



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107073049 B

(45) 授权公告日 2021.12.14

(21) 申请号 201580057157.0

专利权人 莱昂大学

(22) 申请日 2015.10.21

(72) 发明人 佩德罗·米格尔·鲁维奥·尼斯特
安娜·玛利亚·卡瓦哈尔·乌鲁埃
尼亚

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107073049 A

玛尔塔·加西亚·迪兹

(43) 申请公布日 2017.08.18

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

(30) 优先权数据
14382412.6 2014.10.21 EP

代理人 肖善强

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.04.20

(51) Int.Cl.

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/074375 2015.10.21

G12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/062771 EN 2016.04.28

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

(56) 对比文件

CECT 8166 2012.06.20

WO 2014049023 A1,2014.04.03

CECT 8165 2012.06.20

EP 1997499 A1,2008.12.03

CECT 8164 2012.06.20

Byeong Joo Seo等.bile tolerant

CECT 8163 2012.06.20

lactobacillus reuteri isolated from pig

CECT 8347 2013.05.16

feces inhibits enteric bacterial

CECT 8348 2013.05.16

pathogens and porcine rotavirus.《Vet Res

CECT 8349 2013.05.16

Commun》.2010,323-333.

CECT 8350 2013.05.16

CECT 8700 2014.09.10

审查员 罗洋

(73) 专利权人 阿曲龙CYL有限公司

地址 西班牙莱昂市

权利要求书2页 说明书33页 附图2页

(54) 发明名称

益生菌和益生元组合物

品或组合物,可促进动物生长并可增加动物重
量。所述化合物或组合物还可预防或治疗感染。

(57) 摘要

本发明涉及可有益于畜牧业的产品和组合
物。所述产品和组合物包含微生物,例如细菌,尤
其是益生菌。因此,本发明提供微生物菌株,以
及使有技能的读者能够找到在本发明中有用的
其它菌株的选择标准。菌株以及包含其的组合物
可被施用至动物、养殖动物例如特别是猪。施用
可发生在生命的头几天。通过施用本发明所述产

1. 组合物, 其至少包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株。

2. 根据权利要求1的组合物, 其另外包含至少一种微生物菌株, 其中每种另外的菌株均具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性: (i) 对于 *Salmonella*, 抑制区为10mm或更大; (ii) 对于 *Listeria monocytogenes*, 抑制区为9mm或更大; (iii) 对于 *Staphylococcus aureus*, 抑制区为9mm或更大; (iv) 对于 *Escherichia coli*, 抑制区为10mm或更大。

3. 根据权利要求2的组合物, 其中所述至少一种另外的菌株选自属于 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus* 和/或 *Weissella* 属的菌株。

4. 根据权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述组合物另外包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。

5. 根据权利要求4的组合物, 其中所述组合物包含两种微生物菌株, 且其中所述两种微生物为保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株和保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。

6. 根据权利要求5的组合物, 其中两种菌株在所述组合物中以2:1-1:2的比例存在, 其中所述比例以菌落形成单位 (CFU) 计算。

7. 根据权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述组合物中所包含的至少一种菌株无抗生素抗性。

8. 根据权利要求7的组合物, 其中所述组合物中所包含的所有菌株无抗生素抗性。

9. 根据权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述组合物中所包含的至少一种菌株在 pH 3.5 下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力, 其中如果菌株与孵育前的CFU相比在 pH 3.5 下孵育3小时后有至少50%CFU, 则所述菌株能够基本保持相同的生存力。

10. 根据权利要求9的组合物, 其中所述组合物中所包含的所有菌株在 pH 3.5 下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力, 其中如果菌株与孵育前的CFU相比在 pH 3.5 下孵育3小时后有至少50%CFU, 则所述菌株能够基本保持相同的生存力。

11. 根据权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述组合物中所包含的至少一种菌株在 0.45% 胆汁提取物存在下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力, 其中如果菌株与孵育前的CFU相比在 0.45% 胆汁提取物存在下孵育4小时后有至少50%CFU, 则所述菌株能够基本保持相同的生存力。

12. 根据权利要求11的组合物, 其中所述组合物中所包含的所有菌株在 0.45% 胆汁提取物存在下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力, 其中如果菌株与孵育前的CFU相比在 0.45% 胆汁提取物存在下孵育4小时后有至少50%CFU, 则所述菌株能够基本保持相同的生存力。

13. 根据权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述组合物中所包含的至少一种菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的所有下述抗微生物活性: (i) 对于 *Salmonella*, 抑制区为10mm或更大; (ii) 对于 *Listeria monocytogenes*, 抑制区为9mm或更大; (iii) 对于 *Staphylococcus aureus*, 抑制区为9mm或更大; (iv) 对于 *Escherichia coli*,

抑制区为10mm或更大。

14. 根据权利要求13的组合物,其中所述组合物中所包含的所有菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的所有下述抗微生物活性:(i) 对于*Salmonella*,抑制区为10mm或更大;(ii) 对于*Listeria monocytogenes*,抑制区为9mm或更大;(iii) 对于*Staphylococcus aureus*,抑制区为9mm或更大;(iv) 对于*Escherichia coli*,抑制区为10mm或更大。

15. 组合物在制备用于在动物和/或人中治疗或预防由病毒感染引起的腹泻的药物中的用途,所述组合物包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株和保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株的混合物,并任选地包含至少一种属于*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus*和/或*Weissella*属的微生物,其中所述微生物具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性:(i) 对于*Salmonella*,抑制区为10mm或更大;(ii) 对于*Listeria monocytogenes*,抑制区为9mm或更大;(iii) 对于*Staphylococcus aureus*,抑制区为9mm或更大;(iv) 对于*Escherichia coli*,抑制区为10mm或更大,以及其中所述属于*Lactobacillus*属的微生物不是*Lactobacillus fermentum* CECT 8347 (AqSynJ12) 或*Lactobacillus mucosae* CECT 8349 (AqSynJ55)。

16. 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株。

17. 权利要求1-14的任一项组合物在制备用于在动物和/或人中治疗或预防由病毒感染引起的腹泻的药物中的用途。

益生菌和益生元组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及可用于处理人和/或动物的益生菌和包含益生菌的组合物。

背景技术

[0002] 初生动物以及尤其是(密集)养殖的初生动物易于被细菌和其它感染,例如病毒感染。这些感染可导致与体重减轻相关的腹泻,在严重情况下甚至导致初生动物死亡。例如,几年前,西班牙不同地理位置的猪农场中已描述了初生小猪的腹泻病例。认为所述腹泻是这些动物的症状,然而,所述症状的诱发因素有时很难查找。在许多例如初生猪中的腹泻情况下,可以分离到单独的或者与*Clostridium perfringens*或*Clostridium difficile*联合的可能不利的/不期望的细菌菌株(例如*Escherichia coli*),但腹泻通常在出生后不久发现且常规治疗和预防程序常常无效。在其它情况下,腹泻由例如病毒感染(例如由轮状病毒、冠状病毒、诺如病毒、腺病毒和/或星状病毒引起的感染)引起。

[0003] 不希望受限于任何特定理论,认为菌态不平衡(也被称为菌群失调)可以是诱发因素。菌态不平衡指的是身体上或身体内微生物失衡的状态。在养殖动物(尤其是猪)中,菌态不平衡可由在母猪喂养期间滥用抗生素,从而使初生小猪的肠道菌群改变引起。

[0004] 鉴于使用抗生素的这些缺点,建议减少在畜牧业中使用抗生素。另一方面,如此则将需要处理初生动物的替代性方法来替代通常使用的抗生素。

[0005] 因为EU从2005年开始建议减少使用抗生素作为养猪业的生长促进剂(被2005年3月4日的规章(EC) 编号378/2005修正),所以动物饲养者需要能够改善(农场)动物(尤其在生命早期)的一般健康状况的替代物。本发明人提供了这个问题的解决方案,所述解决方案将在下文中被描述。因此,本发明解决了一些由现有技术方法引起的问题,其有利效果将在下文详述。

[0006] 发明概述

[0007] 在第一方面,本发明涉及组合物,其至少包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69)的菌株。

[0008] 此外,本发明涉及用于处理人或动物的方法中的组合物,所述组合物包含属于*Lactobacillus plantarum*和*Lactobacillus reuteri*种的微生物的混合物,并任选地包含至少一种属于*Lactobacillus* (优选地,除了属于*Lactobacillus fermentum*和*Lactobacillus mucosae*种的微生物之外;优选地,这些微生物分别为CECT 8347 (AqSynJ12) 和CECT 8349 (AqSynJ55))、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus*和/或*Weissella*属的微生物。

[0009] *Lactobacillus fermentum* CECT 8347 (AqSynJ12) 和*Lactobacillus mucosae* CECT 8349 (AqSynJ55) 由阿曲龙CYL有限公司于2013年5月16日保藏在CECT(西班牙典型培养物保藏中心,Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)),巴伦西亚大学,巴伦西亚

大学科学园,Catedrático Agustín Escardino,9,46980巴特纳(巴伦西亚,西班牙))。

[0010] 在一种优选的实施方式中,本发明的组合物包含两种乳酸菌,其为CECT 8700 (AqSynRMH69) 和CECT8350 (AqSynJ59),其由阿曲龙CYL有限公司保藏在CECT (Colección Española de Cultivos Tipo (CECT),巴伦西亚大学,巴伦西亚大学科学园,Catedrático Agustín Escardino,9,46980巴特纳(巴伦西亚,西班牙))。

[0011] 在一个实施方式中,本发明组合物中的每种菌株至少满足下述条件a.,优选地条件a.和b.二者,最优选地全部条件a.、b.和c.:

[0012] a.显示由至少1种下述抑制区(inhibition zone)证明的抗微生物活性:(i) 对于Salmonella,10mm或更大,例如13mm或更大;(ii) 对于Listeria monocytogenes,9mm或更大,优选地10mm或更大;(iii) 对于Staphylococcus aureus,9mm或更大,优选地10mm或更大;(iv) 对于Escherichia coli,10mm或更大,例如18mm或更大;

[0013] b.在pH=3.5或者pH=2.5下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力(viability);

[0014] c.在0.45%胆汁提取物的存在下优选地在pH=8下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0015] “有生存力的生物体”可被定义为活的生物体及其任何生命阶段。因此,“能够保持基本相同的生存力”的菌株可表示在某些条件下能够存活并保持活力的菌株,例如,暴露于某些条件(例如在pH=3.5下或者在pH=2.5下孵育3小时,和/或在0.45%胆汁提取物的存在下优选地在pH=8下孵育4小时)之后,50%或更多CFU,例如50%或60%或70%或75%或80%或95%、99%或更多CFU、例如100%CFU有活力(有生存力)。

[0016] 本发明组合物的任何变体均可用于处理人或动物的方法中,例如用于治疗或预防腹泻的方法中。在这种情况下,腹泻可由细菌感染引起。此外,腹泻可由病毒感染引起。另外或替代性地,用于治疗人或动物的方法中的本发明组合物的任何变体可用于增加初生哺乳动物(优选小猪)的重量。所述组合物可以施用至哺乳动物,优选地施用至初生哺乳动物,优选地施用至初生动物,更优选地施用至小猪。

[0017] 本发明还提供微生物,优选细菌,更优选乳酸菌。本发明所提供的微生物是菌株CECT 8700 (AqSynRMH69),其由阿曲龙CYL有限公司于2014年9月10日保藏在CECT (西班牙典型培养物保藏中心,Colección Española de Cultivos Tipo (CECT),巴伦西亚大学,巴伦西亚大学科学园,Catedrático Agustín Escardino,9,46980巴特纳(巴伦西亚,西班牙))。

[0018] 可以与每种菌株同义使用的括号中的AqSyn编号由本发明的发明人分配给菌株。

[0019] 优选地,本发明的组合物包含菌株CECT8700 (AqSynRMH69) 和至少一种其它菌株。优选地,所述至少一种其它菌株选自属于Lactobacillus(优选地,除了属于Lactobacillus fermentum和Lactobacillus mucosae种的微生物之外;优选地,这些微生物分别为CECT 8347 (AqSynJ12) 和CECT8349 (AqSynJ55))、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的菌株。

[0020] 在一种优选的实施方式中,组合物包含至少以下菌株或者由至少以下菌株组成:CECT8700 (AqSynRMH69) 和CECT8350 (AqSynJ59)。任选地,组合物可包含其它菌株。优选地,

组合物不包含任何其它菌株。因此,优选的组合物包含由CECT8700 (AqSynRMH69) 和 CECT8350 (AqSynJ59) 组成的微生物(即组合物包含以下微生物:CECT8700 (AqSynRMH69) 和 CECT8350 (AqSynJ59),并且其可以包含不是微生物的其它组分)。

