(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117547556 A
(43)申请公布日 2024.02.13

(21)申请号 202310158938.5

(22)申请日 2023.02.24

(83)生物保藏信息
CGMCC NO.24403 2022.02.17

(71)申请人 鼎正新兴生物技术(天津)有限公司
地址 300383 天津市西青区王稳庄盛达二支路27号

(72)发明人 刘鼎阔 刘芳 董惠峰 王俊菊 杨晓伟 何志霞 李源 胡鹏程 李道稳 王磊 任连泉 史燕燕 张博 张怀瑾 刘宁 高晶晶

(74)专利代理机构 北京誉加知识产权代理有限公司 11476
专利代理师 林军

(51)Int.Cl.
A61K 35/74(2015.01)
C12N 1/20(2006.01)
A61P 33/02(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种禽毛滴虫病治疗药物及制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种禽毛滴虫病治疗药物,治疗药物由河生肠杆菌培养后制成;河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001。本发明中,菌株对毛滴虫具有杀灭作用,培养后得到的药物制剂对病禽进行喂食,能够抑制毛滴虫生长,恢复病禽精神,使病禽食欲正常,毛色逐渐恢复光亮。

CN 117547556 A

1.一种禽毛滴虫病治疗药物,其特征在于:所述治疗药物由河生肠杆菌培养后制成;

所述河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001,分类命名为Lelliottia amnigena,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.24403,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

2.一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:将河生肠杆菌接种至培养基内,培养一段时间后,得到生物制剂;

所述河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001,分类命名为Lelliottia amnigena,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.24403,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

3.根据权利要求2所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:所述生物制剂中活菌为6.25×10^{4}-6.25×10^{5}CFU。

4.根据权利要求3所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:所述培养基为蛋白胨2-8份、酵母粉1-5份、NaCl 2-8份、葡萄糖5-15份。

5.根据权利要求2或3或4所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:所述培养基为蛋白胨5份、酵母粉2.5份、NaCl 5份、葡萄糖10份。

6.根据权利要求5所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

称取蛋白胨、酵母粉、NaCl和葡萄糖,加水定容,摇匀;

高温灭菌后在无菌环境下静置;

温度为室温时,吸取菌液进行接种量,恒温培养后得到母液;

通过三级发酵罐进行工业放大,稀释后得到成品。

7.根据权利要求6所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:所述接种量为5%。

8.根据权利要求6所述的一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,其特征在于:所述恒温培养的条件是:恒温水浴摇床设置至30℃、180r/min转速,恒温培养48h。

9.一种河生肠杆菌DZ04001在制备禽毛滴虫病治疗药物中的应用。

一种禽毛滴虫病治疗药物及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及禽毛滴虫病防治技术领域,尤其是一种禽毛滴虫病治疗药物及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 禽毛滴虫病是由毛滴虫引起的一种以禽上消化道溃疡和下痢为特征的原虫病,其通过污染的饲料和饮水而传播,火鸡、鸡、鸭、鹅、鸽和鹰等禽类均易感且幼禽发病严重,禽毛滴虫病的特征是喉部有干酪样积聚,常常伴有体重下降。上消化道感染的病禽表现食欲废绝,精神萎顿,嗉囊塌瘪,颈部常伸拉作吞咽状,眼有水汪汪分泌物,闭口困难,口中流出浅绿色至淡黄色粘液,并散发出恶臭味;下消化道感染的病禽表现精神沉郁,食欲下降或废绝,羽毛松乱,步态不稳,呆立喜卧,拉淡黄色水样稀粪,体重下降,呈昏睡状,直至死亡。禽毛滴虫侵害口腔、鼻腔、咽、食道和嗉囊的粘膜表层。

[0003] 养殖场所需要严格执行环境卫生消毒制度,比如:使用熏蒸、暴晒等方法进行环境消杀,及时清理地面粪便以切断传播途径和传染源,还可以改平养为笼养。除了上述物理手段以外,在禽毛滴虫病防治中较常采用药物治疗,硝基咪唑类药物自问世以来就受到人们的青睐,甲硝唑更是其中的佼佼者,但是甲硝唑被长期应用,其耐药性问题也随之凸显出来。我国有关部门已经出台具体规定,禁止将甲硝唑应用于动物源性食品生产中。而其余硝基咪唑药物与甲硝唑同属一类药物,也有致癌、致突变的风险。因此,寻找新的安全、有效的化学药物和植物提取物代替硝基咪唑类药物已经刻不容缓,目前已经报道有一些植物提取物对抗滴虫具有良好的效果,而生物类制剂用于抗毛滴虫的研究却未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种禽毛滴虫病的生物制剂。本发明中,筛选出河生肠杆菌DZ04001,该菌株对毛滴虫具有杀灭作用,培养后得到的药物制剂对病禽进行喂食,能够抑制毛滴虫生长,恢复病禽精神,使病禽食欲正常,毛色逐渐恢复光亮。

