



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101277708 B

(45) 授权公告日 2013.02.13

(21) 申请号 200680036778.1

(22) 申请日 2006.10.06

(30) 优先权数据

60/724,214 2005.10.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.04.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/009695 2006.10.06

(87) PCT申请的公布数据

W02007/039313 EN 2007.04.12

(73) 专利权人 雀巢技术公司

地址 瑞士沃韦

(72) 发明人 R·诺尔 C·卡瓦迪尼

J·本雅各布 E·萨蒂亚拉

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 35/74 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9800035 A1, 1998.01.08, 权利要求 1 — 13, 摘要.

WO 0190311 A1, 2001.11.29, 权利要求 1 — 31, 摘要.

EP 1364586 A1, 2003.11.26, 权利要求 1 — 35, 摘要.

Jalil Benyacoub et al..Supplementation of food with enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs.《THE JOURNAL OF NUTRITION》.2003, 第 133 卷 (第 4 期), 第 1158 — 1162.

J.Benyacoub et al..Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to giardia intestinalis in mice.《THE JOURNAL OF NUTRITION》.2005, 第 135 卷 (第 5 期), 第 1171 — 1176 页.

Jalil Benyacoub et al..Supplementation of food with enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs.《THE JOURNAL OF NUTRITION》.2003, 第 133 卷 (第 4 期), 第 1158 — 1162.

审查员 何瑜

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于改良免疫性的益生肠道球菌

(57) 摘要

本发明公开了用于调控动物中的免疫性和疫苗效能的组合物和方法。该组合物和方法使用益生生物,特别是益生肠球菌 (Enterococcus) 菌株,并且特别适用于猫科。

1. 一种或多种益生肠道球菌在制备在猫科动物中调控对于FHV-1或FPV的免疫性或增强FHV-1疫苗或FPV疫苗的疫苗效能的药物或组合物中的用途。
2. 权利要求1的用途,其中该组合物是动物食品组合物或饮食添加物。
3. 权利要求1的用途,其中该益生肠道球菌是粪肠球菌菌株SF68。
4. 权利要求1的用途,其中每克制剂中存在的益生肠道球菌的量为 $10^2$ 到 $10^{11}$ CFU。
5. 权利要求1的用途,其中该动物是家猫。
6. 权利要求1的用途,其中增强动物中的疫苗效能导致动物中CD4+淋巴细胞的产量增加。
7. 权利要求1的用途,其中增强动物中的疫苗效能导致动物的血清、粪便、乳、泪、唾液、呼吸上皮、或胃肠上皮中针对特异性病原的抗原反应的免疫球蛋白浓度增加。

## 用于改良免疫性的益生肠道球菌

### 技术领域

[0001] 本发明涉及哺乳动物营养物及其在免疫应答方面的作用。具体地,本发明利用益生生物向动物施用,从而改良先天和适应性的免疫并增强动物中的疫苗效能。

### 背景技术

[0002] 本说明书中引用了多种出版物,包括专利、公开的应用、技术文献和学术文献。这些出版物在此处以其整体引用作为参考。在说明书中没有完全引用的出版物在说明书末尾列出。

[0003] 益生菌的定义为活的微生物,当其以适当量施用,具有使宿主健康的作用。(Schrezenmeir J等人(2001))。理论上益生菌可以通过增加粘膜表面对病原菌定居的抗性(抗移植性)(Sanders ME(2003))或通过对消化道联合淋巴组织(GALT)直接起作用,来行使其有益健康的作用,从而产生免疫调节物质。(Isolauri E等人(2001a);和Macpherson AJ等人(2004))。

[0004] 益生菌在人药物中曾用于调控多种传染性疾病的过程。(Isolauri E(2001b))。相反,在兽医学方面的研究很少,大多数兽医学研究在大型动物中进行,其中益生菌用于尝试改变粪便病原体的释放(Kim LM等人(2001))或改良生产参数(例如体重增加、饲料转换率和死亡率的减少)。在一个动物研究中,将粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)菌株SF68(NCIMB10415)喂给一组接种过犬瘟热病毒(CDV)的狗,并与只接受接种过疫苗的安慰剂组进行比较。(Benyacoub J等人(2003))。与对照狗相比较,补充SF68的狗具有增加的血清和粪便的总IgA浓度、增加的CDV-特异性IgG和IgA血清浓度、和增加的循环B淋巴细胞百分数,证明此种益生菌可以诱导免疫增强效应。

[0005] 猫瘟病毒(FPV)是一种病毒,可导致病毒血症,随后导致严重的胃肠疾病;适当接种的小猫具有消除性免疫。(Richards J等人(2001))。然而,在猫医学方面,病毒上呼吸道感染仍然是一个主要问题。(Sykes JE等人(1999))。猫鼻气管炎病毒(FHV-1)和猫杯状病毒(FCV)是综合征中涉及的两种病毒病原体。而在接种病原激发菌株以后,与未接种对照相比较,接种FCV疫苗诱导>95%的相对效能,接种FHV-1疫苗只诱导约60%的相对效能。(Lappin MR等人2002)。因此,尽管FHV-1是广泛普及的疫苗,其仍然具有显著的问题。(Sykes JE等人(1999))。先前的改良疫苗效能方面的尝试包括产生更大副作用的鼻内给药,(Scott FW等人(1999)),和降低疾病严重度但不降低病原携带状态传播的有毒菌株的基因操作(Slater E等人(1976))。病原携带状态可以导致宿主复发或再感染,以及传播给同住者。曾经尝试过慢性FHV-1感染的多种疗法,包括干扰素 $\alpha$ 、环钻术、抗病毒药物、鼻切开术、糖皮质激素、局部解充血剂和针对二次细菌感染的抗生素(Van Pelt DR等人(1994))。然而,这些都不能清除慢性病毒感染;因此常见病毒释放和临床疾病的复发。在预防和控制 $\alpha$ 疱疹病毒感染过程中,细胞介导和IgA粘膜免疫应答都是很重要的(Lappin MR等人(2002);和Slater E等人(1976))。改良FHV-1疫苗或接种应答必需减少该病原体所诱导的发病率。

## 发明内容

[0006] 本发明一方面特征在于以在动物中调控免疫或增强疫苗效能的有效量的一种或多种益生生物组成的组合物。调控免疫应答和增强疫苗效能用于保护动物和减少病原体诱导的发病率和死亡率。

[0007] 在某些实施方案中,组合物是宠物或动物食品组合物、饮食添加物、或为人消耗配制的食物产品。在多种实施方案中,益生生物包括至少一种单独的肠道球菌属 (*Enterococcus* spp.), 或与其他益生生物, 例如链球菌属 (*Streptococcus* spp.)、乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.)、乳球菌属 (*Lactococcus* spp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium* spp.) 或酵母菌属 (*Saccharomyces* spp.) 组合。在优选实施方案中,益生生物是粪肠球菌 NCIMB 10415(SF68)。组合物可能包含附加成分。例如包括一种或多种能够进一步增强免疫性的化合物,例如 7-氧代脱氢表雄酮。