[0021] 优选地,如下文更详细描述的那样,本发明的组合物中所含的微生物具有抗生素抗性。

[0022] 在任何一种情况下,“包含”可被任选地理解为:存在其它细菌菌株,或不存在其它细菌菌株。即使不存在其它细菌菌株,“包含”可任选地表示:存在其它成分,即不同于细菌的任何成分。

[0023] 菌株CECT 8350 (AqSynJ59) 由阿曲龙CYL有限公司于2013年5月16日保藏在CECT (西班牙典型培养物保藏中心,Colección Española de Cultivos Tipo (CECT),阿曲龙CYL有限公司,Catedrático Agustín Escardino,9,46980巴特纳(巴伦西亚,西班牙))。

[0024] 术语“治疗”或“疗法”包括治疗疾病的预防方法和治愈方法二者,因为二者都是旨在维持或恢复健康。不考虑疼痛、不适或机能不全的起因,通过施用适当的药剂,其缓解应被视为本申请上下文中使用的疗法或治疗用途。

[0025] 在一些实施方式中,本发明的组合物(在任何所述实施方式中)可用于例如处理人或动物的方法中,例如用于增加初生哺乳动物的重量和/或治疗或预防腹泻的方法中和/或用于促进初生哺乳动物生长的方法中。优选地,组合物可用于处理动物的方法中,例如用于增加初生哺乳动物的重量和/或治疗或预防腹泻的方法中和/或用于促进初生哺乳动物生长的方法中,所述初生哺乳动物为例如初生小猪。腹泻可由细菌感染和/或病毒感染引起(即,细菌感染和/或病毒感染可以是初生哺乳动物腹泻的原因)。

[0026] 本发明的组合物特别适用于治疗或预防如上所述的哺乳动物中的病症,例如腹泻和/或感染,例如细菌感染和/或病毒感染。在一些实施方式中,所述病症可选自由细菌感染(包括大肠杆菌症)引起的腹泻、Clostridium difficile初生腹泻、Clostridium perfringens A和C型。在一些实施方式中,所述病症可选自由病毒感染引起的腹泻,所述病毒感染例如轮状病毒感染、冠状病毒感染、诺如病毒感染、腺病毒感染和/或星状病毒感染,优选轮状病毒感染和/或冠状病毒感染。还可以向患腹泻的动物施用所述组合物,即使(尚)未证明(细菌和/或病毒)感染是所述腹泻的诱发因素。也可以在动物具有任何腹泻和/或感染之前施用本发明的组合物,以防止腹泻和/或感染。

[0027] 附图简述

[0028] 图1:抑制区,示例性实例。

[0029] 图2:呈现腹泻的窝的%。

[0030] 图3:经处理窝的%。

[0031] 发明的详细公开内容

[0032] 以下详细描述公开了本发明各特征的特定和/或优选变化形式。本发明还考虑了作为特别优选的实施方式的通过组合关于本发明的两种或更多种特征描述的两种或更多种特定和/或优选变化形式而产生的那些实施方式。

[0033] 除非另外清楚指出,术语“包含”在本文件的语境中被用来表示:除了通过“包含”被引入的成员列表之外,其它成员可任选地存在。然而,作为本发明的一个特定实施方式考虑,术语“包含”涵盖其它成员不存在的可能性,即,为了这个实施方式的目的,“包含”应被

理解为具有“由……组成”的含义。

[0034] 除非另外清楚指出,本申请中的所有相对量表示均基于重量/重量。由通用术语表征的组分的相对量表示意指由所述通用术语涵盖的所有具体变化形式或成员的总量。如果由通用术语界定的某一组分被指定以某一相对量存在,且如果这种组分还被表征为所述通用术语涵盖的具体变化形式或成员,那么这表示:不额外存在所述通用术语涵盖的其它变化形式或成员以至于所述通用术语涵盖的组分的总相对量超过指定的相对量;更优选地根本不存在所述通用术语涵盖的其它变化形式或成员。

[0035] 在本文中使用时,术语“约”表示其值的指示值 $\pm 1\%$,或者术语“约”表示其值的指示值 $\pm 2\%$,或者术语“约”表示其值的指示值 $\pm 5\%$,术语“约”表示其值的指定值 $\pm 10\%$,或者术语“约”表示其值的指示值 $\pm 20\%$,或术语“约”表示其值的指示值 $\pm 30\%$;优选地,术语“约”精确地表示指示值($\pm 0\%$)。

[0036] 本发明整合了益生菌和益生元的概念,从而提供合生元(synbiotics)。本发明人打开了具有免疫调节剂效果的细菌和组合物的新的治疗窗。本发明的微生物或组合物可在动物(例如小猪)的生命早期阶段被施用。因此,本发明涉及可有益于畜牧业的产品和组合物。由实施例证明的真正重要的观察为:在生产方面,与抗生素处理相比,益生菌处理至少同样有效,并极可能更好(与标准抗生素处理相比)。由于处理的总成本以及法律压力 and 环境影响二者,本发明人的贡献具有巨大经济效益。

[0037] 根据本发明可被使用的微生物(优选地细菌)是具有有益效果的微生物。它们优选地是乳酸菌。根据本发明甚至可使用非细菌的微生物物种,只要它们符合下列选择标准a.到c.。例如,已知一些酵母也可具有益生性能。

[0038] 虽然本文所述功能参数是最重要的选择标准,但就所涉及的微生物物种而言,乳酸菌是优选的。乳酸菌(LAB)包含革兰氏阳性耐酸细菌的进化枝,它们因它们的共有代谢和生理特征相关。这些细菌被天然地发现于分解的植物和乳产品以及动物排泄物中,它们产生乳酸作为碳水化合物发酵的主要代谢终产物。由于乳酸菌在食物中的普遍存在以及它们对哺乳动物黏膜表面的健康微生物群落的贡献,它们通常被认为是安全的(GRAS状态)。乳酸菌优选地选自Lactobacillus,Leuconostoc,Pediococcus,Lactococcus,Streptococcus,Aerococcus,Carnobacterium,Enterococcus,Oenococcus,Sporolactobacillus,Tetragenococcus,Vagococcus,和Weissella属。Lactobacillus和/或Enterococcus可以是优选的。Lactobacillus是优选的。在本发明的一种实施方式中,属于Lactobacillus fermentum和Lactobacillus mucosae种的微生物可不存在于本发明的组合物中。特别地,在本发明的一种实施方式中,属于Lactobacillus fermentum CECT 8347(AqSynJ12)和Lactobacillus mucosae CECT 8349(AqSynJ55)的微生物可不存在于本发明的组合物中。

[0039] 本文中优选的细菌优选地为革兰氏阳性和过氧化氢酶阴性。可根据本领域已知的标准技术检测细菌是否为革兰氏阳性。革兰氏染色法包括连续地用不同“着色剂”(染色剂)染色并洗涤样品以检查其为阳性或阴性。如下所述检测细菌是否为过氧化氢酶阴性:过氧化氢酶试验涉及将过氧化氢加入到培养样品或琼脂斜面上。如果目标细菌产生过氧化氢酶,那么它们将转变过氧化氢并将产生氧气。气体的产生导致形成泡沫,这些泡沫是阳性试验的指示(过氧化氢酶阳性细菌)。

[0040] 本文中优选的乳酸菌优选地能够在MRS(Man Rogosa Sharpe)培养基,更优选地在

酸化MRS琼脂中生长,如下所述。MRS培养基被创造以促进乳酸菌,尤其是Lactobacillus sp.的生长。其被认为不利于绝大部分革兰氏阴性细菌的生长。然而,不同于乳酸菌的其它细菌可最终在MRS上生长,因此建议或甚至必须核实菌落属于革兰氏阳性和为过氧化氢酶阴性细菌。

[0041] 本文中优选的乳酸菌可以是益生菌。“益生菌”最普遍接受的定义在1998年由Fuller给出,Fuller将它描述为“通过改善宿主动物的肠道微生物平衡有益影响宿主动物的活的微生物饲料补充物”。益生菌通常是活的微生物。认为不同益生菌在肠中具有不同作用,因此不同益生菌可一起作用从而提供有益效果。其它来源将益生菌定义为对人类或动物的健康益处已被证明的那些微生物。”Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria”,联合国粮农组织和世界卫生组织,2001,科多巴,阿根廷中公开了益生菌的选择标准。使用活细菌的优点已被广泛描述。

[0042] 近些年,“益生元”的概念被引入;益生元是不可消化的食物组分,其增强胃肠道中特定微生物的生长。“合生元”是包含至少1种益生菌和至少1种益生元的组合物。这种组合物被理解为促进有益细菌(例如益生菌)的生长。作为示例性实例,发酵的乳制品常常被认为是合生元,因为它们含有活细菌以及活细菌需要的食物来源。虽然与益生元和益生菌相关的益处是有利的,但研究者对于得出一般性结论很谨慎,因为益处因摄入的益生菌和益生元的类型和量以及特定益生菌与特定益生元的特定组合而异。因此,强效合生元基于特定益生菌菌株与仔细选择的益生元的组合。它们能够对哺乳动物产生重要的健康益处。

[0043] 特定益生菌、益生元和合生元已被建议供人类使用,益生菌的选择标准在例如”Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria”,联合国粮农组织和世界卫生组织,2001,科多巴,阿根廷中被公开。

[0044] 本发明使用微生物,尤其是细菌,其具有显示出对动物(尤其是农场动物)的健康益处的能力。优选地,动物是驯养的、家养动物或其本身不是驯养的或家养的(即野生的)但属于驯养动物的相同物种或属的动物。例如,野生猪会被包括在这个定义中,因为它属于驯养猪的相同物种。可被处理的驯养动物的一些实例包括但不限于狗、猫和其它宠物、马、牛、鸡和其它禽类、猪、绵羊、山羊。优选地,动物是农场动物,农场动物包括但不限于马、牛、鸡和其它禽类、猪、绵羊、山羊。更优选地,动物来源于Suina亚目。Suina亚目(也被称为Suiformes)是哺乳动物的品系,其包括Suidae和Tayassuidae科的猪和野猪。野生的或驯养的猪可以是特别优选的。

[0045] 可如下所述鉴定适用于本发明的菌株(即,可包含在本发明组合物中的菌株)。

[0046] 获得本发明菌株的第一步:分离单菌株

[0047] 在第一步中,分离含微生物(优选地细菌)的样品。任何微生物来源可以是合适的,最广义地说,其可以是任何来源于自然的未经灭菌的样品。所述来源可以来自(驯养)动物,例如来自生命头30天的年幼动物,或者来自它们的母亲。或者,来源可来自野生动物(例如野生野猪),例如从捕获的野生野猪收集的样品。合适的来源包括来自母亲动物(例如母猪)

的初乳,来自初生动物(例如小猪)的胎便样品、来自驯养或野生动物的肠壁洗涤物或天然肠乳酸菌。可使样品中所含的微生物(例如细菌)在本领域公知适合肠道微生物生长的生长培养基(例如MRS培养基)上生长。可将微生物划线,这将能够分离单菌落。可挑取单菌落并使各个菌株在合适的生长培养基(例如与最初使用的培养基相同)上进一步繁殖。

[0048] 任选地,通过本领域已知方法利用革兰氏染色检验这些单菌落的菌株(并选择革兰氏阳性菌株),和/或如上所述检验过氧化氢酶活性的存在(并选择过氧化氢酶阴性菌株)。

[0049] 获得本发明菌株的第二步:体外试验

[0050] 为了被选择为对本发明有用,微生物菌株(优选地来源于上述第一步)必须满足下述标准中的至少一种,所述标准先在此处列出并将在下文详述:

[0051] a. 抗不期望细菌的活性;

[0052] b. 耐酸性;

[0053] c. 胆汁盐耐受性;

[0054] 项目a.到c.代表优先性;即最期望的是满足标准a.,第二最期望的是满足标准a.和b.,最优选的是满足标准a.到c.全部。下文详述了选择标准。

[0055] a. 抗不期望细菌的活性

[0056] 进行抗不期望细菌的体外筛选。“不期望”的是选择下列一种或更多种的细菌: *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*和*Escherichia coli*。优选地,*Salmonella*物种是*Salmonella enterica*,更优选地*Salmonella enterica*血清型Typhimurium。

