(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **152381 B**

(21) Patentansøgning nr.: **0060/81**

(22) Indleveringsdag: **08 jan 1981**

(41) Alm. tilgængelig: **12 jul 1981**

(44) Fremlagt: **22 feb 1988**

(86) International ansøgning nr.: **-**

(30) Prioritet: **11 jan 1980 FI 800077**

(51) Int.Cl.[4] **C 12 N 1/20**
A 61 K 35/74

(71) Ansøger: ***FARMOS-YHTYMAE OY; PL 425; 20101 Turku 10, FI**

(72) Opfinder: **Esko Viljo *Nurmi; FI, Carita Elisabeth *Schneitz; FI, Pirjo Helena *Maekelae; FI**

(74) Fuldmægtig: **Kontor for Industriel Eneret**

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et bakteriepræparat til forebyggelse af salmonellainfektioner hos fjerkræ

(56) Fremdragne publikationer

EP pat. nr. 6695
Andre publikationer. Avion Diseases, vol 22 (1978) s. 273-287

DK 152381 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i krav 1's indledning angivne art til fremstilling af et bakteriepræparat til forebyggelse af salmonellainfektioner hos fjerkræ.

Fjerkræ er den vigtigste kilde til salmonellainfektioner hos mennesket. I Canada er det beregnet at 77% af salmonellainfektioner hos mennesker stammer fra fjerkræ (B.J. Finn og B. Mehr, Proceedings of the International Symposium on Salmonella and Prospects for Control; Ontario, Canada 1977). I Finland synes det samme at være iagttaget i 1970erne. I 1971 bredte en omfattende salmonellaepidemi hos slagtekyllinger sig i Finland og Salmonella infantis var den mest almindelige salmonellatype. Epidemien gav avlerne og slagterierne meget store økonomiske tab. Mere end 100.000 fugle måtte destrueres som uegnede til menneskeføde og hundrede tusinder fugle måtte underkastes opvarmning før de kunne bringes på markedet, hvilket nedsatte deres salgsværdi. Tilsvarende har siden året 1971 tilfælde af salmonellainfektioner hos mennesket og fremkaldt af Salmonella infantis været næstmest almindelige. I 1972 fandtes ca. 500 mennesker at være blevet syge af tarminfektion fremkaldt af S. infantis. De inficerede slagtekyllinger bevirkede således et alvorligt nationalt sundhedsproblem og økonomisk problem.

I Sverige, hvor regeringen ligesom i Finland iværksætter lovbestemte forholdsregler for at bekæmpe salmonellainfektioner hos fjerkræet, betales der over 10 millioner sKr. om året som kompensation til avlerne for de destruerede høns. I Canada har man for nylig erkendt den meget store nationale sundhedsrisiko der bevirkes af salmonellainfektioner hos fjerkræ. De tab der bevirkes af infektioner hos mennesker og dyr er blevet anslået til ca. 30 millioner dollars om året. I USA anslås sådanne tab til at være over 300 millioner dollars om året.

Traditionelle fremgangsmåder der bruges til at forhindre salmonellainfektioner er overvågning af dyrenes foder ved bakteriologiske prøver, overvågning af hygiejnen i fjerkræfarmene og fjerkræslagterierne samt bakteriologisk undersøgelse af

de fjerkræfodere der kommer i handelen. Med disse metoder kan salmonellasituationen hos de fleste husdyr holdes under rimelig kontrol.

Fjerkræ og navnlig det masseavlede produkt slagtekyllinger danner en undtagelse i så henseende. Ved en undersøgelse udført for det statslige Veterinærmedicinske Institut i Finland blev det bekræftet at en sandsynlig grund til slagtekyllingernes store følsomhed for kolonisation (vækst og invasion) af Salmonella-bakterier i tarmene var den forsinkede udvikling af den normale tarmflora. Denne forsinkelse skyldes de moderne masseopdrætsmetoder af dyr (E. Nurmi og M. Rantala, Nature 241, 210-211, 1973).

Denne undersøgelse gav anledning til at udforske nye muligheder for at forhindre salmonellainfektioner hos unge kyllinger. Det viste sig at en kultur af bakterieceller beriget fra en voksen hønes tarme forhindrede fæstnelse eller invasion og vækst af Salmonella-bakterier i tarmene, når den blev givet til en til to dage gamle kyllinger. Denne fremgangsmåde har været meget effektiv ved laboratorieforsøg i lille målestok og har også vist sig lovende ved forsøg i stor målestok. En ulempe og en hindring for udbredt anvendelse af denne metode i forskellige lande har vist sig at være den kendsgerning at produktets sammensætning er ukendt og ikke kan standardiseres så at produktet ville kunne opbevares uden ændringer i sammensætning og virkning. Da udgangsmaterialet altid er tarmindholdet fra en voksen fugl, kan præparaterne indeholde patogene vira, bakterier eller parasitter som kan være skadelige og farlige for kyllingernes helbred.