[0008] 在特定实施方案中,为陪伴动物,例如猫配制组合物。在其他实施方案中,为非陪伴动物,尤其是猫科成员配制组合物。在其他实施方案中,为人消耗配制组合物。

[0009] 本发明的另一方面是在动物中调控免疫性的方法,包含基于常规基础以有效量给动物施用如上所述由一种或多种益生生物组成的组合物,从而调节动物的免疫性。在特定实施方案中,本方法应用于陪伴动物,例如猫。在另外实施方案中,本方法应用于非陪伴动物,尤其是猫科成员。在其他实施方案中,本方法应用于人。

[0010] 本发明的另一方面是增强动物中疫苗效能的方法,包含基于常规基础以有效量给动物施用如上所述由一种或多种益生生物组成的组合物,从而增强动物中的疫苗效能。在优选实施方案中,疫苗是猫鼻气管炎病毒 (*feline rhinotracheitis virus*)、猫杯状病毒 (*feline calicivirus*) 或猫瘟病毒 (*feline panleukopenia virus*)。在特定实施方案中,本方法应用于陪伴动物,例如猫。在另外实施方案中,本方法应用于非陪伴动物,尤其是猫科成员。在其他实施方案中,本方法应用于人。

[0011] 本发明的另一方面是如上所述一种或多种益生生物作为调控动物免疫性的医药产品或组合物的用途。在特定实施方案中,组合物是功能性食品或饮食添加物。组合物可以作为陪伴动物,例如猫的饲料。在其他实施方案中,组合物可以应用于非陪伴动物,尤其是猫科成员。在其他实施方案中,本用途可以应用于人。

[0012] 本发明的另一方面是如上所述一种或多种益生生物作为增强动物疫苗效能的医药产品或组合物的用途。在特定实施方案中,组合物是功能性食品或饮食添加物。基于常规标准给动物施用有效量的组合物,从而增强动物中的疫苗效能。在优选实施方案中,疫苗是猫鼻气管炎病毒、猫杯状病毒或猫瘟病毒。在特定实施方案中,组合物可以应用于陪伴动物,例如猫。在其他实施方案中,组合物应用于非陪伴动物,尤其是猫科成员。在其他实施方案中,组合物可以应用于人。

[0013] 通过参考如下附图、发明详述和实施例将会使本发明的其他特征和优势清楚显示。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1,每天补充 150mg 鸡肉消化液 P0(安慰剂, n = 9) 或 150mg 混合  $5 \times 10^8$  cfu/天的粪肠球菌菌株 SF68(治疗, n = 9) 的鸡肉消化液的小猫,从第 7 周龄开始到 27 周龄

的体重 (a) 和粪便评分 (b)。在第 9 和 12 周龄给小猫皮下接种商业上可获得的减毒活 FHV-1 疫苗<sup>d</sup>。盒和虚线代表最小、最大、中间值以及 25 百分比和 75 百分比 (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles)。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0016] 图 2, 从补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫血清 (a) 和唾液 (b) 中获得的 FHV-1 特异性的 IgA。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0017] 图 3, 从补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫血清中获得的 FHV-1 特异性的 IgG。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0018] 图 4, 从补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫中获得的 FCV 特异性的 IgG。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0019] 图 5, 从补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫中获得的 FPV 特异性的 IgG。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0020] 图 6, 补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫粪便提取物中的总 IgG (a) 和 IgA (b)。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。在所有时间点  $p > 0.05$ 。

[0021] 图 7, 通过流式细胞计数得到的补充 (治疗) 或未补充 (安慰剂) SF68 的小猫外周血中 CD4 (a) 和 CD8 (b) 阳性门控淋巴细胞的百分数。盒和虚线代表最小值、最大值、中间值以及 25 百分比和 75 百分比。\* 表示治疗组显著高于安慰剂组的时间点。

[0022] 说明性实施方案的详述:

[0023] 在说明书和权利要求中使用了本发明方法和其他方面涉及的多种术语。这些术语除非另外说明均为其在本领域内的常用意义。其他特殊定义的术语以此处给出的定义进行解释。

[0024] 在说明书和实施例中可能用到的缩写如下: FHV-1, 猫鼻气管炎病毒; FCV, 猫杯状病毒; FPV, 猫瘟病毒; spp., 种; ELISA, 酶联免疫吸附测定; DM, 干物质; CFU, 菌落形成单位; kg, 千克; BW, 体重。

[0025] “有效量”指在此处描述为有效达到特定生物学结果的化合物、材料或组合物的量。此类结果包括 (但是不限于) 在动物中改良免疫性或增强疫苗效能。此类有效活性可以例如通过向动物施用本发明的组合物来实现。

[0026] 在本说明书中, 术语“约”解释为任选加或减 20%, 更优选任选加或减 10%, 甚至更优选任选加或减 5%, 甚至更优选任选加或减 2%, 最优选任选加或减 1%。

[0027] “包含”解释为“包括, 在其他事物之中”, 并非意指“仅包括”。

[0028] “适应性免疫”或“适应性免疫应答”可以互换使用, 并且此处为广义使用, 指对抗原激发的免疫应答, 包括免疫记忆的发生。适应性免疫应答包括 (不限于) 体液和细胞免疫。

[0029] “体液免疫”或“体液免疫应答”在此处可以互换使用, 指应答抗原激发而产生免疫球蛋白分子。

[0030] “细胞免疫”或“细胞免疫应答”或“细胞介导免疫”在此处可以互换使用, 指应答抗原激发而激活细胞毒素或辅助 T 淋巴细胞、单核细胞和细胞因子。术语包含所有不能转

化为具有抗体的天然接受者的适应性免疫。

[0031] “先天免疫”指机体对抗病原的非特异性机制,其并不由于特定抗原的后来的刺激而增强。

[0032] “调控免疫”或“免疫的调控”指任意增强或抑制机体对抗原激发产生先天或适应性免疫应答的能力,其可以通过本领域内任意合适方法测量。

[0033] “疫苗效能”指疫苗在动物上针对特异性病原产生预期治疗或保护效应的能力。“增强的疫苗效能”指疫苗在动物上针对特异性病原产生预期治疗或保护效应的能力方面的任意改良,其通过本领域内任意合适的方法测量。

[0034] “益生生物”指对宿主动物发挥有益作用(例如增加健康或对抗疾病)的任意生物,尤其是微生物。益生生物可以展现一种或多种如下非限制性特征:对宿主无病原性或无毒性;以有活力的细胞存在,优选以大量数目存在;在消化道环境中能够存活、代谢和持续(例如抵抗低 pH 和胃酸和分泌物);黏附于上皮细胞,尤其是胃肠道上皮细胞;对有病原细菌的杀微生物或杀菌活性或效应;抗癌活性;免疫调控活性,尤其是增强免疫性;对内源菌群的调控活性;增强泌尿生殖道健康;在创伤或创伤周围的抗菌活性和促进创伤愈合;减少腹泻;减少过敏反应,减少新生儿坏死性小肠结肠炎;减少炎症性肠疾病;和减少肠渗透性。(Reid G 等人(2003);Drisko JA 等人(2003);和 Oyetayo VO 等人(2004))

