

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710139878.3

[51] Int. Cl.

A61K 36/064 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 5 月 7 日

[11] 公开号 CN 101172118A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 33/14 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23C 9/127 (2006.01)

[22] 申请日 2007.7.25

[21] 申请号 200710139878.3

[30] 优先权

[32] 2006.7.26 [33] US [31] 11/493,859

[71] 申请人 美国医迈科技有限公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 林哲志

[74] 专利代理机构 上海恩田旭诚知识产权代理有限公司

代理人 尹洪波

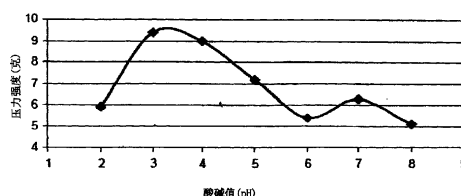
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 6 页

[54] 发明名称

作为抗传染病替代药物的益生微生物

[57] 摘要

在这项提案, 提供一个具代表性的新体系, 是用来改进喂食益生菌的方法。将益生菌特别是乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 和布拉酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*) 混合在不同的胶质网内, 包括黄原胶 (Xanthan), 壳聚糖 (chitosan) 或明胶 (gelatin)。使用这种混合胶质保护, 可以保护益生菌的活性, 并帮助抵抗, 多种恶劣的环境和不利生长的温度。这种具代表性的新方法也提供多种方法, 用有活性的益生菌, 赞助治疗, 鸟类及哺乳动物的传染病。此外, 益生菌也能常作辅佐剂, 以提高抗体的产生, 以及促进细胞性的免疫效果。更特别的是使用益生菌在此提示, 可以减少粪便中卵囊虫的数目, 增加抗体的产生。在被艾美尔球虫感染的鸡, 能促进脾细胞 (splenocytes) 的繁殖, 此外如被小病毒 (parvovirus) 感染的狗, 益生菌也能减轻他的病症。



1. 一种益生微生物组合物，其包括：至少一种包囊在明胶中、或黄原胶与壳聚糖的混合物中的益生微生物。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述益生微生物是酵母菌或乳酸菌。
3. 如权利要求 2 所述的组合物，其中所述益生微生物是小球菌属 (*Pediococcus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、杆菌属 (*Bacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、或肠球菌属 (*Enterococcus*) 细菌或酵母菌属 (*Saccharomyces*) 酵母。
4. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述小球菌属细菌是乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)，或者所述酵母菌属酵母是布拉酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae boulardii*)。
5. 一种调节寄主对抗原的免疫反应以及治疗鸟类、鱼类以及哺乳类动物的传染病的方法，所述方法包括：向需要增强所述免疫反应的寄主或向需要所述治疗的鸟类、鱼类或哺乳类动物施用如权利要求 1 所述的益生微生物组合物。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述益生微生物包含在动物的食物、宠物的零食、动物的风味料、发酵过的乳制品或酸奶中。
7. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述鸟类是鸡、鸚鵡、长尾小鸚鵡、鸽子、火鸡、鸭或鹅。
8. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述哺乳类是狗、猫、天竺鼠、亚洲大鼠、老鼠、兔子、猴子、猩猩、猪或人。
9. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述传染病由病原性细菌、病毒、真菌、寄生虫或原生动物引起。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述病毒是细小病毒(*parvovirus*)、轮状病毒(*rotavirus*)或流行感冒病毒(*influenza virus*)。
11. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述寄生虫是钩虫、蛔虫、鞭虫或绦虫。
12. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述原生动物是艾美尔球虫(*Eimeria*)、贾第

虫(*Giardia*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*)、弓形虫 (*Toxoplasma*)、疟原虫 (*Plasmodium*)、莱什曼原虫 (*Leishmania*)或是环孢子虫 (*Cyclospora*)。

13. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述调节免疫反应是增加抗体的产生或增加 T 细胞及辅助 T 细胞的繁殖。
14. 一种增强鸟类、鱼类和哺乳类动物对抗原的免疫反应的方法,所述方法包括向所述鸟类、鱼类或哺乳类动物施用如权利要求 1 所述的益生微生物组合物。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述增强免疫反应包括增加抗体的产生或增加 T 细胞的繁殖。
16. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述益生微生物包含在动物的食物、宠物的零食、动物的风味料、发酵过的乳制品或酸奶中。
17. 一种益生微生物组合物,其包含至少一种粉状益生微生物。

作为抗传染病替代药物的益生微生物

技术领域

本发明涉及一种益生微生物组合物，以及一种用该益生微生物组合物调节免疫反应的方法。

背景技术

相关文献的描述，包括信息发表在 37 CER1.97 和 37 CER1.98。

益生菌是一种有活性的微生物，应给予适量的益生菌，它可以授予“寄主”有益健康的效果(摘自联合国食物与农业组织及世界健康组织，替换医药 2001)。益生菌普及用与人类，及动物营养添加剂，例如说，酵母菌常作为给家禽的营养补充剂。优乐乳和乳酸菌，乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)，通常用来预防及治疗与腹泻，和有关肠胃感染的疾病(Alvaez, et al, 2001; Fuller 1989; Majamaa, et al 1995)。

许多益生菌独特的特点，例如抗感染的性质，调节免疫反应，增加防疫功能，代谢功能以及改变肠的蠕动及吸收功能。这些功能都使益生菌成为对人类及动物的替代医药(Walker and Buckley, 2006)。

虽然益生菌的产物，如短连脂肪酸 (SCFA)，细胞壁的蛋白肽糖(peptidoglycan)和短连去氧核糖核酸(DNA)含有 CPG 排列，可以有益生菌的功能。使用有活性的微生物，给人类和动物吃，是目前主要应用和研究益生菌的方针(Walker and Buckley, 2006)。为了使益生菌对人类及动物发挥最大的效果，我们必须将活的细菌传送到肠内并在肠内生长、繁殖(Kailasapatha and Chin 2000)。

乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)及双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)是两种最常见的乳酸益生菌，常在科学文献中讨论，也常在一般商品中见到。

这两属细菌是属于适合厌氧环境的细菌，这两属细菌中大部分的种及小种对

氧气以及高温都很敏感(Gomes et al, 1995; Talwakar and Kailasapathy, 2004), 所以在室温, 一直又开又关的环境下, 是非常困难维持这两类细菌的活性。因此, 对于目前的商品来说, 长期保存的方法, 以及在不同温度的运送条件, 常有不同的结果发表(Tuomola et al, 2001)。

美国专利号码 5,968,569, 声明在宠物食物中胶质, 淀粉网包含有益微生物, 特别声明是酵母菌属(*Saccharomyces*)及乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)。

美国专利号码 6,551,663, 声明给宠物的奶粉中含有乳酸酵素及乳酸, 并包含专利 5,968,569 所声明的益生菌。

美国专利号码 6,780,447 声明动物食物包含山梨酸(sorbic acid)以及有活性及无活性的微生物, 这些微生物是指乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)。

