(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119855498 A
(43)申请公布日 2025.04.18

(21)申请号 202380064647.8
(22)申请日 2023.07.14
(30)优先权数据
2210435.0 2022.07.15 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/069724 2023.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/013396 EN 2024.01.18
(71)申请人 卡鲁斯动物健康有限公司
地址 英国萨里
(72)发明人 G·J·弗思 R·M·奥德拉
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 顾云峰 何筝
(51)Int.Cl.
A01N 63/40(2006.01)
A01P 1/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图5页

(54)发明名称

农业组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物和试剂盒,所述组合物和所述试剂盒包含噬菌体和/或免疫原性剂和飞行昆虫引诱剂。本发明还涉及用于将飞行昆虫引诱到噬菌体和/或免疫原性剂的方法。本发明还涉及飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到动物或植物的方法中的用途,以及使用飞行昆虫治疗或预防动物和植物中的疾病的方法。本发明还涉及用于治疗和/或预防动物或植物中的疾病的噬菌体和/或免疫原性剂的制剂。

CN 119855498 A

1.一种将噬菌体和/或免疫原性剂转移到飞行昆虫的方法,所述方法包括将飞行昆虫引诱到噬菌体和/或免疫原性剂,这包括:

(i)将所述噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合;或者

(ii)将所述噬菌体和/或免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内;

其中所述噬菌体和/或免疫原性剂在所述飞行昆虫向所述引诱剂移动或与所述引诱剂接触时被转移到所述飞行昆虫。

2.飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到陆生动物或植物的方法中的用途,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

3.根据权利要求2所述的用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂已经通过根据权利要求1所述的方法转移到所述飞行昆虫。

4.一种治疗或预防陆生动物或植物中的疾病的方法,所述方法包括使用飞行昆虫将有效量的噬菌体和/或免疫原性剂转移到所述动物或所述植物,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂已经通过根据权利要求1所述的方法转移到所述飞行昆虫。

6.一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物,所述组合物包含:

(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及

(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自粪便物质,优选地牛粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、能够反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫营养源以及其组合。

7.一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含:

(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及

(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自粪便物质,优选地牛粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、能够反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫天生被引诱的休息场所、飞行昆虫营养源以及其组合。

8.根据权利要求6所述的组合物、根据权利要求1或6所述的方法、根据权利要求7所述的试剂盒或根据权利要求2或3所述的用途,其中所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源,任选地其中所述营养源是糖,优选地其中所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源与第二物质的组合。

9.根据权利要求6或8所述的组合物、根据权利要求1、5或6所述的方法、根据权利要求7或8所述的试剂盒或者根据权利要求2、3或8所述的用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对(against)与陆生动物或植物中的疾病相关的细菌的活性。

10.根据任一前述权利要求所述的组合物或试剂盒,其中所述组合物或所述试剂盒包含两种或更多种免疫原性剂和/或噬菌体,优选地一种或多种噬菌体。

11.根据任一前述权利要求所述的方法或用途,其中使用两种或更多种免疫原性剂和/或一种或多种噬菌体。

12.根据任一前述权利要求所述的组合物或试剂盒,其包含噬菌体,或者根据任一前述权利要求所述的方法或用途,其中使用噬菌体,优选地其中所述噬菌体通过固定到基质上

而稳定,优选地其中所述噬菌体通过其头部固定。

13.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述免疫原性剂包含细菌抗原。

14.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述飞行昆虫是苍蝇,优选地双翅目昆虫,优选地其中所述飞行昆虫是面蝇、澳大利亚灌木丛蝇、水牛蝇、角蝇或厩螯蝇,最优选地面蝇;或者其中所述飞行昆虫是黄蜂、东方果蝇或橄榄果蝇、食蚜蝇、丽蝇或蜜蜂。

15.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生动物中的疾病相关的细菌的活性,优选地其中所述动物是牛科或马科动物,更优选地牛科动物;和/或所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生植物中的疾病相关的细菌的活性,优选地其中所述植物是结果植物,最优选地其中所述植物是香蕉植物、橄榄树或猕猴桃植物;和/或

所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与传染性牛角膜结膜炎的病因有关的病原体的活性;和/或

所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对牛莫拉氏菌的活性;和/或

所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对卡他莫拉氏菌、牛眼莫拉氏菌、支原体、野油菜黄单胞菌、青枯罗尔斯顿菌、苛养木杆菌、萨瓦氏假单胞菌和/或丁香假单胞菌的活性。

16.根据任一前述权利要求所述的方法或用途,其中所述飞行昆虫引诱剂包含以下中的一种或多种:粪便物质,优选地牛粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、能够反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫天生被引诱的休息场所或飞行昆虫营养源。

17.根据任一前述权利要求所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述引诱剂和所述噬菌体和/或免疫原性剂以固体形式或液体形式呈现;和/或其中所述噬菌体和/或免疫原性剂与所述引诱剂混合。

18.一种制品,其包含根据任一前述权利要求所述的组合物,优选地其中所述制品能够由陆生动物佩戴,最优选地其中所述制品是耳标,任选地牛耳标或马耳标。

19.一种方法,其中将根据任一前述权利要求所述的组合物施涂于陆生动物的皮肤。

农业组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物和试剂盒，所述组合物和所述试剂盒包含噬菌体和/或免疫原性剂和飞行昆虫引诱剂。本发明还涉及用于将飞行昆虫引诱到噬菌体和/或免疫原性剂的方法。本发明还涉及飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到动物或植物的方法中的用途，以及使用飞行昆虫治疗或预防动物和植物中的疾病的方法。本发明还涉及用于治疗和/或预防动物或植物中的疾病的噬菌体和/或免疫原性剂的制剂。

背景技术

[0002] 已知如苍蝇等飞行昆虫会将细菌性、寄生虫性和病毒性疾病传播给动物和植物物种。苍蝇会从其接触的表面摄取并携带微生物，尤其包括人类和动物排泄物以及腐烂的有机材料。当苍蝇随后与动物或植物发生实际接触时，它们将携带的微生物传播给动物和植物宿主，从而充当微生物的机械载体。

[0003] 作为细菌性疾病的常见载体的苍蝇的一个实例是秋家蝇(Musca autumnalis)，其通常被称为面蝇，并且是牛科和马科动物的有害物种，其原产于欧洲和中亚，并且在加拿大和美国大部分地区均有发现。其它蝇科成员包括澳大利亚灌木丛蝇(澳洲灌木蝇(Musca vetustissima))和水牛蝇(东方角蝇(Haematobia exigus))，是在南半球地区(如澳大利亚)可以充当细菌性疾病的载体的苍蝇。面蝇在春天从越冬地出来，雌蝇在新鲜牛粪中产卵。根据气温，成年苍蝇的寿命为20天至50天，并且从初秋开始，随着存活的苍蝇准备越冬，牛科和马科动物身上的昆虫载菌量下降。尽管果蝇可以迁移数公里寻找宿主，但一旦找到合适的栖息地，它们往往会聚集在牛群周围，尤其是在饮水处附近。

[0004] 面蝇，尤其是雌性，以牛和马宿主的血液、汗液、唾液、鼻粘膜、粪便和眼泪为食。摄食只在白天期间进行，这意味着面蝇每天傍晚都会离开牛群，并且每天早上又会重新分布。在夏季白天，通常记录的每头牛面部的苍蝇数量为约5只至30只。

[0005] 面蝇通常充当载体的一种疾病是传染性牛角膜结膜炎(IBK)，这是牛中最常见的眼病，也称为新林眼(New Forest Eye)和红眼病(Pinkeye)。它的主要发病原因是革兰氏阴性杆状细菌，牛莫拉氏菌(Moraxella bovis)，尽管包括卡他莫拉氏菌(Moraxella catarrhalis)、牛眼莫拉氏菌(Moraxella bovoculi)和牛眼支原体(Mycoplasma bovoculi)感染在内的其它微生物也与IBK的发病机理中的潜在诱发作用有关。

[0006] 面蝇是牛莫拉氏菌的常见携带者，并且因此也是IBK的常见载体。具体地，面蝇的表面，包括它们的口器、身体和四肢，可能被牛莫拉氏菌污染，并可以存活数小时，而被面蝇摄取的牛莫拉氏菌可以在苍蝇消化道中存活长达3天，这意味着携带牛莫拉氏菌的面蝇可以通过前肠和中肠反刍出的飞沫而引发牛的眼部感染，持续数天。

[0007] 这种疾病的经济影响是相当大的，并且IBK是影响肉牛和奶牛的最常见疾病，并且是大于三周大的哺乳小牛的第二常见疾病。

[0008] 目前，针对IBK最常用的治疗方法是抗生素药物，所述药物通过全身注射、结膜下

注射、眼睑内注射或局部施加进行递送。可替代地,必要时依靠预防措施,如使用含有杀虫剂的耳标。然而,所有这些治疗方案都会受到药物递送到眼表的药代动力学以及为了施用治疗或预防措施而需要对动物进行处理和约束的影响。因此,仍然需要一种有效的方法来降低动物中的细菌感染的发病率,并且具体地降低牛因面蝇诱发的IBK的发病率,所述方法不需要对动物进行处理和约束。

