



F1000112374B



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 112374 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

28.11.2003

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 1/20, A23K 1/16, A01K 45/00, A01N 63/00,
A61K 35/74 // (C12N 1/20 ; C12R 1:225)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

933360

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

27.07.1993

(24) Alkupäivä - Löpdag

28.01.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

27.07.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/00654

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

28.01.1991 US 646879 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Biogaia Biologics AB, Kungsgatan 53, 111 22 Stockholm, SVERIGE, (SE)
2 •Casas-Perez,Ivan A., 4916 North Hills Drive, Raleigh, NC 27612, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Edens, Frank W., 326 Northclift Drive, Raleigh, NC 27609, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Casas-Perez,Ivan A., 4916 North Hills Drive, Raleigh, NC 27612, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä suorasyöttöisten mikro-organismien antamiseksi siipikarjalle in ovo
Förfarande för att ge direktmatade mikroorganismer åt fjäderfän in ovo**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: ATCC 55148 ATCC ATCC 55149 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 4040388 A, US 4689226 A, WO 9014765 A, WO 8808452 A

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä suorasyöttöisten mikro-organismien, kuten *Lactobacillus reuteri*, saattamiseksi kasvamaan vakiintuneella tavalla aviäärin organismien ruuansulatuskana-
vassa, jossa menetelmässä muniin ympätään mikro-organismien eläviä soluja.

Förfarande för etablering av direkt matade mikroorganismer, såsom *Lactobacillus reuteri*, i den gastrointestinala kanalen hos fågelorganismer, enligt vilket ägg ympas med levande celler av mikroorganismen.

Menetelmä suorasyöttöisten mikro-organismien antamiseksi siipikarjalle in ovo

Keksinnön ala

5 Tämä keksintö liittyy uuteen menetelmään elin-
kykyisten mikrobisolujen antamiseksi eläimille in ovo.

Keksinnön tausta

10 Ansio termien "probiootit" käyttöönotosta on kat-
sottava kuuluvan Parkerille (20), joka määritteli ne
"organismeiksi ja aineiksi, jotka toimivat myötävaikutta-
vina tekijöinä suoliston tasapainon muodostumisessa", sil-
loin kun niitä käytetään ruokavalion täydennykseksi. Tämä
15 julkaisu ja kaikki muut tässä keksinnössä siteeratut jul-
kaisut ja patentit on liitetty tähän keksintöön siihen
oikeuttavien säädösten nojalla. Myöhemmin Fuller (11) piti
tätä määritelmää liian laaja-alaisena, koska siihen sisäl-
tyvien soluviljelmien ja mikrobien aineenvaihduntatuottei-
den lisäksi se olisi voinut kattaa antibioottivalmisteet.
Alan ammattikirjallisuudessa on joitakin vuosia sitten
20 julkaistu useita yhteenvetoja, joissa on kuvattu tieteel-
lisiä perusteita probioottien käytölle tuotantoeläinten
suolistoymppeinä (10, 26). On ehdotettu, että termi "pro-
biootit" korvattaisiin termillä "suorasyöttöiset mikro-
organismit" eli DFM:t (Direct Feed Microorganisms) (9).

25 Ajatusta elinkykyisten, vaarattomien maitohappo-
bakteerien lisäämisestä ruansulatuskanavaan ruokavalion
täydennykseksi arvosti ensimmäisenä Metchnikoff (16), joka
katsoi bulgarialaisten talonpoikien pitkäikäisyyden johtu-
van heidän jogurtinsyönnistään. Jotkut tutkijat ovat esit-
30 täneet, että tällaisten fermentoitujen maitovalmisteiden
nauttimisesta saatava terapeuttinen arvo on riippuvainen
näiden valmisteiden sisältämien elinkykyisten bakteerien
määrästä (12, 27). Metchnikoffin varhaisista raporteista
lähtien on useissa tutkimuksissa osoitettu laktobasillien

kykenevän esimerkiksi rajoittamaan koliformisten bakteerien kasvua. Elinkykyisten *Lactobacillus acidophilus* -solujen syöttämisen nuorille lypsyvasikoille osoitettiin vähentävän ripulin insidenssiä (3), ja lisäävän laktobasillien lukumäärää ja vähentävän laskettuja koliformisten bakteerien määriä ulosteessa (4). Nämä havainnot ovat ristiriidassa toisten tutkimusten kanssa, joissa ei kyetty osoittamaan mitään hyötyä *Lactobacillus acidophiluksen* (8, 13) eikä maidossa viljellyn *Lactobacillus acidophiluksen* tai *Lactobacillus lactiksen* syöttämisestä (17).