美国专利号码 6,827,957 声明动物食物中的特别组合, 包含一层软质的内层及硬质的外壳与益生菌混合在一起, 特别是指酵母菌属 (*Saccharomyces*)。

美国专利号码 6,827,397, 用脂肪来包含酵母菌, 包括各式各样的益生菌, 包括布拉酵母菌(*Saccharomyces boulardii*)和乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。

美国专利申请中 2003/0049240, 揭示一种方法, 是用乳酸杆菌(*Lactobacillus*)及双歧杆菌 (*Bifidobacterium*), 治疗螺杆菌(helicobacter)的感染。

美国专利申请中 2003/0109025, 声称一种方法用来制造一种微粒, 外面涂有活性的微生物。

美国专利申请中 2004/0197352, 声称益生菌的前身其中的成份和减少肌肉素(creatine)和 BUN 包含各种不同种的微生物。

美国专利申请中 2003/0165472, 声称一种用来储存及运输微生物。

美国专利申请中 2006/0008511, 声称益生菌包含在黄原胶 (xanthan gum), 壳聚糖 (chitosan)及明胶 (gelatin)的混合物中。

以前的例子无论相关与否都是用来说明。

发明内容

以下的体系与观念配合各种系统工具及方法来解释, 说明具代表性, 并不局限于此点的空间。在不同的体系中, 有一些上述的问题就相对减少或是解决, 当

我们用不同的方法系统来解决问题。

所揭示的具体实施方式包括一种宠物用制品，该制品包括包裹在黄原胶和壳聚糖的混合物中的益生菌。又所揭示的具体实施方式，包括准备给宠物食用的食物，包含益生微生物包装在一种明胶胶囊中，这种益生微生物是酵母菌 (*Saccharomyces*)及乳酸细菌。在此项揭示中，酵母菌是指酵母菌属(*Saccharomyces*)，乳酸细菌是指乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。酵母菌是特别指布拉酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae boulardii*)，又叫 *Saccharomyces boulardii*。所谓乳酸菌是指乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。在这项揭示中，黄原胶 (xanthan gum)的浓度是在 0.2-2.0%(百分比重量/容积)，壳聚糖的浓度在 0.1-1.0%(重量/容积)，而酸碱度(PH)在 2-7 之间。更具体一点来说，黄原胶 (xanthan gum)的浓度在 1.25%(重量/容积)左右，壳聚糖的浓度在 0.4%左右(重量/容积)，而酸碱(PH)度在 4.15 左右。所揭示的具体实施方式包括治疗鸟及哺乳动物肠胃有关的传染病。在这治疗的过程中，包括将益生菌包装在里面，或是将益生菌加在动物的饲料和零食里，当益生菌喂于鸟及哺乳类，以如此的方式可以增强鸟类与哺乳类的免疫功能，抵抗病原。

附图说明

图 1 表示，酸碱度(PH)和黄原胶和壳聚糖胶囊硬度的关系。

图 2 表示，益生菌的活性与有无黄原胶和壳聚糖胶囊在减温的关系。

图 3 表示，益生菌的活性与有无黄原胶和壳聚糖胶囊在增温的关系。

图 4 表示，益生菌的活性与有无黄原胶和壳聚糖胶囊在酸性环境的关系。

图 5 表示，益生菌对抗体产生的效应。

图 6 表示，益生菌对细胞免疫的效应。

图 7 表示，被(*E. acervullina*)感染鸡粪便中的胞囊虫。

图 8 表示，被(*E. acervullina*)或是(*E. tenella*)感染的鸡，粪便中的胞囊虫。

具体实施方式

有活性的乳酸菌与酵母菌用来喂食给猫狗宠物的益生菌，是被一种微生物的

生物多聚合物黄原胶 (xanthan gum)和壳聚糖(Chitosan)混合保护包装而成的。黄原胶 (xanthan gum)是一种多糖类胶,用很少的量,即可溶解在水中,加上些许的搅拌,就变成非常浓稠的溶液,它可以在溶液上形成一层强韧的保护膜,可以帮助益生菌提高对热分解的忍耐度。甲壳素 (chitin)也是一种多醣类,大部分是由不分支连的葡萄糖胺(N-acetyl-glucosamine)单位体。壳聚糖(Chitosan)是一种去除胺基(acetyl)的甲壳素,这种聚合物通常用来处理水,冲洗照相的乳剂以及改进人造合成纤维,织布的染色力,和伤口愈合的准备。

益生微生物被包裹在水溶液中,含有 0.5-2.5%(重量百分比,重量/体积)的黄原胶(Xanthan gum)以及 0.2-0.8%(重量/容积)的壳聚糖(chitosan) 胶囊,此溶液的酸碱度(PH)在 2 至 7 之间,比较更适宜的溶液是含有 1.25%的黄原胶 (xanthan)和 0.4%的壳聚糖(chitosan) 胶囊 (重量/容积),酸碱度(PH)在 4:15,此种被包裹而仍有活性的微生物细胞每毫升仍能形成 10^{10} 菌株单位体(cfu/ml)。

将有活性的益生微生物包裹在黄原胶(xanthan)和壳聚糖 (chitosan)的混合液中,它能保存微生物的活性,并将正确的活性益生菌的剂量,送到宠物的肠胃中,如此使喂食益生菌给猫狗能达到最大的效益。通常猫狗都不会拒绝食用益生菌,包裹在黄原胶 (xanthan)和壳聚糖(chitosan)的混合液中。

发明者希望不要被局限在这个解释,他们建议当益生微生物包含在黄原胶 (xanthan gum)和壳聚糖 (chitosan)溶液中,特殊的功效是因为这种胶囊混合液形成一处特殊的黄原胶壳聚糖 (xanthan chitosan) 结合复体。这个复体在溶液中带有两种相交的电极的电解质。由于不同的电极互相吸引而形成聚合电解质。根据测在中性的溶液中,黄原胶 (xanthan gum)大部分是带负电极,而壳聚糖 (chitosan)大部分是带有正电极,这两种聚合物带有不同电极在水溶液中,就会结合成一个稳定的聚合复体和强韧的胶囊。当酸碱值(PH)升高也就是溶液变在碱性,就会使壳聚糖的胺基部分去除(去离子),使两种聚合物之间产生比较不稳定的结合,导致成较弱的保护胶囊。

图 1 黄原胶(xanthan)和壳聚糖 (chitosan)的胶囊的硬度的酸碱值(PH)在 2 至 8 之间的关系。胶囊在上述适常的溶液环境下形成的。利用 TA.XT25 可以测量出胶囊的硬度与韧性,与不同酸碱值的关系,测量时用一个 5 公斤测值器,在距离 1

