



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113577112 B

(45) 授权公告日 2022. 03. 01

(21) 申请号 202111071631.9

A61K 35/742 (2015.01)

(22) 申请日 2021.09.14

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101803681 A, 2010.08.18

申请公布号 CN 113577112 A

CN 106085864 A, 2016.11.09

(43) 申请公布日 2021.11.02

宋羿. 基于青蒿琥酯抗菌增敏作用的新型

(73) 专利权人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药
研究所

AcrB抑制剂的设计、合成及作用研究.《中国优秀
硕士学位论文电子期刊网》.2017, (第6期),

地址 730050 甘肃省兰州市七里河区硷沟
沿335号

黄梅等. 青蒿素及其衍生物的抗菌活性初步
研究.《中国中药杂志》.2019, 第44卷(第9期),

(72) 发明人 王玲 郭文柱 沙赫巴兹 郭志廷
崔东安 王彩玲 魏小娟 杨峰
王春梅 吕嘉文 杨珍 程峰

Bin Li. Artesunate enhances the

antibacterial effect of b-lactam

antibiotics.《J Antimicrob Chemother》

.2011, (第66期),

(74) 专利代理机构 北京律谱知识产权代理有限
公司 11457

宋文龙等. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化及
微生态制剂的研制.《食品工业科技》.2013, 第34
卷(第17期), 第206-213页.

代理人 黄云铎 孙红颖

肖建光等. 联合用药对禽源沙门氏菌的体外
抑菌试验.《家禽科学》.2009, (第11期), 第33-36
页.

(51) Int. Cl.

胡海燕等. 复方氨苄西林可溶性粉治疗鸡大
肠杆菌病的疗效试验.《中国兽药杂志》.2005, 第
39卷(第10期), 第34-36页.

A61K 31/43 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

审查员 李德利

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

一种防治禽沙门氏菌病的药物组合物及制
备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种预防和治疗禽沙门氏菌病的
药物组合物及其制备方法, 该药物组合物包括
以下组分: 青蒿酸、氨苄西林钠、环丙沙星、多糖+
益生菌微囊。本发明的药物组合物选取单体中药
有效成分与抗生素联合使用, 可在提高抗菌抑杀
作用的前提下, 减少以往中药和抗生素的使用
量, 提高药物生物利用度和效能。同时以免疫增
强调节为辅助治疗手段, 选择多糖与益生菌对患
病雏鸡进行肠道菌群调节及重新构建良好的微

生物菌系, 从而加强雏鸡免疫功能, 提高生产性
能。本发明的药物组合物可通过混饲给药, 适于
临床应用且疗效确切, 适于集约化规模养殖场应
用。

1. 一种防治禽沙门氏菌病的药物组合物,其特征在于:所述药物组合物的组分及其重量份为:青蒿酸10-30份;氨苄西林钠0.001-0.002份;环丙沙星0.00005-0.00015份;由银耳多糖、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌构成的微囊270-290份。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于:所述药物组合物的组分及其重量份为:青蒿酸20份;氨苄西林钠0.00125份;环丙沙星0.0001份;银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其特征在于:制备微囊时,微囊的组分及其重量份为:银耳多糖70份,枯草芽孢杆菌70份,产朊假丝酵母菌140份。

4. 一种权利要求1和2任一项所述的药物组合物的制备方法,包括如下步骤:

步骤1. 制备银耳多糖、枯草芽孢杆菌及产朊假丝酵母菌微囊;

步骤1.1. 将枯草芽孢杆菌新鲜培养物接种至胰酪大豆胨液体培养基,恒温振荡培养约24h,恒温振荡的条件是:温度30~35℃,转速150r/min,培养基中的活菌含量扩大培养至 9.0×10^8 CFU/mL为宜;所得菌液,进行低温离心操作,低温离心的条件是:4℃,3000rpm条件下,离心5~6min,弃上清收集底层菌泥;再加入pH 7.4的PBS缓冲液,移液枪吹打混匀菌泥,低温离心获得的干净湿菌体;称取70mg菌泥,用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL,4℃保存,备用;

步骤1.2. 将产朊假丝酵母菌新鲜复壮培养物接种至基础培养基,恒温振荡培养24h,恒温振荡的条件是:温度28℃,转速180r/min,培养基中的活菌含量扩大培养至 9.0×10^8 CFU/mL;进行低温离心操作,低温离心的条件是:4℃、3000rpm低温离心5~6min,弃上清收集底层菌泥;再加入pH 7.4的PBS缓冲液,移液枪吹打混匀菌泥,低温离心获得的干净湿菌体;称取140mg菌泥,用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL,4℃保存,备用;

步骤1.3. 制备微囊包被所需试剂溶液:配制质量浓度为2.0%的海藻酸钠水溶液,配制质量浓度为2.0%的CaCl₂溶液作为第一成囊溶液、质量浓度为2.0%的壳聚糖溶液作为第二成囊溶液,配制质量浓度为1.0%的CaCl₂溶液作为洗涤溶液;20mL大豆色拉油作为乳化剂,内含体积比为0.1%~0.4%的司班80;