[0035] 本发明涉及任意的动物,优选哺乳动物,并且在一个实施方案中的陪伴动物。“陪伴动物”是任意家养的动物,包括(不限于)猫、狗、兔、豚鼠、雪貂、仓鼠、小鼠、沙鼠、马、奶牛、山羊、绵羊、驴、猪等等。最优选狗和猫,并且此处以猫作为例证。在特定实施方案中,“动物”可以是人。在其他实施方案中,本发明涉及陪伴动物以外的动物。特别地,本方法涉及猫家族猫科成员,本发明可以应用于例如可以有效实现将益生组合物施用于猫的情况(例如在动物园、兽医实验室、野生动物保护区等等)。除家养的猫以外,猫科猫属包括的成员有:(1) 猎豹属 (*Acinonyx*),例如猎豹 (*A. jubatus*), (2) 云豹属,例如云豹 (*N. nebulosa*), (3) 豹属,例如狮 (*P. leo*) 和美洲虎 (*P. onca*)、豹 (*P. pardus*)、虎 (*P. tigris*); (3) *Uncia*, 例如雪豹 (*U. uncial*); (4) 美洲狮 (*puma*), 例如美洲豹、山狮或美洲狮 (*P. concolor*) 和 (5) 多种非家猫属 (*Felis*), 包括(但不限于)婆罗洲金猫 (*F. badia*)、山猫 (*F. caracal*)、中国山猫 (*F. bieti*)、丛林猫 (*F. chaus*)、沙猫 (*F. margarita*)、黑足猫 (*F. nigripes*)、野猫 (*F. sylvestris*, *F. lybica*)、豹猫 (*F. yagouraroundsi*)、虎猫 (*F. pardalis*)、小斑虎猫 (*F. tigrina*)、长尾猫 (*F. wiedi*)、薮猫 (*F. servat*)、猞猁 (*F. lynx*)、短尾猫 (*F. rufus*)、南美草原猫 (*F. colocolo*)、乔氏猫 (*F. geoffroyi*)、安第斯山猫 (*F. jacobita*)、兔狲 (*F. manul*)、南美林猫 (*F. guigna*)、美洲豹猫 (*F. bengalensis*, *F. iriomotensis*)、扁头猫 (*F. planiceps*)、锈斑猫 (*F. rubiginosus*)、渔猫 (*F. viverrina*) 和非洲金猫 (*F. aurata*)。除非另外说明,此处所用术语“猫科”或“猫科动物”指所有猫科成员。

[0036] 此处所用术语“宠物食品”、“宠物食品组合物”、“动物食品”或“动物食品组合物”指由动物,优选陪伴动物计划摄取的组合物。“完全和营养平衡的宠物或动物食品”是含有基于动物营养领域公认权威所推荐的合适量的所有已知的必需营养素,和因此其可以作为维持生命或促进生产的饮食摄入的唯一来源,而不需附加补充的营养来源。营养平衡的宠物食品和动物食品组合物是本领域已知和广泛使用的。

[0037] 此处所用“饮食添加物”是动物除正常饮食外计划摄入的产品。

[0038] 此处所用“为人消耗配制的食物产品”是人计划摄入的任意组合物。

[0039] 为使说明书清楚和简明,此处描述了某些实施方案,但是应该理解这些实施方案的特征可以在本发明的范围内进行多种组合或分离。

[0040] 发明描述

[0041] 发明者发现含益生生物(例如粪肠球菌 NCIMB 10415(SF68))的饮食添加物可以增加小猫的 CD4+ 淋巴细胞数。相应地,本发明的多个方面通过提供改良动物免疫性和促进动物中疫苗效能的食品组合物和方法利用这些发现。

[0042] 组合物

[0043] 本发明的一方面特征是由一种或多种益生生物以在动物中调控免疫性或增强疫苗效能的有效量组成的组合物。在一个优选实施方案中,益生生物调控动物的先天免疫。在更优选的实施方案中,益生生物调控动物的适应性免疫应答。在另外的优选实施方案中,益生生物在动物中增加对抗 FHV-1、FCV 和 FPV 的疫苗的效能。

[0044] 益生生物可以是组合物的组成成分或附加成分。益生生物可以是原核、真核或古细菌。在组合物的多种实施方案中,益生生物包含至少一种单独的任意合适菌株或肠道球菌亚种,或与其他益生生物结合,包括链球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、芽孢杆菌属、双歧杆菌属、或酵母属。肠道球菌属包括(不限于)粪肠球菌,尤其是粪肠球菌菌株 SF68,和其他肠道球菌,例如粪肠球菌 DSM 10663(M74)、粪肠球菌 GHR 017 DSM 7134、粪肠球菌 CECT 4515、粪肠球菌 CL15/ATCC 19434、粪肠球菌 NCMB 11181/DSM5464、粪肠球菌 IMB 52/DSM 3530、粪肠球菌 CNCM MA 17/5U、粪肠球菌 202DSM 4788/ATCC53519、粪肠球菌 301DSM 4789/ATCC 55593、粪肠球菌 ATCC 19434、粪肠球菌 EF-101ATCC 19434 和粪肠球菌 AK 2205BCCM/LMG S-16555。链球菌属包括(不限于)粪链球菌、嗜热链球菌和唾液链球菌。乳杆菌属包括(不限于)嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、纤维二糖乳杆菌 (*Lactobacillus cellobiosus*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、GG 乳杆菌(鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 或干酪乳杆菌鼠李糖亚种 (*Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus*))、加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*)、胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、罗伊乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、干酪乳杆菌 LA1 (*Lactobacillus johnsonii* LA1)、嗜酸乳杆菌 NCFB 1748、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus Shirota*)、嗜酸乳杆菌 NCFM、嗜酸乳杆菌 DDS-1、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 德氏亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种 2038 型、嗜酸乳杆菌 SBT-2062、唾液乳杆菌 UCC 118、副酪蛋白乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) ST11、和副酪蛋白乳杆菌副酪蛋白亚种 F 19。乳球菌属包括(不限于)乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 和植物乳球菌 (*Lactococcus plantarum*)。杆菌属包括(不限于)枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。双歧杆菌属包括(不限于)青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)、嗜热双歧杆菌 (*Bifidobacterium thermophilum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌 (*bifidobacterium longum*)、假长双

歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudolongum*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) 和乳酸双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*)。酵母菌属包括 (不限于) 啤酒酵母 (*Saccharomyces boulardii*) (*cerevisiae*)。

[0045] 在一个优选的实施方案中,本发明的组合物是宠物或动物食品组合物。这些最好包括供给必需饮食需要的食物和零食 (treats) (例如饼干) 或其他饮食添加物。任选地,宠物或动物食品组合物可以是干的组合物 (例如粗粒)、半湿组合物、湿的组合物、或其任意混合。在具体实施方案中,组合物是为猫科动物消耗配制,包括 (但不限于) 家猫。

[0046] 在另一优选实施方案中,本发明的组合物是为人消耗配制的食物产品。这些有利地包括供应人必需饮食需要的食品 and 营养,和其他人饮食添加物。在一个详细的实施方案中,为人消耗配制的食物产品是完全的和营养平衡的。