毫米下测量,图1表示胶囊最强韧尖峰是落在酸碱值3至4之间。当酸碱值在6至8之间,胶囊的韧性也相对减弱,图1的数据也符合前一段理论上的讨论。黄原胶(xanthan)和壳聚糖(chitosan)的黄原胶和壳聚糖 Xanthan chitosan 因正负两极相吸形成聚合复合体的稳定性与酸碱值有关。

图2显示,低温效应下,益生菌的活性与有无黄原胶(xanthan)和壳聚糖(chitosan)的胶囊的关系。在0°C将有胶囊和没有胶囊的益生菌置放1小时,没有胶囊保护的活性益生菌数目从 $10^{9.3}$ 菌株体/毫升(cfu/ml),降至 $10^{8.3}$ 菌株体/毫升。有胶囊的活性微生物数目从 $10^{9.3}$ 菌株体/毫升,降至 10^9 菌株体/毫升,图2显示在低温下,胶囊对益生菌的保护效果。

图3显示,高温效应下,益生菌的活性与有无黄原胶(xanthan)和壳聚糖(chitosan)的胶囊的关系。在60°C将有胶囊和没有胶囊的益生菌置放150秒,没有胶囊保护的活性微生物数目从 10^9 菌株体/毫升降至 10^7 菌株体/毫升。有胶囊的活性微生物数目从 10^9 菌株体/毫升降至 $10^{8.9}$ 菌株体/毫升。图3显示,在高温下,胶囊对益生菌的保护效果。

图4显示,在酸碱质低(酸性溶液)时,益生菌的活性与有无黄原胶(xanthan)和壳聚糖(chitosan)的黄原胶胶质(xanthan)和壳聚糖聚甲壳糖(chitosan)的混合液胶囊的关系。将有胶囊与没有胶质膜的益生菌,放置在酸碱值2的环境下0至60分钟不等,在30分钟后,没有胶囊的活性微生物从原来 10^9 降至 $10^{5.7}$ 菌株体/毫升,在60分钟后,降至 $10^{5.5}$ 菌株体/毫升。有胶囊的活性微生物从原来 10^9 降至 $10^{7.8}$ 菌株体/毫升,在30分与60分钟后,图4显示,在酸性高的溶液,胶囊对益生菌的保护效果!

益生菌可作为替代医药,可以替适烧烤的鸡防卫寄生虫引起的传染病。

鸟类的球虫病是在家禽养殖业最常见,最主要的寄生虫病,严重可以致死,轻者造成消化不良,吸收不佳,导致生长缓慢,并减少下蛋的机会(Lillehoj et al., 2004)。球虫病最明显的病状就是抑制生长,减缓体重的增加,在比较严重的状况,会减轻体重,这些都会影响到家禽业的经济效益(Dalloul and Lillehoj, 2006)。目前,药物及活菌疫苗是两种主要治疗球虫病的方法,但是由于使用预防疫病的药物管理手续增多,以及疫苗成本提高,替代治疗方法的需求也就相对提高,对于被艾

美尔球虫感染的子鸡，虽然观察到鸡体内的抗体增加，但是细胞免疫性的增加，才是治疗疾病的根本基础(Dalloul and Lillehoj, 2004)。最近益生菌研究的进展，证明活的细菌可以影响寄主体液免疫性增加，尤其是对由轮状病毒(rotavirus)、大肠杆菌(E.coli)及沙门杆菌(Salmonella)引起有关肠的疾病(Isolauri E., 2003; Majamaa, et al 1995; Perdigon et al 2001)。为了更有效使用益生菌成为一种替代医药，对抗由艾美尔球虫引起的传染病，我们必须证明使用益生菌喂食并被艾美尔球虫感染的子鸡，其鸡体内的体液免疫及细胞免疫均有提高，并有很好的效果。

检查使用益生菌对被艾美尔球虫感染的子鸡，在其体任何所产生任何可能的毒性。

将 15-20 只一天大的小鸡，列为一组，共有 6 组。从第一天起喂予不同的饲料，一组是对照组只喂食一般市面上的饲料，另外喂食添加益生菌。乳酸片球菌(*P. acidilactici*)的饲料，在喂食有益生菌的饲料中又分为五种不同的饲料，依照不同浓度的益生菌区分成 0, 0.01%, 0.05%, 0.1%及 0.4%。

在第 10 天，除了对照组的变化(没有喂食乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*, 没有感染)，其他所有的子鸡都给予口服感染 5000 个艾美尔球虫(*Eimeria acervulina*)的发芽的卵囊虫。在感染后的第 0, 6, 9 天之后，测量所有小鸡的重量，并记录他们体重的增值数。在感染后 6 天，开始收集小鸡的粪便，连续收集 4 天(感染后第 6 天到第 9 天)，收集粪便放于小桶内，并记录粪便中的卵囊虫。

将不同实验组及对照组所收集的数据差异，以“差异分析”(ANOVA)用统计的程式 GRAPHPAD INSTAT 分析，这是统计软体程式的注册商标，是由 GraphPad 软件公司所设计的。公司位于圣地牙哥，加利福尼亚州。数据是这个程式分析后，发现实验组之间与对照组有明显的差异，其概率 $P < 0.05$ ，此外还用 Dunnett 比较试验法，来比较每组的中间值。

图表 1(TABLE-US-00001)显示乳酸片球菌 (*Podiococcus acidilactici*)对被球虫菌感染的子鸡的生长以及鸡粪中卵囊虫的数目却有明显的影响与作用。首先检视子鸡被 5000 个艾美尔球虫的卵囊虫感染后 1-9 天体重增加的比较，一共有 6 组，依序为 1, 2, 3, 4, 5, 6。每组给 0, 5000, 5000, 5000, 5000 个卵囊虫。以及喂不同百分比的乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)，分别是 0%, 0%, 0.01%, 0.05%，

0.1%和 0.4%。

平均每组的体重增值依次为 396 克, 343 克, 362 克, 366 克, 395 克和 382 克, 其标准差为 45, 51, 58, 36, 44。其次在粪便中所收集的艾美尔球虫的卵囊虫每组平均值依次约为 0×10^8 , 2.65×10^8 , 1.97×10^8 , 2.39×10^8 , 1.39×10^8 , 2.10×10^8 , 其标准差为 0.67, 0.50, 0.27, 0.23, 0.60。

A.被 5000 个发芽卵囊虫感染后子鸡 1-9 天体重增加量, 以克为单位。

组别	发芽卵囊虫剂量	益生菌(%)	平均体重增加量 (克)	标准误差
1	0	0	396	45
2	5000	0	343	45
3	5000	0.01	362	51
4	5000	0.05	366	58
5	5000	0.1	395	36
6	5000	0.4	382	44

B.发芽卵囊虫感染鸡类似表 A

组别	发芽卵囊虫剂量	益生菌(%)	卵囊虫平均值($\times 10^8$)	标准误差
1	0	0	0	0
2	5000	0	2.65	0.67
3	5000	0.01	1.97	0.50
4	5000	0.05	2.39	0.27
5	5000	0.1	1.39	0.23
6	5000	0.4	2.10	0.60