Muralidharan et al. (18) yksityiskohtaisessa tutkimuksessa porsailla, joille annettiin *Lactobacillus lactis* -tiivistettä enintään 8 viikon ajan syntymästä, havaittiin ulostenäytteissä laskettavissa olevien koliformisten bakteerien määrien laskevan asteittain. Näillä eläimillä esiintyi ripulia merkityksettömän vähän, mutta kontrollieläimillä sitä esiintyi selvästi varsinkin vieroitettaessa. Underdahl et al. (32) havaitsivat sellaisilla gnotobioottisilla sioilla ainoastaan lievää, 2 - 4 päivää kestävästä ripulista, joihin oli ennen keinotekoista *Escherichia coli* -infektiota ympäröivä *Streptococcus faecium*. Samassa tutkimuksessa samalla tavalla *Escherichia coli*lla infektoidut, mutta ennaltaehkäisevällä *Streptococcus*-mikro-organismilla käsittelemättömät siat saivat sitkeän ripulin.

Probiotit (joista tästä eteenpäin käytetään nimitystä DFM:t) ovat bakteeri- tai hiivavalmisteita, joita annetaan suun kautta tai lisätään rehuihin. Tavallisimmin käytettyjä DFM:iä ovat maitohappobakteeri (MHB) -kannat, erityisesti suvut *Lactobacillus*, *Lactococcus* ja *Enterococcus*. Näihin kuuluvat lajit *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus thermophilus*, *Lactococcus diacetylactis* ja *Enterococcus faecium*. Näiden MHB:iden lisäksi DFM:einä käytetään joitakin *Bacillus*-lajeja (*Bacillus subtilis*,

Bacillus toyoi) sekä hiivoja ja homeita (Saccharomyces cerevisiae-, Aspergillus oryzae- ja Torulopsis-lajit) (10).

5 Yleisen käsityksen mukaisesti katsotaan haitallisten mikro-organismien pystyvän lisääntymään eläinten ruoansulatuskanavassa heikentyneen vastustuskyvyn, kuten stressin, vallitessa, missä suhteessa ihminenkään ei tee poikkeusta. Tällaisina rasituskausina on mikro-organismien normaalin ja terveellisen tasapainon säilyttämisen katsotu olevan erittäin tärkeää (10). DFM:ien käytön taustalla 10 oleva ajatus on siis se, että jos suolistokanavaan lisätään riittävä määrä sopivaa(ia) mikro-organismia(eja) (i) stressin tai sairauden aikana, (ii) syntymän yhteydessä tai (iii) antibiootihoidon jälkeen (kun MHB:ita on minimaalisesti), niin mikrobien epätasapainosta aiheutuvat 15 haitalliset seuraukset voidaan minimoida tai ne voidaan välttää. Tällaisten elävien, luonnossa esiintyvien mikro-organismien käyttö auttaa palauttamaan ja ylläpitämään hyödyllisten mikrobien oikean tasapainon ruoansulatuskanavassa stressin ja sairauksien aikana ja antibiootihoidon 20 jälkeen (10). Tämä ajatus, kuvaukset ehdotetuista vaikutustavoista ja todistusaineistoa DFM:ien tehokkaasta käytöstä kaikilla tuotantoeläimillä on esitetty yhteenvedona Foxin (10), Sissons (26) ja monien muiden kirjoittajien 25 (22) katsauksissa.