步骤1.4. 以银耳多糖为辅助芯材,以海藻酸钠-壳聚糖微囊为载体,进行微生态制剂微囊的制备;

将步骤1.1、步骤1.2制备获得的枯草芽孢杆菌菌悬液、产朊假丝酵母菌菌悬液及70mg银耳多糖,缓慢加入到100mL的2.0%海藻酸钠水溶液中;再加入2.0mL的乳化剂大豆色拉油,在37℃、400rpm磁力搅拌的作用下,均质乳化30min,形成均匀浑浊乳状液;

步骤1.5. 将步骤1.4制成的均质乳化液,通过注射器挤压滴入到2.0%的CaCl₂溶液中进行包被,包被搅拌速率为100~150rpm;反应完成后,静置固化40min左右;去除上清液,将微球用步骤1.0%的CaCl₂溶液洗涤;再与2.0%的壳聚糖溶液反应,充分混合,进一步固化30min;将微球用去离子水清洗过滤,自然干燥或冷冻干燥,制得包被有银耳多糖、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌的微囊制品;

步骤2. 进行药物组合物的制备:按照重量份数,青蒿酸20份;氨苄西林钠0.00125份;环丙沙星0.0001份;银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份,其中银耳多糖70份,枯草芽孢杆菌70份,产朊假丝酵母菌140份;依次称取,混匀;根据应装剂量,将药物混合物称量、分装,置热封口小铝箔袋封装,贴标后,4℃储存,备用。

5. 根据权利要求1~3任一项所述的药物组合物在制备预防和治疗禽沙门氏菌病的药物中的应用。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物的应用, 用于禽鸡白痢、禽伤寒及禽副伤寒沙门氏菌感染引起的疾病。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物的应用, 所述药物组合物为口服散剂, 通过饲料拌服给药, 治疗添加用量为3.0g药物组合物/10kg鸡饲料, 3~5天为1个疗程; 预防添加用量为1.5g药物组合物/10kg鸡饲料, 3~5天为1个疗程。

一种防治禽沙门氏菌病的药物组合物及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽药领域,具体涉及一种预防和治疗禽沙门氏菌病的药物组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 禽沙门氏菌病是由肠杆菌科沙门氏菌属中的一种或多种沙门氏菌引起的一类严重威胁家禽肠道健康的细菌性疾病,依病原体的抗原结构不同,分为鸡白痢、禽伤寒及禽副伤寒三种。其中以鸡白痢的发病率和死亡率为最高,呈流行性,2~3周龄以内雏鸡最为易感,雏鸡感染后表现为下痢,排白色、糊状稀粪,肛门周围的绒毛常被粪便所污染,干后结成石灰样硬块;成年鸡感染后呈慢性或隐性经过,虽无临床症状,但是影响产卵量和受精率,还可经蛋传播给子代鸡。存在本病的老疫场,雏鸡的发病率为20%~40%,但新传入发病的鸡场,发病率显著增高,病死率也高于老疫场。由于诱发禽副伤寒的沙门氏菌能广泛地感染各种动物和人类,例如人感染后以胃肠炎型(食物中毒)最常见,因此,在公共卫生上有着重要意义。本病的病原体血清型众多,难以用疫苗来预防该病,氟喹诺酮类及氨基青霉素类等抗生素可以控制本病,但不能完全消灭,而且抗生素的长期滥用,细菌容易产生耐药性,畜禽产品药物残留问题日益突出。因此,临床上需根据细菌对药物的敏感性,正确使用抗菌药物,同时,寻求高效低毒、无残留的新型药物制剂来控制禽沙门氏菌病。

[0003] 中草药具有非特异性抗菌作用,残留毒性均较低,且不易产生耐药性。但目前临床应用治疗鸡白痢的传统中药剂型主要为散剂,适口性差,生物利用度低,不能适应现代集约化规模养殖业的发展使用。前期研究表明,青蒿素的合成前体——青蒿酸,可协同不同喹诺酮类或 β -内酰胺类抗生素对致腹泻、耐药性沙门氏菌产生较好的抗菌效果,其效果明显优于单独使用青蒿酸单体,或单独使用抗生素,两者联合用药其抗菌增敏作用呈协同效应,可增强耐药菌对抗生素和青蒿酸的药物敏感性。与单独用药时的最低抑菌浓度1MIC值相比,联合用药时的单药最低浓度仅为1/4MIC、1/8MIC及1/16MIC浓度,抗菌效果成倍增加,由此可大大减少了临床抗生素的使用量。综上,针对禽沙门氏菌病选取单体中药有效成分与抗生素联合使用,可在提高药效的前提下,减少中药和抗生素的使用量,提高药物生物利用度和效能,不失为一种理想的研发重新途径。同时以免疫增强调节为辅助治疗手段,选择多糖与益生菌对患病雏鸡进行肠道菌群调节,加快恢复、重新构建良好的微生物菌系,全面加强雏鸡免疫功能,提高生产性能。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术存在的问题,本发明提供一种用于治疗禽沙门氏菌病的药物组合物,标本兼治,从根本上解决家禽肠道健康问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用的一种防治禽沙门氏菌病的药物组合物,其特征在于:所述药物组合物的组分及其重量份为:青蒿酸10-30份;氨苄西林钠0.001-0.002份;环丙沙星0.00005-0.00015份;由银耳多糖、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌构成的微囊