[0009] 牛喜欢在一天中的某段时间在栅栏柱、树木或灌木丛上磨蹭,在此期间,它们似乎获得了享受和满足。对此行为的观察最终推动了商业生产的刷子和身体擦洗器的研发,所述刷子和身体擦洗器可以部署在田地和围栏内以促进这种活动。具体地,摩擦头部会使面蝇暂时离开牛的面部,从而导致苍蝇寻找另一个休息的场所或者停留在空中,直到它们可以实现返回到面部。如果牛科动物的这种自然倾向可以用于减轻牛科动物体内苍蝇诱发的IBK或其它细菌感染的策略中,这将是有利的。

[0010] 其它苍蝇物种,包括角蝇(西方角蝇(Haematobia irritans))和厩螯蝇(厩螯蝇(Stomoxys calcitrans))也是牛科动物的主要害虫。像常见的家蝇(家蝇(Musca domestica))和丽蝇(反吐丽蝇(Calliphora vomitoria))一样,这些苍蝇物种是细菌传播的载体,并且具体地角蝇与细菌(包括葡萄球菌)的传播有关,这可能导致牛科动物的乳腺炎。因此,在牛的健康和福利方面,从牛科动物身上驱除这些讨厌的苍蝇并消除它们的载菌量是有利的。

[0011] 另一种易受飞行昆虫携带的细菌性疾病影响的宿主物种是香蕉植物(芭蕉科的一部分)。香蕉植物易受若干种细菌性疾病的影响,包含由细菌野油菜黄单胞菌(Xanthomonas campestris)引起的‘香蕉细菌性枯萎病(banana bacterial wilt)’和由细菌青枯罗尔斯顿菌(Ralstonia solancearum)引起的‘马可病(Moko disease)’。寄生蝇,如东方果蝇(桔小实蝇(Bactrocera dorsalis))和黄蜂活跃在香蕉种植园中,并且因此可以充当将细菌性疾病携带到香蕉植物的载体。

[0012] 同样,橄榄树(油橄榄(Olea europaea))也易受由橄榄果蝇(橄榄果实蝇(Bactrocera oleae))携带的细菌(包括苛养木杆菌和萨瓦氏假单胞菌)引起的细菌性疾病的影响。

[0013] 蜜蜂,如大黄蜂(黄尾熊蜂(Bombus terrestris audax))也可以将细菌感染带到植物物种,如花。具体地,许多植物易受由丁香假单胞菌的若干种菌株之一引起的细菌性枯病的影响,所述菌株具有非常广泛的宿主物种。蜜蜂和其它飞行昆虫均可以携带和传播这些病原体。例如,作为增加水果产率的一种手段,商业蜂箱通常用于增强如猕猴桃(美味猕猴桃(Actinidia deliciosa))等结果植物的授粉。然而,猕猴桃植物极易受由可能由蜜蜂携带的丁香假单胞菌猕猴桃致病变种引起的感染。因此,限制商业蜂箱中蜜蜂的载菌量以及允许它们将具有针对(against)此病原体的活性的噬菌体分布到植物中作为疾病预防的手段将是非常有利的。目前,用于减轻植物中的细菌感染的农业策略严重依赖于将人造化学品引入到土壤中或施加到植物物种,这破坏了周围的生态系统。因此,仍然需要降低植物中的细菌感染发病率的有效方法。

附图说明

[0014] 图1示出了蝇科苍蝇正在以由50:50的葡萄糖浆和水的混合组成的引诱剂为食的

俯视图。

[0015] 图2a示出了蝇科苍蝇正在以由糖粉和单独的水源组成的引诱剂为食的俯视图。

[0016] 图2b示出了蝇科苍蝇正在以由糖粉和单独的水源组成的引诱剂为食的侧视图。

[0017] 图3示出了在琼脂板在一天的过程内被置于含有苍蝇、在蔗糖溶液中具有针对牛莫拉氏菌的裂解活性的噬菌体或两者的封闭物中后,牛莫拉氏菌在琼脂板上的生长。

[0018] 图4示出了在琼脂板在一天的过程内被置于含有苍蝇、在蔗糖溶液中具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体或两者的封闭物中后,肠道沙门氏菌在琼脂板上的生长。

[0019] 图5示出了在转移用于冲洗离体牛眼的溶液后,肠道沙门氏菌病原体在琼脂板上的生长,所述琼脂板在一天的过程内被置于含有面蝇、在蔗糖溶液中具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体或两者的封闭物中。

[0020] 图6示出了在转移用于冲洗新鲜切花的溶液后,肠道沙门氏菌病原体在琼脂板上的生长,所述琼脂板在一天的过程内被置于含有蜜蜂、在蔗糖溶液中具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体或两者的封闭物中。

[0021] 图7示出了具有针对牛莫拉氏菌的活性的噬菌体的透射电子显微镜图像。

[0022] 图8示出了具有针对牛莫拉氏菌的活性的噬菌体的透射电子显微镜图像。

[0023] 图9示出了具有针对牛莫拉氏菌的活性的噬菌体的透射电子显微镜图像。

[0024] 图10示出了具有针对牛莫拉氏菌的活性的噬菌体的透射电子显微镜图像。

[0025] 图11a和11b示出了在产生图10的噬菌体的分离物的连续传代后产生的聚集体。

发明内容

[0026] 在本发明的第一方面,提供了一种将飞行昆虫引诱到噬菌体和/或免疫原性剂的方法,所述方法包括(i)将所述噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合,或者(ii)将所述噬菌体或免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内。

[0027] 本发明的第二方面涉及飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到陆生动物或植物的方法中的用途,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

[0028] 本发明的第三方面涉及一种治疗或预防陆生动物或植物中的疾病的方法,所述方法包括使用飞行昆虫将噬菌体和/或免疫原性剂转移到所述动物或所述植物,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

[0029] 在本发明的第四方面,提供了一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物,所述组合物包含:(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自以下中的一种或多种:粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫营养源以及其组合。还提供了一种制品,其包含本发明的组合物。

[0030] 在本发明的第五方面,提供了一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含:(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自以下中的一种或多种:粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫营养源或飞行昆虫天生被引诱的休息场所(如在蜜蜂的情况下是蜂箱)以及其组合。

[0031] 在一些实施方式中,本发明涉及噬菌体的用途。噬菌体的用途解决了上述问题,因为噬菌体可以对抗飞行昆虫天然携带的细菌,以便降低飞行昆虫感染陆生动物和植物的可能性。此外,噬菌体可以治疗或控制已经感染目标动物和植物的细菌,并且然后噬菌体可以通过飞行昆虫转移到未经感染的生物体。换言之,通常充当引起陆生动物或植物中的疾病的细菌的载体的飞行昆虫变成了噬菌体的载体,所述噬菌体可以对抗引起疾病的细菌。这提供了靶向方法以减少陆生动物和植物中的细菌感染的发病率,而不需要任何直接的人为干预,包括处理、人工操作或限制。

[0032] 在一些实施方式中,本发明涉及免疫原性剂的用途。本发明另外提供了一种递送免疫原性剂的方法,用于激发免疫原性应答,而不需要直接的人为干预。这通过将免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合,或者将免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内,使得实现免疫原性剂向飞行昆虫的转移。随后免疫原性剂转移到目标动物或植物提供了靶向手段以在陆生动物和植物中引发保护性反应,而不需要任何直接的人为干预,包括处理、人工操作或限制。将理解,通过体液或细胞介导机制的免疫应答在植物中不会像在动物中那样发生。尽管如此,普遍认为植物具有免疫系统,并且能够响应于病原体分子引发保护性反应。

[0033] 在优选实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合,所述引诱剂包含飞行昆虫想要取食的营养源,由此促进噬菌体或免疫原性剂的摄取。然后,在飞行昆虫摄食活动中正常发生的消化道内容物反刍期间,噬菌体或免疫原性剂被转移到目标生物体。

[0034] 定义

[0035] 如本文所使用的,术语“飞行昆虫”是指任何具有飞行能力的昆虫。因此,术语“飞行昆虫”包括所有具有一对或多对翅膀的昆虫。

[0036] 如本文所使用的,名词“苍蝇”是指任何以仅使用一对翅膀飞行为特征的飞行昆虫。这包括但不限于双翅目昆虫动物。

[0037] 如本文所使用的,术语“双翅目”是指双翅目的昆虫,并且术语“双翅目昆虫”是指双翅目的单一昆虫。

[0038] 如本文所使用的,术语“面蝇”是指秋家蝇。

[0039] 如本文所使用的,术语“澳大利亚灌木丛蝇”是指澳洲灌木蝇。

[0040] 如本文所使用的,术语“水牛蝇”是指东方角蝇。

[0041] 如本文所使用的,术语“东方果蝇”是指桔小实蝇。

[0042] 如本文所使用的,术语“橄榄果蝇”是指橄榄果实蝇。

[0043] 如本文所使用的,术语“丽蝇”指反吐丽蝇或丝光绿蝇(Lucilia sericata)中的任何昆虫。

[0044] 如本文所使用的术语“大黄蜂”是指欧洲熊蜂(Bombus terrestris)或黄尾熊蜂中的任何昆虫。

[0045] 如本文所使用的,术语“食蚜蝇”是指食蚜蝇科(family Syrphidae)中的任何昆虫。

[0046] 如本文所使用的术语“角蝇”是指西方角蝇。

[0047] 如本文所使用的,术语“厩螯蝇”是指厩螯蝇。

[0048] 如本文所使用的,术语“免疫原性剂”是指能够在目标陆生生物体中提供免疫应答

的任何药剂。

[0049] 如本文所使用的,术语“引诱剂”是指引诱目标动物的任何物质。因此,例如,“飞行昆虫引诱剂”是指引诱飞行昆虫的任何物质。将理解,引诱剂可以是除营养源以外的物质,它可以是包含或含有营养源的物质,或者它可以是昆虫天生被引诱到的场所,如蜂箱。