Europæisk patentansøgning nr. EPA 6695 beskriver et bakteriepræparat til profylaxe af salmonellainfektioner hos fjerkræ. Denne patentansøgning er i det væsentlige baseret på ovennævnte undersøgelse. De eneste forskelle er at patogene bakterier er blevet fjernet fra bakteriecellekulturen, der stammer fra tarmene af en voksen høne, og at bakteriekulturen er slutbehandlet til dannelse af et præparat, fx ved frysetørring.

Svensk patentskrift nr. 371 209 beskriver en fremgangsmåde til fremstilling af et bakteriepræparat indeholdende Streptococcus faecium, egnet til profylakse af tarminfektioner hos svin og kalve.

Britisk patentskrift nr. 1 208 599 beskriver en fremgangsmåde til selektiv dyrkning af lactobacterier, ved hvilken bakterierne, der ved en udførelsesform for opfindelsen kan være af tarmoprindelse, dyrkes på et næringsmedium indeholdende tarm-slimhinder.

Britisk patentskrift nr. 1.167.196 beskriver fremstilling af et bakteriepræparat af Lactobacillus, egnet til inhibering af tarminfektioner, og i dette præparat kan udgangsmaterialet være af tarm-oprindelse. Patogene bakterier fjernes ved at man holder tarmbakterieblandingen i en sur opløsning i hvilken de patogene bakterier dør. De overlevende Lactobacillusbakterier isoleres, dyrkes og gives oralt til pattedyr, hvorefter trinnene med isolering og dyrkning af bakterierne gentages. På denne måde forøges aktiviteten af de slutteligt isolerede mælkesyrebakterier.

USA-patentskrift nr. 3 952 609 beskriver en fremgangsmåde til at give pattedyr oralt en stamme af Lactobacillus lactis for at inhibere tarminfektioner.

Disse patentskrifter beskriver imidlertid ikke noget præparat som kan bruges til profylakse af tarminfektioner hos fjerkræ. De beskrevne præparater har ikke opnået nogen bredere anvendelse fordi de har vist sig ineffektive mod infektioner i fjerkræ.

Noget bedre resultater er opnået med præparaterne hos svin og kalve. Den største ulempe ved de markedsførte præparater er at bakterierne i præparaterne ikke har bevaret deres evne til at hænge fast i tarmslimhinderne.

Antibiotika og kemoterapeutika har også været anvendt til at forhindre eller eliminere salmonellainfektioner. Det har imidlertid været nødvendigt at opgive denne måde fordi behandling med disse stoffer ikke kan gennemføres gennem avlingsperioden indtil slagtetiden uden at efterlade rester i kød og æg. Fødevarer til brug for mennesker må ikke inde-

holde spor af sådanne substanser. På den anden side er afbrudt behandling med antibiotika og kemoterapeutika ødelæggende fordi stofferne ødelægger den normale tarmflora. Som følge heraf vil dyrene være mere følsomme for infektioner efter at behandlingen er afsluttet.

Det er opfindelsens formål at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af et bakteriepræparat som er i stand til effektivt at forebygge salmonellainfektioner og andre tarmsygdomme hos fjerkræ på økonomisk fordelagtig måde.

Overvågning af dyrefoderet og de hygiejniske betingelser ved bakterieprøvetagning som beskrevet foran, obligatorisk opvarmning af foder og foderstoffer og ødelæggelse af inficerede produkter er ganske effektive metoder til profylakse af salmonellainfektioner hos mennesket. Disse metoder er imidlertid så kostbare at det er næsten umuligt at gennemføre dem effektivt i noget land. I Canada var de anslåede omkostninger ved effektiv overvågning og inhibering af Salmonella 300 millioner dollars i 1977. De opnåede fordele blev anslået til 23 millioner dollars.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er økonomisk meget fordelagtig. Forsøg har vist at salmonellainfektioner effektivt kan inhiberes hos fjerkræ på denne måde. Fremgangsmåden lider ikke af de ulemper og ricici for sundheden, som de tidligere eksperimentelt anvendte og med hensyn til sammensætning udefinerede bakteriepræparater led af. Præparatet er fremstillet af rene kulturer og kan derfor standardiseres.