[0057] 根据下述菌苔斑点试验(spot on lawn test)检验抗不期望细菌的活性。将待被检验的每种菌株的液体过夜培养物(MRS)在MRS琼脂上涂布为10 μ l的单个斑点并在厌氧条件下在30℃孵育24小时。孵育之后,用7ml接种有一种不期望细菌(1%;100ml培养基中1ml过夜培养物)的半固体BHI琼脂(0.7%)覆盖平板。含一种待被检验的特定菌株的不同平板分别被一种不期望的细菌物种覆盖。每个这种试验一式三份进行。在处于或者接近不期望细菌的最佳生长温度(本文中涉及的每种不期望细菌的最佳生长温度在本领域已知)下孵育24小时之后,检验样品的抑制证据。为了达到这个目的,首先核实是否存在抑制区。如果存在,则光学测量抑制区的直径。如果抑制区显示为不精确的圆形,那么按照测量抑制区的最短直径的规则来进行抑制区的测量。最后,确定一式三份实验的算术平均值并核实其是否满足下述标准。

[0058] 标准:为了被选择为阳性,菌株必须满足下述条件[(i),(ii),(iii),(iv)]中的至少一种:

[0059] (i) 对于*Salmonella*,抑制区为10mm或更大,例如13mm或更大。

[0060] (ii) 对于*Listeria monocytogenes*,抑制区为9mm或更大,例如10mm或更大。

[0061] (iii) 对于*Staphylococcus aureus*,抑制区为9mm或更大,例如10mm或更大。

[0062] (iv) 对于*Escherichia coli*,抑制区为10mm或更大,例如18mm或更大。

[0063] 9mm或更大包括10mm或更大,11mm或更大,12mm或更大,13mm或更大,14mm或更大,15mm或更大,16mm或更大,17mm或更大,18mm或更大,19mm或更大,20mm或更大,21mm或更大,22mm或更大,23mm或更大,24mm或更大,25mm或更大,26mm或更大,27mm或更大,28mm或更大,

29mm或更大,30mm或更大,31mm或更大,32mm或更大,33mm或更大,34mm或更大,35mm或更大。

[0064] 10mm或更大包括11mm或更大,12mm或更大,13mm或更大,14mm或更大,15mm或更大,16mm或更大,17mm或更大,18mm或更大,19mm或更大,20mm或更大,21mm或更大,22mm或更大,23mm或更大,24mm或更大,25mm或更大,26mm或更大,27mm或更大,28mm或更大,29mm或更大,30mm或更大,35mm或更大。

[0065] 13mm或更大包括14mm或更大,15mm或更大,16mm或更大,17mm或更大,18mm或更大,19mm或更大,20mm或更大,19mm或更大,20mm或更大,25mm或更大,30mm或更大。

[0066] 18mm或更大包括19mm或更大,20mm或更大,21mm或更大,22mm或更大,23mm或更大,24mm或更大,25mm或更大,26mm或更大,27mm或更大,28mm或更大,29mm或更大,30mm或更大,35mm或更大。

[0067] 也可以根据上述标准检验含若干菌株的组合物,为了被选择为适合本文所述的任意用途,这种组合物必须满足标准[(i),(ii),(iii),(iv)]中的至少一种、更优选地全部。还可以预期:可通过组合每种均满足标准(i),(ii),(iii),(iv)中的至少一种的单个微生物菌株来合适地制备这种组合物;但必须通过实验检验情况是否确实如此。

[0068] 或者,可使用琼脂孔扩散试验(agar well diffusion assay)来测定抑制区。这个方法消除任何痕量乳酸,所述乳酸可产生于低葡萄糖MRS培养液中,其通过中和无细胞上清液进行。通过离心(5000g/20分钟/4℃)收获在厌氧条件下生长的待被检验的稳定期物种培养物,然后用1M NaOH将无细胞上清液的pH调节至6.5。将上清液过滤灭菌(0.20mm; Millipore有限公司,Hertfordshire,英国)。将无细胞上清液(30μl)加入到在琼脂平板中切出的7mm直径孔中,其中接种有[约] 10^5 菌落形成单位(CFU)/ml的(i),(ii),(iii),(iv)中所列出的不期望细菌。然后在30℃下孵育琼脂平板24小时。测量孔周围的抑制区的直径,选择标准如上文(i),(ii),(iii),(iv)中所示,将被选择为阳性的菌株必须满足其中的至少一种。

[0069] 供参考的是:上述试验基于Kawai等人,2004.Applied and Environmental Microbiology 70(5):2906-2911;Dortu等人2008.Letters in Applied Microbiology, 47:581-586;Hata等人,2009.International Journal of Food Microbiology,37:94-99, Awaisheh 2009.Food Pathogens and Disease 6(9):1 125-1 132.)已描述的内容。

[0070] b.耐酸性

[0071] 酸可被视为模仿胃液,可如下所述检验对其的耐受性。将100μl $6-8 \times 10^8$ CFU/ml的每种菌株在MRS中的初始悬浮物悬浮在通过加入恰当量的12N HCl被酸化的酸化MRS(pH=3.5,或者pH=2.5)中,并在110rpm搅拌条件下在37℃孵育。在0小时、3小时和6小时时通过菌落计数(CFU/ml)检验样品。可以使用本领域技术人员已知的检验耐酸性的任何其它方法。

[0072] 标准:在所述培养基中的3小时孵育期间,菌株必须能够保持基本相同的生存力(与试验之前相比,试验之后至少50%,或至少55%,或至少60%,或至少70%,或至少75%,或至少80%,或至少95%的CFU,最优选地与试验之前相比,试验之后至少50%的CFU)。供参考的是:Huang等人,International Journal of Food Microbiology 91:253-260简述了类似的实验流程。

[0073] c.胆汁盐耐受性

[0074] 模拟哺乳动物的天然小肠条件。

[0075] 可如下所述检验胆汁盐耐受性：将 $100\mu\text{l}$ $6-8 \times 10^8 \text{CFU/ml}$ 的细菌菌株在MRS中的初始悬浮物悬浮在模拟的小肠溶液（例如 $\text{pH}=8$ 的MRS（通过加入NaOH来调节 pH ）和0.45%胆汁提取物（胆汁提取物，猪.B8631-100G.SIGMA-ALDRICH））中，并在110rpm搅拌条件下在 37°C 孵育。在1小时、2小时和4小时通过菌落计数（ CFU/ml ）检验样品。可以使用本领域技术人员已知的检验胆汁盐耐受性的任何其它方法。

[0076] 标准：暴露于模拟的小肠液（0.45%胆汁盐，任选地 $\text{pH}=8$ ）4小时之后，不损失生存力（或基本不损失生存力，即优选地50%或更多 CFU ，例如50%，或60%，或70%，或75%，或80%，或95%或更多 CFU ）。Huang等人，International Journal of Food Microbiology 91:253-260简述了类似的实验流程。

[0077] 任选地，还可以检验根据以上标准a.到c.已被鉴定为阳性的菌株对上皮表面的粘附性和在动物（例如猪）胃肠道中的持久性。认为具有良好粘附性的菌株将表现最好。

[0078] 任选地，额外检验根据以上标准a.到c.已被鉴定为阳性的菌株的抗生素抗性谱，例如通过最低抗生素浓度试验（VetMIC微孔板试验）和/或通过对不同抗性基因进行PCR来进行的基因型抗性试验（Egervärn等人，2010.Antonie van Leeuwenhoek 97:189-200）。认为无抗生素抗性的细菌（抗性基因不存在或失活/功能丢失）最适合应用于农场动物。

[0079] 在一种优选的实施方式中，组合物中包含的至少一种菌株、优选地所有菌株满足如上所述的所有标准a.到c.。另外，关于标准a.，组合物中包含的至少一种菌株、优选地所有菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的所有下述抗微生物活性：(i) 对于Salmonella，抑制区为10mm或更大；(ii) 对于Listeria monocytogenes，抑制区为9mm或更大；(iii) 对于Staphylococcus aureus，抑制区为9mm或更大；(iv) 对于Escherichia coli，抑制区为10mm或更大。

[0080] 本发明提供组合物，其至少包含由阿曲龙CYL有限公司于2014年9月10日保藏在西班牙典型培养物保藏中心，Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)，巴伦西亚大学，巴伦西亚大学科学园，Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980巴特纳（巴伦西亚，西班牙）的保藏号为CECT8700 (AqSynRMH69)的菌株。本发明的组合物可另外包含至少一种微生物菌株，例如至少一种，或至少两种，或至少三种，或至少四种，或至少五种，或至少六种，或至少七种，或至少八种等等，其中每种另外的菌株均具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性：(i) 对于Salmonella，抑制区为10mm或更大；(ii) 对于Listeria monocytogenes，抑制区为9mm或更大；(iii) 对于Staphylococcus aureus，抑制区为9mm或更大；(iv) 对于Escherichia coli，抑制区为10mm或更大。

[0081] 组合物中包含的所述至少一种另外的菌株优选地可选自以下菌株，所述菌株属于选自Lactobacillus（优选地除了Lactobacillus fermentum（优选地CECT 8347 (AqSynJ12)和Lactobacillus mucosae（优选地CECT 8349 (AqSynJ55)之外））、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella的属。

[0082] 例如，组合物包含CECT8700 (AqSynRMH69)和至少一种、优选地一种选自CECT8163 (AqSyn04)；CECT 8165 (AqSyn06)；CECT 8164 (AqSyn09)；CECT 8166 (AqSyn10)，CECT 8347

(AqSynJ12); CECT 8348 (AqSynJ17); CECT8349 (AqSynJ55) 和 CECT8350 (AqSynJ59) 的另外的菌株; 或者组合物由上述组成。

[0083] CECT 8163 (AqSyn04); CECT 8165 (AqSyn06); CECT 8164 (AqSyn09); CECT 8166 (AqSyn10), CECT 8347 (AqSynJ12); CECT 8348 (AqSynJ17); CECT 8349 (AqSynJ55) 和 CECT 8350 (AqSynJ59) 均由阿曲龙CYL有限公司保藏在CECT(西班牙典型培养物保藏中心, Colección **Española** de Cultivos Tipo (CECT), 巴伦西亚大学, 巴伦西亚大学科学园, , Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚, 西班牙))。

[0084] CECT 8163 (AqSyn04); CECT 8165 (AqSyn06); CECT 8164 (AqSyn09) 和 CECT 8166 (AqSyn10) 于2012年6月20日保藏。CECT 8347 (AqSynJ12); CECT 8348 (AqSynJ17); CECT 8349 (AqSynJ55) 和 CECT 8350 (AqSynJ59) 于2013年5月16日保藏。

[0085] CECT 8700 (AqSynRMH69): *Lactobacillus reuteri*

[0086] CECT 8163 (AqSyn04): *Lactobacillus reuteri*

[0087] CECT 8165 (AqSyn06): *Lactobacillus reuteri*

[0088] CECT 8164 (AqSyn09): *Enterococcus faecium*

[0089] CECT 8166 (AqSyn10): *Enterococcus faecium*

[0090] CECT 8347 (AqSynJ12): *Lactobacillus fermentum*

[0091] CECT 8348 (AqSynJ17): *Lactobacillus reuteri*

[0092] CECT 8349 (AqSynJ55): *Lactobacillus mucosae*

[0093] CECT 8350 (AqSynJ59): *Lactobacillus plantarum*

[0094] 例如, 在一种优选的实施方式中, 包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT8700 (AqSynRMH69) 的菌株的本发明组合物还包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT8350 (AqSynJ59) 的菌株。所述组合物可以不包含任何另外的菌株。

[0095] 在一种更优选的实施方式中, 组合物包含两种微生物菌株。优选地, 一种菌株是 CECT8700 (AqSynRMH69)。甚至更优选地, 本发明的组合物包含两种微生物(例如两种菌株)或者由两种微生物(例如两种菌株)组成。优选地, 所述两种微生物是保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT8700 (AqSynRMH69) 的菌株和保藏在西班牙典型培养物保藏中心、保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。在这种实施方式中, 组合物可另外包含不是微生物的其它组分, 即组合物可包含其它组分(例如下文所述的组分), 但优选地组合物不包含除CECT 8350 (AqSynJ59) 和CECT8700 (AqSynRMH69) 之外的其它菌株。

[0096] 因此, 本发明的组合物可以包含微生物的混合物, 其中所述微生物属于 *Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus reuteri* 种。任选地, 本发明的组合物可另外包括至少一种属于 *Lactobacillus* (优选地, 除了 *Lactobacillus fermentum* CECT 8347 (AqSynJ12) 和 *Lactobacillus mucosae* CECT 8349 (AqSynJ55) 之外)、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus* 和/或 *Weissella* 属的微生物。任选地, 本发明的组合物可另外包括至少一种属于 *Lactobacillus* (优选地, 除了属于 *Lactobacillus fermentum* 和 *Lactobacillus mucosae* 种的微生物之外)、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus* 和/或 *Weissella* 属的微生