270-290份。

[0006] 进一步地,所述药物组合物的组分及其重量份为:青蒿酸20份;氨苄西林钠0.00125份;环丙沙星0.0001份;银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份。

[0007] 进一步地,制备微囊时,微囊的组分及其重量份为:银耳多糖70份,枯草芽孢杆菌70份,产朊假丝酵母菌140份。

[0008] 本发明还提供了一种用于治疗禽沙门氏菌病的药物组合物的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤1.分别制备银耳多糖、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌微囊;

[0010] 步骤1.1.将枯草芽孢杆菌新鲜培养物接种至胰酪大豆胨液体培养基,恒温振荡培养约24h,恒温振荡的条件是:温度30~35℃,转速150r/min,培养基中的活菌含量扩大培养至 9.0×10^8 CFU/mL为宜;所得菌液,进行低温离心操作,低温离心的条件是:4℃,3000rpm条件下,离心5~6min,弃上清收集底层菌泥;再加入pH 7.4的PBS缓冲液,移液枪吹打混匀菌泥,低温离心获得的干净湿菌体;称取70mg菌泥,用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL,4℃保存,备用;

[0011] 步骤1.2.将产朊假丝酵母菌新鲜复壮培养物接种至基础培养基,恒温振荡培养24h,恒温振荡的条件是:温度28℃,转速180r/min,培养基中的活菌含量扩大培养至 9.0×10^8 CFU/mL;进行低温离心操作,低温离心的条件是:4℃、3000rpm低温离心5~6min,弃上清收集底层菌泥;再加入pH 7.4的PBS缓冲液,移液枪吹打混匀菌泥,低温离心获得的干净湿菌体;称取140mg菌泥,用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL,4℃保存,备用;

[0012] 步骤1.3.制备微囊包被所需试剂溶液:配制质量浓度为2.0%的海藻酸钠水溶液,配制质量浓度为2.0%的CaCl₂溶液作为第一成囊溶液、质量浓度为2.0%的壳聚糖溶液作为第二成囊溶液,配制质量浓度为1.0%的CaCl₂溶液作为洗涤溶液;20mL大豆色拉油作为乳化剂,内含体积比为0.1%~0.4%的司班80。

[0013] 步骤1.4.以银耳多糖为辅助芯材,以海藻酸钠-壳聚糖微囊为载体,进行微生态制剂微囊的制备;

[0014] 将步骤1.1、步骤1.2制备获得的枯草芽孢杆菌菌悬液、产朊假丝酵母菌悬液及70mg银耳多糖,缓慢加入到100mL的2.0%海藻酸钠水溶液中;再加入2.0mL的乳化剂大豆色拉油,在37℃、400rpm磁力搅拌的作用下,均质乳化30min,形成均匀浑浊乳状液;

[0015] 步骤1.5.将步骤1.4制成的均质乳化液,通过注射器挤压滴入到2.0%的CaCl₂溶液中进行包被,包被搅拌速率为100~150rpm;反应完成后,静置固化40min左右;去除上清液,将微球用步骤1.0%的CaCl₂溶液洗涤;再与2.0%的壳聚糖溶液反应,充分混合,进一步固化30min;将微球用去离子水清洗过滤,自然干燥或冷冻干燥,制得包被有银耳多糖、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌的微囊制品;

[0016] 步骤2.进行药物组合物的制备:按照重量份数,青蒿酸20份;氨苄西林钠0.00125份;环丙沙星0.0001份;银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份,其中银耳多糖70份,枯草芽孢杆菌70份,产朊假丝酵母菌140份;依次称取,混匀;根据应装剂量,将药物混合物称量、分装,置热封口小铝箔袋封装,贴标后,4℃储存,备用。

[0017] 进一步地,本发明还提供了一种药物组合物在制备预防和治疗禽沙门氏菌病的药物中的应用。

[0018] 进一步地,本发明还提供了一种药物组合物的应用,用于禽鸡白痢、禽伤寒及禽副伤寒沙门氏菌感染引起的疾病。

[0019] 进一步地,所述药物组合物为口服散剂,通过饲料拌服给药,治疗添加用量为3.0g/10kg鸡饲料,3~5天为1个疗程;预防添加用量为1.5g/10kg鸡饲料,3~5天为1个疗程

[0020] 与现有技术相比,本发明的药物组合物可以有效防治家禽沙门氏菌病,达到标本兼治的效果,从根本上解决家禽肠道健康问题。本发明具有如下有益效果:

[0021] (1) 本发明制备的药物组合物,可针对禽沙门氏菌引起的急性腹泻,如鸡白痢、禽伤寒及禽副伤寒。其中所含青蒿酸与 β -内酰胺类抗生素氨苄西林钠和喹诺酮类抗生素环丙沙星联合应用时,可产生联合抗菌增敏效果。该联合增敏组合剂可协同逆转致腹泻沙门氏菌的耐药性,并提高耐药沙门氏菌的药物敏感性,显著增强青蒿酸或抗生素的抑菌作用,腹泻治疗效果明显优于单独使用青蒿酸,或单独使用抗生素,协同增效的杀菌作用可成倍增强。与单独用药时的最低抑菌浓度1MIC值相比,联合用药时的单药最低浓度仅为1/4MIC、1/8MIC及1/16MIC浓度。因此,选取单体中药有效成分与抗生素联合使用,可在提高抗菌抑杀作用的前提下,同时减少以往中药和抗生素的使用量,提高药物生物利用度和效能,不失为一种理想的研发重新途径。

[0022] (2) 本发明提供了一种用于治疗禽沙门氏菌病的药物组合物,其中所含银耳多糖、益生菌枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母菌,采用肠溶微囊剂型,尤利于雏鸡服用。微囊的良好密闭性,可避免药物组合中抗生素对益生菌的抑杀作用,能较好的提高药物稳定性,同时也便于运输、保存和使用。其次,微囊中的药物可在家禽胃肠道中定点散发、溶出和吸收,尤其利于保护所含益生菌的生物活性,可有效保障益生菌在病畜肠道内发挥功效,通过竞争性排斥作用减少肠道内致病性沙门氏菌的数量,从而提高药物的生物利用度。

[0023] (3) 本发明提供的药物组合物,其中微囊是将银耳多糖与益生菌组合起来,通过三者共同协调肠道菌群,通过银耳多糖中富含的蛋白质、维生素、氨基酸等营养成分,以及益生菌的非特异性免疫原性,能够刺激动物机体免疫应答,降低动物应激反应;银耳多糖还可作为某些外源抗原如毒素、病毒和致病菌的佐剂,增加抗原的效价,从而增强动物体的细胞和体液免疫反应。再者还可通过增强家禽的抗病力,减轻气温剧变、微生物入侵等因素引起的应激反应,提高动物机体抵御疾病的能力。

[0024] (4) 本发明提供的药物组合物,其中微囊包含的益生菌枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母菌能调控动物胃肠道微生态环境,它能选择性促进动物肠道有益菌生长和繁殖,使其在胃肠道中形成微生态竞争优势,抑制有害外源菌和肠内固有腐败菌在肠道的粘附和定植,从而发挥正常肠道菌群在屏障、营养和免疫上的正常功能,得以维持正常的消化道环境。其次,所含产朊假丝酵母菌含有丰富的蛋白质,可改善产品口味,可通过刺激患病家禽免疫系统的防御能力,加快恢复、建立良好的肠道微生物菌系,减少肠道内有毒物质的产生,保护肠道黏膜的完整性,对家禽机体免疫功能和生产性能具有良好的促进作用。

[0025] 本发明提供的药物组合物,依据禽沙门氏菌病的发病诱因和临床特征,以抗炎抑菌、清肠止泻、免疫调节为治疗原则,按照一定重量份数的青蒿酸、抗生素、银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊,混合制备而成。首先可通过药物单体与抗生素之间的协同抗菌增敏作用成倍增强抑菌效果,止泻效果理想,治疗时间短,可减少抗生素的使用量,由此消除抗生素残留对牧区草场公共卫生的威胁,符合当前提供安全无污染动物源食品的社

会需求。其次,本发明提供一种用于防治禽沙门氏菌病的药物组合物,其中所含银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊,为肠溶微囊剂型,尤利于雏鸡服用(饲料拌服),符合临床用药的便利化需求;微囊中药物成分在肠道溶解、释放后,可以抑制致病性沙门氏菌的繁殖,促进益生菌的增值,快速修复雏鸡肠道粘膜。该药物组合物的制备方法简单,安全可靠,选材方便、成本低廉,易于形成规模化生产。

具体实施方式

[0026] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面对本发明进行进一步详细说明。但是应该理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限制本发明的范围。下述实施例中所用的试验材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0027] 实施例1青蒿酸、氨苄西林钠及环丙沙星的MIC值,以及联合抗菌FICI指数测定

[0028] (1) 单体中药有效成分与抗生素的MIC值测定

[0029] 按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的方法步骤,采用96孔板微量肉汤稀释法,进行青蒿酸单体的MIC值测定。采用E-试验,通过含药药敏试条(Liofilchem s.r.l,意大利),阅读抑菌圈和试条的横向相交处的读数刻度,测定抗生素氨苄西林钠和环丙沙星对测试菌的MIC值。抗生素环丙沙星(Lot#C10532503, $\geq 98\%$),购自上海麦克林生化科技有限公司;氨苄西林钠(Lot.No.826H031, $\geq 85\%$),均购自北京索莱宝科技有限公司。鸡白痢沙门氏杆菌(*Salmonella pullorum*, BNCC124693, 购自北京北纳创联生物技术研究院);乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*, CMCC(B) 50094, 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心);其余2株沙门氏菌为临床分离株,本实验室保存,实验用。