[0005] 本发明采取的技术方案是:

[0006] 一种禽毛滴虫病治疗药物,其特征在于:所述治疗药物由河生肠杆菌培养后制成;

[0007] 所述河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001,分类命名为Lelliottia amnigena,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.24403,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,将河生肠杆菌接种至培养基内,培养一段时间后,得到生物制剂;

[0009] 所述河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001,分类命名为Lelliottia amnigena,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.24403,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0010] 进一步的:所述生物制剂中活菌为6.25×10^{4}-6.25×10^{5}CFU。所述培养基为蛋白胨2-8份、酵母粉1-5份、NaCl 2-8份、葡萄糖5-15份。所述培养基为蛋白胨5份、酵母粉2.5份、NaCl 5份、葡萄糖10份。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种禽毛滴虫病治疗药物的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 称取蛋白胨、酵母粉、NaCl和葡萄糖,加水定容,摇匀;

[0013] 高温灭菌后在无菌环境下静置;

[0014] 温度为室温时,吸取菌液进行接种量,恒温培养后得到母液;

[0015] 通过三级发酵罐进行工业放大,稀释后得到成品。

[0016] 进一步的:所述接种量为5%。所述恒温培养的条件是:恒温水浴摇床设置至30℃、180r/min转速,恒温培养48h。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种河生肠杆菌DZ04001在制备禽毛滴虫病治疗药物中的应用。

[0018] 本发明的优点和积极效果是:

[0019] 本发明中,筛选出河生肠杆菌DZ04001,该菌株对毛滴虫具有杀灭作用,培养后得到的药物制剂对病禽进行喂食,能够抑制毛滴虫生长,恢复病禽精神,使病禽食欲正常,毛色逐渐恢复光亮。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例,对本发明进一步说明,下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0021] 一种禽毛滴虫病治疗药物,其特征在于:所述治疗药物由河生肠杆菌培养后制成;所述河生肠杆菌为河生肠杆菌DZ04001,分类命名为Lelliottia amnigena,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.24403,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0022] 上述治疗药物的制备方法是:将河生肠杆菌接种至培养基内,培养一段时间后,得到生物制剂;生物制剂中活菌为6.25×10^{4}-6.25×10^{5}CFU。所述培养基为蛋白胨2-8份、酵母粉1-5份、NaCl 2-8份、葡萄糖5-15份。优选的方案是:培养基为蛋白胨5份、酵母粉2.5份、NaCl 5份、葡萄糖10份。

[0023] 根据杀虫效果和安全性对菌株培养基配方、培养温度、培养时间接种量、转速等条件进行优化,得到最优培养条件:培养基制备:分别称取蛋白胨5.0g、酵母粉2.5g、NaCl 5.0g、葡萄糖10g,加入净化水定容至1L,颠倒摇匀,高温灭菌后在无菌环境下放置。降温至常温时,吸取菌液,接种量5%,将恒温水浴摇床设置至30℃、180r/min转速,恒温培养48h,得到1.0×10^{9}CFU菌液。通过三级发酵罐进行工业放大,获得发酵液,通入稀释罐,稀释后得到成品。

[0024] 菌株的筛选:在养殖环境调查过程中,从采集的养殖场附近的土壤中发现了多种细菌,根据“以夷制夷”的研究方向,筛选能够抑制病原体的微生物菌株。经过血琼脂培养富集,单菌落画线培养,筛选出一组表面光滑,边缘整齐,呈短小棒状的革兰氏阴性菌菌株(DZ04001),分别进行抑菌、抗病毒、抗寄生虫试验,发现该菌株仅对寄生虫具有杀灭作用。