物。

[0097] 在一个优选的实施方式中,本发明的组合物包含微生物的混合物,其中所述混合物由至少一种*Lactobacillus plantarum*菌株和至少一种*Lactobacillus reuteri*菌株组成。在一个更优选的实施方式中,本发明的组合物包含微生物的混合物,其中所述混合物由一种*Lactobacillus plantarum*菌株和一种*Lactobacillus reuteri*菌株组成。一种优选的*Lactobacillus plantarum*菌株是CECT8350 (AqSynJ59)。一种优选的*Lactobacillus reuteri*菌株是CECT8700 (AqSynRMH69)。在一个甚至更优选的实施方式中,本发明的组合物包含微生物的混合物,其中所述混合物由CECT8350 (AqSynJ59) 和CECT8700 (AqSynRMH69) 组成。

[0098] 认为不同菌株在肠中可具有不同功能,因此不同菌株可一起作用从而提供有益效果。

[0099] 在本发明的一个实施方式中,本发明组合物中所包含的至少1种菌株(例如组合物中所包含的1种和/或2种和/或3种和/或4种和/或5种和/或6种和/或7种和/或8种菌株)以及优选地组合物中所包含的全部菌株无抗生素抗性,即它们在暴露于恰当的标准抗生素处理后不能存活。

[0100] 例如,在一个实施方式中,组合物包含无抗生素抗性的CECT 8700 (AqSynRMH69) 和CECT 8350 (AqSynJ59),或者由无抗生素抗性的CECT8700 (AqSynRMH69) 和CECT 8350 (AqSynJ59) 组成。

[0101] 为了辨别敏感菌株的抗性,欧洲食品安全局(EFSA) 动物饲料添加剂和产品或物质小组(FEEDAP) 定义了微生物截取值。通过研究选择的抗微生物剂在属于单个分类学单元(物种或属)的细菌群体中的MIC分布来设置微生物截取值。明显偏离正常敏感群体的群体部分被归类为有抗性。"Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance",EFSA动物饲料添加剂和产品或物质小组(FEEDAP),欧洲食品安全局(EFSA),帕尔马,意大利.EFSA Journal 2012;10(6): 2740中定义了可被用于评估本发明所述菌株的抗生素抗性的微生物截取值。

[0102] 可对所有建议菌株进行旨在评估抗生素抗性的最低抑制浓度(MIC) 体外试验。被评估的抗生素可以是下列抗生素:氨苄青霉素、万古霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、红霉素、克林霉素、四环素和氯霉素。

[0103] 可存在于本发明组合物中的一种或多种其它成分不以任何方式被限制。在一个优选的方面,至少一种益生元化合物被包含在本发明的组合物中,即作为其它成分。在一个非常宽泛的概念中,益生元是所有可被益生菌代谢的那些食物来源。优选地,益生元不可或不良地被哺乳动物消化。因此,被哺乳动物摄入之后,不可消化的益生元能够通过小肠并进入大肠从而刺激这个区域中益生菌的生长。因此,益生元可担当益生菌的食物来源。认为其中许多是不可消化碳水化合物的益生元促进肠内益生菌的生长。益生元被天然地发现于例如洋葱、全谷类、香蕉、蒜、蜂蜜、韭葱、洋葱、强化食品和饮料、以及膳食补充剂中。益生元在本领域众所周知,当在本发明中使用,没有对益生元本身的特别限制。然而,在一些优选的实施方式中,组合物中的至少一种益生元产品选自下列化合物和组合物:不可消化的碳水化合物、 β -葡聚糖、甘露寡糖、菊粉、寡果糖、半乳寡糖(GOS)、乳果糖、低聚乳果糖、半乳糖、果寡糖(FOS)、纤维二糖、纤维糊精、环糊精、麦芽糖醇、乳糖醇、葡萄糖基蔗糖、维生素E或

其变体(其中所述变体选自 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚、生育三烯酚和生育单烯酚)。任选地,甘露寡糖和/或菊粉可以是优选的。任选地,甘露寡糖、 β -葡聚糖和/或菊粉可以是优选的。

[0104] 例如,本发明的组合物可另外包含增稠剂和/或补充饲料/营养物质。例如,本发明的组合物可以包含一种或多种增稠剂(稠化剂,即可以增加液体粘度但基本上不改变其其它性质的物质,并且其可以改善其它成分或乳液的悬浮,这提高了产品的稳定性),例如多糖(果胶、植物胶和/或淀粉)或蛋白质。例如,本发明的组合物还包含植物胶,例如褐藻胶、槐豆胶、黄原胶和/或瓜尔胶,优选黄原胶和/或瓜尔胶。例如,所述组合物可以包含量为约0.1-0.5w/v%、优选地约0.3w/v%(100ml中0.3克增稠剂(例如,植物胶,诸如黄原胶和瓜尔胶))的植物胶,例如黄原胶和瓜尔胶。

[0105] 此外,本发明的组合物可以包含补充饲料(营养物质),例如乳制品、糖等。组合物可以包含量为约0.5-2w/v%、优选地约1w/v%的脱脂乳粉。组合物还可包含量为约0.1w/v%至1w/v%、优选地约0.5w/v%的糖(优选蔗糖)。

[0106] 此外,本发明的组合物还可包含输注溶液,例如盐水(含有NaCl的水)。例如,组合物可以包含含有约0.9w/v%NaCl的水作为输注溶液。

[0107] 在一个实施方式中,本发明的组合物包含以下物质或者由以下物质组成:

物质	每 2 ml 剂量的量	每 2 ml 剂量的浓度
菌株 AqSynJ59 - <i>Lactobacillus plantarum</i>	0.076 g	10^9 CFU
菌株 AqSynRMH69- <i>Lactobacillus reuteri</i>		
CHEMGEL-56 (黄原胶+瓜尔胶)	0.006 g	0.3 %
脱脂乳粉	0.02 g	1 %
糖	0.01 g	0.5 %
输注溶液 (水+0.9 % NaCl)	2 mL	-

[0109] 就可包含不同菌株的本发明组合物而言,任何混合比例是可以的。以菌落形成单位(CFU)表示混合比例,CFU在混合各菌株之前被适当地测定。在一个实施方式中,菌株比例可相等或可不相等,例如对于包含2种菌株的组合物为1:(0.1-1);对于包含3种菌株的组合物为1:(0.1-10):(0.1-10);对于包含4种菌株的组合物为1:(0.1-10):(0.1-10):(0.1-10),等等。例如,包含2种菌株的组合物中的比例可以为1:2至2:1。在另一个实施方式中,菌株比例可大致或基本相等,例如对于包含两种菌株的组合物为1:1,对于包含3种菌株的组合物为1:1:1,对于包含4种菌株的组合物为1:1:1:1,等等。可通过混合待被并入组合物的每种菌株的相应细菌量(通过菌落计数所测定的)来制备组合物。待并入的菌株可以作为各菌株的原种(stock)提供,其中的每一种例如呈冻干物的形式。如果不同的原种具有不同的浓度(CFU/g),则使用合适量(g)的每一种,以使得期望的组合物具有每种菌株的期望CFU。其实例如下所示。

[0110] 在一种优选的实施方式中,其中组合物包含两种菌株或者由两种菌株组成,菌株的比例大致或基本相等,例如1:1。例如,本发明的组合物可以包含比例为1:1的菌株AqSynJ59-*Lactobacillus plantarum*和菌株AqSynRMH69-*Lactobacillus reuteri*,例如多

于或约 5×10^8 CFU的每种上述菌株(例如,组合中总共多于或约 10^9 CFU),或者由上述组成。

[0111] 本发明还提供本发明组合物在治疗人和/或动物的方法中的用途。因此,本发明的组合物可以用于治疗性处理(在疾病的临床表现(例如腹泻)之后)和/或预防性处理(在疾病的临床表现(例如腹泻)之前)的方法中。处理动物、哺乳动物和/或尤其是驯养动物可以是优选的。优选地,动物是非人的动物,更优选地其来源于Suina亚目(Suina亚目(又名Suiformes)是哺乳动物的品系,其包括Suidae和Tayassuidae科的猪和野猪)。野生的或驯养的猪可以是特别优选的。这还包括居住在半野生条件下的猪,即一年中大部分时间居住在户外并自己寻找它们的食物的驯养猪。所述组合物可以是包含至少一种上述被保藏菌株的组合物。在另一种实施方式中,本发明的组合物可以施用至人。

[0112] 如上所述,本发明的组合物可用于处理人或动物的方法中。处理人或动物的这种方法可以是增加初生哺乳动物重量的方法,所述初生哺乳动物优选地是小猪。另外和/或替代性地,处理人或动物的方法可以是促进初生哺乳动物、优选地小猪生长的方法。另外和/或替代性地,处理人或动物的方法可以是治疗或预防初生哺乳动物、优选地小猪的腹泻的方法。腹泻可以由细菌感染引起的。腹泻可以由非细菌感染,例如病毒感染和/或寄生虫。处理人或动物的方法可以是治疗或预防感染(例如,细菌感染和/或病毒感染)的方法。此外,本发明的组合物可以在检测到任何症状之前施用,以预防人和/或动物的病症,例如腹泻和/或感染,例如细菌感染和/或病毒感染。

[0113] 本发明的组合物可优选用于处理动物的方法中。优选地,动物是农场动物,农场动物包括但不限于马、牛、鸡和其它禽类、猪、绵羊、山羊。更优选地,动物来源于Suina亚目、甚至更优选地小猪。这种处理动物的方法可以是增加初生哺乳动物、优选地小猪的重量的方法。另外和/或替代性地,处理动物的方法可以是促进初生哺乳动物、优选地小猪生长的方法。另外和/或替代性地,处理动物的方法可以是治疗或预防初生哺乳动物、优选地小猪的腹泻的方法。腹泻可以由细菌感染引起的。腹泻可以由病毒感染或任何其它原因引起的。此外,本发明的组合物可以在检测到任何症状之前施用,以预防动物的病症,例如腹泻和/或感染,例如细菌感染和/或病毒感染。

[0114] 即使(尚)未发生疾病(例如腹泻)的临床表现,也可将本发明的组合物有益地施用至初生哺乳动物、优选地小猪。例如,可将本发明的组合物有益地施用至健康的初生哺乳动物、优选地小猪。

[0115] 可将本发明的组合物施用至初生哺乳动物、优选地小猪,所述初生哺乳动物、优选地小猪:

[0116] -显示腹泻的临床表现;

[0117] - (尚)未显示出腹泻的临床表现,但被可能引起腹泻的细菌感染和/或病毒感染;

[0118] -是健康的。

[0119] 优选地,用本发明的组合物处理的人和/或动物不经受任何其它处理;优选地,人和/或动物不用抗生素处理。

[0120] 抗生素是用于治疗 and/或预防感染(例如,细菌感染)的药物。

[0121] 在一种优选的实施方式中,在出生后的早期,即出生后的头30天内,优选地在出生后的头21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天内,最优选地在出生后的头2天(48小时)内或在出生后的头1天(24小时)内,向初生的人和/或动物(优选小猪)

施用本发明的组合物。优选施用至少三次,例如两次或一次。优选地,在出生后的头48小时内,施用本发明的组合物至少一次(例如一次)。优选地,在出生后的头48小时内,甚至更优选地在出生后的头24小时内,例如出生后马上(立刻)施用本发明的组合物一次。可以施用两次本发明的组合物:一次在出生后的第一天内,第二次在出生后的第二天内。

[0122] 如上所述,本发明的组合物中包含至少1种(例如1种),例如至少2个(例如2种),例如至少3种,例如4种或多于4种(最优选地,2种)不同的根据如上所述的标准a.到c.中的至少一个、优选地所有三个选择的微生物(优选地细菌、更优选地乳酸菌)菌株。如上所述,在用于处理人和/或动物的方法中的组合物的情况下,每种微生物(优选地细菌、更优选地乳酸菌)必须满足如上所述的标准a.到c.(抗不期望细菌的活性;耐酸性;胆汁盐耐受性)中的至少一个。就标准a.而言,优选地观察到对所有不期望细菌(i)到(iv)的上文提及的最小抑制区。优选地,本发明的组合物中所包含的微生物(优选地细菌、更优选地乳酸菌)应该满足上述标准(a.到c.)中的多个(例如a.和b.),优选地满足全部。此外,优选地,(适用于处理人和/或动物的方法中的)本发明组合物中所包含的至少1种(例如1种),例如至少2个(例如2种),例如至少3种,例如4种或多于4种(最优选地,2种)不同的微生物(优选地细菌、更优选地乳酸菌)菌株无抗生素抗性,即它们在暴露于恰当的标准抗生素处理后不能存活。益生菌组合物或合生元组合物可被用于所述处理人和/或动物的方法中(即包含至少一种益生元化合物)。