[0050] 如本文所指的“陆生动物”是主要或完全生活在陆地上的动物。如本文所指的“陆生植物”是生长在陆地上、陆地中或来自陆地的植物。

[0051] 如本文所使用的,术语“包括/包含(comprising)”意味着必须存在至少所有列出的元素,但是也可以存在没有提到的其它元素。

[0052] 在本发明的上下文中,“引诱半径”意指目标动物被引诱到引诱剂的区域。例如,对于涉及使用气味来引诱昆虫的昆虫引诱剂,引诱半径是昆虫可以闻到引诱剂的区域。将理解,特定引诱剂和目标动物的引诱半径可以通过常规实验来确定。例如,可以通过在正常大气条件下将引诱剂置于测试室中,并且将目标动物放置在距引诱剂渐增的距离处以确定目标动物被引诱剂引诱的最大距离来确定引诱半径。

[0053] 如本文所使用的,术语“组合”是指X和Y的组合,涵盖X和Y的混合,以及使X与Y接触。在一些实施方式中,术语“组合”意指混合。在一些实施方式中,术语“组合”意指使第一组分与第二组分接触。

[0054] 如本文所使用的术语“IBK”、“新林眼病”和“红眼病”都是指传染性牛角膜结膜炎。

[0055] 根据本发明,术语“病毒”包括感染细菌、植物和/或动物的细胞的双链或单链RNA或DNA病毒。

[0056] 术语“噬菌体(phage)”和“噬菌体(bacteriophage)”在本文中可互换使用,是指噬菌体,即感染特定细菌的病毒。

[0057] 根据本发明,术语“基质”被理解为意指任何固相材料,病毒如噬菌体可以固定到所述固相材料。

[0058] 如本文所使用的,术语“约”,当应用于所关注的一个或多个值时,是指与所规定的参考值相似的值。在一些实施方式中,术语“约”是指在任一方向上落在参考值的25%以内(大于或小于参考值)的值范围。在一些实施方式中,术语“约”是指落在所述参考值的20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值(除非此类数值超过可能值的100%)。

具体实施方式

[0059] 本发明涉及飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到陆生动物或植物的方法中的用途,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

[0060] 另外,本发明涉及一种治疗或预防陆生动物或植物中的疾病的方法,所述方法包括使用飞行昆虫将噬菌体和/或免疫原性剂转移到所述动物或所述植物,其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。在优选的实施方式中,治疗或预防陆生动物或植物中的疾病的方法包括将所述噬菌体和/或免疫原性剂直接转移到所述陆生动物或植物上的感染(如细菌感染)部位。

[0061] 本发明还涉及一种将噬菌体和/或免疫原性剂转移到飞行昆虫的方法,所述方法包括(i)将所述噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合;或者(ii)将所述噬菌体

和/或免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内。

[0062] 在本发明的方法和用途实施方式中,所述飞行昆虫引诱剂优选地是选自以下的飞行昆虫引诱剂:粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫天生被引诱的休息场所、营养源或其组合。

[0063] 本发明进一步涉及一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物,所述组合物包含:(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫营养源或其组合。

[0064] 另外,本发明涉及一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含:(i)噬菌体和/或免疫原性剂;以及(ii)飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂选自粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料、飞行昆虫天生被引诱的休息场所、飞行昆虫营养源或其组合。

[0065] 在本发明的上下文中,“预防(prevention)”或“预防(preventing)”细菌性疾病涵盖转移到飞行昆虫的噬菌体或免疫原性剂可以对抗细菌的任何方式,无论细菌是由昆虫自身携带还是位于陆生动物或植物上。例如,细菌性疾病的预防可以通过噬菌体或免疫原性剂对抗飞行昆虫上存在的细菌,从而减少飞行昆虫的细菌负载量并防止细菌性疾病通过昆虫传播来进行。可替代地,当飞行昆虫接触陆生动物或植物,从而将噬菌体或免疫原性剂沉积在陆生动物或植物上并防止动物或植物上发生细菌感染时,可以预防细菌性疾病。

[0066] 在优选实施方式中,所述噬菌体和/或免疫原性剂是抗微生物剂。

[0067] 在其它优选实施方式中,所述噬菌体和/或免疫原性剂包含噬菌体。更优选地,噬菌体是工程化的噬菌体,即已经针对本发明的方法、组合物、试剂盒和用途制备的噬菌体。

[0068] 噬菌体是靶向特定细菌的病毒,并且在感染其宿主细菌后,可以通过溶菌性方式或溶源性方式繁殖。裂解性噬菌体通过感染细菌并使用它复制和产生更多的病毒来起作用。最终,在充分的病毒复制后,细菌细胞的裂解释放出大量新的噬菌体,所述噬菌体本身可以感染邻近的细菌。溶源性噬菌体通过将其DNA整合到细菌染色体中并沿着宿主染色体复制来产生新的整合病毒DNA拷贝来起作用。有利的是,噬菌体对其靶向的细菌具有特异性,这意味着它们可以在宿主中用作抗菌剂,而不会对宿主中的其它细菌造成损害,这与特异性较低的抗生素不同。

[0069] 将理解,技术人员可以分离出具有针对特定细菌的活性的噬菌体。例如,噬菌体可以通过首先培养相关的细菌并将其铺板在琼脂上以产生细菌的生长菌苔来分离。然后,可以从合适的噬菌体来源采集液体,所述来源包括但不限于动物组织和分泌物、粪便物质、植物物质、土壤或水样品。例如,可以采集牛瘤胃液、鼻分泌物和泪腺分泌物以分离具有针对牛莫拉氏菌(一种在牛科动物中发现的细菌)的活性的噬菌体,并且可以从猪粪便物质中采集液体以分离具有针对肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)(一种在猪动物中发现的细菌)的活性的噬菌体。然后将琼脂上的细菌菌苔暴露于所采集的液体的等分试样,对于观察到细菌裂解的样品,可以从中浓缩噬菌体裂解物。

[0070] 在优选实施方式中,噬菌体是稳定的。例如,如EP 1496919 B1中所描述,噬菌体通

过固定到基质来稳定。这是有利的,因为它确保了噬菌体保留其抗菌活性,同时也提高了其相对于游离噬菌体的稳定性。

[0071] 在一些实施方式中,如EP 1496919 B1中所描述,噬菌体通过基质与噬菌体之间形成的共价键固定到基质。在优选实施方式中,噬菌体通过其头部被固定,留下游离的尾部。这确保了噬菌体保持其活性,因为噬菌体的尾部与噬菌体识别和感染特定细菌的能力有关。

[0072] 在优选实施方式中,飞行昆虫是双翅目昆虫。在特别优选的实施方式中,双翅目昆虫是面蝇、澳大利亚灌木丛蝇、水牛蝇、角蝇或厩螯蝇。这是有利的,因为这些蝇是牛科动物和马科动物的有害物种。因此,使用这些苍蝇携带噬菌体和/或免疫原性剂提供了利用这些药剂靶向牛科动物和马科动物的有效方法,因为这些蝇会将噬菌体或免疫原性剂转移到牛科动物和马科动物。在特别优选的实施方式中,双翅目昆虫是面蝇。

[0073] 在一些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生动物或植物中的疾病相关的细菌的活性。在优选实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生动物中的疾病相关的细菌的活性。在优选实施方式中,陆生动物或植物是陆生动物。在特别优选的实施方式中,陆生动物或植物是牛科动物或马科动物,优选地是牛科动物,如母牛或小牛。在特别优选的实施方式中,所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与传染性牛角膜结膜炎的病因有关的病原体的活性。在这些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂可以具有针对牛莫拉氏菌、卡他莫拉氏菌、牛眼莫拉氏菌和支原体(优选地牛莫拉氏菌)中的一种或多种的活性。将理解,噬菌体能够具有针对细菌的直接活性,而免疫原性剂通过激发针对细菌的免疫应答间接发挥其作用。然而,可以说两者都具有针对细菌物种的活性,并且这将被本领域技术人员所理解。因此,本发明的方法、试剂盒和用途提供了用于将噬菌体或免疫原性剂递送到动物以通过自然过程对抗致病病原体而不需要直接的人为干预的有效方式。

[0074] 在一些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生植物中的疾病相关的细菌的活性。在特别优选的实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与香蕉细菌性枯萎病的病因有关的病原体的活性。在这些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂可以具有针对野油菜黄单胞菌的活性。在其它优选的实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与马可病的病因有关的病原体的活性。在这些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂可以具有针对青枯罗尔斯顿菌的活性。在一些实施方式中,飞行昆虫是黄蜂。在一些实施方式中,飞行昆虫是东方果蝇。在其它优选的实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂具有针对苛养木杆菌、丁香假单胞菌或萨瓦氏假单胞菌的活性。在一些实施方式中,飞行昆虫是橄榄果蝇。在另外的实施方式中,昆虫是蜜蜂,优选地大黄蜂。因此,本发明的方法、试剂盒和用途提供了一种有效方式以将噬菌体和/或免疫原性剂递送到植物,以通过自然过程、通过利用植物的昆虫物种的自然移动来对抗致病病原体,而不需要直接的人为干预。