当想要将一个试剂应用成为一个新的药物之前, 一定要去除此试剂会产生任何有毒素的副作用之可能性, 然后才能运行应用这试剂, 做各种数能的研究。乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 是一种自然生长在动物和人类肠内的微生物, 从来没有任何文献上记载, 这种乳酸片球菌有明显的毒害作用。为了确保调查乳酸片球

菌有可能造成对这种适合嫩鸡产生毒害的副作用，我们喂 0.1-0.4%的乳酸片球菌给嫩鸡或是被艾美尔球虫发芽卵囊虫(*E. acervulina*)感染的鸡。

如同表 1A 显示，无论是否被艾美尔球虫感染的嫩鸡，只要喂食乳酸片球菌，就没有体重减轻或是狭死的现象。更进一步的结果显示，被艾美尔球虫感染的嫩鸡喂能混合种的益生菌，也就是说乳酸片球菌 (*P. acidilactic*)与布拉酵母菌 (*S. boulardii*)浓度分别为 0.01%和 1.0%。这些被感染的鸡在感染期间，体重反而增加比较多，整个实验的过程当中，我们在喂益生菌给鸡吃之后，没有观察到任何主要器官有任何变化。这些器官包括，肝、心脏、肾、脾。此项实验与类似的实验结果证明被艾美尔球虫感染的嫩鸡，可以喂以比正常浓度高 40 倍的稚球乳酸菌(也就是说，浓度在 0.01%至 0.4%)或是喂以混合乳酸片球菌和布拉酵母菌浓度可以从 0.01 高达至 1.0%，都不会观察到任何形态上的变化。

为了证明乳酸片球菌 (*P. acidilactic*)可以用来防御子鸡被艾美尔球虫感染所产生的病症。我们观察是否使用乳酸片球菌来喂鸡，然后再口服一种艾美尔球虫的发芽卵囊虫(*Eimeria tellena*)。有趣的是被感染艾美尔球虫的子鸡，又喂以乳酸片球菌显示卵囊虫的数目量减少比没有喂食乳酸片球菌的子鸡产生的卵囊虫数大约少 20-40%百分比(参见图 7)。在相似的状况下，我们观察到当子鸡被 *E. acervulina* 感染时，若喂以混合两种益生菌乳酸片球菌和布拉酵母菌，卵囊虫的数目会减少到 30-50%百分比。当子鸡被 *E. tellena* 感染，又喂以同样的混合益生菌，卵囊虫的数目比没有喂食益生菌的鸡减少 10-20%(参见图 8)，因此这些结果显示益生菌可以减低病原或是寄生虫对鸡体内的损害。

喂食益生菌可以使被艾美尔球虫感染的嫩鸡，刺激鸡体内的体液免疫反应。

图 5 显示在喂食浓度不同的益生菌混合种(乳酸片球菌和布拉酵母菌)。以没有益生菌混合种(以 NOR 代表)，0.1%或 0.2%的比例掺和益生菌混合种在一般的饲料中喂食 21 天(以 MG0.1 和 MG0.2 代表)，检验鸡体内产生抗艾美尔球虫的抗体(Anti-ETMICZ)反应。比较孵化 12 天后没有被感染的子鸡，和被 5000 个艾美尔球虫(*E. tenella*)的卵囊虫感染子鸡，在感染卵囊虫后 10 天，取鸡的血清，检验抗艾美尔球虫的抗体。鸡体内产生抗艾美尔球虫的抗体(Anti-ETMICZ)反应不同，每一个带状条代表中间值加减标准差(N=3)，被感染艾美尔球虫的鸡和没有被感

染的鸡，他们的中间值有明显的不同，概率小于 0.05($P < 0.05$)。

为了评估抗体对艾美尔球虫抗原，ETMIC2 的反应。ETMIC2 是艾美尔球虫中的一种 *Eimeria* 蛋白，它的基因已经被分离出来，并加以分析评估(Dalloul et al, 2006)并用 ELISA 检定鸡体内的血清。在所有被艾美尔球虫 (*E. tenella*)感染的子鸡，他们的血清中明显的都引起产生对艾美尔球虫蛋白的抗体。更进一步说，在使用喂食益生菌乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)又被虫感染的鸡，他体内的血清对艾美尔球虫的抗体，明显的高过没有喂食益生菌又被虫感染的鸡，体内血清中的抗体，其概率 $P < 0.05$ (如图 5)。这项结果明显的证明益生菌乳酸片球菌(*P. acidilactici*)是能够刺激产生体液免疫性的抗体，来抵抗特定的寄生虫感染的嫩鸡。

全身性的细胞免疫性反应，淋巴球的繁殖。

图 6 显示 Concanavalline A (conA)可以导引脾细胞的繁殖。当嫩鸡感染艾美尔球虫后，又喂食普通饲料或含有不同浓度 0.01%，0.1%或 1.0%的混合益生菌乳酸片球菌和布拉酵母菌用 5000 个艾美尔球虫 *E. acervulina*(EA)或是 *E. tenella*(ET)的卵囊虫感染孵化 14 后天的子鸡，取出脾细胞加以培养，并加入 conA 继续培养 24 小时，接着用含有放射性的 $[^3\text{H}]$ -thymidine，来测量细胞繁殖，每一个带状条代表中间值加减标准差($N=3$)。感染不同种的艾美尔球虫(EA 或是 ET)的鸡，他们细胞繁殖的中间值不同。

概率(P)小于 0.05($P < 0.05$)。

我们利用被艾美尔球虫感染的嫩鸡，一组喂食普通饲料，另一组喂食含有益生菌的饲料，利用 conA 促使脾细胞繁殖反应的检测，来决定是否被喂食含有益生菌如乳酸片球菌的鸡能产生全身性的细胞免疫反应，来对抗艾美尔球虫的感染。在被 EA 艾美尔球虫感染的嫩鸡中，喂以含有 0.1%益生菌的嫩鸡，他们的脾细胞繁殖速度明显的比其他任何一组喂以不同饲料嫩鸡的脾细胞都快($P < 0.05$)。这些不同的饲料是指普通不含益生菌或是含有不同浓度的益生菌饲料，在被 ET 艾美尔球虫感染的嫩鸡中，喂食以含有 0.01%和 0.1%益生菌的嫩鸡组，明显的显示他们的脾细胞在受 conA 的刺激下，繁殖速度比其他实验组快，而喂以 0.1%益生菌的鸡之脾细胞繁殖速度又比 0.01%的快。

