

马 霞,张国祖,郭振环. 黄连解毒散超微粉治疗鸡大肠杆菌病的效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):204-206.

黄连解毒散超微粉治疗鸡大肠杆菌病的效果

马 霞¹, 张国祖^{1,2}, 郭振环²

(1. 河南牧业经济学院,河南郑州 450011; 2. 河南省康星药业股份有限公司,河南中牟 451464)

摘要:观察了黄连解毒散超微粉对人工诱发鸡大肠杆菌病的治疗效果。通过人工诱发建立鸡大肠杆菌病模型,用黄连解毒散超微粉进行治疗,同时设黄连解毒散散剂对照和氟苯尼考西药对照,观察临床症状、体质量变化及血清超氧化物歧化酶活性和内毒素含量变化。结果表明,黄连解毒散超微粉、黄连解毒散散剂和西药氟苯尼考的治愈率和有效率差异不显著;黄连解毒散超微粉和黄连解毒散散剂降低血清内毒素含量,提高超氧化物歧化酶活性,增加体质量的作用显著优于西药氟苯尼考。黄连解毒散超微粉对人工鸡大肠杆菌病有很好的疗效,与其散剂比较,使用剂量可以节省一半。

关键词:黄连解毒散;超微粉;鸡;大肠杆菌病;疗效;剂量

中图分类号: S858.315.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0204-03

鸡大肠杆菌病的发病率和死亡率很高,不同品种不同日龄的鸡均可发病,给养鸡业造成极大的损失^[1-3]。抗菌药对该病虽有一定的治疗和预防作用,但由于其反复和大量应用,极易产生抗药性,而且易造成药物残留影响食品安全^[4]。中药具有疗效可靠、毒副作用小、不易产生有害残留等优势^[5],河南省康星药业股份有限公司研制开发了黄连解毒散超微粉,本试验通过人工诱发鸡大肠杆菌病,然后用黄连解毒散超微粉进行治疗,旨在确认该药对鸡大肠杆菌病的疗效,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

黄连解毒散超微粉,河南省康星药业有限公司制备,规格:100 g;批号:11110502;黄连解毒散,河南省康星药业股份有限公司产品,规格:每袋 100 g;批号:12060101;氟苯尼考粉,河南省康星药业有限公司产品,规格:100 g : 10 g;批号:11110101。

1.2 检测试剂

内毒素和超氧化物歧化酶 ELISA 检测试剂盒,R&D Systems Inc.,Minneapolis 公司产品,批号分别为 12-03 和 12-01。

1.3 主要仪器

酶标仪,离心机,超净工作台,分析天平,恒温摇床等。

1.4 攻毒菌种与人工发病预试验

鸡大肠杆菌 O78 株(C83890),购自中国兽药监察所。

菌种复活与鉴定:先将菌种接种到 GN 增菌液中,放置 37 ℃ 恒温摇床(180 r/min)培养 8 h,然后无菌操作接种于麦康凯琼脂平板上,37 ℃ 培养 16 h,呈边缘整齐、光滑、隆起的红色菌落。从麦康凯琼脂培养基上挑取单个的菌落用革兰氏

染色后,在油镜下观察,有许多短杆状、单个散落的红色细菌。

菌种培养:挑取经鉴定过的单个菌落接种于 GN 增菌液中,放置 37 ℃ 恒温摇床(180 r/min)培养 8 h。然后无菌操作接种于麦康凯琼脂平板上,37 ℃ 培养 16 h。4 ℃ 冰箱保存备用。

攻毒预试:挑取麦康凯琼脂平板上单个菌落于 GN 增菌液中放置 37 ℃ 恒温摇床(180 r/min)培养 8 h。用麦氏比浊法调整菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL、 1×10^8 CFU/mL、 1×10^9 CFU/mL、 1×10^{10} CFU/mL 和 1×10^{11} CFU/mL;取 60 日龄罗曼蛋鸡 180 羽随机均分为 6 组,每组 30 羽。空白对照组隔离饲养并胸肌注射 0.5 mL GN 增菌液。其余 5 组,分别用稀释的大肠杆菌菌液胸肌注射 0.5 mL 攻毒。各组死亡率在 0~100% 之间(表 1),因正式试验时需要观察用药效果,死亡率太高不利于观察用药效果,死亡率太低又不利于比较不同剂量的药物治疗效果,所以选择 1×10^9 CFU/mL 菌液浓度(死亡率为 36.7%)为正式试验的攻毒菌液浓度。