[0047] 在另一优选实施方案中,组合物是饮食添加物,例如肉汁、饮用水、饮料、浓缩液体、酸乳酪、粉末、颗粒、糊剂、悬浮液、咀嚼剂、小片食物 (morsel)、零食 (treat)、点心、片剂、丸剂、胶囊、药片、或其他形式。饮食添加物可以是为特定动物消耗特异配制的,例如陪伴或非陪伴动物,尤其是猫科动物或人。在一个详细的实施方案中,饮食添加物可以由高浓度的益生生物组成,因而添加物可以小量向动物施用,或者任选地可以稀释后向动物施用。在向动物施用前,饮食添加物需要与水混合。

[0048] 组合物可以是冷却的或冷冻的。益生生物可以预先与组合物的其他成分调和从而提供所需要的有益量,可以涂布到宠物食品组合物、饮食添加物、或为人消耗制备的食物产品上,或可以在例如使用粉末或混合物添加到组合物中之后提供给动物。

[0049] 本发明的组合物包含在所施用的动物中调控免疫性或促进疫苗效能的有效量的益生生物。宠物食品 and 为人消耗配制的食物产品可以配制成每克组合物含有约  $10^2$  到约  $10^{11}$  菌落形成单位 (CFU) 的益生生物。饮食添加物可以配制成含有高几倍浓度的益生生物,从而可以以片剂、胶囊、浓缩液体或其他类似剂型的形式施用于动物,或者在施用前稀释,例如用水稀释、喷雾或洒水到宠物食品上,或其他类似的施用类型。

[0050] 在一个实施方案中,组合物中益生生物浓度是调控免疫功能所必需的量的函数,包括动物血中 CD4+ 淋巴细胞的比例和 / 或数目的增加。在另一实施方案中,组合物中益生生物浓度是增加在血清、粪便、分泌物 (例如乳、泪和唾液) 中针对特异病原体抗原的免疫球蛋白浓度所必需的量的函数。动物血清、粪便、分泌物 (例如乳、泪和唾液) 中 CD4+ 淋巴细胞的水平和免疫球蛋白浓度可以通过本领域内技术人员所公认和理解的方法测定。

[0051] 本发明的组合物任选地包含添加物质,例如矿物质、维生素、盐类、香料、色素、和防腐剂。添加矿物质的非限制性实例包括钙、磷、钾、钠、铁、氯化物、硼、铜、锌、镁、锰、碘、硒等等。添加维生素的非限制性实例包括维生素 A、多种维生素 B、维生素 C、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。也可以包括另外的饮食添加物,例如烟酸、泛酸、旋复花粉、叶酸、维生素 H、氨基酸等等。

[0052] 本发明的组合物任选包含一种或多种促进或维持健康免疫系统或进一步调控免疫性的添加物质。此类物质包括 (不限于) L-精氨酸、类固醇例如 7-氧代脱氢表雄酮 (7-氧代 DHEA)、类胡萝卜素例如  $\alpha$ -和  $\beta$ -胡萝卜素、抗氧化剂、和草药或草药提取物例如黄芪和紫锥花 (*echinacea*)。

[0053] 在多种实施方案中,本发明的动物食品或饮食添加物组合物的干物质可以包含以

组合物重量计从约 15%到约 50%的粗蛋白质。粗蛋白质物质包含植物蛋白（例如大豆、棉籽和花生）或动物蛋白（例如酪蛋白、白蛋白和肉蛋白质）。此处所用肉蛋白质的非限制性实例包括猪肉、羊肉、马、家禽、鱼和其混合物。

[0054] 组合物的干物质还可以包含以组合物重量计从约 5%到约 40%重量的脂肪。组合物还可以包含碳水化合物来源。组合物的干物质可以包含以组合物重量计从约 15%到约 60%重量的碳水化合物。此类碳水化合物的非限制性实例包括谷物或粮食，例如稻、玉米、高粱、苜蓿、大麦、大豆、油菜、燕麦、小麦和其混合物。组合物也可以任选的包含其他物质，例如干乳清和其他牛奶副产品。

[0055] 组合物也包含至少一种纤维来源。可以利用本领域内普通技术人员所公知的多种可溶或不可溶的纤维。纤维来源可以是甜菜果肉（来源于甜菜）、阿拉伯胶、塔尔哈胶（gum talha）、蚤草、米糠、角豆胶、柑橘果肉、果胶、短链寡聚果糖外附加的低聚果糖、甘露糖寡聚果糖、大豆纤维、羽扇豆纤维、阿拉伯半乳聚糖、半乳寡聚糖、阿拉伯木聚糖、或其混合物。可选择地，纤维来源可以是可发酵纤维。可发酵纤维如上所述有益于陪伴动物的免疫系统。也可以在组合物中掺入本领域技术人员已知的提供促进肠益生微生物生长的益生组合物的可发酵纤维或其他组合物，从而帮助增强本发明对动物免疫系统的有益作用。

[0056] 在一个具体的实施方案中，组合物是完全的和营养平衡的宠物或动物食品。在本说明书中，宠物食品可以是湿食品、干食品或含水量中等的食品，正如本领域技术人员所公认的宠物食品配方和制造。“湿食品”描述通常以罐或箔袋装售卖的宠物食品，其含水量通常在约 70%到约 90%范围内。

[0057] “干食品”描述与湿食品组分相似的宠物食品，但是其含水量有限，通常在约 5%到约 15%范围，并且因此例如以小的饼干状粗粒形式存在。组合物和饮食添加物可以为成年动物、或老年或年幼动物，例如“幼犬”、“小猫”或“老年”配方特异地配制。通常，特定的配方包含适合动物不同发育或年龄阶段所需的能量和营养。

[0058] 本发明的某些方面优选用于与完全和平衡的食品（例如在国家研究委员会，2006，狗和猫的营养需求，国家学术出版社，华盛顿，或美国饲料控制协会，官方出版物 1996 中所描述的）组合使用。即包含根据本发明某方面的益生生物的组合优选与高质量商品化食品使用。此处所用“高质量商品化食品”指经加工产生的主要营养物的消化率达 80%或更高的饮食，例如上述国家研究委员会为狗和猫所推荐的，或美国饲料控制协会所制定的。对于其他动物也使用类似的高营养标准。

[0059] 熟练的技术人员应该理解如何确定在给定组合物中加入合适量的益生生物。应该考虑到的因素包括组合物的类型（例如宠物食品组合物、饮食添加物或为人消耗所配制的食物产品）、不同动物对特定类型组合物的平均消耗、和制备组合物的制造条件。可以基于动物的能量和营养需求来计算加入组合物的益生生物浓度。根据本发明的某些方面，可以在制造和 / 或加工组合物过程中的任意时间加入益生生物。这包括（不限于）作为宠物食品组合物、饮食添加物或为人消耗所配制的食物产品的组成部分，或涂布于宠物食品组合物、饮食添加物或为人消耗所配制的食物产品上的包被。