图 7 显示比较被艾美尔球虫 *E. tenella* (ET)感染的嫩鸡，被艾美尔球虫 ET，

感染的鸡粪中卵囊虫的数目。喂食普通的饲料(REG)或是含有 0.1%益生菌(MG0.1)或是含有 0.2%的益生菌(MG0.2)。感染后的 6 至 9 天, 每天收集鸡粪中的卵囊虫。MG 代表含有鸡球乳酸菌的饲料, 每一个带状条代表中间值加减标准差(N=5 个笼子)。

图 8, 用 5000 个艾美尔球虫的卵囊虫(EA 或是 ET), 感染 12 天孵化后的子鸡鸡粪中卵囊虫的数目, 在感染, 这些被感染的子鸡喂食普通饲料(REG), 含 0.01%的混合益生菌(M0.01), 0.1%(M0.1)或 1.0%(M1.0)。M 是代表混合乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)和布拉酵母菌(*S. boulardii*), 每一个带状条是代表中间值加减标准差(N=5 笼)。

益生菌可做为狗消化不良或是狗受病毒感染的替代医药。

益生菌的应用——对于狗消化不良的疫病。

应用益生菌成功的例子: 迈特灵 MITOMAX™, 是一种混合乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)和布拉酵母菌(*S. boulardii*)益生菌。它可以帮助子鸡抵制艾美尔球虫的感染, 使我们想进一步的做田间试验来评估是否迈特灵 MITOMAX™可以帮助解决狗消化不良的问题。迈特灵 MITOMAX™是益生菌的注册商标, 属于 Imagilin Technology, LLC, 位于波多马克, 马里兰州。它是混合乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)和布拉酵母菌(*S. boulardii*)被包装在明胶的胶囊中。这个田间评估是与巴西圣保罗 3 家动物医院的 4 位兽医进行合作实验 (表 2), 狗的体重分布于 2 公斤到 26 公斤, 狗龄大约 1 岁至 15 岁不等。这些狗都总有不同程度的肠胃消化不良的病症, 每天喂以 1 颗或 2 颗的益生菌, 按狗的体重来决定是 1 颗还是两颗。经过 14 天使用益生菌的治疗, 大部分的狗都有明显的改进, 不再受消化不良的现象。这项结果很明确的显示, 益生菌对于治疗消化不良的狗有很好的效果。表 2 (TABLE-US-0002) 将益生菌对治疗狗消化不良的田间试验所做的总结, 此项田间试验是在巴西圣保罗的动物医院进行的。

表 2 益生菌对有消化不良病症的狗患的田间评估, 评估是在巴西圣保罗市的动物医院进行。

名字	年龄 (年)	体重 (公斤)	性别 (男)或 (女)	益生菌处理前的病症 (D,V,C,OC,F,LA)*	益生菌 处理时 间(天)	益生菌处理 的效果**
佛尼	9	16	女	D+	4	恢复良好
派若基	4	10	男	D+, V+, F+	4	恢复良好
哈比	9	13	女	OC	10	减轻病症
贝尼	5	12	男	D+, F++	9	恢复良好
巴尔尼	1	4	女	LA+	4	减轻病症
派利	6	12	男	OC+	9	减轻病症
发尼尔	3	9	男	LA+	4	减轻病症
耐卡	2	6	女	D+, V+	4	减轻病症
汤姆斯	11	24	男	LA+	9	减轻病症
特特	10	5	女	D++, F+	9	恢复良好
阿德尼	10	25	男	D+	15	恢复良好
凯特	2	6	女	D++++	7	恢复良好
汤利	15	26	男	D++, V++	4	恢复良好
肯罗	13	4	男	D++	6	恢复良好
马利尔	13	4	男	D++	14	恢复良好
哈克	10	4	女	D++, V++, F+, LA+	9	恢复良好
派利克	2	3	男	D+, F+	12	恢复良好
乔非	1	7	男	V+, D++	4	恢复良好
马卡	1	2	男	D++++, F++	9	恢复良好

*: 消化不良有不同的病症, 分为 D=腹泻, V=呕吐, C=便秘, OC=体臭, F=肠胃胀气, LA=失专胃口, 病情程度: +++++=非常严重, ++++=严重, ++=轻微到严重之间, +=轻微。

**：益生菌治疗是指口服迈特灵 MITOMAX™ 的胶囊包含了混合乳酸片球菌和布拉酵母菌。如果狗的体重少于 20 公斤，每天口服一颗迈特灵 MITOMAX™，如果狗的体重超过 20 公斤以上，每天 2 颗迈特灵 MITOMAX™。

益生菌是一种替代医药，可用来停止狗因小病毒感染引起的血性腹泻。

被小病毒感染的狗，会有严重的肠、胃症状，如呕吐和血性腹泻。被感染的小狗，如果没有适当的医疗，几天内就会病死，因为这是病毒引起的疾病，抗生素不能有效的扑减病毒，狗的复健是依赖狗的免疫系统来对抗小病毒的感染，扩散，因此这会是很好的实例来描述益生菌用来做替代医药处理被小病毒感染的小狗。四只已被检试证实受小病毒感染的小狗，虽然经过综合抗生素的处理后，血性腹泻还是无法停止，这四只小狗喂食益生菌混合乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 和布拉酵母菌 (*S. boulardii*)，2-3 天后血性腹泻完全停止，大便也恢复正常的块状，经过连续 2 个星期服用益生菌，也没有任何的复发个案(表 3)。

表 3 益生菌对小病毒感染狗的疗效*。

名字	年龄 (月)	体重 (公斤)	小病毒 检测	经过标准小病毒感染处 理**后的证状	使用益生 微生物	疗效	2 周后 复发证
凯莉	4	5	阳性	血性腹泻,一天多于 6 次	2 天	止泻,块状大便	没有
旦活	5	6.4	阳性	血性腹泻,一天 6 次以上	3 天	止泻,块状大便	没有
佛拉希	12	20.5	阳性	血性腹泻,一天 6 次以上	2 天	止泻,块状大便	没有
摩利	9	20.5	阳性	血性腹泻,一天 6 次以上	3 天	止泻,块状大便	没有

*:由加州兰卡斯特的动物急救诊所的 Dr. Volkenbrough, DVM 所执行。

**：标准小病毒感染狗的处理是用综合抗生素(Normosol R, Reglan, Cefazolin, Metronidazole or Ampiliccin, +/- Famotidine)于感染的小狗，有些狗会接受多糖淀粉(hetastarch)或血浆运送。益生菌的处理是喂用 1 天 1 颗迈特灵 MITOMAX™——乳酸片球菌 *P. acidilactici* 和布拉酵母菌 *S. boulardii* 的综合剂。

益生菌对动物和人体的效用取决于益生菌的活性，胶质囊包装的益生菌，经过贮藏在低温 4°C 或常温 25°C，二年后，贮藏后的活性益生菌的数目被检试到和原来的益生菌的活性数目是相似的。艾美尔球虫感染的嫩鸡，喂食饲料，包含 0.01%到 0.4%的益生菌乳酸片球菌 *P. acidilactici* 后，形态上或体重上和没有被感染的嫩鸡，没有明显的差别。类似的结果也同样在不同的种艾美尔球虫 (EA 或 ET) 感染的嫩鸡得到。