表 1 攻毒预试结果

菌液浓度 (CFU/mL)	死亡数 (羽)	死亡率 (%)
0(空白组)	0	0
1×10^7	0	0
1×10^8	5	13.3
1×10^9	11	36.7
1×10^{10}	20	66.7
1×10^{11}	30	100.0

死亡鸡剖检可见,肝脏肿大质脆;肺炎性水肿,有出血点;胃粘膜脱落,胃壁有大小不一的黑褐色溃疡斑;结肠、盲肠的浆膜和粘膜充血或出血,肠内充满气体和胶冻样物。个别病例肝脏和心脏有局灶性坏死病灶。取病变明显脏器抹片革兰氏染色镜检为短杆状、单个散落的红色细菌。

用药敏纸片法^[6]测定了临床常用的 16 种抗菌药对分离菌株的体外抑菌效果。结果,各抗菌药的抑菌圈直径分别为:丁胺卡那 26 mm;卡那霉素 25 mm;庆大霉素 13 mm;林可霉素 0 mm;强力霉素 9 mm;复方新诺明 8 mm;氟哌酸 12 mm;氨

收稿日期:2013-12-21

基金项目:河南省重点科技攻关项目(编号:122102110185、122102110224);河南省科技成果转化项目(编号:132201310002)。

作者简介:马 霞(1978—),女,山东泰安人,博士,讲师,主要从事中兽药新制剂研究。E-mail: maxia801010@126.com。

芑青霉素 0 mm;环丙沙星 11 mm;恩诺沙星 8 mm;罗红霉素 0 mm;阿莫西林 0 mm;四环素 0 mm;氟苯尼考 27 mm;红霉素 8 mm;新霉素 22 mm。以氟苯尼考的抑菌效果最好,因此选择其作为对照药物。

1.5 试验动物及分组处理

1 日龄罗曼蛋公鸡,饲养至 60 日龄选取 300 羽,均分为 5 组,每组 60 羽,设 3 个重复。空白对照组隔离饲养并胸肌注射 GN 增菌液 0.5 mL,其余 4 组每羽胸肌注射 1×10^9 CFU/mL 大肠杆菌液 0.5 mL 攻毒,出现明显临床症状后,黄连解毒散超微粉组分别按照 1% 黄连解毒散超微粉拌料混饲,黄连解毒散散剂对照组按照 2% 黄连解毒散拌料混饲,连用 7 d,西药对照组氟苯尼考粉混饲,阳性对照组不用药。试验期 28 d,其中用药期 7 d,用药后观察期 21 d(表 2)^[7]。

表 2 试验动物分组处理

组别	处理
黄连解毒散超微粉组	黄连解毒散超微粉 1% 混饲,攻毒
黄连解毒散散剂对照	黄连解毒散 2% 混饲,攻毒
西药(氟苯尼考)对照	混饲,按照说明书添加,攻毒
阳性对照	不用药,攻毒
空白对照	不用药,不攻毒,隔离饲养

1.6 测定指标及方法

每日观察并记录:采食量、饮水量、精神状态、拉稀状况、

发病情况、死亡情况。

试验结束时统计各组鸡的发病率、治愈率、有效率。

攻毒后 3、5、7、10 d 每组随即取 6 羽鸡翅静脉采血制备血清用酶联免疫试剂盒检测血清内毒素含量和超氧化物歧化酶浓度。

试验前及试验结束每组 3 个重复存活鸡分别称质量统计质量增加情况。

1.7 数据处理与统计

采用 *t* 检验,用 SPSS 软件进行 Duncan's 多重分析。

1.8 疗效评价标准

痊愈:鸡精神活泼,下痢停止,饮食完全正常。显效:鸡存活,但精神、下痢及饮食等未完全恢复正常。无效:鸡死亡,剖检呈现典型的大肠杆菌病病变。有效率 = (痊愈数 + 显效数)/样本数 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 总体疗效

西药对照组、黄连解毒散超微粉组和黄连解毒散散剂对照组的死亡率显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$);西药对照组、黄连解毒散超微粉组和黄连解毒散散剂对照组的治愈率和有效率显著高于阳性对照组 ($P < 0.05$),西药对照组的治愈率和有效率最高,但与黄连解毒散超微粉组和黄连解毒散散剂对照组间差异不显著 ($P > 0.05$)(表 3)。