[0060] 可以根据本领域内任意合适方法制备组合物，例如在 Waltham Book of Dog and Cat Nutrition, ATB Edney 编辑, Chapter by A. Rainbird, 标题为“均衡饮食”在 57 到 74 页, Pergamon Press Oxford 中所描述。

**[0061] 方法**

**[0062]** 本发明的另一方面为调控动物免疫性的方法,包含向动物施用由以调控动物免疫性的有效量的一种或多种益生生物组成的组合物。而本发明的另一方面为增强动物中疫苗效能的方法,包含向动物施用由以增强动物中疫苗效能的有效量的一种或多种益生生物组成的组合物。在某些实施方案中,疫苗是猫瘟病毒、猫鼻气管炎病毒或猫杯状病毒的疫苗。

**[0063]** 在本发明上述两方面的任一的详细实施方案中,组合物是此处举例的宠物或动物食品组合物、饮食添加物或为人消耗配制的食物产品。在更详细的实施方案中,益生生物包括单独的至少一种肠道球菌,优选粪肠球菌,最优选菌株 SF68,或与其他益生生物组合,所述其他益生生物包括如上所述的一种或多种链球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、芽孢杆菌属、双歧杆菌属或酵母菌属。动物可以包括任意上述家养的或陪伴动物,或可以包括人。在某些实施方案中,该动物是陪伴动物,例如猫。在另一实施方案中,该动物是人。

**[0064]** 可以以多种可选择的施用途径的任一种向动物施用组合物。此类途径包括(不限于)口腔、鼻内、静脉内、肌肉内、胃内、经幽门、皮下、直肠等等。优选地,通过口腔施用组合物。此处所用术语“口腔施用”或“口腔给药”指动物摄入或人指导喂给动物以一种或多种此处所述本发明的组合物。

**[0065]** 其中人指导喂组合物,此类指导可能是指示和/或告知人使用组合物可以或/或将会有参考的益处,例如调控免疫性或增加动物中疫苗效能。此类指导可以是口头指导(例如通过医师、兽医或其他健康专家的口头指导、或广播或电视媒体(即广告)、或书面指导(例如通过医师、兽医或其他健康专家的文字指导(例如处方))、销售专业人士或组织(例如通过销售宣传册、小册或其他教育性资料)、书面媒体(例如互联网、电子邮件或其他计算机相关媒体)、和/或组合物的包装(例如储存组合物的容器上的标签))。

**[0066]** 可以以基于需要或期望的基础施用,例如一月一次、一周一次、每天一次或每天多次。同样,可以隔天、隔周、隔月、每三天、每三周或每三月、每四天、每四周或每四月等等施用。可以每天多次施用。当作为通常饮食需求的添加物使用时,组合物可以直接施用于动物或者另外与每日的饲料或食品接触或混合。当作为每日饲料或食品使用时,此种施用是普通技术人员所熟知的。

**[0067]** 也可以基于常规基础施用,例如作为动物饮食的一部分。饮食可以包含动物有规则地摄入由以在动物中调控免疫性或增强疫苗效能的有效量的一种或多种益生生物组成的组合物。有规则摄入基于每日或每周可以是每天一次、或两次、三次、四次、或更多次。同样,有规则施用可以是每两天或周、每三天或周、每四天或周、每五天或周、或每六天或周,并且此类饮食可以每天多次施用。有规则施用的目的是向动物提供如此处举例的优选每日剂量的益生生物。

**[0068]** 可以以每个动物每天所施用的菌落形成单位(CFU)的方式来测量益生生物的每日剂量。益生生物的每日剂量可以在约 $10^5$ 到约 $10^{12}$ CFU/天的范围。更优选地,益生生物的每日剂量为约 $10^7$ 到约 $10^9$ CFU/天。更优选地,益生生物的每日剂量为约 $10^8$ 到约 $10^9$ CFU/天。最优选地,益生生物的每日剂量为约 $10^8$ CFU/天。

**[0069]** 根据本发明的方法,由一种或多种益生生物组成的组合物的施用,包括作为饮食部分的施用,可以跨越动物从妊娠期到整个生命期的范围。

**[0070]** 通过以下实施例更详细地描述本发明。他们意在说明而不是限制本发明。

[0071] 实施例

[0072] 实施例 1

[0073] 动物和实验参数

[0074] 猫研究群体。20 只 6 周大的 SPF 小猫购自 Liberty 实验室 (Liberty, NY)。经 ELISA 鉴定,小猫为猫白血病毒抗原和猫免疫缺陷病毒抗体血清阴性。(Snap Combo, IDEXX 实验室,波特兰,ME)。

[0075] 实验设计。10 天平衡期之后,将小猫随机分为两组,每组 10 只,从 7 周龄开始治疗研究。将 0.25-0.28g ( $\sim 5 \times 10^9$ CFU,基于稀释液的计数测定)的 LBC ME5 PET 粪肠球菌 SF68 (NCMB 10415) (Cerbios-Pharma SA,瑞士) 加入到 50mL 圆锥底聚丙烯离心管中,盖紧,并储存于 4°C 直到开始研究。也同样制备等分试样的增味剂(通常使用的宠物食品包被包含肝消化物作为主要成分),每管 150mg。使用等分试样进行吸水率的测定,如果益生菌或增味剂出现凝集则丢弃。在施用之前,将等分试样的增味剂转移到一个储存粪肠球菌 SF68 的管中(治疗组)或空管中(安慰剂组),并用室温的水稀释至总体积为 10mL。将内容物涡旋至少 3 分钟,吸入 12cc 注射器。悬浮液涡旋后,立即向小猫口腔施用 1ml 粪肠球菌 SF68 (日总剂量每天  $5 \times 10^8$ CFU) 或只有增味剂(对照小猫),一直到 27 周龄。两组均随意喂养干的猫食(符合所有 AAFCO 需求的常用猫生长配方,使用鸡肉和稻作为主要成分),并分置于两个分离的房间从而避免益生菌的交互污染。在 9-12 周龄,所有的小猫皮下接种由美国猫医生协会推荐的用于猫疱疹病毒-1、杯状病毒和猫瘟病毒的减毒活组合疫苗(辉瑞动物健康,Exton,PA)。(Richards J 等人 (2001))。

[0076] 统计评估。在每个样本日,测定所有测量参数的组平均值。用适合重复测量实验的混合 ANOVA 模型分析益生菌治疗组和安慰剂组之间的差异。模型中包括的时间为连续变量。计算各组猫在研究期间的产气荚膜杆菌 (*C. perfringens*) 肠毒素或难辨梭菌 (*C. difficile*) 毒素 A 或 B 的阳性猫样本的百分比和细胞表面标记阳性的门控细胞的百分比,并以双尾 t 检验来比较。(GRAPHPAD Prism,GRAPHPAD 软件公司, San Diego, CA)。认为  $p < 0.05$  具有统计学显著性。