随后送至中国微生物菌种保藏管理委员会进行鉴定保藏,经检定该菌株(DZ04001)为河生肠杆菌(Lelliottia amnigena),保藏号24403。

[0025] 最低有效剂量确认:取15g新鲜猪肝,剪碎,加入适量纯水后放入4℃冰箱过夜,将猪肝熬成肝浸汤,过滤,取上清液。L—半胱氨酸、蛋白胨、氯化钠(比例如表1),用肝浸汤上清液定容至100mL,调pH至6,高温高压灭菌后于4℃冰箱保存备用。使用前加入20%灭菌小牛血清,青霉素、链霉素各100U/mL。

[0026] 表1:毛滴虫培养基成分配比

[0027]

成分	含量
L—半胱氨酸	0.2g
蛋白胨	2g
氯化钠	0.5g

[0028] 于患毛滴虫病鸽口腔中采集口腔黏液及鼻窦黄白色分泌物,接种于5mL肝浸汤培养基(毛滴虫培养基见表1)中,置于37℃恒温培养箱中培养。取体外稳定培养3代的鸽毛滴虫进行分步离心,筛除死亡及活力不强的虫体,与肝浸汤按照1:50比例混合。

[0029] 将DZ04001菌液用含有体积分数为0.2%吐温—80的肝浸汤培养基配制成一定浓度备用。试验分为药物组和空白组,其中药物组以1.0×10^6CFU为初始值梯度加入DZ04001菌液;空白组不加药,其余因素同于药物组。每个试验组设3个平行对照,且鸽毛滴虫的终浓度为2×10^5个/mL。将药物组和空白组置于37℃恒温培养箱中培养。分别于恒温培养6、12、24和36h,取样用血球计数板计数并计算鸽毛滴虫的死亡率。光学显微镜下可明显看到毛滴虫在血球计数板上的活力状况,获得DZ04001菌液抗鸽毛滴虫的活菌最低含量6.25×10^4CFU。

[0030] 动物回归性试验确定安全剂量范围:分别以以下剂量(表2)DZ04001菌液注射30只昆明鼠于腹腔注射5h后,观察小鼠情况,结果见表2:

[0031] 表2:注射结果

[0032]

序号	A	B	C	D	E	F
菌液剂量(CFU)	6.25×10^4	6.25×10^5	6.25×10^6	6.25×10^7	6.25×10^8	0
小鼠数量(只)	6	6	6	6	6	6

[0033] A、B及F组小鼠未出现异常;C组小鼠出现食欲废绝,未出现死亡;D组小鼠出现精神萎靡,个别出现死亡;E组小鼠,眼部有透明液体流出,8h后全部死亡。同时,对小鼠进行剖检,A、B及F组小鼠无明显病理变化;C、D组小鼠出现肠道鼓气;E组小鼠出现肠道整体出血,鼓气,肝脏有大面积白色坏死。因此,安全菌液剂量范围在6.25×10^4至6.25×10^5CFU。

[0034] 药敏试验结果显示:分离株对卡那霉素、链霉素、阿米卡星、新霉素等药物敏感,对青霉素、庆大霉素等耐药。

[0035] 菌液最佳剂量确定:

[0036] 确诊感染毛滴虫肉鸽42羽,随机分为7组,按表3自由饮水给药,5d后统计成活率(成活鸽数/每组动物数量×100%),同时检查口腔黏液寄生虫情况。

[0037] 表3:试验分组情况

[0038]

分组	试验动物数量	是否用药	用药品种	菌液剂量(CFU)	用药剂量

A	6羽	否	/	/	/
B	6羽	是	本发明菌液	6.25×10^4	0.2mL/L
C	6羽	是	本发明菌液	1.0×10^5	0.2mL/L
D	6羽	是	本发明菌液	1.5×10^5	0.2mL/L
E	6羽	是	本发明菌液	3.0×10^5	0.2mL/L
F	6羽	是	本发明菌液	4.5×10^5	0.2mL/L
G	6羽	是	本发明菌液	6.25×10^5	0.2mL/L

[0039] 试验结果如表4,菌液剂量为6.25×10^4-1.0×10^5CFU时,病鸽成活率50%～67%,精神状态明显好转,采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阳性;菌液剂量为1.5×10^5CFU时,病鸽成活率83%,精神状态明显好转,食欲恢复,采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阴性;菌液剂量为3.0×10^5CFU～6.285×10^5CFU时,病鸽成活率100%,精神状态明显好转,食欲恢复,羽毛变光泽,采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阴性。上述内容表明,D组至G组毛滴虫检测阴性,E组至G组成活率100%,E组为最低治愈菌液浓度。