表 3 各组的总体疗效

组别	样本数 (羽)	死亡数 (羽)	死亡率 (%)	显效数 (羽)	治愈数 (羽)	治愈率 (%)	有效率 (%)
黄连解毒散超微粉组	60	11	18.3b	9	40	66.7a	81.7a
黄连解毒散散剂对照	60	11	18.3b	10	39	65.0a	81.7a
西药(氯苯尼考)对照	60	8	13.3b	10	42	70.0a	86.7a
阳性对照	60	20	33.3a	15	25	41.7b	66.7b
空白对照	60	0	0d				

注:同列数据后标不同字母者差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 血清内毒素

攻毒后 3 d,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散散剂对照组的血清内毒素含量显著低于阳性对照组和西药对照组 ($P < 0.05$);攻毒后 5、7 d,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散

散剂对照组的血清内毒素含量显著低于西药对照组,西药对照组显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$);攻毒后 10 d,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散散剂对照组和西药对照组的血清内毒素含量显著低于阳性对照组 ($P < 0.05$)(表 4)。

表 4 各组血清内毒素含量

组别	血清毒素含量(EU/L)			
	3 d	5 d	7 d	10 d
黄连解毒散超微粉组	24.3 \pm 2.4b	19.8 \pm 2.2c	15.2 \pm 1.8c	11.9 \pm 2.1b
黄连解毒散散剂对照	23.5 \pm 2.5b	19.5 \pm 2.4c	15.0 \pm 2.3c	11.5 \pm 2.0b
西药(氯苯尼考)对照	33.8 \pm 2.0a	24.1 \pm 2.3b	18.6 \pm 1.9b	12.0 \pm 2.3b
阳性对照	35.4 \pm 2.3a	29.8 \pm 2.1a	23.3 \pm 2.0a	15.4 \pm 2.2a
空白对照	11.4 \pm 1.6c	10.7 \pm 2.0d	11.5 \pm 1.9d	10.8 \pm 1.7b

注:同列数据后标不同字母者差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 血清 SOD 浓度

攻毒后 3、5 d,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散散剂对照组的血清 SOD 浓度显著高于阳性对照组和西药对照组 ($P < 0.05$);攻毒后第 7 d,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散散剂对照组的血清 SOD 浓度显著高于西药对照组,西药对照

组显著高于阳性对照组 ($P < 0.05$);攻毒后第 10 d,空白对照组、黄连解毒散超微粉组和黄连解毒散散剂对照组的血清 SOD 浓度差异不显著,但显著高于西药对照组,西药对照组显著高于阳性对照组 ($P < 0.05$)(表 5)。

表 5 各组血清 SOD 浓度变化

组别	SOD 浓度(U/L)			
	3 d	5 d	7 d	10 d
黄连解毒散超微粉组	137.6 ± 9.4b	140.8 ± 9.2b	148.2 ± 7.6b	168.7 ± 9.2a
黄连解毒散散剂对照	135.5 ± 8.5b	142.5 ± 8.4b	150.6 ± 8.3b	170.2 ± 8.5a
西药(氯苯尼考)对照	99.8 ± 9.0c	114.1 ± 8.3c	138.6 ± 7.9c	152.0 ± 8.7b
阳性对照	97.5 ± 9.3c	109.8 ± 9.1c	125.3 ± 8.0d	135.9 ± 7.8c
空白对照	167.4 ± 8.6a	170.5 ± 9.0a	171.7 ± 8.9a	175.8 ± 8.7a

注:同列数据后标不同字母者差异显著($P < 0.05$)。

2.4 试验前后体质量变化

在试验开始时,各组间体质量差异不显著($P > 0.05$)。在试验结束时(28 d),各攻毒组体质量显著低于空白对照组,黄连解毒散超微粉组和黄连解毒散散剂对照组的体质量差异不显著($P > 0.05$),但显著高于西药对照组,西药对照组显著高于阳性对照组($P < 0.05$) (表 6)。

表 6 各组体质量的变化

组别	体质量(g/羽)	
	0 d	28 d
黄连解毒散超微粉组	875 ± 30a	1 137 ± 35b
黄连解毒散散剂对照	875 ± 25a	1 140 ± 39b
西药氟苯尼考对照	868 ± 27a	1 080 ± 33c
阳性对照	861 ± 26a	995 ± 37d
空白对照	867 ± 28a	1 255 ± 38a