[0030] (2) 采用棋盘格稀释法进行联合药物的FICI指数测定

[0031] 联合方案为青蒿酸+ β -内酰胺类抗生素氨苄西林钠、青蒿酸+喹诺酮类抗生素环丙沙星以及青蒿酸+氨苄西林钠+环丙沙星(3个药物组合),再分别对4株沙门氏菌(12个细菌联合抗敏剂)进行FICI值测定,每个联合抗敏剂5个稀释度(药物对照、稀释对照除外),最终获得300个不同稀释度的联合增敏剂组合。抗菌药物(单体青蒿酸及抗生素)浓度依次为 $2 \times \text{MIC}$ 至 $1/16 \times \text{MIC}$ (6个稀释度,包括药物对照、稀释对照)。根据联合后各行列所在未见细菌生长孔的最小药物浓度计算每行列部分抑菌浓度指数(FICI, fractional inhibitory concentration index)。

[0032] FICI判读标准: $\text{FICI} \leq 0.5$,协同作用; $0.5 < \text{FICI} < 1$,部分协同; $\text{FICI} = 1$,相加作用; $1 < \text{FICI} < 4$,无相关作用; $\text{FICI} \geq 4$,拮抗作用。

[0033] (3) 试验结果(表1)

[0034] 本次试验所选用的2株临床分离株沙门氏菌对氨苄西林钠中度耐药,对环丙沙星中度敏感,青蒿酸及上述2种抗生素单独应用时,抗菌效果较差。通过联合应用青蒿酸+抗生素,可对4株沙门氏菌产生较好的抗菌增敏效果,协同作用显著,还可增强耐药菌对抗生素或青蒿酸的药物敏感性,其效果明显优于单独使用青蒿素或青蒿酸,或单独使用抗生素,其中,青蒿酸+氨苄西林钠+环丙沙星的药物组合,产生的联合抗菌增敏作用最为显著。联合用药时抗菌作用成倍增加,与单独用药时的最低抑菌浓度1MIC值相比,联合用药时的单药最低浓度仅为 $1/4\text{MIC}$ 、 $1/8\text{MIC}$ 及 $1/16\text{MIC}$ 浓度。

[0035] 表1青蒿酸联合2种抗生素对4株沙门氏菌的最小FICI指数结果

	药 物	菌 株			
		BNCC124693	CMCC50094	临床分离株 1	临床分离株 2
[0036]	MIC 值测定				
	青蒿酸（mg/mL）	10	10	10	10
	氨苄西林钠（μg/mL）	5	10	10	10
	环丙沙星（μg/mL）	0.032	0.023	0.0391	0.0391
	FICI 指数				
	青蒿酸+氨苄西林钠	0.5265	0.375	0.375	0.375
	青蒿酸+环丙沙星	0.375	0.5625	0.3125	0.625
	青蒿酸+氨苄西林钠+环丙沙星	0.3125	0.25	0.25	0.25

[0037] 实施例2银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊的制备

[0038] 本试验以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, 购自北京北纳创联生物技术研究院, 为饲料酵母, 菌株编号BNCC223758) 和产朊假丝酵母菌 (*Candida utilis*, 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心, 为饲料酵母, 菌株编号CICC1769) 为模型菌株, 以银耳多糖 (食品级, 纯度30%, 产品批号20200312, 西安森冉生物工程有限公司) 为辅助芯材, 以海藻酸钠-壳聚糖微囊为载体, 进行微生态制剂微囊的制备。

[0039] (1) 将枯草芽孢杆菌新鲜培养物接种至胰酪大豆胨液体培养基, 恒温振荡培养约24h (30~35℃, 150r/min), 培养基中的活菌含量扩大培养至 1.2×10^9 CFU/mL为宜 (4.0麦氏比浊管浓度)。所得菌液, 低温离心 (4℃, 3000rpm条件下, 离心5~6min), 弃上清收集底层菌泥。再加入pH 7.4的PBS缓冲液, 移液枪吹打混匀菌泥, 同样条件下低温离心获得的干净湿菌体。称取70mg菌泥, 用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL (4.0麦氏比浊管浓度), 4℃保存, 备用。

[0040] (2) 将产朊假丝酵母菌新鲜复壮培养物, 接种至基础培养基 (包括葡萄糖30g/L、蔗糖20g/L、蛋白胨30g/L、酵母浸膏10g/L、麦芽汁100mL/L、 KH_2PO_4 2.0g/L、 NH_4SO_4 1.0g/L、 MgSO_4 1.0g/L。调整pH至5.5, 115℃, 灭菌20min)。恒温振荡培养约24h (28℃, 180r/min), 培养基中的活菌含量扩大培养至 1.2×10^9 CFU/mL为宜 (4.0麦氏比浊管浓度)。4℃、3000rpm低温离心5~6min, 弃上清收集底层菌泥。再加入pH 7.4的PBS缓冲液, 移液枪吹打混匀菌泥, 同样条件下低温离心获得干净湿菌体。称取140mg菌泥, 用生理盐水调整菌体浓度至 1.2×10^9 CFU/mL (4.0麦氏比浊管浓度), 4℃保存, 备用。

[0041] (3) 制备微囊包被所需试剂溶液: 包括配制2.0%的海藻酸钠水溶液 (w/v)、2.0%的 CaCl_2 溶液 (w/v, 即成囊溶液1)、2.0%的壳聚糖溶液 (w/v, 成囊溶液2)、1.0%的 CaCl_2 溶液 (w/v, 洗涤溶液); 20mL大豆色拉油 (乳化剂, 内含体积比为0.1%~0.4%的司班-80)。