[0075] 另外地,本发明涉及一种将噬菌体和/或免疫原性剂转移到飞行昆虫的方法,所述方法包括将所述免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合,或者将所述噬菌体和/或免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内。

[0076] 在一些实施方式中,所述引诱剂包含以下中的一种或多种:粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料或飞行昆虫天生被引诱的休息场所。飞行昆虫天生被引诱到的休息

场所包括但不限于毛刷、蜂箱和陆生植物和动物的表面。例如,苍蝇天生被牛的面部引诱,并且蜜蜂天生被花引诱。将理解,在适当的情况下,营养源也可以充当引诱剂。因此,引诱剂可以优选地包含两种物质的组合:一种是营养源,并且一种不是营养源。

[0077] 在优选的实施方式中,所述组合物或试剂盒包含飞行昆虫引诱剂,所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源,或者所述方法包括将噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫营养源组合。营养源可以是糖,优选地葡萄糖或干冰糖。在一些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂和营养源的组合以液体的形式呈现。在一些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂和营养源的组合以固体的形式呈现。

[0078] 使用包含营养源的飞行昆虫引诱剂是有利的,因为当昆虫以营养源为食时,它增加了昆虫摄取噬菌体和/或免疫原性剂的可能性。这是有利的,因为它将确保噬菌体和/或免疫原性剂被转移到飞行昆虫的消化道。当飞行昆虫是苍蝇时,这是特别有利的,因为肠内容物液滴的回流是苍蝇摄食活动的正常特征。因此,当苍蝇从以营养源为食转移到以动物或植物宿主为食时,噬菌体和/或免疫原性剂向动物或植物宿主的传递量特别高。

[0079] 优选地,噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合,所述引诱剂包含飞行昆虫倾向于以其为食的营养源,由此促进飞行昆虫对药剂的摄取。

[0080] 图1展示了用于苍蝇的示例性液体营养源,其由葡萄糖浆和水的50:50混合物组成。图2a和2b展示了用于苍蝇的示例性固体营养源,由干冰糖组成。这些图示出了以每种营养源为食的苍蝇,证明当用于治疗或控制在陆生生物中引起疾病的细菌的噬菌体和/或免疫原性剂与营养源组合或在营养源的引诱半径内时,它也将通过摄取或吸入或四肢沾染被苍蝇摄取。

[0081] 优选的引诱剂包含粪便物质。使用粪便物质作为引诱剂是有利的,因为昆虫在其整个生命周期中经常接触粪便物质。具体地,对于在粪便中产卵的昆虫物种,包含面蝇,在每个产卵周期中都与粪便物质接触。因此,当粪便物质用作引诱剂时,这提供了一种有效的方法来确保免疫原性剂被双翅目昆虫拾取,并且因此在双翅目昆虫移动时随后被转移到植物或动物宿主。在优选实施方式中,粪便物质包含马科动物粪便物质。

[0082] 在特别优选的实施方式中,粪便物质包含牛科动物粪便物质。这有利于与具有针对在牛科动物如奶牛中引起感染的细菌的活性的噬菌体和/或免疫原性剂组合使用。另外,这对在牛科动物粪便物质中产卵的昆虫特别有利。以面蝇为例,假设雌性面蝇在牛粪中产卵,如果它们位于牛粪中或牛粪上,它们极有可能与牛粪中的噬菌体和/或免疫原性剂接触。另外,雌性面蝇对牛宿主和马宿主的血液、汗液、唾液、鼻粘膜、粪便和眼泪具有特别高的摄食率。因此,涉及牛科动物粪便物质的方法特别可能通过面蝇向牛宿主有效转移免疫原性剂。

[0083] 在一些实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合。这是有利的,例如,在引诱剂包含飞行昆虫营养源的情况下,因为它确保当飞行昆虫接触或消耗一些营养源时,它也将消耗一些噬菌体和/或免疫原性剂。

[0084] 在其它实施方式中,噬菌体和/或免疫原性剂被置于引诱剂的引诱半径内。这在噬菌体和/或免疫原性剂不能与引诱剂组合的情况下是有利的,因为它在引诱剂的引诱半径内的位置确保了当飞行昆虫向引诱剂移动时,噬菌体和/或免疫原性剂将被转移到飞行昆虫。

[0085] 将理解,引诱半径将根据引诱剂的类型、浓度和效力以及目标动物或植物的特性而变化。引诱剂和目标动物或植物的特定组合的引诱半径通过常规实验确定。例如,可以通过在正常大气条件下将引诱剂置于测试室中,并且将目标动物放置在距引诱剂渐增的距离处以确定目标动物被引诱剂引诱的最大距离来确定引诱半径。使用家禽养殖场作为引诱剂来确定家蝇的引诱半径的研究的一个实例见于Nazni WA等人,《热带生物医学(Trop Biomed.)》2005年6月;22(1):53-61。

[0086] 在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约一千米内。在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约五百米内。在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约一百米内。在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约十米内。在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约五米内。在一些实施方式中,引诱半径可以在引诱剂的约一米内。

[0087] 将理解,与引诱剂组合的噬菌体或免疫原性剂的最佳浓度可以使用挑战研究来确定,在所述研究中,研究了不同的浓度。在一些实施方式中,噬菌体的浓度可以>10^2pfu/ml,优选地>10^3pfu/ml、>10^4pfu/ml或最优选地>10^6pfu/ml。在特别优选的实施方式中,噬菌体的浓度为约10^6pfu/ml。

[0088] 在一些实施方式中,所述组合物或试剂盒包含两种或更多种噬菌体和/或免疫原性剂,或者所述用途或方法涉及使用两种或更多种噬菌体和/或免疫原性剂。在特别优选的实施方式中,所述组合物包括两种或更多种噬菌体的组合。使用噬菌体和/或免疫原性剂的组合是有利的,因为细菌已经进化出许多针对病毒的防御机制,并且已知会产生抗性。因此,希望制剂包含两种或更多种活性剂的混合物,以最小化此类抗性的影响。

[0089] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以施加于塑料基质,所述塑料基质进而可以被附着到用于动物如牛科动物或马科动物的摩擦柱,或者被置于所述摩擦柱的引诱半径内。可替代地,塑料基质可以呈液体或液体玻璃的形式。当它是液体制剂时,它可以被涂覆、吸收或分散在其它材料如粪便物质中。在一些实施方式中,本发明的组合物可以被置于保护组合物免受外部条件如气象条件影响的壳体内。

[0090] 例如,塑料基质可以附着到柱、树或其它动物如牛科动物或马科动物可能接触的天然或人造结构,或者置于它们的引诱半径内,例如摩擦或处于它们的环境中。所述结构可以优选地是刷子或身体擦洗器。

[0091] 这在牛科动物的情况下特别有利,因为面蝇充当疾病的载体。具体地,考虑到当牛科动物用头摩擦柱、树或其它结构(如刷子或身体擦洗器)时面蝇从牛的面部被赶走,这些苍蝇要么停留在空中,要么寻找另一个栖息场所,直到他们可以返回到牛科动物的面部。因此,将具有针对牛莫拉氏菌的活性的噬菌体或免疫原性剂与苍蝇引诱剂组合,并部署在摩擦站附近或与之结合的位置,将促进它们被苍蝇摄取。例如,当苍蝇从牛科动物的面部被赶走时,集成了苍蝇栖息场所的面部摩擦刷将促使苍蝇停留在噬菌体/免疫原性剂的储器上,所述苍蝇栖息场所含有噬菌体/免疫原性剂的储器,含有或不含苍蝇引诱剂。然后,苍蝇将摄取噬菌体/免疫原性剂,并且在它们返回时将噬菌体/免疫原性剂转移到牛科动物的面部,从而使得治疗或预防细菌感染,如IBK。这种策略是有益的,因为它利用了牛和面蝇的自然行为,并且不需要直接的人为干预。

[0092] 可替代地,将带有或不带有飞行昆虫引诱剂的噬菌体或免疫原性剂直接施加于面部摩擦刷,将允许噬菌体/免疫原性剂转移到牛的面部,而不需要直接的人为相互作用。将

噬菌体/免疫原性剂转移到牛科动物的面部而不需要直接的人为相互作用的另外的方法包括将含有或不含有飞行昆虫引诱剂的噬菌体/免疫原性剂添加到含有牛科动物的食物源的合适尺寸的容器的边缘。当牛科动物的口鼻与容器的边缘接触时,从此类容器中觅食和抓取食物将最终使得噬菌体/免疫原性剂转移到牛科动物的面部。在这两种情况下,飞行昆虫然后可以将噬菌体/免疫原性剂从动物的面部转移到动物要治疗的区域,例如眼睛。当存在飞行昆虫引诱剂时,这是特别有利的,因为这促使飞行昆虫从牛的面部摄取噬菌体,并将它们转移到感染部位。