Yksi niistä suurista ongelmista tai rajoituksista, joita on esiintynyt DFM:ien eläimiä koskevissa kaupallisessa mittakaavassa toteutetuissa sovellutuksissa on (i) sopivien annostelujärjestelmien saatavuus ja (ii) kyky 30 saada probioottiset valmisteet eläimiin mahdollisimman nopeasti syntymän jälkeen. Tämä pätee varsinkin rakeistettujen rehujen käytön yhteydessä, millainen on asianlaita siipikarjateollisuudessa. Rakeistusmenetelmään kuuluu tavallisesti yksi tai useampi kuumennusvaihe, jossa käytetyt 35 lämpötilat ovat riittävän korkeita aikaansaamaan rehun

komponenttien pastöroitumisen tai steriloitumisen, minkä vuoksi elinkykyisiä mikro-organismeja ei kyetä lisäämään näihin rehuihin ennen rakeistusta.

5 Tässä keksinnössä kuvataan uusia menetelmiä ja tuotantotapoja joidenkin näiden ongelmien voittamiseksi antamalla elinkykyisiä DFM:iä in ovo -olosuhteissa. Näiden menetelmien kehittämisessä käytetty DFM oli *Lactobacillus reuteri*. Tämä laji valittiin käyttöön, koska sen on osoitettu olevan tehokas DFM siipikarjalla (21). On myös olemassa tämän lajin ainutlaatuisiin ominaisuuksiin liittyviä 10 aiemmin jätettyjä patenttihakemusjulkaisuja. Nämä hakemusjulkaisut ovat PCT/US88/01 423, joka on jätetty 28.4.1988 ja julkaistu 3.11.1988, jossa esitetään sellaisia prioriteettia koskevia vaatimuksia, jotka ovat peräisin US-hakemusjulkaisusta sarjanumero 07/268 361, joka on jätetty 15 19.9.1988, joka on jatkohakemus US-hakemusjulkaisulle sarjanumero 07/102 830, joka on jätetty 22.9.1987, joka on jatkohakemus US-hakemusjulkaisulle sarjanumero 07/046 027, joka on jätetty 1.5.1987; ja US-hakemusjulkaisu sarjanumero 20 07/539 014, joka on jätetty 15.6.1990. Näiden hakemusjulkaisujen patenttiselitykset on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säädösten nojalla.

Lactobacillus reuteri on maitohappobakteerilaji, joka on ollut tunnettu jo vuosisadan vaihteesta lähtien 25 (19). Vaikka sillä on alunperin ollut eri lajinimiä (esim. *Lactobacillus fermentum* biotyyppeillä II), niin se sai oman lajin statuksen vuonna 1980 ja on rekisteröity Bergeyn käsikirjan vuoden 1988 painokseen (14, 15). Sitä esiintyy elintarvikkeissa, erityisesti meijerituotteissa ja liha- 30 laaduissa, mutta pääasiassa sitä esiintyy terveiden eläinten ja myös ihmisten ruuansulatuskanavassa. (1, 6, 7, 14, 15, 23, 24, 25 ja 33).

Lactobacillus reuteri on lukumäärältään suurin ruuansulatuskanavassa elävä heterofermentatiivinen *Lactobacillus* (23, 24, 25). Se on tyypillinen heterofermenta- 35

tiivinen bakteeri, joka muuttaa sokereita etikkahapoksi, etanoliksi ja CO₂:ksi sekä maitohapoksi, joka on Lactobacillus acidophiluksen tyyppisten lajien homofermentatiivisen aineenvaihdunnan pääasiallisin lopputuote (31). Se käyttää fosfoketolaasiaineenvaihduntatietä glukoosin muuttamiseen lopputuotteiksi. Kun viljelyalustalla on glyserolia, vaihtoehtoista vedyn akseptoria sekä glukoosia tai muita käytettäväksi kelpaavia hiilen ja energian lähteitä (esimerkiksi laktoosia), muodostuu etanolin sijasta ase-
10 taattia ja glyseroli pelkistyy 1,3-propaanidioliksi aineenvaihdunnan välituotteen, 3-hydroksipropionaldehydin (3-HPA), kautta. 3-HPA:n on osoitettu olevan voimakkaasti antimikrobiaalinen aine ja Lactobacillus reuteri vaikuttaa olevan ainutlaatuinen laji tähän mennessä tutkittujen mikro-
15 organismien joukossa, koska se kykenee erittämään ympäröivään väliaineeseen tätä ainetta, jota kutsutaan reuteriiniksi (2, 5, 7, 28, 29, 30 ja 31). Tällä ainutlaatuisella antimikrobiaalisella aktiivisuudella saattaa olla tärkeä osa tämän lajin kilpailullisessa eloonjäämisessä ruuansulatuskanavan ekosysteemissä ja/tai sen kyvyssä sää-
20 dellä muiden mikro-organismien kasvua ja aktiivisuutta tässä ekosysteemissä (7). Tästä syystä tämä mikro-organismi täytyy saada tuotua eläimiin varhaisessa vaiheessa. Tämän keksinnön kohteena on siten saada käyttöön menetelmä
25 DFM:ien, kuten Lactobacilluksen, antamiseksi aviäärisiin lajeihin. Keksinnön muut tavoitteet ja siitä saatavat edut selviävät paremmin seuraavasta kuvauksesta sekä oheistuista patenttivaatimuksista.