益生菌(乳酸片球菌 *P. acidilactici* 或乳酸片球菌 *P. acidilactici* 和布拉酵母菌 *S. boulardii* 的综合剂)对于艾美尔球虫感染的嫩鸡的效用，取决于：1.从大便样品抽取卵囊数目的减少量 2.促进小鸡制造抗体 3.促进小鸡脾细胞的繁殖，益生菌(乳酸

片球菌 *P. acidilactici* 或乳酸片球菌 *P. acidilactici* 和布拉酵母菌 *S. boulardii* 的综合剂)。从动物医疗诊所的田间试验评估, 证明对肠胃消化病, 如泻肚, 呕吐, 丧失食欲, 口臭是有效果的。最重要的是, 口服益生菌综合剂(乳酸片球菌 *P. acidilactici* 和布拉酵母菌 *S. boulardii*)2-3 天后, 被小病毒感染的犬类, 健康能立即恢复, 这些结果描述益生菌可用来做代替医药, 对付传染性疾病。

最适合的益生菌是酵母菌和乳酸菌, 乳酸菌是小球菌属 (*Pediococcus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、杆菌属 (*Bacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)或酵母菌属。酵母菌属是 *Saccharomyces*, 囊包益生菌对致病的细菌、病毒、真菌、寄生虫和单胞体是有医疗效果的。囊包益生菌对钩虫、蛔虫、鞭虫, 绦虫是有医疗效果的, 囊包益生菌对球虫, 如贾第虫属是有效果的。

当人感染传染性肠胃病后, 服用适当剂量的囊包益生菌, 囊包益生菌对抗人体传染性肠胃病是有效的, 囊包益生菌对抗鱼类传染性肠胃病是有效的, 粉状益生菌和囊包益生菌是有相似的医疗效果的。