[0093] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以整合到陆生动物的可穿戴制品中,如牛科或马科动物的耳标。可替代地,本发明的组合物可以直接或间接粘附到动物的皮肤。在这些实施方式中,如果陆生动物是游牧的,组合物将由陆生动物携带,而不是固定在一个地方。这是有利的,因为所述组合物将随着动物移动,并且即使动物移动,也能继续将飞行昆虫引诱到动物身上。耳标特别有利,因为所述组合物位于动物面部附近,因此使得容易接近被引诱到动物面部的飞行昆虫,如面蝇。

[0094] 在所有上述实施方式中,组合物的最终形式将是使飞行昆虫能够摄食和摄取噬菌体和/或免疫原性剂的形式。

[0095] 实施例

[0096] 进行实验来研究飞行昆虫将噬菌体从一个来源携带到位于远处的感染部位的能力。在这些原理验证实验中,通过使用三种不同的飞行昆虫载体和两种不同的噬菌体/病原体系统,证明了所述概念的可再现性和实用性。更具体地,实验是用与对牛莫拉氏菌具有特异性的噬菌体或对肠道沙门氏菌具有特异性的噬菌体组合的面蝇(秋家蝇)、丽蝇(反吐丽蝇)和大黄蜂(黄尾熊蜂)进行的。在涉及肠道沙门氏菌的试验的情况下,使用了先前针对肠道沙门氏菌血清型鼠伤寒沙门氏菌SL1344分离的噬菌体。这些肠道沙门氏菌噬菌体是通过将琼脂上的肠道沙门氏菌生长菌苔暴露于从已经悬浮于无菌水缓冲液中的猪粪便物质中采集的液体的等分试样,并且随后在37℃下温育一段时间后观察细菌菌苔中的噬菌斑来分离的。

[0097] 在牛莫拉氏菌的情况下,噬菌体的分离如下。牛莫拉氏菌购自英国全国菌种保藏中心(National Collection of Type Cultures)(NCTC 9426),并且在补充有5%马血的脑心浸液(BHI)液体培养基中培养。将细菌铺板到补充有5%马血的BHI琼脂中,并且将板在37℃下温育48小时。从屠宰场采集的牛瘤胃液和牛鼻和泪腺分泌物样本中分离具有针对牛莫拉氏菌的裂解活性的噬菌体,从所述样本中浓缩了噬菌体裂解物。这是通过将裂解物引入到血琼脂中的牛莫拉氏菌板并在进一步温育一段时间后观察细菌裂解来实现的。在血琼脂板中加入氯化三苯基四唑有助于观察噬菌体对细菌的裂解。采集噬菌斑,用于在补充有5%马血的牛莫拉氏菌/BHI液体培养基中富集。对四个单独的培养物进行连续传代以获得噬菌体克隆群体,将其用于透射电子显微术(TEM)。图7、8、9和10示出了分离的具有针对牛莫拉氏菌的活性的四种噬菌体的TEM图像。图11a和11b示出了在产生图10的噬菌体的分离物连续传代后产生的聚集体。可以看出,分离物中的所有噬菌体具有相同的形态,与连续传代后的克隆群体一致。进一步,可以看出每个分离的噬菌体具有不同的形态。虽然图7中的噬菌体具有典型的噬菌体形态,但图10中的噬菌体具有显著不同的形态。图8和9中的噬菌体具有彼此非常相似的形态。

[0098] 实施例1

[0099] 建立了一种模型系统,用于研究苍蝇将噬菌体从一个来源携带到位于远处的感染部位的能力的实验。在此模型中,感染部位以牛莫拉氏菌在血琼脂上的生长或肠道沙门氏菌在琼脂上的生长为代表,并且所使用的飞行昆虫是面蝇(秋家蝇)或丽蝇(反吐丽蝇)。实验中使用的面蝇是从牛附近广泛捕获的样本。在丽蝇的情况下,这些是最近从蛹中孵化出来的3天大的成年苍蝇,其在23℃,12:12的明:暗循环下被温育。将具有针对牛莫拉氏菌或肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体添加到充当飞行昆虫引诱剂的20%蔗糖溶液中。在牛莫拉氏菌实验的情况下,使用了图7-10所示的四种噬菌体的混合物。具有针对牛莫拉氏菌的裂解活性的噬菌体的浓度为约10^6pfu/ml,并且具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体的浓度为约10^{11}pfu/ml。

[0100] 设置一种封闭物,其含有蔗糖溶液中的噬菌体、5只成年苍蝇和远离蔗糖溶液放置的生长有病原体的琼脂板。因此,在封闭物内,苍蝇能够以蔗糖溶液为食,在这样做的同时消耗噬菌体,并行进到位于远处的琼脂板上的感染部位,在那里它们可以另外摄食。

[0101] 另外,还设置了其它封闭物作为含有以下的对照:

[0102] 1.对照1:不含噬菌体的20%蔗糖溶液,但含有苍蝇和生长有牛莫拉氏菌或肠道沙门氏菌的位于远处的琼脂板。

[0103] 2.对照2:20%蔗糖溶液中的噬菌体,以及位于远处生长有牛莫拉氏菌或肠道沙门氏菌的琼脂板,但没有苍蝇。

[0104] 表1总结了每个牛莫拉氏菌和肠道沙门氏菌病原体实验的这种实验设置。

[0105] 表1:实施例1的实验设置概述

[0106]

	20%蔗糖溶液中的噬菌体	飞行昆虫(5只成年苍蝇)	位于远处的病原体的生长
对照1	不存在	存在	存在
对照2	存在	不存在	存在
根据本发明的封闭物	存在	存在	存在

[0107] 将每个封闭物置于室温下一天。然后从每个封闭物中取出琼脂板并进行分析,以确定是否对病原生长具有任何影响。

[0108] 图3示出了牛莫拉氏菌实验结束时的每个琼脂板。可以看出,在对照1(图3A)和对照2(图3B)的迭代实验中,牛莫拉氏菌的菌苔不受阻碍地继续生长。相比之下,在蔗糖溶液中存在苍蝇和噬菌体的迭代实验中(图3C),由于噬菌体介导的细胞裂解,观察到牛莫拉氏菌生长耗竭的区域。这种裂解活性的可视化通过添加氯化三苯基四唑而增强。

[0109] 图4示出了肠道沙门氏菌实验结束时的每个琼脂板。可以看出,在对照1(图4A)和对照2(图4B)的迭代实验中,肠道沙门氏菌的菌苔不受阻碍地继续生长。相比之下,在蔗糖溶液中存在苍蝇和噬菌体的迭代实验中(图4C),由于噬菌体介导的细胞裂解,观察到肠道沙门氏菌生长耗竭的区域。这种裂解活性的可视化通过添加氯化三苯基四唑而增强。

[0110] 实施例1的结果证实,飞行昆虫能够充当载体将噬菌体从一个位置转移到另一个位置,并且因此,在存在细菌感染的情况下,它们可以成为改善在该第二个位置的感染的方式。

[0111] 实施例2

[0112] 建立了一种模型系统,用于研究飞行昆虫将噬菌体从一个来源携带到位于远处的牛眼的能力的实验。在此模型中,所使用的飞行昆虫是面蝇(秋家蝇)。实验中使用的面蝇是野外捕获的,实验之前在环境条件下以12:12的明:暗照明模式将它们维持在20%蔗糖溶液中。牛眼是屠宰场来源的离体牛眼。将具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体添加到充当飞行昆虫引诱剂的20%蔗糖溶液中。具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体的浓度为约10^{11}pfu/ml。

[0113] 设置一种封闭物,其含有蔗糖溶液中的噬菌体、5只成年苍蝇和远离蔗糖溶液放置的牛眼。因此,在封闭物内,苍蝇能够以蔗糖溶液为食,在这样做的同时消耗噬菌体,并行进到牛眼。

[0114] 另外,还设置了其它封闭物作为含有以下的对照:

[0115] 1.对照1:20%蔗糖溶液,不含噬菌体,但含有苍蝇和位于远处的离体牛眼;

[0116] 2.对照2:20%蔗糖溶液中的噬菌体、位于远处的离体牛眼,但没有苍蝇。

[0117] 表2总结了此实验设置。

[0118] 表2.实施例2的实验设置概述

[0119]

实验条件	20%蔗糖溶液中的噬菌体	载体（5只成年面蝇）	位于远处的离体牛眼
对照1	不存在	存在	存在
对照2	存在	不存在	存在
根据本发明的封闭物	存在	存在	存在

[0120] 将每个封闭物在室温下放置一天。然后从每个封闭物中取出牛眼,并且用1ml无菌PBS溶液冲洗眼睛表面,将其中100μl转移到琼脂上的肠道沙门氏菌生长菌苔,以便在37℃下培养过夜。然后分析每只眼睛的琼脂板,以确定是否对病原生长有任何影响。

[0121] 图5示出了实验结束时的每个琼脂板。在对照1(图5A)和对照2(图5B)琼脂板中,来自离体牛眼的PBS冲洗液的添加引起了病原体菌苔的紊乱,但是没有检测到细菌裂解的区域。在所有变量都存在的重复试验中(图5C),来自离体眼睛的PBS冲洗液的添加引起病原体菌苔的紊乱,并且在液体汇集的地方观察到另外的裂解活性。