[0123] 本发明的组合物优选地包含活的微生物,优选地细菌。

[0124] 本发明的发明人已发现:在适当的时间(即,如上所述,出生后的早期阶段)施用本发明组合物的任何变体对于初生的人或动物(优选小猪)能够控制源自不同病因学的菌态不平衡具有显著效果。例如,为了使组合物在处理人和/或动物方面(例如在治疗或预防腹泻方面)具有更好的效果,发明人发现:应当优选地在出生后的早期,例如在出生后的头30天内(更优选地在出生后的头21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天内,最优选地在出生后的头2天内或在出生后的头1天(24小时)内),施用所述组合物。甚至更优选地,在出生后的头2天内施用本发明的组合物,例如在出生后的头48小时内,和/或例如在出生后的第一天(24小时)和/或在出生后的第二天施用1次。可(任选地,另外)在出生后的第三天施用组合物。优选地,在出生后的头48小时内,甚至更优选地在出生后的头24小时内,例如在出生后马上施用本发明的组合物一次。任选地,特别是如果在动物和/或人中观察到腹泻和/或感染症状,则在第一剂的益生菌组合物后24小时施用第二剂的益生菌组合物。

[0125] 任何施用途径都是合适的,但经口施用可以是优选的。最典型地,直接向每个动物的口中给予剂量以确保动物咽下所述剂量。或者,组合物还可以被提供为食物补充剂,即被加入到动物每天的饲料中。

[0126] 组合物可以是任何形式,例如冻干的,液体或雾状形式。例如,如果使用冻干细菌来制造组合物,那么可例如利用无菌等渗盐水溶液或利用无菌水或利用无菌生长培养基将所述冻干细菌的初步组合物再水化,以至于可获得具有期望的总浓度(CFU/ml)的最终组合物。

[0127] 为了使得便于使用,组合物可以为剂量形式(dosed form)。例如,每剂量可包含 10^7 或更多, 10^8 或更多, 10^9 或更多, 10^{10} 或更多, 10^{11} 或更多微生物(优选细菌)菌落形成单位

(CFU); 10^9 或更多的剂量可以是优选的。剂量体积可在 0.1-100ml, 优选地 0.2-50ml, 更优选地 0.5-20ml, 更优选地 1.0-10ml, 更优选地 1.5-5ml, 甚至更优选地 (基本上) 2ml 的范围内。具有 10^9 或更多 CFU 的 2ml 剂量可以是特别优选的。在组合物包含两种菌株的情况下, 2mL 剂量优选地包含 5×10^8 CFU 的每种菌株 (即每剂量总共 10^9 CFU)。

[0128] 可施用任何剂量数, 本领域技术人员能够根据各个农场的需要选择处理长度。在一个具体实施方式中, 向动物施用的总剂量数为 10 或更少, 例如选自下列的任何数字: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10, 或者组合任何一个这些数字 (除了 10) 和任何一个这些数字的任何范围, 前提条件是第二个数字更高 (例如 1-3 剂量)。

[0129] 例如, 在出生后的头 48 小时内向动物施用至少单次剂量。例如, 在出生后的头 48 小时内向动物施用单次剂量。例如, 在出生后马上 (在出生后的头 24 小时内) 向动物施用单次剂量。任选地, 优选地如果动物显示出腹泻和/或感染的症状, 则在第一剂后 24 小时向动物施用第二剂。任选地, 可以在第二剂后 24 小时随后施用第三剂, 以此类推。

[0130] 每个动物共 2 个剂量可以是优选的。在一个优选的实施方式中, 在出生后的头 24 小时 (出生后的第一天) 内施用第一剂并在随后的 24 小时 (出生后的第二天) 内施用第二剂。任选地, 这些是仅有的 2 剂。在另一个选项中, 接下来施用更多剂, 例如出生后第三天的第三剂, 和/或出生后第四天的第四剂, 以此类推。

[0131] 优选地, 每剂包含至少两种菌株。优选地, 所述两种菌株是 CECT8700 (AqSynRMH69) 和 CECT8350 (AqSynJ59), 并且在出生后的头 48 小时内 (例如在出生后的头 24 小时内, 优选地在出生后马上) 以 2mL 的剂量施用, 所述剂量包含 5×10^8 CFU 的每种菌株 (即以菌落形成单位 (CFU) 表示的菌株比例为 1:1)。可任选地在出生后的头 48 小时内和/或在出生后第三天施用第二剂和/或第三剂。例如, 可以在出生后马上 (在头 24 小时内) 施用一剂, 任选地在第一剂后 24 小时 (即出生后第二天) 施用第二剂, 特别是如果观察到腹泻和/或感染的症状。可以任选地在出生后的第三天施用第三剂。它们优选施用至哺乳动物、优选地施用至初生小猪。

[0132] 优选地, 每剂包含至少两种菌株。优选地, 所述两种菌株是 CECT8700 (AqSynRMH69) 和 CECT8350 (AqSynJ59), 并且在出生后的第一天和第二天以 2mL 的剂量施用, 所述剂量包含 5×10^8 CFU 的每种菌株 (即以菌落形成单位 (CFU) 表示的菌株比例为 1:1)。可以任选地在出生后的第三天施用第三剂。它们优选施用至哺乳动物、优选地施用至初生小猪。

[0133] 如上所述, 本发明所述组合物特别适用于治疗或预防人和/或动物 (优选地, 初生哺乳动物) 中的病症, 例如腹泻、细菌感染、病毒感染或菌态不平衡。感染可以是或者包括消化道感染。这种感染可由任何细菌 (例如 *Escherichia coli*) 单独或与 *Clostridium perfringens* 或 *Clostridium difficile* 相组合引起。其它诱发因素可包括 *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*。在一些实施方式中, 所述病症可选自由细菌感染 (包括大肠杆菌症) 引起的腹泻、*Clostridium difficile* 初生腹泻、*Clostridium perfringens* A 和 C 型。还可以治疗链球菌性脑膜炎。感染可以由任何病毒引起, 例如轮状病毒、冠状病毒、诺如病毒、腺病毒和/或星状病毒, 优选地由轮状病毒和/或冠状病毒引起。

[0134] 还可以向患腹泻或有患腹泻风险的动物施用所述组合物, 即使 (尚) 未证明 (细菌和/或病毒) 感染是所述腹泻的诱发因素。有患腹泻风险的动物可被视为那些居住在 (或出生在) 最近 12 个月、6 个月、3 个月或 1 个月期间已观察到腹泻的地区的动物。

[0135] 还可以在人和/或动物具有腹泻和/或任何感染的任何症状之前施用本发明的组合,以预防腹泻和/或感染。

[0136] 本领域技术人员能够检测人和/或动物的腹泻和/或任何感染的症状。例如,所述症状可以是水样腹泻、水样/稀(糊状)粪便、疼痛、轻度全身病征例如发热、厌食和/或嗜睡、虚弱、一般身体状况变差/恶化、体重减轻等。指示异常行为的任何其他症状可指示腹泻和/或感染。

[0137] 如果人和/或动物没有腹泻和/或感染的症状,即健康的人和/或动物,也可以施用本发明的组合。

[0138] 在一种优选的实施方式中,本发明的组合包含CECT8700 (AqSynRMH69) 和CECT8350 (AqSynJ59) 或者由CECT8700 (AqSynRMH69) 和CECT8350 (AqSynJ59) 组成,并且以包含 5×10^8 CFU每种菌株的2mL剂量向初生动物、优选地初生小猪施用2次,一次在出生后的第一天,另一次在出生后的第二天(例如,施用第一剂后24小时)。组合可用于治疗初生小猪的方法中,特别是用于治疗人和/或预防腹泻的方法中,腹泻优选地由感染(例如,细菌感染和/或病毒感染)引起。组合还可以施用至健康的初生小猪(即没有腹泻和/或感染的症状的小猪)。此外,组合还可以用于增加初生动物、优选地初生小猪的体重和/或促进其生长的方法中。

[0139] 本发明人的结果证实了使用本发明所述产品和组合的有利效果。如以下概念性实施例中的证据所示,死亡率百分比明显低于仅使用常规抗生素管理的其它周(参见实施例)。因此,优选地,本发明所述组合物被施用至同时未利用抗生素处理的动物。

[0140] 本发明还提供微生物,菌株CECT8700 (AqSynRMH69)。认为这种菌株具有益生性能,因此其在本文中可被称为益生菌。本发明的发明人根据上述选择标准分离了菌株。CECT指的是西班牙典型培养物保藏中心,而括号内的AqSyn编号可被同义地用于每种菌株,其是由本发明的发明人分配给菌株的。检验了细菌并发现它们满足上述标准a. 到c. 中的至少一种。

[0141] 当寻找具有根据本发明的有益性能的其它菌株时,任何菌株为了被选择为适合本发明,满足上述标准a. 到c. 中的至少一种就可以是足够的。本发明还提供组合,其包含至少1种(例如1种),优选地至少2种(例如2种),更优选地至少3种(例如3种),更优选地至少4种(例如4种),或者至少5种(例如5种),或者至少6种(例如6种),或者至少7种(例如7种),或者至少8种(例如8种)这些菌株。认为不同菌株在肠中有不同功能,因此不同菌株可一起作用从而提供有益效果。

[0142] 本发明的项目(I)

[0143] 1. 组合物,其至少包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株。

[0144] 2. 根据项目1所述的组合物,其另外包含至少一种微生物菌株,其中每种另外的菌株均具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性:(i) 对于Salmonella,抑制区为10mm或更大;(ii) 对于Listeria monocytogenes,抑制区为9mm或更大;(iii) 对于Staphylococcus aureus,抑制区为9mm或更大;(iv) 对于Escherichia coli,抑制区为10mm或更大。

[0145] 3. 根据项目1-2之任一所述的组合物,其中所述至少一种另外的菌株选自属于

Lactobacillus、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的菌株。

[0146] 4. 根据项目1-3之任一所述的组合物,其中所述组合物另外包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。

[0147] 5. 根据项目4所述的组合物,其中所述组合物包含两种微生物菌株,且其中所述两种微生物由保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株和保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株组成。

[0148] 6. 根据项目2-5之任一所述的组合物,其中两种菌株在所述组合物中以约1:2-2:1的以菌落形成单位(CFU)表示的比例存在。

[0149] 7. 根据项目6所述的组合物,其中两种菌株在所述组合物中以约1:1的以菌落形成单位(CFU)表示的比例存在。

[0150] 8. 根据项目1-7之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株无抗生素抗性。

[0151] 9. 根据项目1-8之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在pH=3.5下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0152] 10. 根据项目1-9之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在0.45%胆汁提取物存在下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0153] 11. 根据项目1-10之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的所有下述抗微生物活性:(i) 对于Salmonella,抑制区为10mm或更大;(ii) 对于Listeria monocytogenes,抑制区为9mm或更大;(iii) 对于Staphylococcus aureus,抑制区为9mm或更大;(iv) 对于Escherichia coli,抑制区为10mm或更大。

[0154] 12. 根据项目1-11之任一所述的组合物,其用于处理人和/或动物的方法中。

[0155] 13. 根据权利要求12所述的组合物,其用于处理动物的方法中。

[0156] 14. 用于处理人或动物的方法中的组合物,所述组合物包含属于Lactobacillus plantarum和Lactobacillus reuteri种的微生物的混合物,并任选地包含至少一种属于Lactobacillus、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的微生物。

[0157] 15. 用于处理人或动物的方法中的组合物,所述组合物包含属于Lactobacillus plantarum和Lactobacillus reuteri种的微生物的混合物,并任选地包含至少一种属于Lactobacillus (除了以下微生物:CECT 8347 (AqSynJ12) 和CECT 8349 (AqSynJ55) 之外)、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的微生物。

[0158] 16. 用于处理人或动物的方法中的组合物,所述组合物包含属于Lactobacillus plantarum和Lactobacillus reuteri种的微生物的混合物,并任选地包含至少一种属于

Lactobacillus (除了属于Lactobacillus fermentum和Lactobacillus mucosaei种的微生物之外)、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的微生物。

[0159] 17. 根据权利要求12-16之任一使用的组合物,其中所述微生物的混合物由属于Lactobacillus plantarum和Lactobacillus reuteri种的微生物组成。

[0160] 18. 根据项目12-17之任一使用的组合物,其中至少一种菌株、优选地所有菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性:(i) 对于Salmonella,抑制区为10mm或更大;(ii) 对于Listeria monocytogenes,抑制区为9mm或更大;(iii) 对于Staphylococcus aureus,抑制区为9mm或更大;(iv) 对于Escherichia coli,抑制区为10mm或更大。