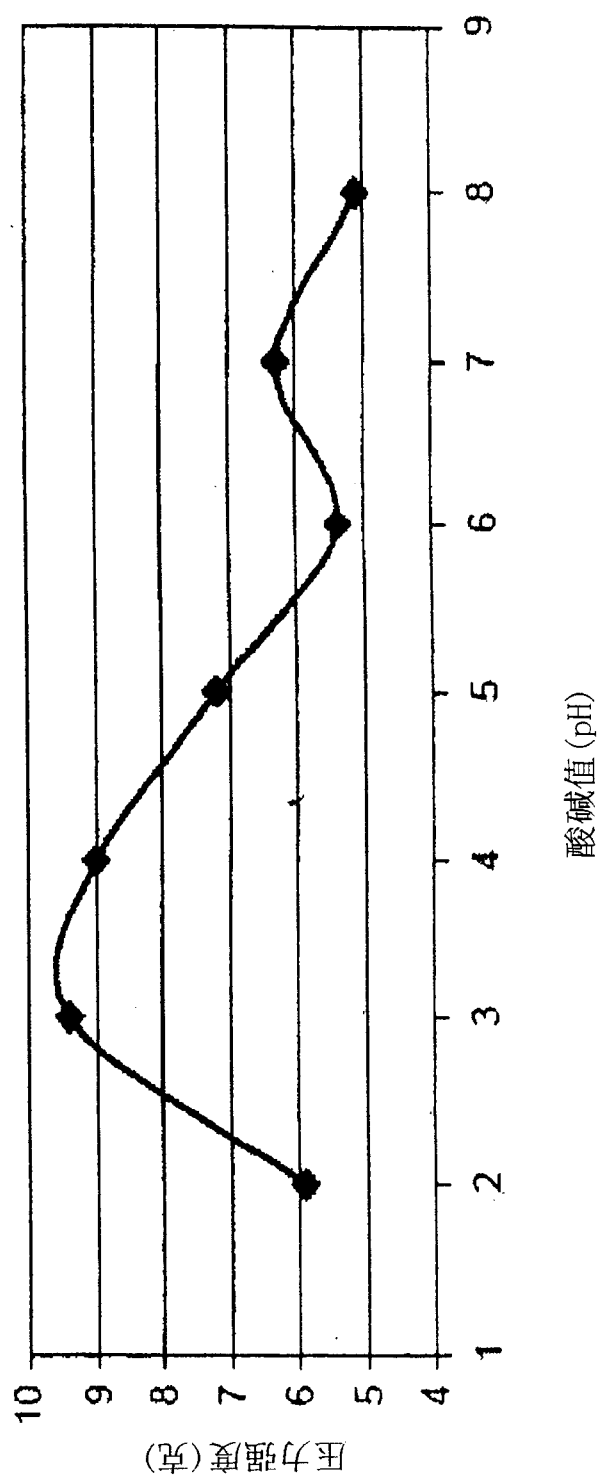


图1

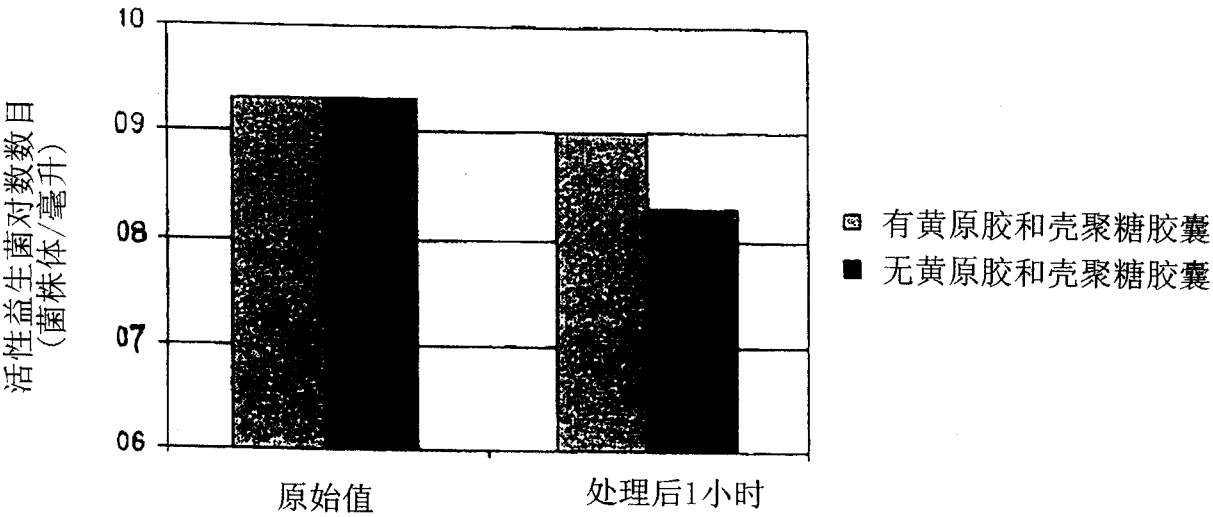


图2

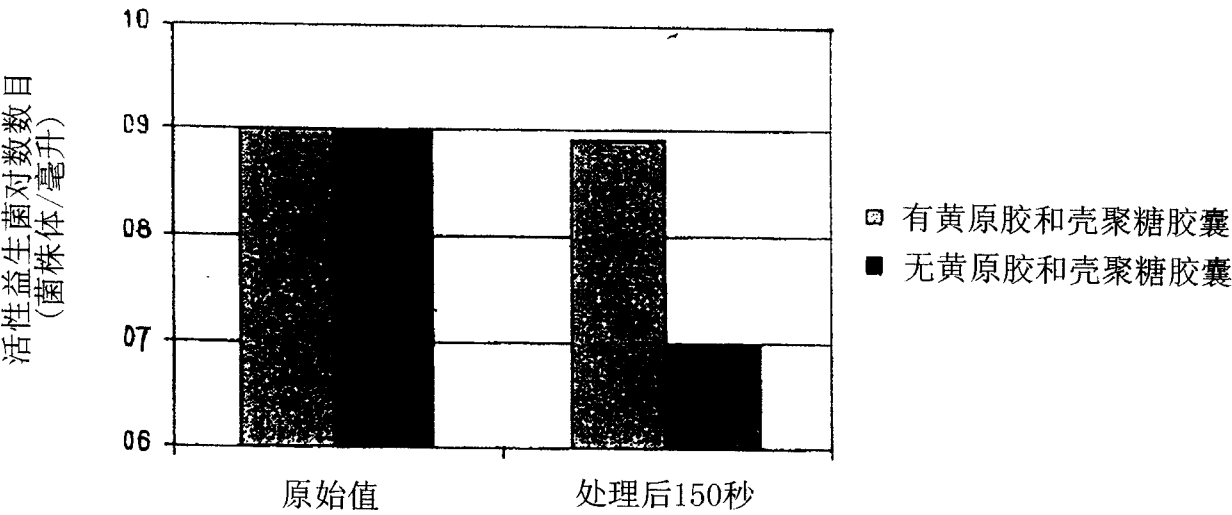


图3

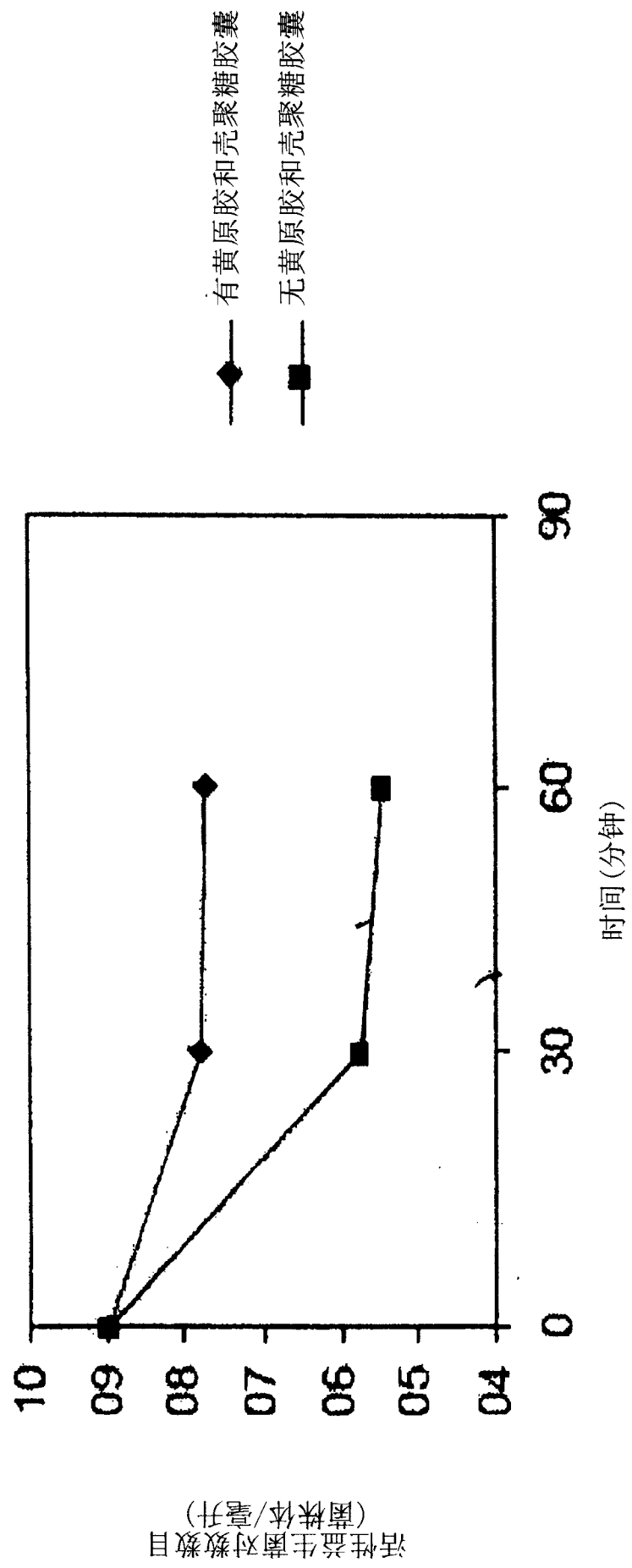


图4