[0122] 此实验的结果表明,苍蝇能够将噬菌体从一个位置转移到牛眼,在牛眼处,它们有可能限制或根除敏感细菌物种的病原体。

[0123] 实施例3

[0124] 建立了一种模型系统,用于研究飞行昆虫将噬菌体从一个来源携带到位于远处的植物物种的能力的实验。在此模型中,所使用的飞行昆虫是大黄蜂(黄尾熊蜂)。植物物种是新鲜切花。将具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体添加到充当飞行昆虫引诱剂的20%蔗糖溶液中。具有针对肠道沙门氏菌的裂解活性的噬菌体的浓度为约10^{11}pfu/ml。

[0125] 设置一种封闭物,其含有置于蔗糖溶液中的噬菌体、5只大黄蜂和远离蔗糖溶液放置的新鲜切花。因此,在封闭物内,蜜蜂能够以蔗糖溶液为食,在这样做的同时消耗噬菌体,并行进到花。

[0126] 另外,还设置了其它封闭物作为含有以下的对照:

[0127] 1.对照1:蜜蜂、位于远处的花,但在20%蔗糖溶液中没有噬菌体;

[0128] 2.对照2:20%蔗糖溶液中的噬菌体、位于远处的花,但没有蜜蜂。

[0129] 表3总结了此实验设置。

[0130] 表3.实施例3的设置概述

[0131]

实验条件	20%蔗糖溶液中的噬菌体	载体（5只蜜蜂）	位于远处的新鲜切花
对照1	不存在	存在	存在
对照2	存在	不存在	存在
根据本发明的封闭物	存在	存在	存在

[0132] 将每个封闭物在室温下放置一天。然后将花从每个封闭物中取出，并且用1ml无菌PBS溶液冲洗，将其中100μl转移到琼脂上的肠道沙门氏菌生长菌苔，以便在37℃下培养过夜。然后分析每朵花的琼脂板，以确定是否对病原生长有任何影响。

[0133] 图6示出了实验结束时的每个琼脂板。在实施例3的对照1(图6A)和对照2(图6B)迭代中，添加来自花的PBS溶液冲洗液没有产生任何可见的细菌裂解区域。相比之下，对于所有变量都存在的重复试验(图6C)，将PBS花冲洗液添加到肠道沙门氏菌的生长菌苔中产生了明显的裂解活性。

[0134] 此实验的结果表明，昆虫载体能够将噬菌体从一个位置转移到植物物种，在植物物种处，它们有可能限制或根除易受感染的细菌物种的病原体。此外，此实验的结果揭示蜜蜂是将噬菌体传播到开花植物的良好载体，这对于植物授粉时的作物保护具有有利的意义。事实上，可以合理地得出结论，向商业蜂箱中添加具有针对特定病原体的活性的噬菌体将减少蜂箱的蜜蜂群体中以及蜜蜂逗留的植物上的病原体的存在。

[0135] 实施例4

[0136] 建立了一种模型系统，用于研究飞行昆虫将细菌从一个来源携带到远程位置的能力的实验。

[0137] 所述细菌是牛莫拉氏菌，其在补充有5％马血的BHI培养基中培养。将此液体培养基的一部分添加到蔗糖中以产生含有细菌的20％溶液。所使用的飞行昆虫是丽蝇(反吐丽蝇)。

[0138] 设置一种封闭物，其含有蔗糖溶液中的细菌、5只丽蝇和远离蔗糖溶液放置的无菌血琼脂板。因此，在封闭物内，苍蝇能够以蔗糖溶液为食，在这样做的同时消耗细菌，并行进到无菌琼脂板。

[0139] 另外，设置另一种封闭物作为对照，其含有蔗糖溶液中的细菌和远离蔗糖溶液放置的无菌血琼脂板，但是没有丽蝇。

[0140] 表4:实施例4的设置概述

[0141]

实验条件	20%蔗糖溶液中的细菌	载体（5只苍蝇）	无菌血琼脂板
对照	存在	不存在	存在
根据本发明的封闭物	存在	存在	存在

[0142] 将每个封闭物在室温下放置一天。然后，将血琼脂板取出并在37℃下温育。从没有苍蝇的封闭物中取出的血琼脂板未能显示细菌生长。然而，从含有苍蝇的封闭物中取出的血琼脂板产生了可见的细菌菌落。

[0143] 此实验证实了苍蝇能够将细菌从一个来源转移到较远的位置。通常将理解的是，细菌具有免疫原性，并且事实上，疫苗可以由灭活或杀死的细菌或细菌组分如细胞膜蛋白研制而成。因此，这意味着飞行昆虫能够将免疫原性物质从一个位置携带到另一个位置，并且通常将理解的是，将此类物质与苍蝇引诱剂连同飞行昆虫载体结合提供，可以用于传播这些免疫原性物质，包括传播给动物和植物。

[0144] 本公开的带编号实施方式

[0145] 1.一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的组合物，所述组合物包含：

[0146] (i)噬菌体和/或免疫原性剂；以及

[0147] (ii)飞行昆虫引诱剂。

[0148] 2.一种将飞行昆虫引诱到噬菌体和/或免疫原性剂的方法，所述方法包括：

[0149] (i)将所述噬菌体和/或免疫原性剂与飞行昆虫引诱剂组合；或者

[0150] (ii)将所述噬菌体和/或免疫原性剂置于飞行昆虫引诱剂的引诱半径内。

[0151] 3.根据实施方式2所述的方法，其中所述噬菌体和/或免疫原性剂在所述飞行昆虫向所述引诱剂移动或与所述引诱剂接触时被转移到所述飞行昆虫。

[0152] 4.一种用于治疗或预防陆生植物或动物中的细菌性疾病的试剂盒，所述试剂盒包含：

[0153] (i)噬菌体和/或免疫原性剂；以及

[0154] (ii)飞行昆虫引诱剂。

[0155] 5.飞行昆虫在将噬菌体和/或免疫原性剂转移到陆生动物或植物的方法中的用途，其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

[0156] 6.根据实施方式5所述的用途，其中所述噬菌体和/或免疫原性剂已经通过根据实施方式2或3所述的方法转移到所述飞行昆虫。

[0157] 7.一种治疗或预防陆生动物或植物中的疾病的方法，所述方法包括使用飞行昆虫将噬菌体和/或免疫原性剂转移到所述动物或所述植物，其中所述飞行昆虫充当所述噬菌体和/或免疫原性剂的载体。

[0158] 8.根据实施方式7所述的方法，其中所述噬菌体和/或免疫原性剂已经通过根据实施方式2或3所述的方法转移到所述飞行昆虫。

[0159] 9.根据实施方式1所述的组合物、根据实施方式2、3或8所述的方法、根据实施方式4所述的试剂盒或根据实施方式6所述的用途，其中所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源。

[0160] 10.根据实施方式9所述的组合物、方法、试剂盒或用途，其中所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源与第二物质的组合。

[0161] 11.根据实施方式1、9或10所述的组合物、根据实施方式2、3、7、8、9或10所述的方法、根据实施方式4、9或10所述的试剂盒或者根据实施方式5、6、9或10所述的用途，其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生动物或植物中的疾病相关的细菌的活性。

[0162] 12.根据任一前述实施方式所述的组合物或试剂盒，其中所述组合物包含两种或更多种免疫原性剂和/或噬菌体，优选地包含两种或更多种噬菌体。

[0163] 13.根据任一前述实施方式所述的方法或用途，其中使用两种或更多种免疫原性

剂和/或噬菌体。

[0164] 14.根据任一前述实施方式所述的组合物或试剂盒,其包含噬菌体,或者根据任一前述实施方式所述的方法或用途,其中使用噬菌体。

[0165] 15.根据实施方式14所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体通过固定到基质上而稳定,优选地其中所述噬菌体通过其头部固定。

[0166] 16.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述免疫原性剂包含变性的细菌抗原。

[0167] 17.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述飞行昆虫是苍蝇,优选地双翅目昆虫,优选地其中所述飞行昆虫是面蝇、澳大利亚灌木丛蝇或水牛蝇,最优选地面蝇。

[0168] 18.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述飞行昆虫是黄蜂、东方果蝇或橄榄果蝇。

[0169] 19.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生动物中的疾病相关的细菌的活性,优选地其中所述动物是牛科或马科动物,更优选地牛科动物。

[0170] 20.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与陆生植物中的疾病相关的细菌的活性,优选地其中所述植物是香蕉植物或橄榄树。

[0171] 21.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对与传染性牛角膜结膜炎的病因有关的病原体的活性。

[0172] 22.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对牛莫拉氏菌的活性。

[0173] 23.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂具有针对卡他莫拉氏菌、牛眼莫拉氏菌、支原体、野油菜黄单胞菌、青枯罗尔斯顿菌、苛养木杆菌和/或萨瓦氏假单胞菌的活性。

[0174] 24.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中存在飞行昆虫引诱剂,优选地其中所述引诱剂包含以下中的一种或多种:粪便物质、信息素、挥发剂、有气味的材料、可以反射或发射可见电磁光谱内的光的材料、反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料或飞行昆虫天生被引诱的休息场所。

[0175] 25.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述引诱剂包含一种或多种天然和/或合成物质,优选地一种或多种选自信息素、挥发剂和有气味的材料的物质,优选地挥发剂。

[0176] 26.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述引诱剂包含反射或发射所述可见电磁光谱内的光的材料或反射或发射所述可见光谱外的电磁辐射的材料。

