

5%地克珠利纳米乳对鸡球虫病的疗效研究

尚朋朋, 欧阳五庆, 傅 晨, 刘 伟, 赵 蓓, 王 璟

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究 5%地克珠利纳米乳对鸡球虫病的疗效。**【方法】**选择 300 只 18 日龄的雏鸡, 随机均分为 5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组, 0.5%地克珠利溶液组, 阴性对照组和阳性对照组 6 组, 试验组和阳性对照组每只鸡经口接种柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)卵囊悬液 0.5 mL(含球虫卵囊 1.0×10^5 个), 阴性对照组接种等量生理盐水, 感染 48 h 后饮水给药, 按地克珠利计, 5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组给药质量浓度分别为 2.0, 1.0, 0.5 mg/L, 0.5%地克珠利溶液组给药质量浓度为 1.0 mg/L, 给药 5 d, 阴性对照组和阳性对照组正常饮水。人工感染后第 8 天测定相对增重率、存活率、盲肠病变值、卵囊值和抗球虫指数。**【结果】**5%地克珠利纳米乳中剂量组疗效最好, 抗球虫指数达 195.81, 相对增重率达 95.81%, 存活率为 100%, 病变值为 0, 卵囊值为 0。**【结论】**5%地克珠利纳米乳是一种高效抗球虫药, 临床推荐用量 1.0 mg/L(按地克珠利计), 饮水给药。

[关键词] 地克珠利; 纳米乳; 鸡球虫病

[中图分类号] S859.79⁺5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)04-0019-05

Research of efficacy of 5% diclazuril nanoemulsion against chicken coccidiosis

SHANG Peng-peng, OUYANG Wu-qing, FU Chen, LIU Wei,
ZHAO Bei, WANG Jing

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was to study the efficacy of 5% diclazuril nanoemulsion against chicken coccidiosis. **【Method】** Three hundred 18-day-old chickens were randomly divided into high, middle, low doses of 5% diclazuril nanoemulsion group, 0.5% diclazuril solution group, negative control group and positive control group. Each chicken of the experimental group and positive control group was inoculated 0.5 mL *Eimeria* coccidium oocyst suspension(including 1.0×10^5 oocysts) and the negative control group was given equivalent physiological saline. After 48 h, high, middle and low doses of 5% diclazuril nanoemulsion group was separately given 2.0, 1.0, 0.5 mg/L diclazuril by drinking water and 0.5% diclazuril solution group was given 1.0 mg/L diclazuril by drinking water. The drug administration lasted for 5 d. The negative and positive control group were given drinking water normally. Relative weight gain rate, livability, cecum lesion value, oocyst value and ACI(anticoccidial index) were determined on the eighth day after artificial infection. **【Result】** Efficacy of middle dose of 5% diclazuril nanoemulsion was the best, ACI being 195.81, relative weight gain rate 95.81%, livability 100%, cecum lesion value 0 and oocyst value 0. **【Conclusion】** 5% diclazuril nanoemulsion is an efficient anticoccidial drug.

Key words: diclazuril; nanoemulsion; chicken coccidiosis

* [收稿日期] 2010-08-04

[基金项目] 陕西省重大科技创新专项(K332020916)

[作者简介] 尚朋朋(1986—), 女, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事纳米药物学研究。E-mail: pengpenggk@163.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—), 男, 陕西西翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药物学、细胞生物学研究。

E-mail: oywq506@sina.com

鸡球虫病是危害养鸡业的一种重要的寄生虫病^[1-2]。据调查,规模化鸡场鸡球虫病发生率高达 100%,全世界每年因鸡球虫病造成的经济损失可达 20 多亿美元^[3]。目前,鸡球虫病主要通过化学药物来防治^[4],但在此方面国内外亟待解决的关键问题是,能否提供一种稳定、缓释、载药量高、用药方便的高效抗球虫药。

地克珠利是一种广谱、高效、低毒的化学合成类抗球虫药,其抗球虫效果优于莫能菌素、氨丙啉、尼卡巴嗪等抗球虫药,主要用于鸡或火鸡球虫病的预防和治疗,是目前用药浓度最低的一种抗球虫药^[5-7]。该药自问世以来,一直按 1 mg/kg 添加于饲料中,用来预防球虫病。目前,市场上主要有地克珠利预混剂、混悬型粉剂、溶液剂等剂型,但市售产品的主要问题是溶解性差、生物利用度低、药效期短。