Det har vist sig at det for at opnå et effektivt præparat er afgørende at dyrke udvalgte bakteriestammer som har god evne til at hænge fast ved epitelcellerne i fordøjelseskanalen. Dette resulterer i et præparat som hovedsagelig består af bakterier med god evne til at hænge fast ved epitelcellerne i fordøjelseskanalen. Evnen til vedhæftning er afgørende, ellers vil præparatet ikke virke.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

De bakteriestammer som skal dyrkes udvælges blandt bakteriearter der normalt forekommer i fjerkræs fordøjelseskanal. Bakteriestammerne inkuberes anaerobt og særskilt eller sammen ved velkendte metoder, eventuelt sammen med epitelceller fra fordøjelseskanalen, fx fra en kyllings kro. Efter dyrkningen isoleres bakterierne fra næringsmediet og oparbejdes til et præparat, fx ved frysetørring.

Det er væsentligt at der til dyrkning i hovedsagen kun vælges bakteriestammer med verificeret god evne til at hæfte sig til epitelceller fra fordøjelseskanalen af den art, til hvilken præparatet skal bruges. En prøve på vedhæftningen udføres ved en eller anden kendt metode, fx ved Fuller's adhæsionsprøve (R. Fuller, J. Appl. Bact. 36, 1973, 131-139). Når Fuller-testen bruges til dyrkningen udvælges der fortrinsvis kun sådanne bakteriestammer, der har en vedhæftningseffektivitet på mindst 10 bakterier pr. epitelcelle.

Særligt gode resultater opnås når to eller flere bakteriestammer dyrkes sammen.

Isolering af egnede bakteriestammer kan udføres på følgende måde: Indholdet af fordøjelseskanalen fra en voksen høne fjernes mekanisk. Derefter fjernes løse og svagt vedhæftende bakterier, fx ved vask med fosfatpufret fysiologisk kogsaltopløsning.

Den vaskede fordøjelseskanal eller del af den, fortrinsvis kroen eller coecum med de vedhæftede bakterier tilbage, hakkes fint, fortyndes i passende grad og dyrkes. Podningen udføres fortrinsvis på overfladen af pladen på et særligt dyrkningsmedium som er selektivt for Lactobacillus og Clostridium. Derefter kontrolleres bakteriernes evne til at hæfte sig til epitelcellerne ved en eller anden kendt prøvemetode. Bakteriestammer med god vedhæftningsevne udvælges til dyrkning af det sluttelige præparat.

For at forøge og bevare bakteriestammernes gode vedhæftningsevne kan man give dem til kyllinger og på ny isolere

dem fra fordøjelseskanalen ved en eller flere gange at gentage de foran beskrevne arbejdstrin.

Den gode vedhæftningsevne kan også præserveres ved at man inkuberer bakteriestammerne sammen med sterile epitelceller fra fordøjelseskanalen, fortrinsvis kyllingekroer.

Fremgangsmåden til fremstilling af produktet og anvendelse af dette produkt til at forebygge salmonellainfektioner hos slagtekyllinger beskrives i de efterfølgende eksempler. Omend forsøgene kun beskriver de iagttagne virkninger hos slagtekyllinger, er anvendelse af det ved fremgangsmåden fremstillede præparat selvsagt ikke begrænset til disse fugle. Opfindelsen kan generelt udnyttes i fjerkræindustrien.

Eksempel 1

Fremstilling af bakteriepræparatet

Isolering af bakterierne

Kroen og/eller coecum af en voksen høne fjernes, åbnes aseptisk og rengøres mekanisk. Derefter vaskes kroen og/eller coecum fire gange med 100 ml sterilt fosfatpufret fysiologisk kogsaltopløsning med følgende sammensætning (R. Fuller og A. Turvey, 1971: Bacteria associated with intestinal wall of the fowl (Gallus domesticus), J. Appl. Bact. 34, side 617-622):

NaCl	8,0 g
K_2HPO_4	1,21 g
KH_2PO_4	0,34 g
destilleret vand	1000 ml

Vasken fjerner løse og svagt vedhæftende bakterier. Derefter finhakkes kroen og/eller coecum med deres vedhæftede bakterier og suspenderes i en saltopløsning med samme sammensætning som ovenfor og under udnyttelse af konventionelle mikrobiologiske homogeniseringsprocesser. Af homogenisatet fremstilles fortyndinger som oparbejdes til en fortyndingsopløsning der er en modifikation af den fortyndingsopløs-

ning som er beskrevet af L.W. Holdeman og W.E.C. Moore (red.) 1977, Anaerobic Laboratory Manual 4. udgave, Virginia Polytechnical Institute and State University Anaerobic Laboratory, Blacksburg. Fortyndingsopløsningen har følgende sammensætning:

gelatine	2,0 g
K_2HPO_4	4,105 g
KH_2PO_4	1,636 g
destilleret vand	1000 ml

Derefter udføres der spredning på et selektivt medium for Lactobacillus (W.L. Sutter, W.L. Vargo og S.N. Finegold (red.), Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 1975, Los Angeles, 2. udgave). Næringsmediets sammensætning er