[0161] 19. 根据项目12-18之任一使用的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株无抗生素抗性。

[0162] 20. 根据项目12-19之任一使用的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在pH3.5下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0163] 21. 根据项目12-20之任一使用的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在0.45%胆汁提取物存在下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0164] 22. 根据项目12-21之任一使用的组合物,其中在出生后的头30天内向人或动物施用所述组合物。

[0165] 23. 根据项目22使用的组合物,其中在出生后的头14天内向人或动物施用所述组合物。

[0166] 24. 根据项目23使用的组合物,其中在出生后的头7天内向人或动物施用所述组合物。

[0167] 25. 根据项目24使用的组合物,其中在出生后的头2天内向人或动物施用所述组合物。

[0168] 26. 根据项目12-25之任一使用的组合物,其中所述方法用于治疗或预防腹泻。

[0169] 27. 根据项目26使用的组合物,其中所述腹泻是由感染,例如细菌感染和/或病毒感染引起的,优选地是由细菌感染引起的。

[0170] 28. 根据项目12-27之任一使用的组合物,其中所述方法用于处理Suina亚目的动物、狗、猫、马、牛、禽类、绵羊和/或山羊。

[0171] 29. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-28之任一使用的组合物,其中所述组合物额外包含至少一种益生元产品。

[0172] 30. 根据项目29所述的组合物,其中所述至少一种益生元产品选自下列化合物和组合物: β -葡聚糖、甘露寡糖、菊粉、寡果糖、半乳寡糖(GOS)、乳果糖、低聚乳果糖、半乳三糖、果寡糖(FOS)、纤维二糖、纤维糊精、环糊精、麦芽糖醇、乳糖醇、葡萄糖基蔗糖、维生素E或其变体(其中所述变体选自 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚、生育三烯酚和生育单烯酚),其中甘露寡糖、 β -葡聚糖和/或菊粉是优选的。

[0173] 31. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-30之任一使用的组合物,

其中所述组合物用于经口施用。

[0174] 32. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-31之任一使用的组合物, 其中所述组合物是冻干的、液体的或雾状形式。

[0175] 33. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-32之任一使用的组合物, 其中所述组合物以剂量形式被提供, 其中每剂包含约 10^9 个菌落形成单位(CFU)。

[0176] 34. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-33之任一使用的组合物, 其中所述组合物以一个单剂量被施用。

[0177] 35. 根据项目34所述的组合物, 其中在出生后的头48小时内施用所述组合物。

[0178] 36. 根据项目35所述的组合物, 其中在出生后的头24小时内施用所述组合物。

[0179] 37. 根据项目36所述的组合物, 其中在出生后马上施用所述组合物。

[0180] 38. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-33之任一使用的组合物, 其中所述组合物以2个剂量被施用。

[0181] 39. 根据项目38所述的组合物, 其中在出生后的头24小时内施用第一剂且在随后的24小时内施用第二剂。

[0182] 40. 根据项目39所述的组合物, 其中只有动物和/或人显示出腹泻和/或感染症状(例如, 水样腹泻、水样/稀(糊状)粪便、疼痛和/或轻度全身病征例如发热、厌食和/或嗜睡、虚弱、一般身体状况变差/恶化、体重减轻等)时才施用所述第二剂。

[0183] 41. 根据项目1-11之任一所述的组合物或者根据项目12-40之任一使用的组合物, 其中所述组合物被用于治疗或预防细菌感染, 例如由细菌感染(包括大肠杆菌症)引起的腹泻, *Clostridium difficile* 初生腹泻, *Clostridium perfringens* A和C型。

[0184] 42. 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株。

[0185] 本发明的项目(II)

[0186] 1. 组合物, 其至少包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株。

[0187] 2. 根据项目1所述的组合物, 其另外包含至少一种微生物菌株, 其中每种另外的菌株均具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的至少一种下述抗微生物活性: (i) 对于 *Salmonella*, 抑制区为10mm或更大; (ii) 对于 *Listeria monocytogenes*, 抑制区为9mm或更大; (iii) 对于 *Staphylococcus aureus*, 抑制区为9mm或更大; (iv) 对于 *Escherichia coli*, 抑制区为10mm或更大。

[0188] 3. 根据项目2所述的组合物, 其中所述至少一种另外的菌株选自属于 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Aerococcus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Oenococcus*、*Sporolactobacillus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus* 和/或 *Weissella* 属的菌株。

[0189] 4. 根据项目1-3之任一所述的组合物, 其中所述组合物另外包含保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。

[0190] 5. 根据项目4所述的组合物, 其中所述组合物包含两种微生物菌株, 且其中所述两种微生物为保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69) 的菌株和保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8350 (AqSynJ59) 的菌株。

[0191] 6. 根据项目5所述的组合物,其中两种菌株在所述组合物中以2:1-1:2的比例(以菌落形成单位(CFU)表示)存在。

[0192] 7. 根据项目1-6之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株无抗生素抗性。

[0193] 8. 根据项目1-7之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在pH3.5下孵育3小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0194] 9. 根据项目1-8之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株在0.45%胆汁提取物存在下孵育4小时期间能够基本保持相同的生存力。

[0195] 10. 根据项目1-9之任一所述的组合物,其中所述组合物中所包含的至少一种菌株、优选地所有菌株具有由通过菌苔斑点试验所测定的抑制区证明的所有下述抗微生物活性:(i)对于Salmonella,抑制区为10mm或更大;(ii)对于Listeria monocytogenes,抑制区为9mm或更大;(iii)对于Staphylococcus aureus,抑制区为9mm或更大;(iv)对于Escherichia coli,抑制区为10mm或更大。

[0196] 11. 根据项目1-10之任一所述的组合物,其用于处理动物和/或人的方法中。

[0197] 12. 用于处理动物和/或人的方法中的组合物,所述组合物包含属于Lactobacillus plantarum和Lactobacillus reuteri种的微生物的混合物,并任选地包含至少一种属于Lactobacillus(除了微生物Lactobacillus fermentum CECT 8347 (AqSynJ12)和Lactobacillus mucosae CECT 8349 (AqSynJ55)之外)、Leuconostoc、Pediococcus、Lactococcus、Streptococcus Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Oenococcus、Sporolactobacillus、Tetragenococcus、Vagococcus和/或Weissella属的微生物。

[0198] 13. 根据项目11-12之任一使用的组合物,其中所述方法用于治疗或预防腹泻。

[0199] 14. 根据项目1-10之任一所述的组合物或者根据项目11-13之任一使用的组合物,其中在出生后的头48小时内施用至少一剂所述组合物。

[0200] 15. 保藏在西班牙典型培养物保藏中心的保藏号为CECT 8700 (AqSynRMH69)的菌株。

实施例

[0201] 实施例1

[0202] 材料和方法

[0203] MRS培养基:根据如下的获自西班牙典型培养物保藏中心(CECT;www.cect.org)的配方制备MRS培养基配方:蛋白胨10.0g,牛肉提取物10.0g,酵母提取物5.0g,葡萄糖20.0g,柠檬酸铵2.00g,乙酸钠5.00g,MgSO₄·7H₂O 0.20g,MnSO₄·H₂O 0.05g,K₂HPO₄ 2.00g,[琼脂粉末(仅用于固体培养基)15g],蒸馏水1L。

[0204] BHI(脑心浸液):根据如下的获自西班牙典型培养物保藏中心(CECT;www.cect.org)的配方制备培养基配方:牛脑浸出物固体12.5g,牛心浸出物固体5.0g,示蛋白胨10.0g,葡萄糖2.0g,NaCl 5.0g,HNa₂PO₄ 2.5g,蒸馏水1L,[琼脂粉末(仅用于固体培养基)15g]。

[0205] 抗生素处理:典型地,每个猪场用抗生素和可能地铁补充剂处理初生小猪。每个猪

场对它们的动物一般有不同的“标准”处理(它们通常在出生时注射抗生素剂和铁补充剂)。在下述实验中,使用各个农场的标准处理。偶尔出现腹泻、跛行、呼吸系统症状和许多其它事实时通常还每天使用抗生素,这在小猪中没有完全确立的流程。

[0206] 实施例1A:菌株来源

[0207] 如下所述分离和鉴定细菌菌株。

[0208] 从小猪肠道的肠壁洗涤物中分离CECT 8350 (AqSynJ59) 和CECT 8700 (AqSynRMH69) 细菌菌株。

[0209] 使样品在De Man,Rogosa,Sharpe (MRS) 琼脂平板上在37℃下有氧和厌氧生长24小时,分离革兰氏阳性且过氧化氢酶阴性的不同形态学菌落。所有菌落都属于细菌菌株。如Berthier和Ehrlich,1998.FEMS Microbiology Letters 161:97-106所述,使用靶向16S/23S rRNA间隔区的PCR引物,通过PCR扩增每种分离的菌株。

[0210] 扩增和电泳之后,纯化并测序明显区分的条带。通过测序,菌株被分配到细菌物种。

[0211] 1.1表征并选择菌株

[0212] 1.Lactobacillus plantarum (AqSynJ59)

[0213] 2.Lactobacillus reuteri (AqSynRMH69)

[0214] 遵循上述“体外选择试验”下的标准a.到c.的体外试验揭示出2种具有特别有益性能的菌株。

[0215] a.对不同病原体的抑制:所选择的菌株显示出通过以下抑制区中的至少一种证明的抗微生物活性:对于Salmonella,抑制区为10mm或更大;对于Listeria monocytogenes,抑制区为9mm或更大;对于Staphylococcus aureus,抑制区为9mm或更大;对于Escherichia coli,抑制区为10mm或更大。AqSynJ59和AqSynRMH69的结果列举如下。

	AqSynJ59	AqSynRMH69
[0216] a. (i) <i>Salmonella enterica</i> 血清型 Typhimurium 抑制区 [mm]	13	35
a. (ii) <i>Listeria monocytogenes</i> 抑制区 [mm]	13	16
a. (iii) <i>Staphylococcus aureus</i> 抑制区 [mm]	9	33
a. (iv) <i>Escherichia coli</i> 抑制区 [mm]	21	35
b. 耐酸性 (是/否)	是	是
c. 胆汁盐耐受性 (是/否)	是	是

[0217] 从上表中可以看出:来自小猪肠道的所选菌株满足上述选择标准a.到c.。

[0218] b. pH耐受性:两种菌株在pH=3.5下孵育3小时期间均能够基本保持相同的生存力。

[0219] c. 胆汁盐耐受性:两种菌株在0.45%胆汁提取物存在下孵育4小时期间均能够基本保持相同的生存力。

[0220] 此外,以上鉴定的菌株均无抗生素抗性。

[0221] 对以上菌株(AqSynJ59和AqSynRMH69)进行旨在评估抗生素抗性的最低抑制浓度(MIC)体外试验。被评估的抗生素如下:

[0222] 氨苄青霉素、万古霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、克林霉素、四环素和氯霉素。

[0223] 被用于评估本发明所述菌株的抗生素抗性的微生物截取值在“Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance”, EFSA动物饲料添加剂和产品或物质小组 (FEEDAP), 欧洲食品安全局 (EFSA), 帕尔马, 意大利. EFSA Journal 2012;10 (6):2740中被定义。

[0224] 每种细菌的MIC结果与EFSA截取值抗生素抗性的比较

[0225]	抗生素	EFSA (2012) 值	AqSynJ59 菌株	
			LSM	类别
	氨苄青霉素	2	0.125	S*
	万古霉素	nr	512	R**
	庆大霉素	16	1	S
	卡那霉素	64	64	S
	链霉素	nr	32	-
	克林霉素	1	0.125	S
	四环素	32	4	S
	氯霉素	8	2	S

[0226]	抗生素	EFSA (2012) 值	AqSynRMH69 菌株	
			LSM	类别
	氨苄青霉素	2	0.125	S
	万古霉素	nr	512	R
	庆大霉素	8	2	S
	卡那霉素	64	64	S
	链霉素	64	32	S
	克林霉素	1	0.125	S
	四环素	16	4	S
	氯霉素	4	2	S

[0227] *:敏感

[0228] **:耐受

[0229] LSM=由调节至pH6.7的MRS培养液(10%)和IST(Oxoid实验室)培养液(90%)的混合物组成的LAB敏感性试验培养基。

[0230] 这两种菌株均可被视为不耐受EFSA推荐的抗生素,因此它们可被用作“食品生产”动物饲料的添加剂。

[0231] 实施例1B:制备根据本发明的益生菌组合物

[0232] 如说明书中所述并且如上文所证明的满足标准a.到c.的菌株CECT 8350(AqSynJ59)和CECT 8700(AqSynRMH69)被包含在益生菌组合物中,并在田间试验中进行检测。