纳米乳是由油相、水相、表面活性剂及助表面活性剂,以适当比例混合形成的一种透明或半透明、低黏度的热力学稳定体系。大量资料表明,纳米乳具有制备简单,安全性高,热力学稳定,能增大难溶性药物溶解度,缓释,靶向,可提高药物生物利用度等优点^[8-11]。为了解决地克珠利溶解性差、生物利用度低、药效期短等问题,本课题组前期已成功地将地克珠利增溶于纳米乳载体,研制出了 5% 地克珠利纳米乳。本试验在上述研究的基础上,进一步探讨了 5% 地克珠利纳米乳对鸡球虫病的疗效,以期为临床治疗鸡球虫病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要药物与仪器 0.5% 地克珠利溶液(镇江威特药业有限责任公司,生产批号:091201);5% 地克珠利纳米乳(本实验室自制)。

BS224S 电子天平(德国 Sartorius 公司);JEM-1230 型透射电子显微镜(日本电子公司);Nicomp388/Zeta PALS 激光粒度测定仪 Zetasizer Nano ZS 型(英国 Malvern instrument 公司)。

1.1.2 试验动物 刚孵出的尼克红小公雏,由陕西杨凌武泉种鸡厂提供,接雏前对饲养笼和所有用具严格消毒,在无球虫的环境中饲喂,饲料为不含任何抗球虫药的全价配合饲料,隔离饲养至 18 日龄。

1.1.3 试验虫株 柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)杨凌株,由西北农林科技大学动物医学院寄生虫课题组提供,用前从 4℃ 冰箱取出,加生理盐水反复离心、淘洗除去重铬酸钾,至悬浮液无黄色为

止,并用生理盐水恢复至原体积,即每 mL 含孢子化柔嫩艾美耳球虫卵囊 2.0×10^5 个。

1.2 方法

1.2.1 试验动物的挑选与分组 试验雏鸡在 18 日龄时称体质量,挑选健康尼克红小公雏(体质量相近,试验前未检查到球虫卵囊)300 只,随机分为 6 组,每组 50 只,分别为 5% 地克珠利纳米乳高(DNH)、中(DNM)、低剂量组(DNL),0.5% 地克珠利溶液组,阳性对照组(感染不给药)和阴性对照组(不感染不给药)。整个试验过程中,所有组的饲料及用具均严格分开,以防止健康组受球虫感染。

1.2.2 感染剂量及方法 试验鸡在 18 日龄时,除阴性对照组外,其余各组鸡用连接橡皮管的注射器经口向嗉囊内接种柔嫩艾美耳球虫卵囊悬液 0.5 mL/只,即每只鸡接种 1.0×10^5 个柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊。阴性对照组接种等量生理盐水。

1.2.3 用药方法 感染后 48 h,分别向各药物组鸡饮水中添加相应剂量的药物,用药剂量均按地克珠利计,5% 地克珠利纳米乳高、中、低剂量组给药质量浓度分别为 2.0,1.0,0.5 mg/L,0.5% 地克珠利溶液组给药质量浓度为 1.0 mg/L,给药时间均为 5 d;阴性对照组和阳性对照组正常饮水。

1.2.4 临床观察 试验开始后每日观察试验鸡的精神状态、食欲、粪便变化和死亡情况,并对死亡鸡只进行剖检。

1.2.5 药效判定 试验后第 8 天对各组鸡称体质量,计算增重率及相对增重率(相对增重率=给药组或感染不给药组的增重率/不感染不给药组的增重率 $\times 100\%$)。根据鸡只死亡数计算存活率(存活率=试验结束时各组存活鸡只数/试验开始时各组鸡只数 $\times 100\%$)。然后对所有试验鸡进行剖检,重点检查盲肠病变,参照 Johnson 和 Reid^[12]的标准进行盲肠病变计分,将各组平均病变计分乘以 10 作为各组病变值。盲肠病变计分标准如下:0,未见病变;+1,盲肠壁散在极少数的点状出血斑,肠壁不增厚,内容物正常;+2,盲肠内容物混有少量血液,肠壁少肥厚,可见很多出血病灶;+3,盲肠内有大量血液或盲肠凝块(凝血或灰白色的栓芯),盲肠壁肥厚,盲肠明显变形或萎缩;+4,盲肠显著萎缩,病变延伸至直肠,盲肠壁极度肥厚,盲肠内容物为凝血或栓芯。如两侧病变不一致,以病变严重的一侧为准,凡因盲肠球虫病死亡者记 4 分。取每只鸡盲肠的内容物,混匀后用血细胞计数板计数每 g 盲肠内容物卵囊数(OPG),并折算为卵囊值^[13],具体标准见表 1。