[0077] 实施例 2

[0078] 样品收集和临床监测

[0079] 研究过程中每天监测小猫的态度和行为。每周测量体重。在第 7 周龄和第 9、15、21 和 27 周龄,开始补充益生菌或增味剂之前,收集所有小猫的血、唾液和粪便。另外,收集 28 周龄的治疗组小猫的粪便。对于各组小猫,每天随机从公用垃圾中选出 5 个粪便样品,用标准图表评分卡进行评分,并测定每日组平均值。根据 Benyacoub J 等人 (2003) 描述的方法测量粪便提取物中的总 IgA 和 IgG。所有样品储存于 -80°C 直到成批测定。

[0080] 在补充的早期阶段 (7 周龄),所有小猫的粪便都是正常的。由于与研究不相关的原因从各组移除一只小猫,因此也从最终数据分析中移除。在整体时间或在任意个别时间点,两组的体重和粪便评分没有统计学差异 (图 1)。

[0081] 在研究过程中,两组猫之间的全血细胞计数、生化参数和体重相似。两组之间粪便评分也相似,说明使用此处所述剂量的 SF68 并不能显著诱导临床差异。

[0082] 实施例 3

[0083] 粪便测定

[0084] 在每个样品日,以 8 个系列的 10 倍稀释将来自各小猫的粪便涂布于 KF 链球菌琼脂平板上,在 37°C 需氧培养 48 小时。用无菌环挑取每个形态学类型的 10 个菌落,置于 1.2mL 脑心浸液培养基 (BHI) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中,在测定期间储存于 -80°C。对于从各样品分离的细菌菌株进行 RAPD-PCR,来确定治疗组小猫的粪便中是否存在有活力的粪肠球菌 SF68,并评估益生菌是否意外地从治疗组小猫传递给安慰剂组小猫。热循环参数如下:95°C 变性 1 分钟、40°C 退火 1 分钟、72°C 延伸 4 分钟,30 个循环。25.5  $\mu$ L 反应混合物包括 2.45  $\mu$ L 10 $\times$  无镁缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl、3.22mM MgCl<sub>2</sub>、0.4  $\mu$ L (1 个单位) 起动的 DNA 聚合酶 (希格玛 D-4184, 希格玛-奥尔德里奇公司, 圣路易斯, MO)、1.9  $\mu$ L dNTP 混合物 (2.5mM)、1  $\mu$ L 引物 (100  $\mu$ M)、15.47  $\mu$ L PCR 水和 1  $\mu$ L 细菌培养物。所用引物的序列为 5' -GGTTGGGTGAGAATTGCACG-3'。5-10  $\mu$ L 的 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,将条带模式与阳性 SF68 对照相比较。使用商业上可获得的 ELISA 测定在所有小猫的粪便中是否存在产气荚膜杆菌肠毒素或难辨梭菌毒素 A/B (产气荚膜杆菌 (ELISA, 试剂盒号 92-000-22) 和难辨梭菌 (ELISA, 试剂盒号 94-0150-KT), Techlabs, Blacksburg, VA.)。粪便的沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 和弯曲杆菌 (*Campylobacter* spp.) 常规需氧培养由美国科罗拉多州大学诊断实验室进行。

[0085] 9 个治疗组猫中有 7 个的粪便在研究过程中的至少一个时间点呈现 SF68 阳性。然而,在停止补充之后一周 (28 周),从任何治疗的猫的粪便中都不能扩增出 SF68DNA。从粪便中也不能生长出沙门氏菌或弯曲杆菌。来自安慰剂组猫的所有样品经 RAPD PCR 都呈现 SF68 阴性。在研究期间两组之间的难辨梭菌毒素 A/B 或产气荚膜杆菌肠毒素的阳性样品数 (表 1) 没有不同。

[0086] 补充 SF68 并不能诱导沙门氏菌和弯曲杆菌的释放。在两组小猫中的几个粪便样品为难辨梭菌或产气荚膜杆菌肠毒素阳性;然而,组间的阳性样本数没有显著差异,并且阳性结果与腹泻不相关。在补充期间多数治疗组小猫的粪便中可检测到 SF68,但是在停止补充之后的一周不再能检测到,这表明生物在猫中仅为短暂持续。因此,施用此处所述剂量的 SF68 没有有害作用,并且研究期间的施用是安全的。

[0087] 实施例 4

[0088] 免疫测定

[0089] 在科罗拉多州大学的临床病理学实验室进行全血细胞计数、血清生化检测和尿检验。通过使用适当的先前公开的 ELISA 测定来测量血清 FHV-1- 特异性 IgG、FHV-1- 特异性 IgA、FCV- 特异性 IgG 和血清中猫瘟 - 特异性 IgG10、以及唾液中 FHV-1 特异性 IgG 和 IgA 水平,来评估抗原特异性体液免疫应答。(Lappin MR 等人 (2002); 和 Ditmer DA 等人 (1998))。对于 FHV-1 特异性 IgG 和 IgA,通过每个样品的三个测试孔的平均吸光率和通过计算 ELISA 单位百分数 (测试样品的平均吸光率减去阴性对照样品平均吸光率 / 阳性对照样品平均吸光率减去阴性对照样品平均吸光率,再除以 100 来计算结果)。对于 FCV 和 FPV,使用平均吸光率。通过使用商业上可获得的 ELISA 测定或放射免疫扩散测定 (贝氏实验公司 (Bethell Laboratories, Inc.), Montgomery, TX) 来评估血清、粪便提取物和唾液中总 IgG 和 IgA 的浓度。

[0090] 通过流式细胞计数和全血细胞增殖测定来评估细胞免疫应答。在收集血液后的 12 小时之内,用 500  $\mu$ L 抗凝血剂 (EDTA) 在红细胞裂解缓冲液 (0.155M NH<sub>4</sub>Cl/0.010M

KHCO<sub>3</sub>/5×10<sup>-4</sup>%酚红(0.5%))中室温培育,进行流式细胞计数。细胞用PBS洗两次,获得的细胞沉淀在含PBS、0.1%叠氮钠和2%胎牛血清的FACS缓冲液中重悬,可能得到浓度为1×10<sup>6</sup>细胞/100μL的溶液。对于细胞不足的样品至少要用500μL的上述悬浮液来计数,并记录细胞浓度。将100μL各细胞悬浮液加入到圆底96孔板的各孔中,用于免疫染色。添加10%正常猫血清以阻断非特异性结合。(杰克逊免疫研究实验公司(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), West Grove, PA)。免疫染色在4℃FACS缓冲液中于黑暗条件进行。染色淋巴细胞以观察CD4和CD8的表达(vpg34;抗-CD4-fitc, vpg9;抗-CD8-rpe抗体; Serotec, Raleigh, NC(Oxford, UK))和CD44的表达(IM17;抗-CD44-pe/cy5抗体; Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)。对于B细胞的分析,裂解的全血细胞用B220(ra3-b62;抗-B220-生物素化抗体; eBioscience, 圣地亚哥, CA)、CD21(b-ly4;抗-CD21-apc抗体; BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、和II类MHC(抗-II类MHC-fitc抗体; 克隆CAG5-3D1, Serotec, Raleigh, NC(Oxford, UK))交叉反应抗体进行免疫染色。对细胞基于向前和侧向散射的特性来门控活的淋巴细胞群用于分析。用Cyan MLEcytometerp收集数据,并用Summit软件进行分析。(Dako-Cytomation, 柯林斯堡, CO)。