Keksinnön yhteenveto

30 Muniin ruiskutetaan Lactobacillus reuteri -puhdasviljelmiä, mikä ei aiheuta haittaa niiden kuoriutuvuudelle. Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön yleinen keino lactobasillien ja muiden DFM:ien viemiseksi aviääristen lajien muniin siten, että nämä mikro-organismit voidaan saa-

da vakiinnuttamaan kasvunsa linnun ruuansulatusjärjestelmässä kuoriutumiseen mennessä.

Muut tämän keksinnön kohteet ja ominaispiirteet käyvät paremmin ilmi seuraavasta kuvauksesta ja oheistuista patenttivaatimuksista.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus ja sen edulliset sovellusmuodot

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön menetelmä DFM:ien viemiseksi munissa oleviin linnunalkioihin siten, että DFM:ien kasvu saadaan vakiinnutettua vastakuoriutuneiden lintujen ruuansulatuskanavassa. Aikaisemmin antibioottien antamiseen tarkoitettuja antamismenetelmiä (katso esimerkiksi US-patenttijulkaisut nro 4 681 063 ja nro 4 903 635) käyttäen tai tekemällä käsivaraisesti neulanreikä munan ilmalokeroon saadaan haudottavien munien ilmalokeroon vietyä DFM-viljelmän, esimerkiksi L. reuterin, eläviä soluja.

Tämän keksinnön ominaispiirteitä ja etuja selvennetään seuraavan esimerkin avulla, jota ei ole pidettävä tätä keksintöä rajoittavana.

Esimerkki

Ennen kuoriutumista ja edullisesti noin 2 päivää tätä ennen tehtiin neulalla aseptisesti reikä kalkkunan (Nicholas) -munien tai kananmunien ilmalokeron yläpuolelle. Ilmalokeroon ruiskutettiin ruiskun ja neulan avulla 100 µl Lactobacillus reuterin kannasta T-1 (eristetty kalkkunoista) tai kannasta 11284 (eristetty kanoista) tehtyä suspensiota, joka sisälsi kutakin kantaa noin 10^5 , 10^7 tai 10^8 solua. Kumpikin kanta on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection, joka sijaitsee Rockvillessä, Marylandissa. Taulukossa 1 on esitetty erisuuruisten Lactobacillus-ymppien vaikutus kuoriutuvuuteen. Taulukossa 1 esitetyt kalkkunoista saadut koetulokset osoittavat, että Lactobacillus reuteri -puhdasviljelmiä voidaan menestyksellisesti viedä elinkykyisiin siipikarjan

muniin vaikuttamatta munien kuoriutuvuuteen. Tämä ympäys ei vaikuttanut kuoriutuvuusprosenttiin. Kanoilla saatiin samanlaisia tuloksia.

Taulukko 1

5

Käsittely	Elävien alkioiden %-osuus kuoriutuessa	Eloonjääneiden %-osuus päivänä 7
Käsitlemättömät alkiot	96	81
Fosfaatti-injektio (kontrolli)	97	81
10 L. reuteri ilmalokeroon injektoituna 10^5 PMY	98	85
L. reuteri ilmalokeroon injektoituna 10^7 PMY	100	78
15 L. reuteri ilmalokeroon injektoituna 10^8 PMY	94	83

Tämä in ovo -menetelmä on uusi keino tiettyjen hyödyllisten mikro-organismien, kuten puhtaan *Lactobacillus reuteri* -kannan, viemiseksi varhaisessa vaiheessa siipikarjaksi luettavien eläinten ruuansulatuskanavaan. Alkiovaiheessa oleva kanan tai siipikarjaksi luettavan eläimen poikanen ui amnionnesteessä, joka on yhteydessä ruuansulatuskanavaan. Niinpä in ovo -olosuhteissa ympätty mikro-organismi pystyy vakiinnuttamaan kasvunsa linnun ruuansulatuskanavassa.