表 1 克盲肠内容物卵囊数与卵囊值对照表

Table 1 Comparative table of cecum OPG and oocyst value

克盲肠内容物 卵囊数/(×10 ⁶) OPG	卵囊值 Oocyst value	克盲肠内容物 卵囊数/(×10 ⁶) OPG	卵囊值 Oocyst value
0~0.1	0	5.0~6.0	15
0.1~1.0	1	6.0~10.0	20
1.0~2.0	5	10.0~11.0	30
2.0~5.0	10	>11.0	40

以抗球虫指数(ACI)作为药物抗球虫病效果的判定指标,其按照美国默克(Merck)公司的公式计算,即 $ACI=(\text{相对增重率}+\text{存活率})-(\text{病变值}+\text{卵囊值})$ 。 $ACI\geq 180$ 判为高效药物; $160\leq ACI<180$ 判为中效药物; $120\leq ACI<160$ 判为药效较差; $ACI<120$ 不宜作为抗球虫药。

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 各试验组鸡的临床表现及剖检观察

阳性对照组鸡感染柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊

表 2 各试验组鸡体质量的变化

Table 2 Weight change of chickens in each experimental group

组别 Group	平均初体质量/g Average initial weight	平均末体质量/g Average last weight	增重率/% Weight gain rate	相对增重率/% Relative weight gain rate
DNH	179.77±3.62 a	274.81±10.40 a	0.53	94.34
DNM	178.39±3.94 a	274.16±6.70 a	0.54	95.81
DNL	177.45±4.01 a	266.31±7.60 b	0.50	89.35
0.5%地克珠利溶液组 0.5% diclazuril solution	176.29±3.98 a	251.23±11.39 c	0.43	75.86
阳性对照组 Positive control	176.49±8.71 a	228.94±11.25 d	0.30	53.04
阴性对照组 Negative control	179.62±4.62 a	280.29±11.16 a	0.56	100

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note:Data in the same column without same superscripts differ significantly ($P<0.05$). The same as follows.

由表 2 可知,攻虫前,各试验组鸡的体质量差异不显著($P>0.05$);扑杀时,5%地克珠利纳米乳高剂量组和中剂量组体质量与阴性对照组差异不显著($P>0.05$),5%地克珠利纳 米 乳 低 剂 量 组、0.5%地克珠利溶液组体质量与阴性对照组差异显著($P<0.05$),且 5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组鸡的体质量显著高于 0.5%地克珠利溶液组($P<0.05$)。

2.3 各试验组鸡的存活率

试验结束时,阳性对照组因鸡球虫病死亡 9 只,存活率为 82%;阴性对照组未出现鸡只死亡,存活率为 100%;0.5%地克珠利溶液组因鸡球虫病死亡 3 只,存活率为 94%;5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组无鸡只死亡,存活率均为 100%。

第 3 天,精神欠佳,饮水增加,出现少量的咖啡色黏稠样粪便;第 4 天见少量血便,采食量明显下降,鸡群精神萎靡;第 5 天血便更严重,且粪便成水样稀粪,鸡群呈现精神高度沉郁、羽毛耸立、头蜷缩、眼无神、昏睡等症状。0.5%地克珠利溶液组鸡感染后第 5 天出现少量血便和水样稀粪。攻虫后第 6 天开始,阳性对照组和 0.5%地克珠利溶液组鸡群排泄血便和稀粪量呈下降趋势;第 7 天血便和稀粪量已减少。在试验中,阳性对照组先后因鸡球虫病死亡 9 只,病死鸡剖检可见,两侧盲肠高度肿大,盲肠内充满新鲜或暗红色血液或血凝块,或者盲肠显著萎缩,内容物为栓芯状;0.5%地克珠利溶液组因鸡球虫病死亡 3 只,病死鸡剖检可见,盲肠内容物附有少量血便,盲肠壁增厚,可见多数出血病灶;而其他各组均未见鸡只死亡。在整个试验期内,阴性对照组和 5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组均未出现可见的鸡球虫病临床症状。

