治研究[J]. 中国兽医杂志, 24(9): 7~8.
- 朱朝君, 赵观禄. 1999. 长颈鹿的蛇形毛圆线虫感染与防治[J]. 中国人兽共患病杂志, 11(1): 55~56.
- Coles GC, C Bauer, *et al.* (何国声译). 1996. 世界兽医寄生虫学促进协会 (WAAVP) 对驱蠕虫药抗药性的检测方法[J]. 中国兽医寄生虫病, 4(5): 60~63.
- Martin PJ, Anderson N, Brown TH, *et al.* 1988. Changes in resistance of *Ostertagia* spp. to thiabendazole following natural selection or treatment with levamisole [J]. International Journal for Parasitology, 3(18): 333~340.
- Young KE, Jensen JM, Craig TM. 2000. Evaluation of anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay [J]. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 31(3): 348~352.