[0177] 27.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述飞行昆虫引诱剂包含飞行昆虫营养源,其中所述营养源是糖。

[0178] 28.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述引诱剂和所述噬菌体和/或免疫原性剂以固体形式或液体形式呈现。

[0179] 29.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述引诱剂包含粪便物质,优选地牛粪便物质。

[0180] 30.根据任一前述实施方式所述的组合物、方法、试剂盒或用途,其中所述噬菌体和/或免疫原性剂与所述引诱剂混合。

[0181] 31.一种制品,其包含根据任一前述实施方式所述的组合物。

[0182] 32.根据实施方式31所述的制品,其中所述制品能够由陆生动物佩戴。

[0183] 33.根据实施方式32所述的制品,其中所述制品是牛耳标或马耳标。

[0184] 34.一种方法,其中将根据任一前述实施方式所述的组合物施涂于陆生动物的皮肤。

[0185] 本公开提供了本发明的示例性实施方式,并且不旨在进行限制。将理解,本发明的各种其它修改和变化也是可能的。



图1

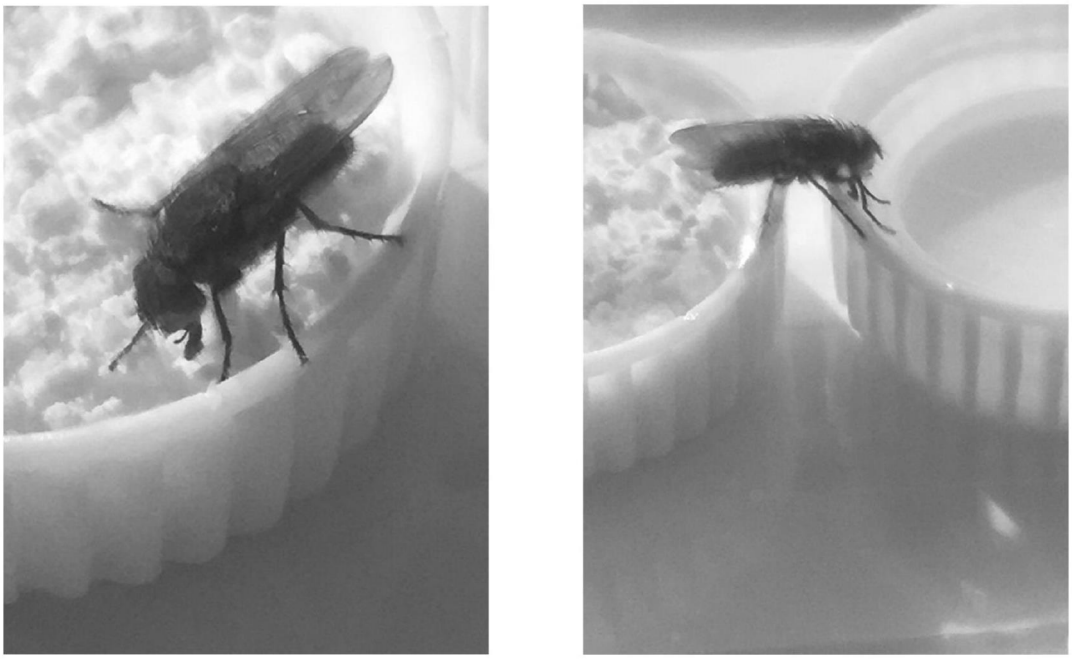


图2

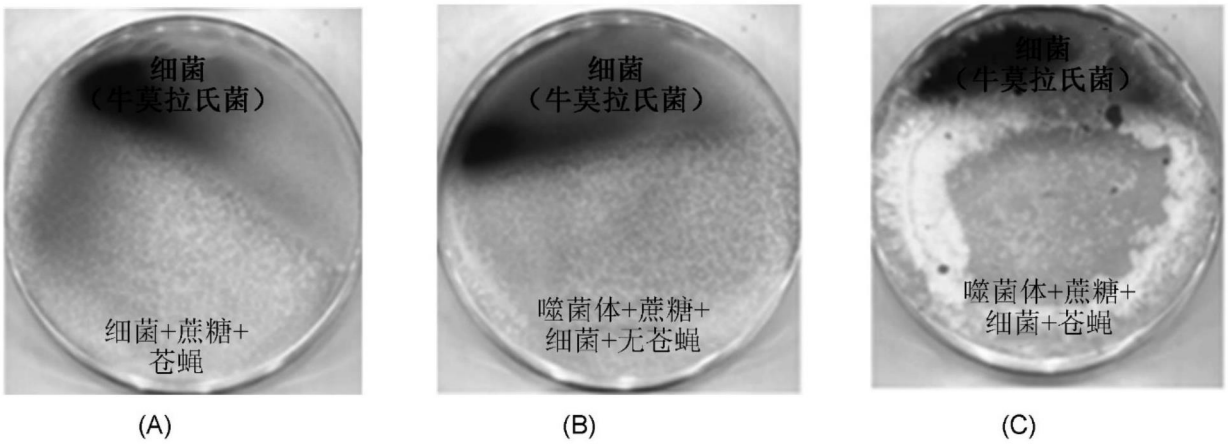

细菌
（牛莫拉氏菌）
细菌+蔗糖+
苍蝇
(A)
细菌
（牛莫拉氏菌）
噬菌体+蔗糖+
细菌+无苍蝇
(B)
细菌
（牛莫拉氏菌）
噬菌体+蔗糖+
细菌+苍蝇
(C)

图3

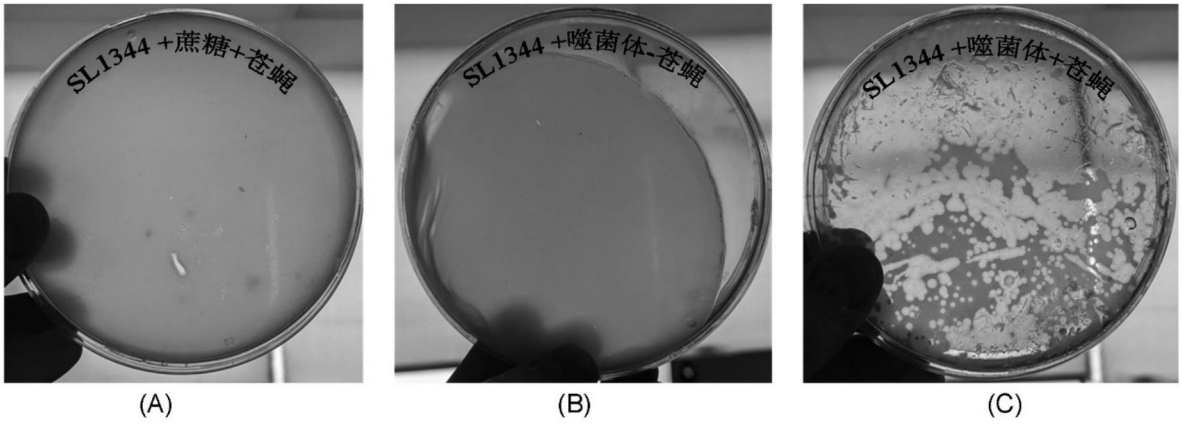

SL1344 +蔗糖+苍蝇
(A)
SL1344 +噬菌体-苍蝇
(B)
SL1344 +噬菌体+苍蝇
(C)

图4

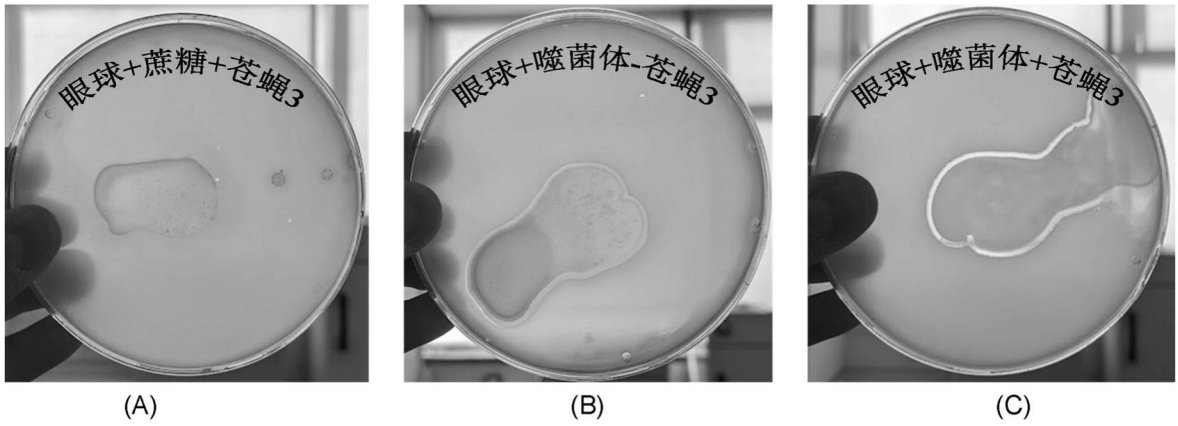

眼球+蔗糖+苍蝇3
(A)
眼球+噬菌体-苍蝇3
(B)
眼球+噬菌体+苍蝇3
(C)