[0233] 通过发酵使菌株AqSynJ59和AqSynRMH69中的每一种在MRS培养液中生长,收获并冻干。通过菌落计数核实终产物的生存力。

[0234] 制备含这些菌株中全部2种的组合物。制备下列组合物:

[0235] 组合物:(2ml中 5×10^8 CFU每种菌株)

[0236]	组分	每2ml剂的量
--------	----	---------

AqSynJ59:Lactobacillus plantarum	0.0024g
AqSynRMH69:Lactobacillus reuteri	0.0052g

[0237] 所有菌株均以冻干形式被使用。

[0238] 通过混合相同细菌量(通过菌落计数所测定(以上显示以g计的各个值))的将被并入组合物中的每种菌株来制备组合物,然后用等渗盐水溶液将由此获得的组合物再水化,从而获得2ml剂中含 10^9 CFU(其中所含所有菌株的总数)的最终组合物。

[0239] 实施例1C:田间试验

[0240] 在西班牙北部的养猪场发现了初生小猪的腹泻,其中对两种菌株产品进行检测。

[0241] 农场基本生产单位是“出生单位”。每个出生单位由24窝组成。在实验中,在标准农场条件下处理12窝(对照组,需要使用抗生素和营养组合物来处理窝中已显示腹泻迹象的小猪)。另外12窝用单独的阿曲龙益生菌组合物处理,在腹泻情况下不另外使用抗生素(所有小猪均在出生后的第一天(在出生后马上)经口施用一剂上述组合物(2ml)。在出生后的第二天(施用第一剂24小时后)仅向那些显示腹泻症状的组的动物施用第二剂(2ml)组合物)。接受益生菌组合物的动物在任何时候都不接受抗生素(但如果它们显示腹泻症状,它们确实接受了与标准处理动物(对照组)相同的饮食中加入营养物的处理)。动物从出生到生命的第二20天受到控制。

[0242] 该试验中使用的益生菌组合物是如上所述的含有 10^9 CFU/2mL剂量(5×10^8 CFU每种菌株)的两种Lactobacillus菌株AqSynJ59:Lactobacillus plantarum和AqSynRMH69:Lactobacillus reuteri的混合物。

[0243] 对照组的处理是使用抗生素,即肌肉注射阿莫西林,剂量为5mg/kg,在症状观察期间注射。这种对照组中的腹泻小猪在显示腹泻期间每天接受一次这种处理,而接受阿曲龙益生菌组合物(如上所述)的组中的腹泻动物在任何时候都不用抗生素处理。

[0244] 实验设计

[0245] A. 每窝的活产数

[0246] B. 出生后死亡数

[0247] C. 腹泻:以每窝为基础计数,利用以下标准进行评分:

[0248] 0.-少于<25%的动物被感染:肛周区域没有不干净动物的明显迹象,且在地板和墙壁上没有观察到软便。

[0249] 1.-一些腹泻:偶尔在窝中观察到一些不干净的动物,地板上有一些软便。

[0250] 2.-大多数动物(>75%)显示出腹泻和改变的身体状态,不干净的动物和地板上的软便。

[0251] D. 处理:每窝的小猪及其接受处理的天数(抗生素、营养物、碳、补液等)。

[0252] 结果总结

	对照组	益生菌组合物组
断奶时的平均重量(kg)	5.06	5.38
任何处理（经口补液或腹部补液与生理输液（益生菌组），经口补液或腹部补液与生理输液和抗生素（对照组））的总天数	34	6
抗生素处理的总天数	31	0
由腹泻引起的死亡数	7	3
死亡率(%)	14.11	10.43
中度腹泻总天数	24	10
严重腹泻总天数	10	5
每窝处理指数*	31.17	1.67

[0255] *每窝处理指数 = (处理的窝 × 处理天数 / 12)

[0256] 结论：

[0257] 所检测的组合物在用于预防和治疗小猪腹泻方面比标准实践要好：

[0258] a) 完全替代了对抗生素的需要

[0259] b) 减少了对非抗生素辅助治疗的需要

[0260] c) 降低了总体腹泻的发病率

[0261] d) 降低了严重腹泻的发病率

[0262] e) 降低了由腹泻引起的死亡发生率

[0263] f) 提高了断奶时的平均重量

[0264] g) 以非常显著的方式降低了商业开发中标准管理条件下腹泻流行病的经济影响（每只动物的公斤数增加、死亡减少、治疗成本降低、环境影响减小、处理时间减少）。

[0265] 实施例2

[0266] 实施例2的材料和方法以及菌株来源与以上在实施例1（“材料和方法”和“实施例1A：菌株来源”）中所述的相同。

[0267] 实施例2A：制备根据本发明的益生菌组合物

[0268] 如说明书中所述并且如上文所证明（在“实施例1A：菌株来源”中）的满足标准a.到c.的菌株CECT 8350 (AqSynJ59) 和CECT 8700 (AqSynRMH69) 被包含在益生菌组合物中，并在田间试验中进行检测。

[0269] 通过发酵使菌株AqSynJ59和AqSynRMH69中的每一种在MRS培养液中生长，收获并冻干。通过菌落计数核实终产物的生存力。

[0270] 制备含这些菌株中全部2种的组合物。制备下列组合物（“AQ1202-PigLife”或“PigLife”或“AQ1202”）：

	材料	每 2 ml 剂量的浓度	作用
[0271]	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CECT 8350)	$\geq 10^9$ CFU (每种菌株约 5×10^8	益生菌
	<i>Lactobacillus reuteri</i> (CECT 8700)	CFU)	
	黄原胶+ 瓜尔胶	0.3 % w/v	增稠剂
[0272]	补充饲料:		
[0273]	材料	每剂的浓度	作用
[0274]	脱脂乳粉	1 % w/v	饲料/营养物
	蔗糖	0.5 % w/v	饲料/营养物
	输注溶液 (水+0.9% w/v NaCl)	2 ml	赋形剂/稀释剂

[0275] 产品(被命名为“AQ1202-PigLife”,也称为“PigLife”或“AQ1202”)由两种酸性乳酸菌和不同饲料物质的冻干混合物组成,以限定初生小猪的经口悬浮液。在阿曲龙设备中混合产品,然后包装在100毫升小瓶中。这种制品旨在于临使用前在100ml输注溶液中洗脱。

[0276] 通过混合相同细菌量(通过菌落计数所测定(以上显示以CFU计的各个值))的将被并入组合物中的每种菌株来制备组合物,然后用等渗盐水溶液将由此获得的各种组合物再水化,从而获得2ml剂中含 10^9 CFU(其中所含所有菌株的总数)的最终组合物。

[0277] 实施例2B:田间试验

[0278] 该实施例的目的是评估:当出生后的小猪特别容易发生菌态不平衡和腹泻时,根据本发明的益生菌组合物在所述小猪中的用途。

[0279] 在具有各种(已知或未知)病因的腹泻散发性发作的商业农场(共5个)中检测两种菌株产品(“AQ1202-PigLife”或“PigLife”)。商业农场位于西班牙的不同位置(Aragón、Castilla y León、Cataluña)。它们均具有集约化养猪系统,包括授精程序、怀孕母猪的管理、产小猪和断奶单元。其中一些包括动物被转移到肥育单元前的过渡畜栏。实验经官方许可进行,包括在田间试验中使用实验性畜牧学添加剂。

[0280] 动物组:

[0281] • 益生菌处理组(AQ1202-PigLife)

[0282] • 对照组(无处理-无操作)。

[0283] 产小猪之后(生命第一天),处理组中的所有小猪均经口接受2ml剂量的益生菌组合物AQ1202-PigLife(AQ1202)。从产小猪到第20天记录数据。

[0284] 评估以下内容:

[0285] • 评估畜牧学参数

[0286] - 出生小猪的数目:总出生和出生存活(死亡率-断奶小猪)

[0287] - 小猪重量(如有可能)

[0288] - 粪便评估

[0289] • 0:正常粪便

[0290] • 1:轻度腹泻;窝中出现一些腹泻病例

[0291] • 2:严重腹泻;大多数小猪受腹泻影响

[0292] -处理评估:记录处理的窝和母猪。

[0293] 农场1-4

[0294]	农场	观察的窝总和
	农场1	24
	农场2	38
	农场3.1	58
	农场3.2	58
	农场4	61

[0295] 在农场3中,观察到两批不同的产小猪窝:

[0296] 实验1:2014年10月(农场3.1)

[0297] 实验2:2015年5月(农场3.2)

[0298] 这些研究中记录了135个对照和104个经PigLife处理的窝的数据。

[0299] 从产小猪至第20天,共观察到了1710个对照和1136只经处理的小猪。

[0300] 在农场1-4中,发现腹泻响应抗生素,即细菌来源的腹泻。

[0301] -死亡率(%) (总死亡率,包括腹泻和挤死的(crushed)小猪)

	组/农场	对照	AQ1202
[0302]	农场 1	14.1	9.9
	农场 2	13.2	9.9

	农场 3.1	19.3	14.7
[0303]	农场 3.2	12.3	11.7
	农场 4	16.31	3.68

[0304] -腹泻(参见图2)

[0305]

组/农场	呈现腹泻的窝%		呈现腹泻的窝中腹泻时长的平均值 (天)	
	对照	AQ1202	对照	AQ1202
农场 1	91.7	50.0	3.1±1.8	2.5±2.1
农场 2	56.3	4.5	2.7±1.8	2*
农场 3.1	73.3	35.7	2.1±1.1	2.8±1.8
农场 3.2	86.2	79.3	3.2±1.6	2.5±1.8
农场 4	31.25	15.38	1.2±0.8	1±0

[0306] *仅一窝具有长达两天的腹泻

[0307] -处理

[0308] 农场1

[0309] 用阿莫西林+林可霉素 (Lincomycin)、对因治疗 (母体) 和泰妙菌素+粘菌素 (Colimutina, SP Veterinaria)+经口输液、在小猪中对症治疗来处理受影响的窝。

[0310] 农场2

[0311] 对于母体 (恩氟沙星通过乳释放到小猪)、小猪或者二者使用的抗生素是恩氟沙星。向受影响的小猪施用经口补液和矿物碳。

[0312] 农场3

[0313] 在窝内的腹泻病例中,用恩氟沙星 (Alsir, Norvet) 处理受影响的小猪。用马波沙星 (Marbofloxacin) (Marbocyl, Vêtoquinol) 处理母体。柯利霉素 (Colimicin)+输注溶液用于有症状的小猪。

[0314] 农场4

[0315] 用恩氟沙星处理呈现腹泻的窝中的母猪。如果有必要,处理可以持续三天。作为预防,在生命的第一天,向该农场中的所有小猪应用一剂头孢噻呋 (Naxcel, Zoetis)。

[0316] 施用剂量如下:

[0317] 阿莫西林:15mg/kg, 肌肉 (IM) 注射

[0318] 林可霉素:饮水水中5-10mg/kg

[0319] 恩氟沙星:2.5mg/kg肌肉注射

[0320] 马波沙星:2mg/kg肌肉注射

[0321] 柯利霉素:0.5克/窝 (饮用水)

[0322] 头孢噻呋:5mg/kg, 肌肉注射

[0323] Colimutina:0.156mg粘菌素甲磺酸钠+12.35mg延胡索酸泰妙菌素/kg;0.1ml/kg 肌肉注射。

[0324] 结果示于下表和图3中:

[0325]

	经处理窝的%		经处理窝的平均处理时长(天)	
农场/组	对照	AQ1202	对照	AQ1202
农场 1	75	16.7	3.2±1.3	2.9±1.2
农场 2	50	4.5	1.1±0.4	1*
农场 3.1	70	17.9	2.76±1	2.6±0.5
农场 3.2	86.21	72.41	3.2±1.3	2.9±1.2

[0326] *仅一窝被处理一次

[0327] 农场1-4的结论

[0328] 从上表和图2可以看出:根据本发明的益生菌组合物(AQ1202)降低了具有持续性腹泻发作(在农场1-4中由细菌感染引起)的农场中的死亡率。这种组合物的施用减少了对处理(包括抗生素)的需要。上表和图3显示了采用根据本发明的益生菌组合物(AQ1202)处理的窝(包括用抗生素处理)的百分比降低。