[0040] 表4:用药结果

[0041]

分组	A	B	C	D	E	F	G
成活率	0	50%	67%	83%	100%	100%	100%
毛滴虫	+	+	+	-	-	-	-

[0042] 实施例1

[0043] 将廊坊某鸽场确诊感染毛滴虫的90羽肉鸽和同一养殖场的30羽经检查无寄生虫的肉鸽,按表5自由饮水给药,5d后统计成活率(成活鸽数/每组动物数量×100%),同时检查口腔黏液寄生虫情况。

[0044] 表5:试验分组情况

[0045]

分组	试验动物数量	感染寄生虫	是否用药	用药品种	用药剂量
A	30羽	否	否	/	/
B	30羽	是	否	/	/
C	30羽	是	是	甲硝唑溶液	0.2mL/L
D	30羽	是	是	本发明菌液（3.0×10^5CFU）	0.05mL/L
E	30羽	是	是	本发明菌液（3.0×10^5CFU）	0.1mL/L
F	30羽	是	是	本发明菌液（3.0×10^5CFU）	0.2mL/L
G	30羽	是	是	本发明菌液（3.0×10^5CFU）	0.3mL/L

[0046] 表6:用药结果

[0047]

分组	A	B	C	D	E	F	G
成活率	100%	10%	90%	93%	97%	100%	100%
毛滴虫	-	+	-	+	-	-	-

[0048] 试验结果如表6所示,使用甲硝唑溶液及本发明菌液后,病鸽死亡率明显降低,同时均能很好抑制毛滴虫生长繁殖。0.2mL/L为3.0×10^5CFU菌液最低有效应用量,可代替抗

生素使用。

[0049] 实施例2

[0050] 宝坻某养殖户饲养的500羽后备鸽,经实验室检查确诊为毛滴虫病。病鸽口、咽、喉等部位黏膜出现黄色纽扣状沉着物为特征的疾病,病程9d,共死亡165只,死亡率达33%。同时,病鸽出现吞咽和呼吸困难,精神沉郁,羽毛松乱,食欲下降,排黄绿色稀粪。

[0051] 按照3.0×10^5CFU的剂量,0.2mL/L兑水连续应用本发明菌液,第5天鸡群停止死亡,精神状态明显好转,第8天食欲恢复,羽毛变光泽,第11天采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阴性。

[0052] 实施例3

[0053] 廊坊某养殖户饲养的12日龄雏乌鸡自3日龄开始发病,患鸡精神沉郁,羽毛松乱、垂翅,食欲不振,排白色米汤样粪便,个别雏鸡排绿色稀便,有的雏鸡排便时发出尖叫。病程1~3天,病雏生长缓慢,消瘦,衰竭死亡。病鸡剖检后,刮取肠道结节置于载玻片上,滴加生理盐水加上盖玻片,镜下可见毛滴虫活虫体,结合临床症状,经进一步诊断确诊为毛滴虫病。

[0054] 按照3.0×10^5CFU的剂量,0.3mL/L兑水连续应用本发明菌液,第3天鸡群停止死亡,精神状态明显好转,第5天食欲恢复,羽毛变光泽,第7天采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阴性。

[0055] 实施例4

[0056] 江苏省盱眙县某养殖户饲养的500只草鸡,经实验室检查确诊为毛滴虫病,病鸡陆续发生采食量下降、精神萎靡、消瘦、呼吸困难、拉淡黄色或淡绿色稀粪现象。

[0057] 按照3.0×10^5CFU的剂量,0.3mL/L兑水连续应用本发明菌液,第4天鸡群精神明显好转,基本不会再发生死亡病例,第5天食欲恢复,第7天采集口腔壁黏液,镜检滴虫呈阴性。

[0058] 除实施例1-4以外,对不同地区的多个有球虫病感染的病鸡养殖场、病鸽养殖场场进行了病鸽的治疗,分别按照2.0×10^5CFU、2.5×10^5CFU、3.5×10^5CFU、3.5×10^5CFU、4.0×10^5CFU、4.5×10^5CFU的剂量进行喂食,喂食过程和实施例1~实施例4相同,病禽在第3-5天停止死亡,第5-7天精神、食欲逐渐恢复,7天后毛滴虫镜检呈阴性。