[0042] (4) 以两种饲用益生菌为模型菌株, 以银耳多糖为辅助芯材, 以海藻酸钠-壳聚糖微囊为载体, 将步骤(1)、(2)制备获得的枯草芽孢杆菌菌悬液、产朊假丝酵母菌悬液及70mg银耳多糖, 缓慢加入到100mL的2.0%海藻酸钠水溶液中; 再加入2.0mL的乳化剂大豆色拉油, 在37℃、400rpm磁力搅拌的作用下, 均质乳化30min, 形成均匀浑浊乳状液。

[0043] (5) 将步骤(4)制成的均质乳化液, 通过注射器挤压滴入到2.0%的 CaCl_2 溶液中进行包被, 包被搅拌速率为100-150rpm; 反应完成后, 静置固化40min左右; 去除上清液, 将微球用步骤1.0%的 CaCl_2 溶液洗涤; 再与2.0%的壳聚糖溶液反应, 充分混合, 进一步固化30min; 将微球用去离子水清洗过滤, 自然干燥, 制得平均粒径为1.0~1.5mm的、包被有银耳

多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌的微囊制品。

[0044] 实施例3多糖+益生菌微囊的体外释放试验

[0045] (1) 微囊膨胀度测定

[0046] 微囊呈球形,生理盐水清洗干燥后,粒径直径范围1.0~1.5mm。微囊在0.9%生理盐水中浸泡3h后,粒径基本无明显变化;在人工模拟胃液中,浸泡1h后粒径大小无明显变化,2h后开始膨胀,浸泡3h后微囊平均直径为1.8mm,膨胀率为120%;而在模拟人工肠液中,浸泡10min后,微囊即开始膨胀,浸泡1h后,微囊的平均直径即可达到1.8mm,微囊膨胀率达200%。

[0047] 结果证明,以壳聚糖-海藻酸钠作为包被材料制得微囊对胃蛋白酶有较好的抵抗力,可有效抵御模拟人工胃酸作用而不至于崩解。

[0048] (2) 包埋率、包埋产率计算及稳定性试验研究

[0049] 2.1测定微胶囊表面活菌数:直接用PBS(缓冲溶液)溶解微囊表层菌体,倍比稀释后进行活菌计数。

[0050] 2.2测定产品中活菌数:将微囊产品放入解囊液中,搅拌30min,振荡混匀使微胶囊完全溶解,倍比稀释后进行计数。结果如下:

[0051] 包埋率 = $1 - (\text{微胶囊表面活菌数} / \text{产品中活菌数}) \times 100\% = 1 - (3 \times 10^8 \text{CFU} / 6.6 \times 10^9 \text{CFU}) \times 100\% = 95.45\%$

[0052] 包埋产率 = $(\text{产品中活菌数}) / (\text{加入的活菌数}) \times 100\% = 6.6 \times 10^9 \text{CFU} / 7.2 \times 10^9 \text{CFU} \times 100\% = 91.67\%$

[0053] 2.3经微囊包埋的活菌制剂,室温下保存30d,活菌存活率为98.8%,保存90d,活菌存活率为50.6%,保存180d,活菌存活率将为15.7%;相对应的,未经微囊化处理的对照样品,室温下保存30d,活菌存活率即将为54.1%,保存90d后,活菌存活率仅为1.41%。两者在相同条件下(4℃冷藏)保存90d,未经微胶囊化的样品,其活菌存活率仅为经微囊制剂的66.2%。

[0054] 结果表明,用海藻酸钠-壳聚糖将枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌和银耳多糖包埋制成的微囊,在一定程度上提高了菌体的成活率,延长活菌常温保存期,能更好的提高益生菌和银耳多糖的免疫功效。

[0055] 实施例4多糖+益生菌微囊的模拟胃液、模拟肠液耐受性试验

[0056] 3.1微囊模拟胃液耐受性测定(表2)

[0057] 取微胶囊0.1g放入模拟胃液中,震荡混匀,37℃水浴孵育,每隔0.5h取出进行活菌计数。采用平板计数法,每次3个平行。

[0058] 表2模拟胃液中菌体存活率结果($\times 10^9 \text{CFU}$)

		取样时间 (h)						
		0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
[0059]	对照组: 未包被活菌总数	7.20±0.32	5.55±0.22	4.25±0.20	4.05±0.18	3.82±0.37	3.56±0.26	3.11±0.25
	试验组: 微囊化活菌总数	6.60±0.17	6.51±0.20	6.11±0.26	6.02±0.15	5.97±0.29	5.91±0.12	5.85±0.16

[0060] 未包被益生菌在pH为2.5的模拟胃液中消化2h、3h后,活菌数量分别下降46.94%和56.81%。微囊化处理后,在相同时间点活菌数量分别下降9.55%和11.36%。结果表明,