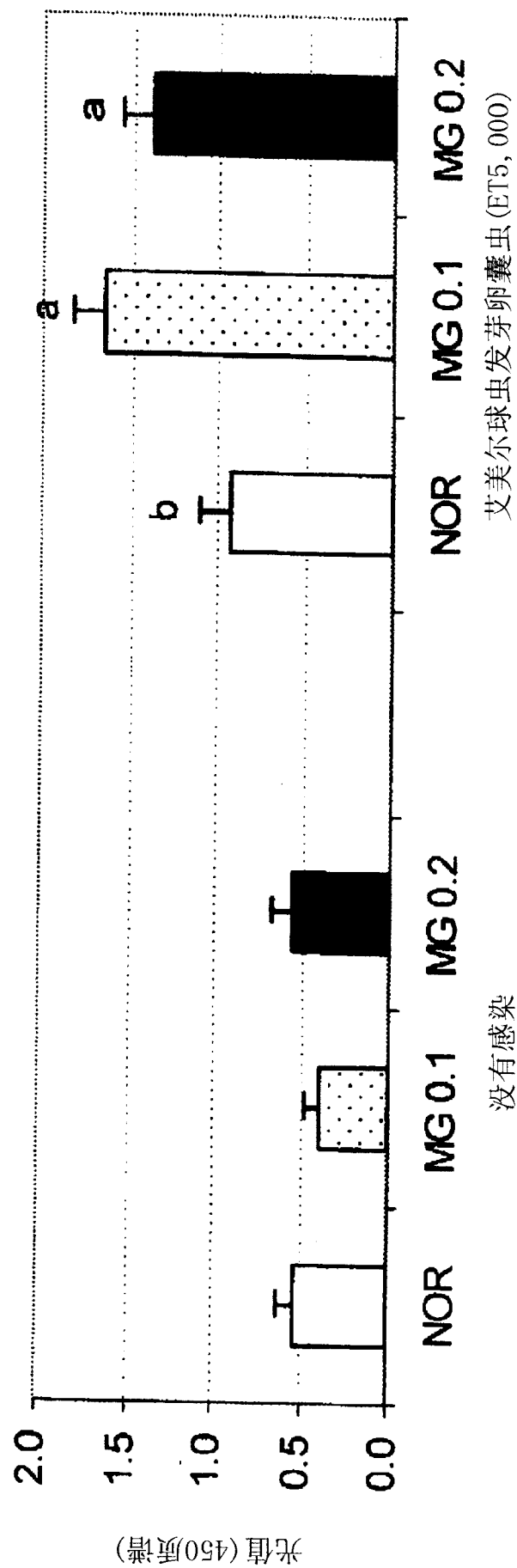


图5

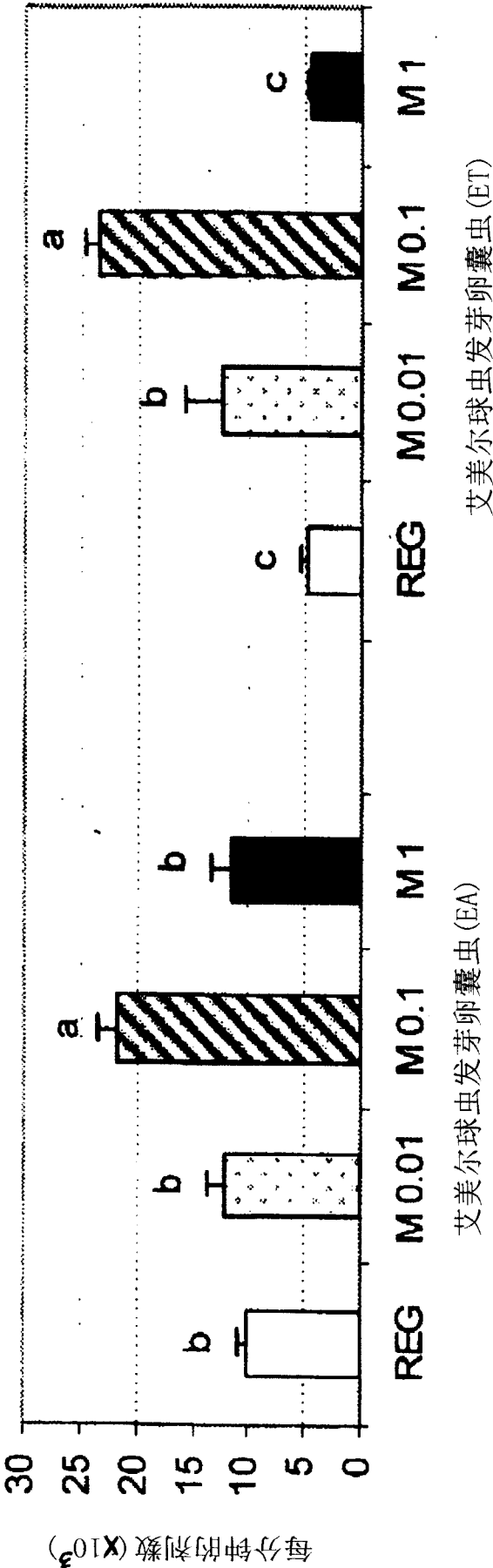


图6

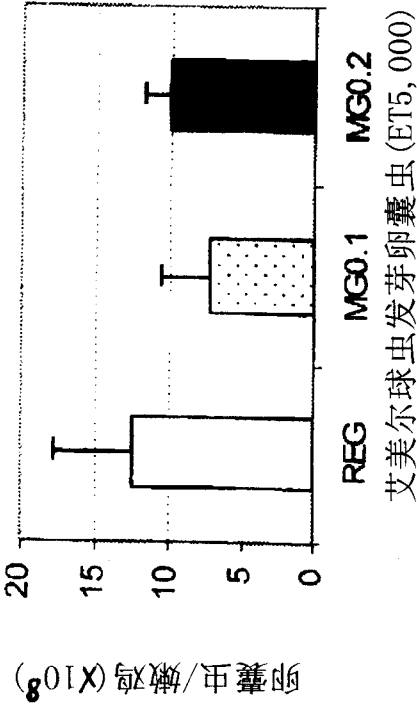


图7

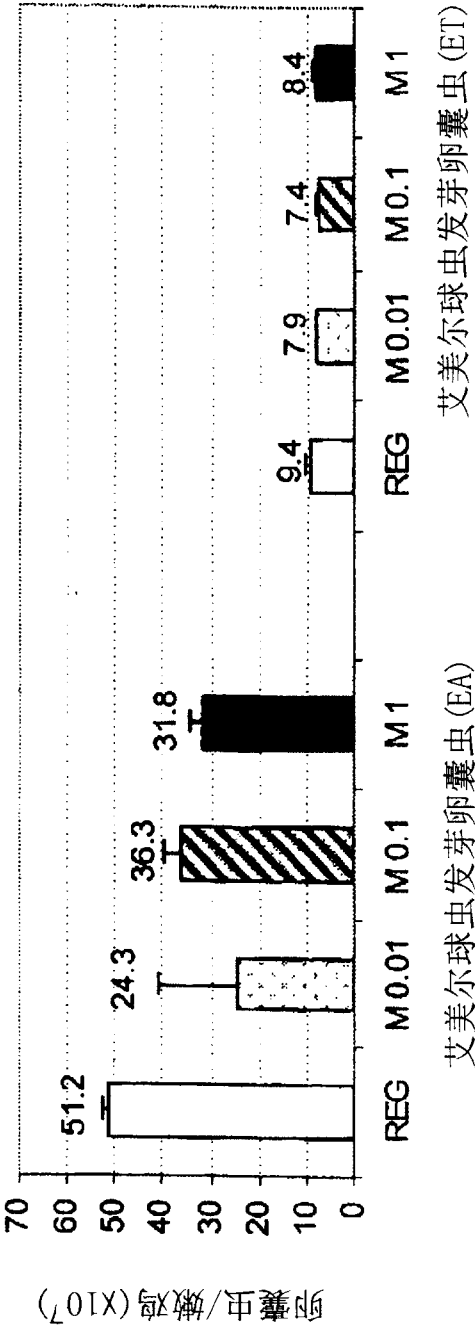


图8