图5

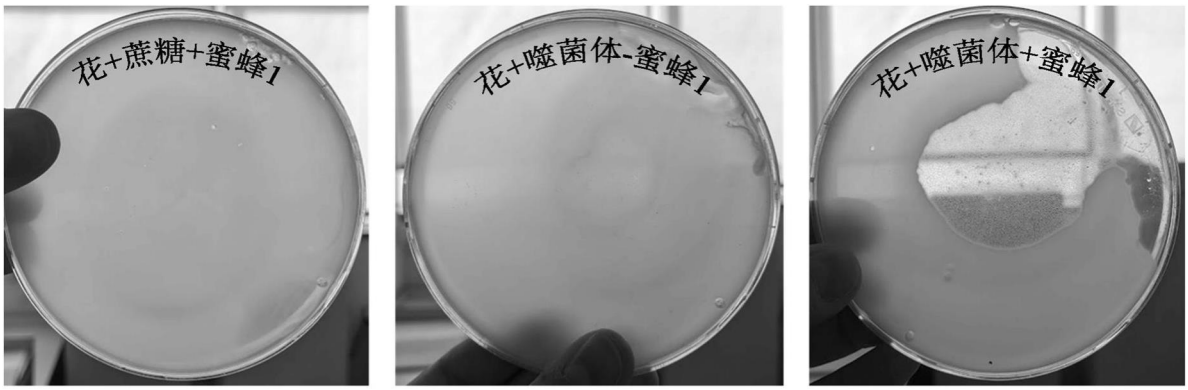


图6

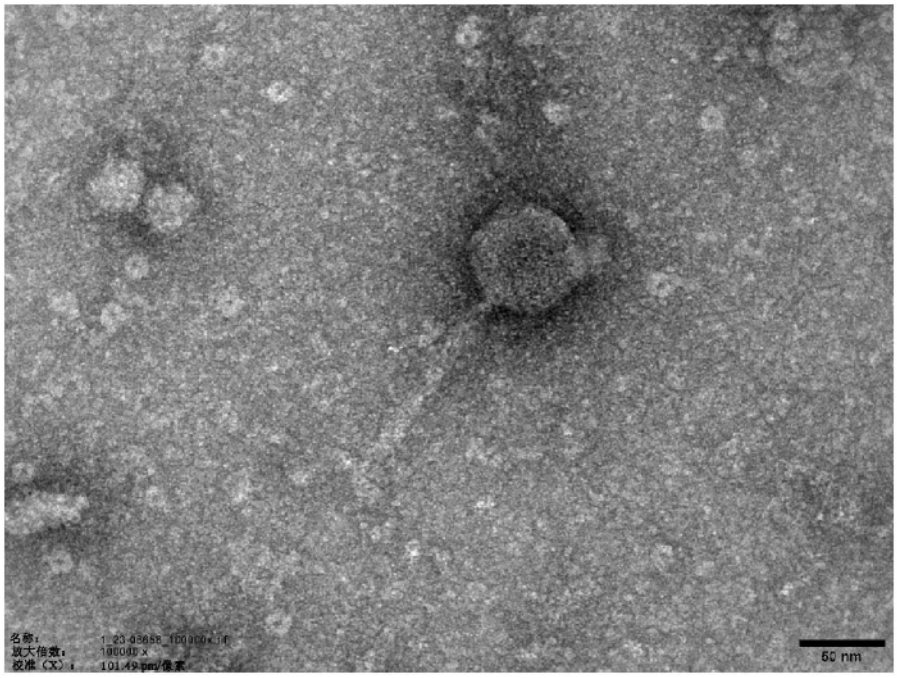


图7

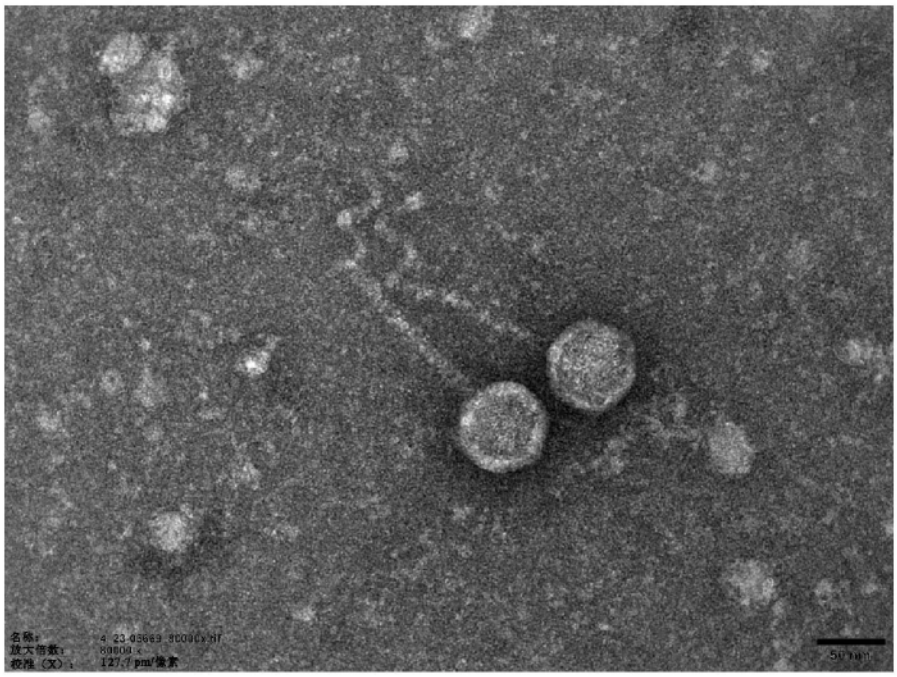


图8

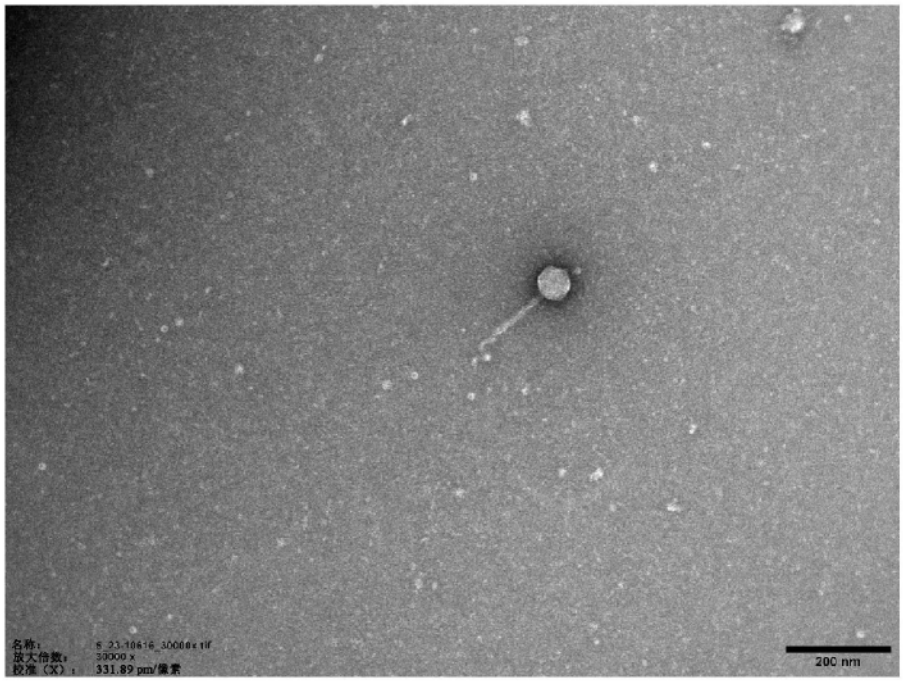
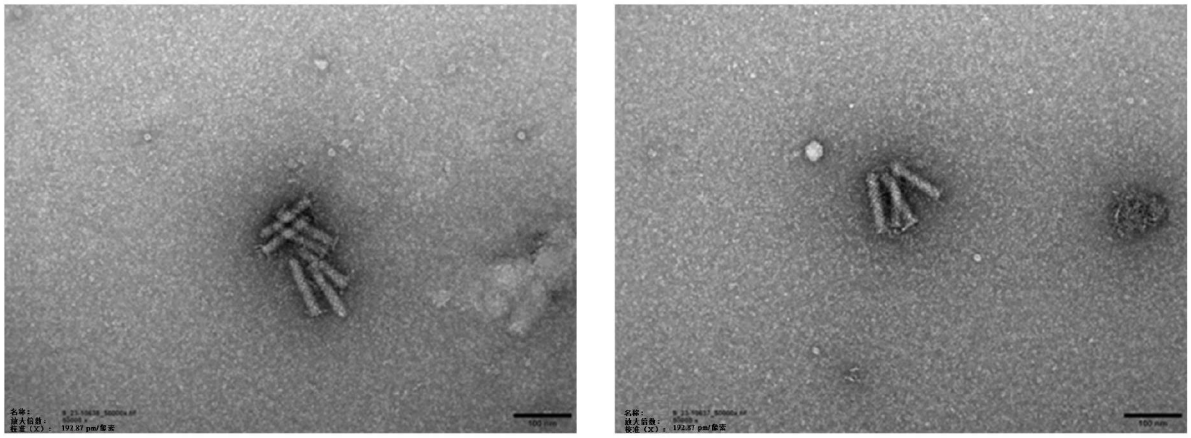


图9



图10



(A) (B)

图11