该微囊制剂能耐pH为2.5的胃酸,用海藻酸钠-壳聚糖对益生菌和银耳多糖进行包被后的微囊制剂能很好抵抗酸性环境,降低酸性胃液对益生菌的破坏,即微囊后可以提高枯草杆菌的利用效率。

[0061] 3.2微囊模拟肠液耐受性测定(表3)

[0062] 将经过不同模拟胃液处理后的微胶囊,PBS液洗涤2次后,放入模拟肠液中,震荡混匀,37℃水浴孵育,每隔0.5h取样进行活菌计数。计数方法及数据处理同上。

[0063] 结果表明,微囊在pH为6.8的模拟肠液中继续消化1.0h、2.0h、3.0h后,活菌数量分别下降44.79%、57.26%和61.54%;而对照组的活菌数量在相同时间点分别下降46.94%、53.05%和58.52%。在模拟肠液中消化1.0h后,两组间活菌总数下降频数相近,表明微囊经过1.0h的肠液浸泡后,药物膨胀释放率达到最高水平,随后,释放量逐渐趋于平稳,为缓慢释放,可以起到缓释的作用;其次,微囊对人工肠液十分敏感,具有肠溶性,消化3.0h后,两组间活菌总数下降频数相似,无显著差异。

[0064] 表3模拟肠液中菌体存活率结果($\times 10^9$ CFU)

		取样时间（h）						
		0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
[0065]	对照组：未包被活菌总数	3.11±0.25	2.15±0.12	1.65±0.24	1.56±0.29	1.46±0.17	1.34±0.21	1.29±0.18
	试验组：微囊化活菌总数	5.85±0.16	4.27±0.24	3.23±0.27	2.68±0.20	2.50±0.35	2.38±0.19	2.25±0.14

[0066] 实施例5药物组合物的制备

[0067] 材料:青蒿酸(Lot#C15H2202, $\geq 98\%$),购自广东翁江化学试剂有限公司;抗生素环丙沙星(Lot#C10532503, $\geq 98\%$),购自上海麦克林生化科技有限公司;抗生素氨苄西林钠(Lot.No.826H031, $\geq 85\%$),购自北京索莱宝科技有限公司。

[0068] 配方1:

[0069] 青蒿酸10份,氨苄西林钠0.002份,环丙沙星0.00015份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊290份

[0070] 配方2:

[0071] 青蒿酸10份,氨苄西林钠0.001份,环丙沙星0.00005份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊290份

[0072] 配方3:

[0073] 青蒿酸20份,氨苄西林钠0.002份,环丙沙星0.00015份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份

[0074] 配方4:

[0075] 青蒿酸20份,氨苄西林钠0.001份,环丙沙星0.00005份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份

[0076] 配方5:

[0077] 青蒿酸30份,氨苄西林钠0.002份,环丙沙星0.00015份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊270份

[0078] 配方6:

[0079] 青蒿酸30份,氨苄西林钠0.001份,环丙沙星0.00005份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+

产朊假丝酵母菌微囊270份

[0080] 配方7:

[0081] 青蒿酸20份,氨苄西林钠0.00125份,环丙沙星0.0001份,银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊280份

[0082] 制备方法:

[0083] (1) 银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊,为按照实施例2的制备方法与步骤所制备的微囊制剂。

[0084] (2) 药物组合物的制备

[0085] 分别按上述配方比例称取各组原料,将100倍重量份数的所述青蒿酸、100倍重量份数的所述氨苄西林钠、100倍重量份数的所述环丙沙星、100倍重量份数的所述银耳多糖+枯草芽孢杆菌+产朊假丝酵母菌微囊,依次称取,混匀;根据应装剂量(每种药物混合物总重量的10%),将药物混合物称量、分装10份(约3.0g/份),置热封口小铝箔袋封装,贴标后,4℃储存,备用。

[0086] 实施例6药物组合物的药效及对实验性鸡沙门氏菌病的疗效试验

[0087] (1) 药物组合物为按照实施例5方法所制备的制剂,具体为:配方7的药物组合物。

[0088] (2) 试验动物及临床药物分组

[0089] 2.1药物处理组及剂量

[0090] 高剂量组(含预防组、治疗组):2份药物组合物/10kg鸡饲料(w/w),3~5d为1个疗程。

[0091] 中剂量组(含预防组、治疗组):1份药物组合物/10kg鸡饲料(w/w),3~5d为1个疗程。

[0092] 低剂量组(含预防组、治疗组):0.5份药物组合物/10kg鸡饲料(w/w),3~5d为1个疗程。

[0093] 对照药物组(仅治疗组):5%盐酸环丙沙星可溶性粉(产品批号:20191226,洛阳鸿牧生物科技有限公司生产;100g/袋,1.0g/1.5kg饲料(w/w),3~5d为1个疗程,)

[0094] 2.2攻毒用菌株:菌种为鸡白痢沙门氏杆菌(*Salmonella pullorum*, BNCC124693, 购自北京北纳创联生物技术研究院)。将沙门氏菌的新鲜培养物接种至胰酪大豆胨液体培养基,30~35℃恒温震荡24h,将菌浓度调至 1.0×10^8 CFU/mL,37℃保存,备用。