注:同列数据后标不同字母者差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

本试验结果显示,黄连解毒散超微粉组、黄连解毒散散剂对照组和西药对照组的治愈率和有效率差异不显著,但显著高于阳性对照组;黄连解毒散超微粉和黄连解毒散散剂降低血清内毒素含量、提高超氧化物歧化酶浓度、增加体质量作用的效果差异不显著,但显著优于西药对照组。表明,黄连解毒散超微粉对鸡大肠杆菌病有较好的疗效,与其粉散剂比较,达到治疗等效的使用剂量可以减少一半。

黄连解毒散为《中华人民共和国兽药典》2010 版二部中收录方剂,由黄连、黄芩、黄柏、栀子四味中药组方而成。具有泻火解毒之功效。主治三焦实热,疮黄肿毒。方中黄连泻上焦心火兼泻中焦火,为君药;黄芩泻上焦肺火,为臣药;黄柏泻下焦肾火,为佐药;栀子通泻三焦之火,导热下行从膀胱而出,为使药^[8]。孙守芳采用给家兔静脉注射大肠杆菌内毒素的方法成功复制中医温病气分证模型,该气分证阶段是温病卫气营血传变过程中期阶段,此时正盛邪实,正邪相争激烈,三焦壮热。用白虎汤、黄连解毒散等清寒方剂进行治疗,取得了很好的效果,并且发现清寒方剂具有清除气分证模型家兔血清内毒素和提高超氧化物歧化酶浓度的作用^[9]。

本试验中我们用大肠杆菌攻毒雏鸡后,雏鸡表现为病鸡精神沉郁,羽毛松乱,食欲不振,呼吸困难,喘气,呼吸啰音,张口伸颈,拉黄白色稀粪。剖检变化为,肝脏肿大,有时见到淡黄色坏死灶,肝包膜略有增厚,不透明呈黄白色,易剥脱。心包增厚不透明,心包积有淡黄色液体;气囊炎也是常见的变

化,胸、腹等气囊囊壁增厚呈灰黄色。病程经历气分证阶段,最后至营血分证而死亡。应用黄连解毒散进行治疗就是对三焦实热的气分证进行对证治疗,把好气分关,防止传入营血分而导致雏鸡更多死亡。

超微粉碎技术是 20 世纪 70 年代为适应高科技的发展而形成的一种新技术,在发达国家被广泛应用于冶金、食品、医药、化妆品、航天航空等国民经济部门及军事领域。中药超微粉碎技术又称中药细胞级粉碎技术,通过超微粉碎,中药材的颗粒从传统工艺的 60 目左右提高到 300 目以上,粉碎后中药粒子的中心粒径在 5 ~ 10 μm。这项新技术应用于不同质地的中药材,通过细胞破壁打破了细胞壁的屏障可使其中有效成分直接暴露出来,从而使药物起效更加迅速、充分^[10-11]。本试验结果表明,1% 剂量黄连解毒散超微粉与 2% 剂量黄连解毒散散剂对人工攻毒模型鸡大肠杆菌病的治疗效果差异不显著,这意味着黄连解毒散经超微粉碎后用于疾病防治可以节省一半的用药量。

参考文献:

[1]程 汉,胡新岗,曹军平. 鸡大肠杆菌病病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):172-174.
[2]樊 琛,曾庆华,王 会,等. 鸡大肠埃希菌 sI 菌株 iss 基因的序列[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):15-16.
[3]孟志敏,牛小飞,李连缺,等. 甲矾霉素可溶性粉对人工感染鸡大肠杆菌病的药效学研究[J]. 湖北农业科学,2012,51(1):120-122.
[4]周 军,李红斌,李睿鸿. 滥用抗生素对养猪业的危害及应对措施[J]. 当代畜禽养殖业,2011(6):44-47.
[5]温 伟,吕金良,高振伟,等. 浅谈现代中兽药的发展前景[J]. 四川畜牧兽医,2009,36(12):12-14.
[6]王效田,孔祥峰,夏明龙,等. 南京郊区奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 畜牧与兽医,2004,36(11):6-8.
[7]农业部兽药审评委员会办公室. 兽药试验技术规范汇编[M]. 北京:农业部,2001:25.
[8]中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:二部[M]. 2010 版. 北京:中国农业出版社,2010:654-655.
[9]孙守芳. 解毒白虎汤治疗温病气分证的实验研究[D]. 福州:福建中医学院,2004.
[10]陈永忠,夏业才. 超微粉碎技术在中兽药方面的应用及展望[J]. 中国兽药杂志,2010,44(6):36-38.
[11]田美湛,张秀英. 超微粉碎技术在兽医临床上应用现状及展望[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005(8):84-85.