[0091] 进行三次增殖测定,在加入促细胞分裂剂或抗原之前,使用10μL预先准备的全肝素化血液在100μL完全肿瘤培养基中于37℃、5%CO<sub>2</sub>培育30分钟。(完全肿瘤培养基:补充必需和非必需氨基酸的改良Eagle's培养基+10%FBS)。细胞只在培养基中(非刺激)、或用刀豆球蛋白A(10μg/mL; Con A Sigma-Aldrich, 圣路易斯, MO)、或FHV-1抗原制品(1μL/孔,在研究开始前制备并分装保存于-80℃)在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下刺激96小时。(Veir JK等人(2005))。用每孔1μCi氚化胸腺嘧啶脉冲细胞,并于18小时后收集到纤维玻璃过滤器上。(Wallac-Microbeta Perkin-Elmer, 波士顿, MA)。用MicroBetas液体闪烁计数器读数。计算所有样品的平均刺激指数(每个刺激样品的平均最大计数除以每个非刺激样品的平均最大计数)。

[0092] 全血细胞计数和生化谱是在正常范围内所有猫年龄组的所有时间点进行。在分析的所有时间和任何个体时间点,组间没有统计学差异。在21和27周龄,治疗组的血清中FHV-1-特异性IgA的平均水平比安慰剂组中的大,但是差异不是统计学上的差异(图2)。在15、21和27周龄,使用两种测定方法,治疗组的FHV-1-特异性血清IgG平均水平比安慰剂组中的大,但是差异不具有统计学上的差异显著性(图3)。在唾液中没有检测到FHV-1特异性IgG。两组血清中FCV-特异性-IgG水平相似(图4)。在第15周龄,治疗组血清平均FPV-特异性IgG水平比安慰剂组的大,但是差异不是统计学上显著的差异(图5)。

[0093] 两组间血清中总IgG和IgA浓度相似(数据未显示)。在唾液中没有检测到总IgG,两组间唾液中总IgA浓度相似(数据未显示)。在27周龄,治疗组粪便提取物中总IgG平均浓度比安慰剂组的大,但是差异不是统计学上的差异(图6)。两组间粪便提取物中的总IgA浓度相似(图6)。

[0094] 使用10μg/mL刀豆球蛋白A或1μL FHV-1抗原制品作为刺激物的增殖测定中,在任一时间点均不产生组间平均最大计数的显著性差异。在前4个时间点,组间的任意细胞表面标记没有统计学上的差异(图7)。在27周龄,治疗组(平均值13.87%)的CD4门控淋巴细胞阳性的百分数显著高于安慰剂组(平均值10.61%, p = 0.0220)。其他的比较没有显著性差异。

[0095] 在 27 周龄, 治疗组中的 CD4+ 计数与安慰剂组相比有所增加, 而 CD8+ 计数没有同时增加, 证明益生菌对系统的免疫调控作用。在某些采集时间点监测到的体液免疫应答参数增大表明出现了 Th1 应答的刺激。在小狗中补充 SF68 的研究发现可以支持此假设 (Benyacoub J 等人 (2003))。

[0096] 接种以后, 各小猫发展了 FHV-1、FCV 和 FPV- 特异性的血清抗体应答, 这与其他研究相似, 表明它们具有免疫能力, 并且使用的减毒活疫苗是有活力的 (Lappin MR 等人 (2002))。几个结果也表明喂以益生菌会影响这些小猫的体液和细胞介导的免疫应答。这些包括在 27 周龄检测到的统计学上显著增大的 CD4+ 淋巴细胞计数, 和与安慰剂组相比较, 在 21 和 27 周龄血清和唾液中 FHV-1 特异性 IgA、在 15、21 和 27 周龄血清中 FHV-1- 特异性 IgG 水平、在 15 周龄血清中 FPV- 特异性 IgG 水平和在 27 周龄粪便提取物中的总 IgG 浓度的平均值均增大。

[0097] 参考文献

[0098] Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffman EJ, von der Weid W (2003), Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J. Nutr.* 133:1158-1162

[0099] Dittmer DA, Lappin MR, Carman J, Collins JK (1998), Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline herpesvirus 1 IgG in the serum, aqueous humor, and cerebrospinal fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:315-319

[0100] Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ (2003), Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern. Med. Rev.* 8:143-155

[0101] Isolauri E, Sutas Y, Kankaahpaa P, Arvilommi H, Salminen S (2001a), Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:444S

[0102] Isolauri E (2001b), Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:1142S-1146S

[0103] Kim LM, Morley PS, Traub-Dargatzis JL, Salman MD, Gentry-Weeks C (2001), Factors associated with *Salmonella* shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218:740-748

[0104] Lappin MR, Andrews J, Simpson D (2002), Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:38-42

[0105] Macpherson AJ, Uhr T (2004), Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303:1662-1665

[0106] Oyetayo VO and Oyetayo FL (2004), Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *Afr. J. Biotechnol.* 4:123-127.

[0107] Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003), Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:658-672

[0108] Richards J, Rodan I, Elston T, Flemmin D, Ford R, Henry S, Hustead D, Lappin

MR, Paul M, Rosen D, Scherk M, Scott F, Welborn L(2001). Feline Vaccine Selection and Administration, Compend. Cont. Ed. Pract. vet. 23 :71-80

[0109] Sanders ME(2003), Probiotics :considerations for human health Nutr. Rev. 61 :91-99

[0110] Schrezenmeir J, de Vrese M(2001), Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr. 73 :36 IS

[0111] Scott FW, Geissinger CM(1999), Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. Am. J. Vet. Res. 60 :652-8

[0112] Slater E, York C(1976), Comparative studies on parenteral and intranasal inoculation of an attenuated feline herpes virus. Dev. Biol. Stand. 33 :410-6

[0113] Sykes JE, Anderson GA, Studdert VP, Browning GF(1999), Prevalence of feline Chlamydia psittaci and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. J. Vet. Intern. Med. 13 :153-162

[0114] Van Pelt DR, Lappin MR(1994), Pathogenesis and treatment of feline rhinitis. [Review][48 refs]. Veterinary Clinics of North America—Small Animal Practice. 24 :807-823

[0115] Veir JK, Lappin MR, Radecke S. Whole blood proliferation assay to assess cell mediated immune responses to FHV-1. J. Vet. Diagn. Invest. 2005. (In Press)