[0095] 2.3试验动物:1日龄良凤花肉鸡,购自白银同仁家禽养殖有限公司永登分公司,饲养于室温20~24℃,相对湿度 $50 \pm 10\%$ 无污染笼舍内;饲料为肉雏鸡全价料(无药配合饲料),购自兰州养动力饲料有限公司。每日给料3次,自由饮水。

[0096] 2.4试验方法

[0097] 雏鸡饲养至14日龄时,取精神状态良好的健壮鸡只,逐只称重后,随机分为9组,组内每只鸡体重差异不超过10g,每组总重差异不超过200g,每组20只鸡。分组后,除健康对照组外,其余各组鸡只,腹腔注射沙门氏菌菌悬液0.6mL。各试验药物治疗组在出现临床症状后用药物进行治疗。健康对照组和感染对照组不加任何药物。预防高、中、低剂量组提前给药3天,于14日龄攻毒相同菌量,并继续给药5天。健康对照组正常饮水给料,单独隔离饲养。治疗期间密切关注各组鸡只的发病和恢复情况。观察记录各组的发病率、死亡率及治愈率。对死亡鸡进行剖检,无菌采集鸡只肝脏或肺脏,进行细菌分离鉴定。

[0098] 2.5疗效判定及观察指标

[0099] 死亡:在试验期间出现鸡白痢的典型症状并死亡,尸体剖检有典型的病变特征,并从肝、脾及心分离培养出鸡白痢沙门氏菌,判定为感染该菌而死亡。根据死亡鸡数计算各组的死亡率。

[0100] 治愈:给药后鸡精神状态、食欲恢复正常,不再出现软嗉症状,无糞糊状粪便排出,肛门周围绒毛污染及肛门周围炎症等典型症状均消失;粪便样品分离培养的疑似菌落,经木糖赖氨酸脱氧胆酸盐鉴别培养未分离出沙门氏菌典型菌落,判为治愈。

[0101] 有效:给药后,鸡只上述临床症状明显好转,腹泻症状减轻,精神状态、食欲、呼吸等逐步恢复正常,判为有效。

[0102] 相对增重率:根据试验开始时和试验结束时每只鸡的体重,计算平均增重量,然后计算每组鸡的平均增重,以空白对照组的增重为100%,各组增重与之相比即得各组相对增重率。

[0103] 2.6试验结果(表4)

[0104] 除健康对照组外,各组攻毒鸡均出现鸡白痢典型临床症状。给药后,与感染对照组相比,各药物处理组能迅速减轻腹泻临床症状,见效快,无任何异常反应及毒副作用,高、中剂量组未见死亡鸡只,发病率和死亡率明显低于感染对照组。给药5天后,鸡只增重效果明显,说明本发明提供的药物组合物对禽沙门氏菌病具有良好的治疗效果且毒副作用小,同时兼具提高相对增重率和生产性能的作用。用药3天后,各药物处理组未死亡雏鸡精神状态、食欲基本恢复正常;用药5天后,不再排出糞糊样灰白色稀粪,且粪便样品经鉴别培养基分离培养,未见沙门氏菌典型菌落检出,可判断为治愈。

[0105] 结果表明:药物组合物的高、中剂量预防组和治疗组,其治愈率均显著高于对照药物5%盐酸环丙沙星组;药物组合物低量组的治愈率略低于对照药物组。感染对照组鸡只生长缓慢,高、中、低预防组的增重效果、食欲恢复情况明显好于高、中、低治疗组和对照药物组,而料重比结果基本相似。考虑到临床用药成本,建议中剂量组(1份药物组合物/10kg鸡饲料,3~5d为1个疗程)为最佳治疗使用剂量,低剂量组(0.5份药物组合物/10kg鸡饲料,3~5d为1个疗程)可作为雏鸡预防用剂量。

[0106] 表4各药物处理组对鸡沙门氏菌病的疗效及生产性能结果(n=20)

组 别	鸡数 (羽)	发病率 (%)	死亡率 (%)	有效率 (%)	治愈率 (%)	增重 (g/羽)	平均日增重 (g/羽)	采食量 (g/羽)	料重比
健康对照组	20	--	--	--	--	255.03	18.47	550.01	2.14
感染对照组 (攻毒不治疗)	20	100	35	--	--	185.31	12.81	428.66	2.37
对照药物组 (盐酸环丙沙 星)	20	100	5	95	90	256.21	18.88	515.22	2.02
[0107] 高剂量预防组	20	100	0	100	100	260.33	19.17	520.10	2.00
中剂量预防组	20	100	0	100	100	257.14	18.58	516.81	2.03
低剂量预防组	20	100	0	100	90	255.68	18.25	517.67	2.02
高剂量治疗组	20	100	0	100	100	246.44	16.66	501.12	2.05
中剂量治疗组	20	100	0	100	100	249.67	18.11	510.17	2.03
低剂量治疗组	20	100	10	90	85	228.80	15.22	504.13	2.19

[0108] 本发明的药物组合物治疗禽沙门氏菌病效果好,见效快,成本低,安全实用、可以减少抗生素的使用,还可以提高动物机体抵抗力,适合在家禽养殖中推广使用。

[0109] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。