Taulukossa 2 esitetyistä koetuloksista käy ilmi, että tällä tavalla in ovo -olosuhteissa *Lactobacillus reuteri* ympättyjen lintujen ruuansulatuskanavassa todella on tämä mikro-organismi niiden kuoriutuessa. Tässä esimerkissä kussakin käsittelyssä määritettiin linnun umpisuollessa olevien *Lactobacillus*-kokonaislukumäärä. Määritettiin myös *L. reuteri* -prosenttiosuus näistä *Lactobacillus*-luksista sen perusteella, että tämä laji tuottaa inhiboivaa ainetta, reuteriinia.

35

Havaittujen lactobacillusten kokonaislukumäärä määritettiin pesäkkeitä muodostavina yksikköinä (PMY) irti-leikattua ja homogenoitua umpisuolta kohti käyttäen kiinteää (1,5 % agarია) lactobacillusten selektioalustaa (LBS, Lactobacillus Selection Medium), joka on kuvattu kirjallisuusuviitteissä 2, 5 ja 7. L. reuterin prosenttiosuus näistä pesäkkeistä määritettiin kansainvälisessä patenttihakemuksessa PCT/US88/01 423 kuvatulla tavalla mutta käyttäen indikaattoriorganismina L. plantarumia. Tässä tutkimuksessa LBS-agarkasvatusalustalla olevien lactobacilluspesäkkeiden päälle lisätään 10 ml 1-%:ista nestemäistä agarია, joka sisältää 0,5 M glyserolia ja L. plantarum -ympäpiä. Maljojen 24 tunnin anaerobisen inkuboinnin jälkeen 37 °C:ssa (Gas-Pack System) havaittiin kasvunestoalueita niiden pesäkkeiden ympärillä, jotka tuottavat glyserolista reuteriinia. Nämä pesäkkeet tunnistettiin L. reuteri -pesäkkeiksi ja niiden lukumäärä määritettiin.

Taulukossa 2 on esitetty kuoriutumisen aikana esiintyneiden lactobacillusten kokonaismäärä sekä L. reuterin prosenttiosuus niistä. Taulukon 2 sarakkeesta 1 voidaan nähdä, että kontrollikäsittelyiden (käsittelemättömät ja fosfaatilla käsitellyt) tuloksena saatiin poikasia, joiden umpisuolissa ei esiintynyt lainkaan L. reuteria vaikkakin niissä esiintyi muutamia muita lactobacilluksia. Kun käsittelyihin kuului erisuuruisia ympymääriä L. reuteria, voitiin tätä mikro-organismia havaita esiintyvän kaikissa umpisuolissa L. reuterin käsittäessä 33 % eristetyistä pesäkkeistä.

Taulukko 2

	Käsittely	Yhteensä	L. reuterin %-osuus
	Käsittelemät alkiot	$3,3 \times 10^2$	0
5	Fosfaatti-injektio (kontrolli)	$<5,0 \times 10^1$	0
	L. reuteri ilmalokeroon injektoituna (10^5 PMY)	$3,3 \times 10^5$	33
	L. reuteri ilmalokeroon injektoituna (10^7 PMY)	$1,2 \times 10^6$	33
10	L. reuteri ilmalokeroon injektoituna (10^8 PMY)	$4,7 \times 10^5$	33

Vaikka tämä keksintö on kuvattu käyttäen sen spesifiä sovellusmuotoja, on selvää, että siitä on mahdollista tehdä useita muunnoksia, modifikaatioita ja sovellutusmuotoja ja että sen mukaisesti kaikki tällaiset muunnokset, modifikaatiot ja sovellutusmuodot kuuluvat tämän keksinnön suojapiiriin ja ovat sen hengen mukaisia.