2.2 各试验组鸡体质量的变化

各试验组鸡体质量的变化见表 2。

2.4 各试验组鸡的盲肠病变记分

各试验组鸡的盲肠病变计分结果见表 3。

表 3 各试验组鸡的盲肠病变计分和病变值

Table 3 Score of cecum lesions and lesion value of chickens in each experimental group

组别 Group	平均盲肠病变计分 Everage scorse of cecum lesions	病变值 Lesion value
DNH	0.00±0.00 a	0
DNM	0.00±0.00 a	0
DNL	0.30±0.46 b	3
0.5%地克珠利溶液组 0.5% diclazuril solution	1.50±0.51 c	15
阳性对照组 Positive control	3.44±0.50 d	34.4
阴性对照组 Negative control	0.00±0.00 a	0

由表 3 可知,5%地克珠利纳米乳高剂量组和中剂量组鸡的盲肠病变计分与阴性对照组差异不显著

($P>0.05$),5%地克珠利纳米乳低剂量组、0.5%地克珠利溶液组鸡的盲肠病变计分与阴性对照组差异显著($P<0.05$),且5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组鸡的盲肠病变计分显著低于0.5%地克珠利溶液组($P<0.05$)。

2.5 各试验组鸡的卵囊值

试验结束时,根据各试验组鸡的克盲肠内容物卵囊数查表1,即得各试验组鸡的卵囊值:阳性对照组 OPG 为 $2.112\ 5\times 10^6$,卵囊值为10;阴性对照组 OPG 为0,卵囊值为0;0.5%地克珠利溶液组 OPG

为 0.5×10^6 ,卵囊值为1;5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组 OPG 分别为 $0.037\ 5\times 10^6$, 0.025×10^6 , 0.075×10^6 ,卵囊值均为0。

2.6 各试验组鸡的抗球虫效果

各试验组鸡的抗球虫效果见表4。由表4可知,5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组的抗球虫指数都大于180,均属于高效抗球虫药,其中以5%地克珠利纳米乳中剂量组效果最好,相对增重率达到95.81%;0.5%地克珠利溶液组的抗球虫指数为153.86,保护性不好,属于低效抗球虫药。

表 4 各试验组鸡的抗球虫效果
Table 4 Anticoccidial effects in each experimental group

组别 Group	相对增重率/% Relative weight gain rate	存活率/% Livability	病变值 Lesion value	卵囊值 Oocyst value	ACI
DNH	94.34	100	0	0	194.34
DNM	95.81	100	0	0	195.81
DNL	89.35	100	3	0	186.35
0.5%地克珠利溶液组 0.5% diclazuril solution	75.86	94	15	1	153.86
阳性对照组 Positive control	53.04	82	34.4	10	90.64
阴性对照组 Negative control	100	100	0	0	200

3 讨 论

鸡球虫病是规模化养殖场最常见,且防治困难、花费成本较高的一种疾病,该病不仅严重影响鸡的生长发育,使产蛋率下降,饲料报酬降低,鸡只抵抗力下降,死亡率上升,给养殖业造成巨大的经济损失,而且影响肉蛋品质,危害人类健康。因此,如何控制鸡球虫病一直是国内外学者关注的一个热点。长期以来,国内外在鸡球虫病的防治方面均以药物治疗为主,但是长期不合理地使用抗球虫药会导致药效降低,耐药性增加,药物残留加大。地克珠利是一种广谱、高效、低毒的化学合成类抗球虫药。本研究所用5%地克珠利纳米乳,利用纳米乳作为药物载体,旨在增加地克珠利的溶解度和生物利用度,提升其稳定性和治疗效果。临床应用时只需兑水稀释,饮水给药,使用方便简单。

本研究以人工感染柔嫩艾美尔球虫孢子化卵囊的鸡为试验动物,采取先感染后给药的方式,检测5%地克珠利纳米乳对鸡球虫病的治疗效果。结果显示,试验鸡感染柔嫩艾美尔球虫孢子化卵囊后48 h出现咖啡色黏稠样粪便,且食欲下降,饮水增加,因此选择感染后48 h开始给药,比较符合实际临床上的给药时间,即发现症状后开始给药。此外,试验结束时,5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组没有鸡