[0329] 农场5

[0330] 在农场5,腹泻没有细菌来源。腹泻不响应抗生素处理。最后,根据农场主所报告的诊断,诊断出轮状病毒感染是初生小猪腹泻的原因。

[0331] 该实验在位于Aragón(西班牙)的具有750头种母猪群体的商业猪场进行。

[0332] 自2014年1月初以来,农场受到持续发作的初生小猪腹泻的影响,截止该年5月份受影响窝的比率达到95%。死亡率不断增加直至影响超过35%的活产小猪。大量使用针对Enterobacteriaceae和Clostridium的抗生素处理持续超过6个月,但几乎没有结果。

[0333] 传染性胃肠炎和流行性猪腹泻(猪流行性腹泻,冠状病毒)被排除为腹泻病因之后,临床诊断为猪轮状病毒。因此,农场5中的腹泻是由病毒感染(猪轮状病毒感染)引起的。

[0334] 通过外部诊断实验室(GSP实验室,加泰罗尼亚,西班牙)的PCR诊断证实了轮状病毒感染。由于在畜群中观察到高腹泻率且第一次处理的成功率低,因此农场主决定从2014年5月至12月向所有小猪系统地施用所述产品(根据本发明的组合物,AQ1202)。

[0335] 自引入所述处理之后,死亡率降至5%,腹泻发病率降至窝的20%。

[0336] 结果如下所示。

[0337] 处理:

[0338] 在腹泻的情况下:

[0339] • CARBOVET(产品Carbovet®是由专门选择的法国橡木制成的热结构(非活性)植物炭)。

[0340] • SUEROMIN(腹膜内补液与高渗输注;组合物:25g葡萄糖,25g果糖,2.62g氯化物,1.57g钠,80mg钾,20mg镁,40mg钙;适量赋形剂,1000ml)

[0341] 对所有动物:

[0342] • AQ1202-PigLife

[0343] 1/5-30/6:每只小猪1-2剂

[0344] 1/7-31/12:每只小猪3剂

[0345] • 铁:在生命第3-8天中的任一天,每只小猪1剂(约150mg,肌内)。

[0346] 该研究中报告了从2014年5月至12月对983窝(从2014年5月至12月)的观察结果(见下表)。用AQ1202-PigLife(根据本发明的组合物)处理每窝中的所有小猪。

	月	报告的窝数	断奶小猪的百分比	处理的平均值	经处理*窝的百分比
				**	比
[0347]	五月	115	76.6	3.08	92.2
	六月	129	81.3	2.15	85.3
	七月	177	82.7	1.06	68.9
	八月	144	78	0.87	47.9
	九月	152	75.7	0.87	48.7
	十月	143	82.7	0.36	19.6
	十一月	51	81.7	0.06	3.9
	十二月	72	81.9	0	0

[0348] *Carbovet和/或Sueromin

[0349] **一次处理=1剂Carbovet和/或Sueromin

[0350] Carbovet:10g/动物,经口

[0351] Sueromin:20-80ml/kg,经腹膜内或皮下

[0352] 向窝内的所有小猪施用益生菌组合物。经处理窝的百分比与在动物中观察到的腹泻直接相关,在连续施用根据本发明的益生菌组合物(AQ1202-PigLife)期间,其从95%降至5%。仅向虚弱和腹泻动物施用Carbovet和Sueromin(对症治疗)。观察到断奶小猪的百分比呈上升趋势。农场主观察到:自施用益生菌组合物以来,每窝多出约0.7%断奶小猪。

PCT

打印出（原件为电子表格）
（本页不是国际申请的一部分且不视为国际申请的页）

0-1	表格 PCT/RO/134 指示涉及经保藏的微生物或其它生物材料（PCT 条约 13）	
0-1-1	准备所使用的	PCT 在线提交 版本 3.5.000.244e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人的文件参考	184813 aa/se
1	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料，在	
1-1	页	13
1-2	行	26
1-3	保藏证明	
1-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心(CECT)
1-3-2	保藏机构地址	Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 （巴伦西亚） 西班牙
1-3-3	保藏日期	2012 年 6 月 20 日（20.06.2012）
1-3-4	保藏号	CECT 8166
1-4	额外指示	参考：AqSyn10
1-5	作出指示的指定国	所有指定
2	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料，在	
2-1	页	13
2-2	行	25
2-3	保藏证明	
2-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心（CECT）
2-3-2	保藏机构地址	Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 （巴伦西亚） 西班牙
2-3-3	保藏日期	2012 年 6 月 20 日（20.06.2012）
2-3-4	保藏号	CECT 8163
2-4	额外指示	参考：AqSyn04
2-5	作出指示的指定国	所有指定
3	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料，在	
3-1	页	13

[0353]

[0354]

3-2	行	26
3-3	保藏证明	
3-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
3-3-2	保藏机构地址	
3-3-3	保藏日期	2012 年 6 月 20 日 (20.06.2012) CECT 8164
3-3-4	保藏号	
3-4	额外指示	参考: AqSyn09
3-5	作出指示的指定国	所有指定
4	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	
4-1	页	13
4-2	行	26
4-3	保藏证明	
4-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
4-3-2	保藏机构地址	
4-3-3	保藏日期	2012 年 6 月 20 日 (20.06.2012) CECT 8165
4-3-4	保藏号	
4-4	额外指示	参考: AqSyn06
4-5	作出指示的指定国	所有指定
5	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	
5-1	页	13
5-2	行	27
5-3	保藏证明	
5-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
5-3-2	保藏机构地址	
5-3-3	保藏日期	2013 年 5 月 16 日 (16.05.2013) CECT 8350
5-3-4	保藏号	
5-4	额外指示	参考: AqSynJ59
5-5	作出指示的指定国	所有指定
6	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	
6-1		13

[0355]

6-2	页 行	27
6-3	保藏证明	
6-3-1	保藏机构名称	
6-3-2	保藏机构地址	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
6-3-3	保藏日期	2013 年 5 月 16 日 (16.05.2013)
6-3-4	保藏号	CECT 8349
6-4	额外指示	参考: AqSynJ55
6-5	作出指示的指定国	所有指定
7	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	
7-1	页	13
7-2	行	27
7-3	保藏证明	
7-3-1	保藏机构名称	
7-3-2	保藏机构地址	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
7-3-3	保藏日期	2013 年 5 月 16 日 (16.05.2013)
7-3-4	保藏号	CECT 8348
7-4	额外指示	参考: AqSynJ17
7-5	作出指示的指定国	所有指定
8	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	
8-1	页	13
8-2	行	26
8-3	保藏证明	
8-3-1	保藏机构名称	
8-3-2	保藏机构地址	CECT 西班牙典型培养物保藏中心 (CECT) Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
8-3-3	保藏日期	2013 年 5 月 16 日 (16.05.2013)
8-3-4	保藏号	CECT 8347
8-4	额外指示	参考: AqSynJ12
8-5	作出指示的指定国	所有指定
9	下文做出的指示涉及说明书中提及的经保藏的微生物或其它生物材料, 在	

[0356]

9-1		13
9-2	页 行	24
9-3	保藏证明	
9-3-1	保藏机构名称	CECT 西班牙典型培养物保藏中心
9-3-2	保藏机构地址	Edificio 3 CUE. 巴伦西亚大学科学园 Catedrático Augustín Escardino, 9, 46980 巴特纳 (巴伦西亚) 西班牙
9-3-3	保藏日期	2014 年 9 月 10 日 (10.09.2014)
9-3-4	保藏号	CECT 8700
9-4	额外指示	参考: AqSynRHM69
9-5	作出指示的指定国	所有指定
仅供受理局使用		
0-4	该表格与国际申请一起接收 (是或否)	是
0-4-1	授权官员	Hurenkamp, Jaap
仅供国际局使用		
0-5	该表格被国际局接收, 在:	
0-5-1	授权官员	

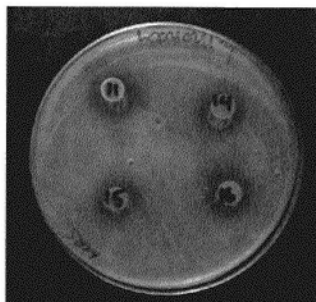


图1

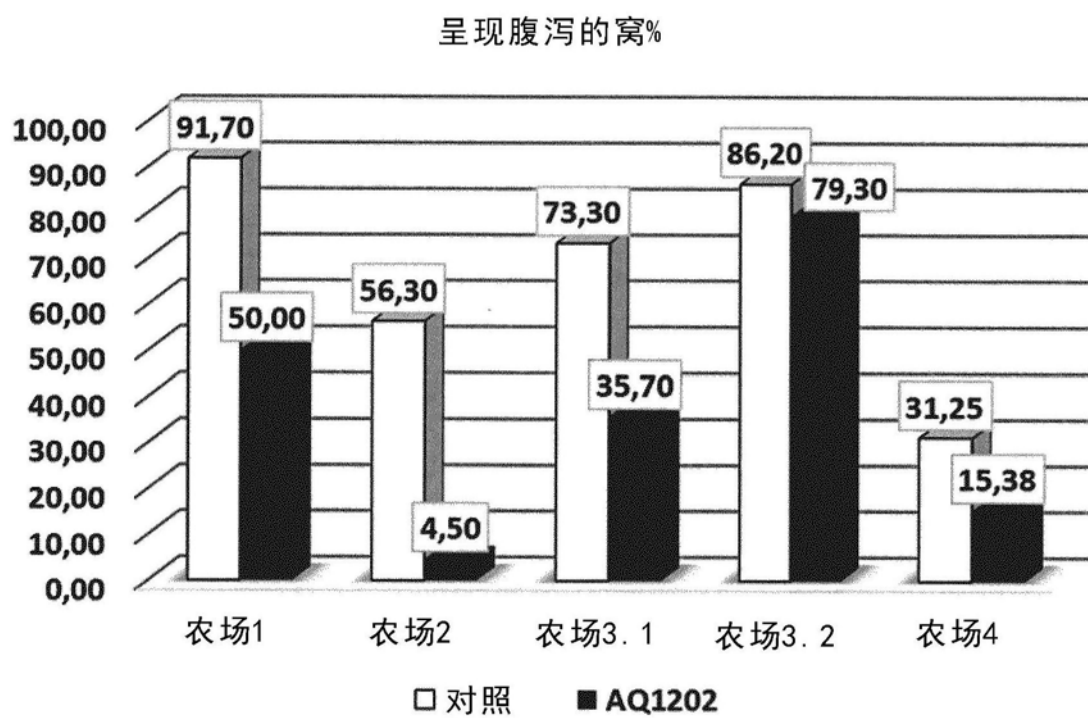


图2

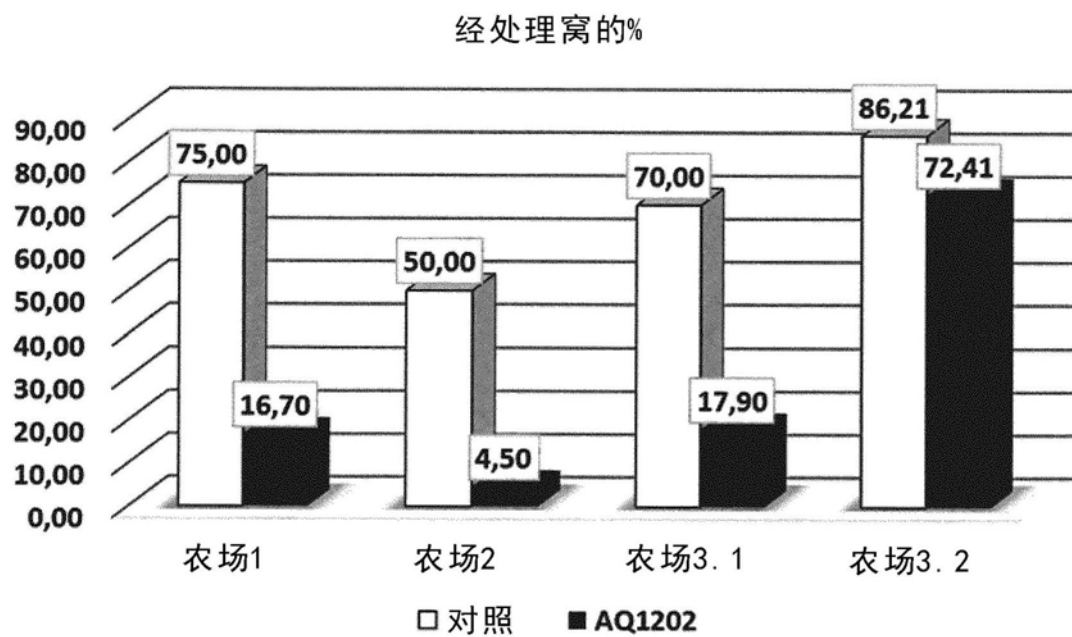


图3