[0116] 本发明不限于以上描述和举例的实施方案,而是可以在所附权利要求的范围内改变和修饰。

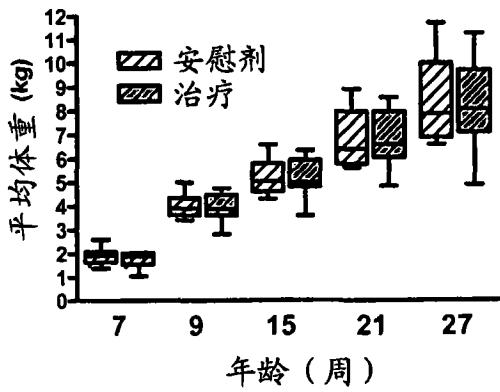


图 1a

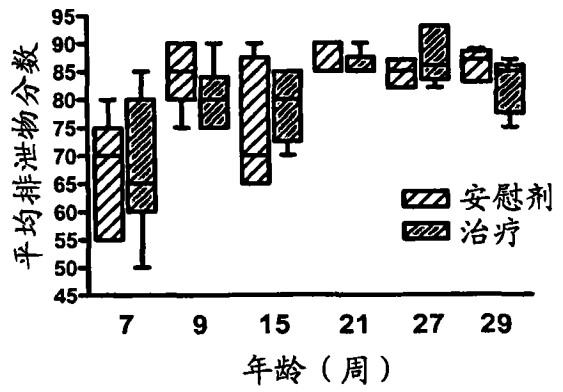


图 1b

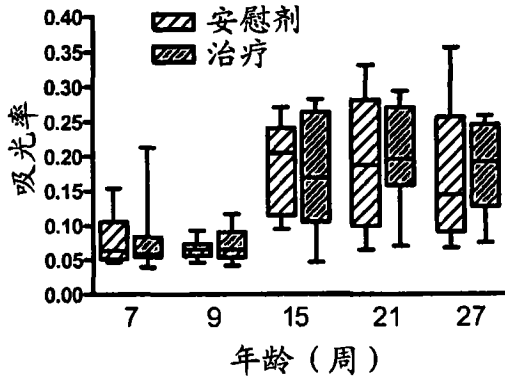


图 2a

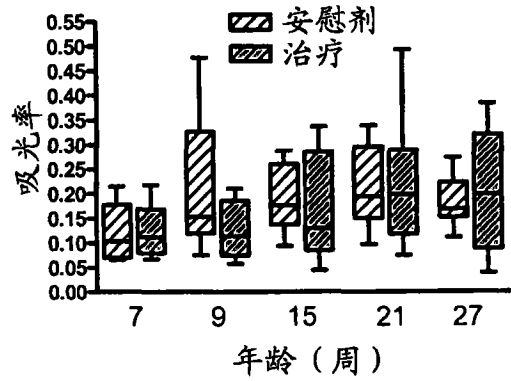


图 2b

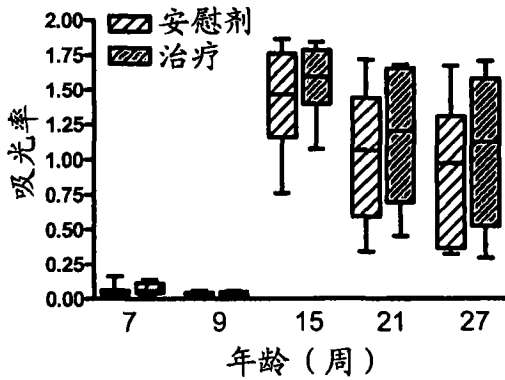


图 3

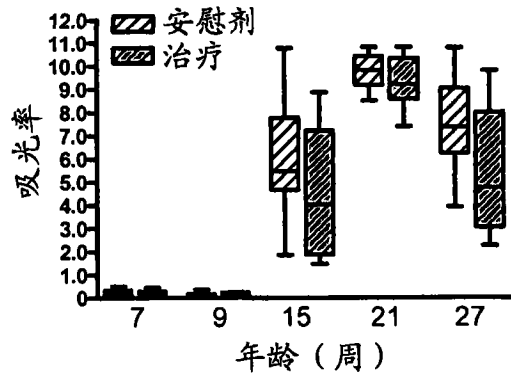


图 4

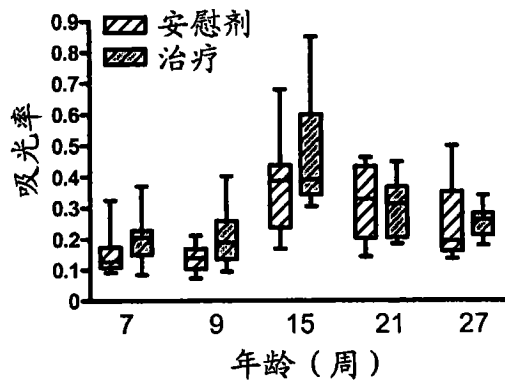


图 5

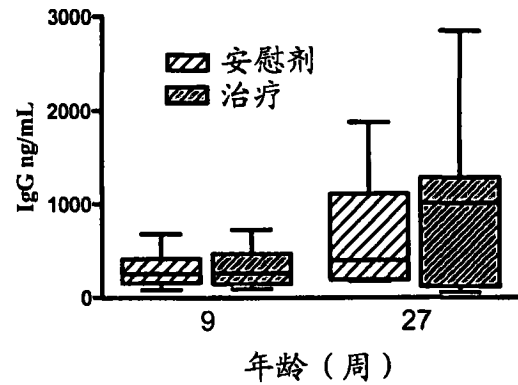


图 6a

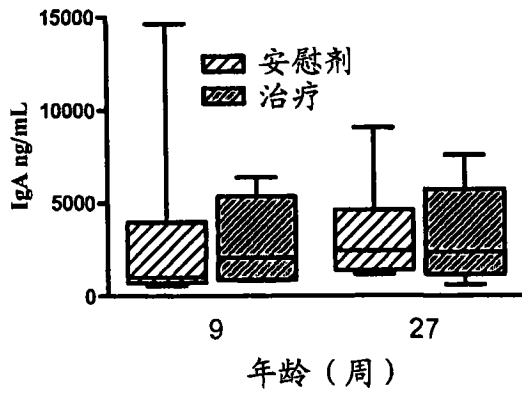


图 6b

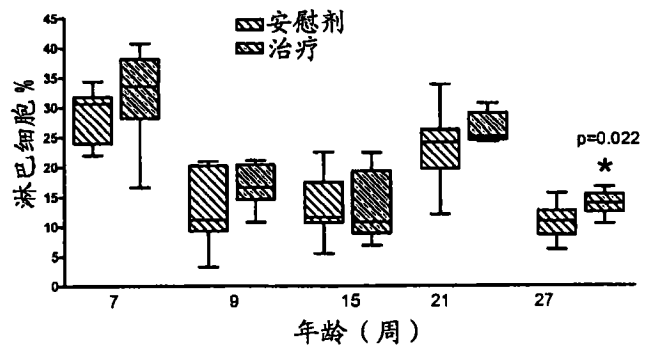


图 7a

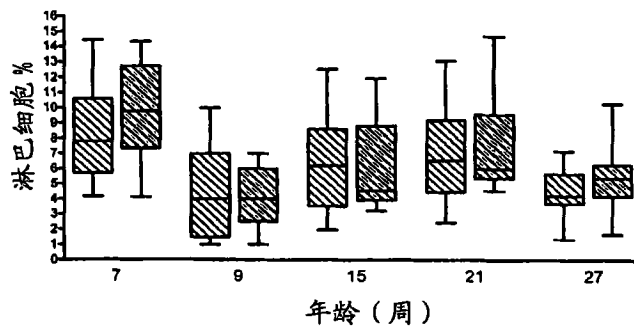


图 7b