20 Keksinnön paras käyttötapa

Muniin ruiskutetaan puhtaita *Lactobacillus reuteri* -viljelmiä tekemällä munaan aseptisesti neulalla reikä ilmalokeron yläpuolelle. Tämän keksinnön avulla saadaan käyttöön yleinen keino *Lactobacillus* ja muiden DFM:ien viemiseksi aviäärinen lajien muniin siten, että nämä mikro-organismit ovat vakiinnuttaneet kasvunsa linnun ruuansulatusjärjestelmässä kuoriutumiseen mennessä.

Teollinen sovellettavuus

Tämän keksinnön avulla saadaan käyttöön in ovo -menetelmä tiettyjen hyödyllisten mikro-organismien, kuten puhtaan *Lactobacillus reuteri* -kannan, viemiseksi siipikarjaksi luettavien eläinten ruuansulatuskanavaan varhaisessa vaiheessa. Tämä johtaa siihen, että siipikarjan, kuten kanojen ja kalkkunoiden, suoja patogeenisiä mikro-organismeja vastaan paranee ja painonnousu lisääntyy.

Kirjallisuusviitteet

- 5 1. Axelsson, L. ja Lindgren, S.E. Characterization and DNA homology of *Lactobacillus reuteri* strains isolated from pig intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 62 (1987) 433 - 440.
2. Axelsson, L., Chung, T.C, Dobrogosz, W.J. ja Lindgren, S.E. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecol. Health Dis.* 2 (1989) 131 - 136.
- 10 3. Bechman, T.L., Chambers, J.V. ja Cunningham, M.D. Influence of *Lactobacillus acidophilus* on performance of young dairy calves. *J. Dairy Sci.* 60 (1977) 74 (tiiv.).
4. Bruce, B.B., Gilliland, S.E., Bush, L.J. ja Staley, T.E. Influence of feeding cells of *Lactobacillus acidophilus* on the fecal flora of young calves. *Oklahoma Anim. Sci. Res. Rep.* 207 (1979).
- 15 5. Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.e. ja Dobrogosz, W.J. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecol. Health Dis.* 2 (1989) 137 - 144.
- 20 6. Dellaglio, F., Arrizza, F.S. ja Leda, A. Classification of citrate fermenting lactobacilli isolated from lamb stomach, sheep milk and pecorino romano cheese. *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. C2* (1981) 349 - 356.
- 25 7. Dobrogosz, W.J., Casas, I.A., Pagano, G.A., Talarico T.L., Sjorberg, B.-M. ja Karlson, M. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. Teoksessa: *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora* (Toim: Grubb, R., Midtvedt, T. ja Norin, E.) Macmillan LTD, Lontoo, 1989. s. 283 - 292.
- 30 8. Ellinger, D.K., Muller, L.D. ja Gantz, P.J. Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora and selected blood parameters of young dairy calves. *J. Dairy Sci.* 61 (1978) 162 (tiiv.).
- 35

9. Food and Drug Administration Compliance Policy Guide No. 7126.41, 2.5.1988.
10. Fox, S.M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. Food-Animal Practice, Vet. Med. (1988) elokuun numero.
11. Fuller, R. Probiotics. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. (1986) 1S - 7S.
12. Goodenough, E.P. ja Kleyn, D.H. Influence of viable yoghurt microflora on the digestion of lactose by the rat. J. Dairy Sci. 59 (1976) 601 - 606.
13. Hatch, R.C., Thomas, R.O. ja Thayne, W.V. Effect of adding *Bacillus acidophilus* to milk fed to baby calves. Dairy Sci. 56 (1973) 682 (tiiv.).
14. Fandler, O., Stetter, Y. ja Kohl, R. *Lactobacillus reuteri* sp. nov. a new species of heterofermentative lactobacilli. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. C1 (1980) 264 - 269.
15. Kandler, O. ja Weiss, N. Regular nonsporing Gram-positive rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Toim.: Sneath DHA, Mair NC, Sharpe ME, Holt JH) osa 2 1208 - 1234 (1986) Williams and Wilkins, NY.
16. Metchnikoff, E. Prolongation of life. (1907) Heinemann, Lontoo.
17. Morrill, J.L., Dayton, A.D. ja Mickelson, R. Cultured milks and antibiotics for young calves. J. Dairy Sci. 60 (1977) 1105.
18. Muralidhara, K.S., Sheggeby, G.G., Elliker, P.R., England, D.C. ja Sandine, W.E. Effects of feeding lactobacilli on coliform and *Lactobacillus* flora of intestine tissue and feces from piglets. J. Food Protection 40 (1977) 288 - 295.
19. Orla-Jensen, S. The lactic acid bacteria. Det Kongelige Danske Videnskabsbernes Selskab. Biologiske Skrifter, Bind II, Nr. 3. (1943) Kööpenhamina.