只死亡,体质量显著高于市售0.5%地克珠利溶液组($P<0.05$)和阳性对照组($P<0.05$),盲肠病变计分显著低于市售0.5%地克珠利溶液组($P<0.05$)和阳性对照组($P<0.05$),且卵囊的排出减少,卵囊值均为0,说明5%地克珠利纳米乳对鸡球虫病的治疗效果优于市售0.5%地克珠利溶液。本试验结果表明,5%地克珠利纳米乳高、中、低剂量组的抗球虫指数均大于180,属于高效抗球虫药,其药效强的原因可能是:1)纳米乳滴粒径小于100 nm,药物极易进入肠道上皮细胞和虫体内部,发挥高效抗球虫作用;2)纳米乳具有缓释性,延长了地克珠利在动物体内的作用时间,提高了生物利用度;3)纳米乳稳定性好,而地克珠利溶液的饮水液,我国规定的稳定期仅为4 h。关于地克珠利纳米乳的确切抗球虫机制,还有待于进一步研究。

疗效对比试验结果表明,5%地克珠利纳米乳中剂量组效果最好,抗球虫指数达195.81,相对增重率达95.81%,存活率为100%,病变值为0,卵囊值为0。因此,5%地克珠利纳米乳的临床推荐用量为1.0 mg/L(按地克珠利计),饮水给药。

鸡球虫病发病病因复杂,管理措施、营养条件和药物使用等均会影响该病的发生和发展。所以搞好环境卫生,保持圈舍干燥通风,及时清除粪便或进行发酵处理,降低饲养密度,选用高档优质的饲料,并

辅以维生素及矿物质等,均能降低鸡球虫病的发病率,对于已经发病的鸡应立即隔离,及时进行药物治疗,只有这样才能有效控制鸡球虫病的发生。

[参考文献]

[1] 彭德旺,周新民,常明雪,等. 畜禽球虫病 [M]. 北京:农业出版社,1993;32.
Peng D W, Zhou X M, Chang M X, et al. Poultry coccidiosis [M]. Beijing: Agriculture Press, 1993; 32. (in Chinese)

[2] 孔繁瑶. 家畜寄生虫学 [M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社, 1997;367.
Kong F Y. Veterinary parasitology [M]. 2nd ed. Beijing: China Agricultural University Press, 1997; 367. (in Chinese)

[3] 蒋金书. 鸡球虫病防治的现状与未来 [J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(7): 42-44.
Jiang J S. The actuality and future of chicken coccidiosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2003, 39(7): 42-44. (in Chinese)

[4] 曾明华. 抗鸡球虫药的筛选方法综述 [J]. 安徽农业科学, 1995, 23(2): 184-186.
Zeng M H. The review of screening method about anticoccidial drug [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1995, 23(2): 184-186. (in Chinese)

[5] 陈仗榴. 兽医药理学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002; 291.
Chen Z L. Veterinary pharmacology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002; 291. (in Chinese)

[6] 朱模忠. 兽药手册 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002; 211-272.
Zhu M Z. Veterinary drug manual [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002; 211-272. (in Chinese)

[7] 高迎春. 动物科学用药 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
Gao Y C. Scientific animal pharmacy [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. (in Chinese)

[8] 杨惊宇,严冬,罗杰英,等. 新型药物剂型:微乳 [J]. 中国医学工程, 2005, 13(4): 378-381.
Yang J Y, Yan D, Luo J Y, et al. New drug formulation: Micro-emulsion [J]. China Medical Engineering, 2005, 13(4): 378-381. (in Chinese)

[9] 谢成,祝恒琛. 纳米医药应用 [M]. 海口:海南出版社, 2005: 126-132.
Xie C, Zhu H C. The application of nanotech in medicine [M]. Haikou: Hainan Publishing House, 2005; 126-132. (in Chinese)

[10] Lawrence M J, Rees G D. Micro-emulsion based media as novel drug delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 45(1): 89-121.

[11] 陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005; 74-76.
Lu B. New formulation and new technique of drug [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005; 74-76. (in Chinese)

[12] Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs; Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens [J]. Experiment Parasitology, 1970, 28: 30-36.

[13] 角田清. 鸡球虫病 [M]. 陈谊,明如镜,译. 上海:上海科学技术出版社, 1986.
Jiao T Q. Chicken coccidiosis [M]. Translated by Chen Y, Ming R J. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1986. (in Chinese)