20. Parker, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29 (1974) 4 - 8.

21. Parkhurst, C.R., Edens, F.W. ja Casas, I.A. Lactobacillus reuteri and whey reduce Salmonella colonization in turkey poults. International Poultry Trade Show, Southeastern Poultry and Egg Association, Atlanta, GA, Abs. Sci. Meet., 30.1. - 1.2. (1991).

22. Revue: Scientifique et Technique, Digestive Microflora and Bioregulation. International Office of Epizootics, F-75017, Pariisi, Ranska, osa 8, kesäkuu (1989).

23. Sarra, P.G., Magri, M., Bottazzi, V., Dellaglio, F. ja Bosi, E. Frequenza di bacilli heterofementanti nelle feci di vitelli lattanti. *Arch. Vet. Ital.* (1979) 30-16-21.

24. Sarra, P.G., Dellaglio, F. ja Bottazzi, V. Taxonomy of lactobacilli isolated from the alimentary tract of chickens. *System. Appl. Microbiol.* 6 (1965) 86 - 89.

25. Sarra, P.G., Vescovo, M. ja Fulgoni, M. Study on crop adhesion genetic determinant in Lactobacillus reuteri. *Microbiologica* 9 (1986) 279 - 285.

26. Sissons, J.W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals - a review. *J. Sci. Food Agric.* 46 (1989) 1 - 13.

27. Speck, M.L. Heated yoghurt - is it still yoghurt? *J. Food Protection.* 40 (1977) 863 - 865.

28. Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C. ja Dobrogosz, W.J. Production and isolation of reuterin: a growth inhibitor produced by Lactobacillus reuteri. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 32 (1988) 1854 - 1858.

29. Talarico, T.L. ja Dobrogosz, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, 33 (1989) 674 - 679.

30. Talarico, T.L. ja Dobrogosz, W.J. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1195 - 1197.
- 5 31. Talarico, T.l., Axelsson, L., Novotny, J., Fiuzat M. ja Dobrogosz, W.J. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3- propanediol:NAD oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 943 - 948.
- 10 32. Underdahl, N.R., Torres-Medina, A. ja Doster, A.R. Fffect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*- induced diarrhoea in gnotobiotic pigs. *Amer. J. Vet. Res.* 43 (1982) 2227 - 2232.
- 15 33. Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P.S. ja Bottazzi, V. Protoplast formation, regeneration, and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 23 (1984) 333 - 334.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä suorasyöttöisen mikro-organismin saattamiseksi asettumaan lintueliön ruuansulatuskanavaan, t u n n e t t u siitä, että Lactobacillus reuterin eläviä soluja injektoidaan lintueliön munaan ennen kuin lintu alkaa kuoriutua munasta painonnousun lisäämiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lintuorganismi on kana.

10 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lintuorganismi on kalkkuna.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kuhunkin munaan lisättävien mikro-organismien määrä on välillä $10^5 - 10^8$ PMY.

15 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Lactobacillus reuteri injektoidaan lintuorganismin munan ilmalokeroon.

Patentkrav

1. Förfarande för etablering av en direktmatad mikroorganism i matsmältningskanalen hos en fågelorganism,
5 k ä n n e t e c k n a t därav, att man injicerar levande celler av *Lactobacillus reuteri* i ett ägg av fågelorganismen före kläckningen av ägget, för att öka kroppsvikten.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
10 t e c k n a t därav, att fågelorganismen är en höna.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att fågelorganismen är en kalkon.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att antalet mikroorganismer, som
15 tillsätts i varje ägg, ligger mellan 10^5 och 10^8 CFU.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att *Lactobacillus reuteri* injiceras i luftrummet i ett ägg av fågelorganismen.