LBS-agar (BBL)	8,40 g
tomatsaft	40,00 ml
destilleret vand	60,00 ml
iseddikesyre	0,13 ml

Inkubering i dette medium udføres anaerobt i 5 dage ved +35°C. Ved inkuberingens slutning isoleres bakteriestammerne, der nu har sandsynlighed for god evne til at vedhæfte godt til en kyllings epitelceller. Udvælgelsen udføres visuelt under hensyn til koloniernes form. Vedhæftningsevnen bestemmes derefter ved fx Fuller's prøve (R. Fuller, J. Appl. Bact. 36, 1973, 131-139). De isolerede stammer dyrkes fx i et MRS-medium, opdeles til små prøver og dybfryses. MRS-mediets sammensætning er som følger (de Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid Ltd., Hampshire, kode CM 359):

Bakteriologisk pepton ("Oxoid" ® L 34)	10,0 g/l
"Lab Lemco" ® mel ("Oxoid" ® L29)	8,0 g/l
gærekstrakt ("Oxoid" ® L21)	4,0 g/l
dextrose	20,0 g/l
"Tween" ® 20	1,0 mg/l
K_2HPO_4	2,0 g/l
natriumacetat, $3H_2O$	5,0 g/l
triammoniumcitrat	2,0 g/l
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,2 g/l
$MnSO_4$, $4H_2O$	0,05 g/l
pH 6,2	

Fullerprøven udføres som følger:

a) Fremstilling af epitelcellesuspensionen

Ved prøven bruges der epithelieceller fra kroen af 1-2 uger gamle kyllinger. Kyllingerne faster i 2 dage før de dræbes for delvis at fjerne bakterier fra kroen. Kroen udtages og åbnes så aseptisk som muligt. Derefter vaskes den med 2 gange 100 ml pufret saltopløsning. Epitelcellerne fra den vaskede kro afskrabes med et sterilt mikroskop-dækglas og udskrabet suspenderes i 10 ml pufret saltopløsning. Cellesuspensionens cellekoncentration reguleres til $3,5 \times 10^5/0,4$ ml.

b) Fremstilling af bakteriesuspensionen

De rene kulturer dyrkes anaerobt i 2 dage ved $+35^{\circ}C$. 10 ml af den dyrkede bakteriesuspension centrifugeres (10 min/ 2600 omdr.). Efter centrifugeringen udtages opløsningen og bakterierne suspenderes i 10 ml pufret saltopløsning. Bakteriesuspensionens cellekoncentration reguleres til ca. $1,5 \times 10^7$/ 0,1 ml.

c) Test for epitelcellernes vedhæftning til kroen

Til 0,4 ml af epitheliecellesuspensionen sættes der 0,1 ml af bakteriesuspensionen. Den forenede suspension indeholdende epithelieceller og bakterier inkuberes i 30 minutter ved $+35^{\circ}C$ i en celleblander hvis rotationshastighed er 20 omdr. pr. minut. Ved prøven blev der brugt en "Heto"-blander ("Fasemotortype RD 12 x R", Birkefod, Danmark).

Efter inkuberingen fremstilles der et normalt gramfarvningspræparat for at bestemme vedhæftningen. Ved gramfarvningen var epitelcellerne negative, de bliver med andre ord røde, mens bakteriecellerne farves positivt og bliver mørkeblå. Adhæsionen kan også bestemmes direkte uden farvning ved hjælp af fasekontrastmikroskopi.

De udvalgte stammer tilhører typisk Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus lactis og forskellige arter af Clostridium. Stammerne kan identificeres ved API-50 testen for Lactobacillus (API system, La

Balme-Les Grottes, Frankrig). Identifikationen behøver naturligvis ikke at blive udført ved biokemiske metoder. Afgørende for udnyttelse af opfindelsen er det blot at de valgte stammer har god vedhængningsstabilitet. En erfaren mikrobiolog kan identificere stammer med god adhæsionstabilitet ved at støtte sig på deres kolonimorfologi.

Fremstiling af den sluttelige kultur

De dybfrosne stammer optøes og et rigt inoculum deraf overføres til 10 ml MRS-medium eller VL-medium (E.M. Barnes og C.S. Impey, Br. Poult. Sci. 11, 1979, 467-481).

VL-suppen har følgende sammensætning:

Tryptikase pepton (BBL 11921)	10,0 g/l
gærekstrakt ("Oxoid" ® L21)	5,0 g/l
kødekstrakt ("Oxoid" ® "Lab Lemco" ® L30)	3,0 g/l
agar	0,6 g/l
NaCl	5,0 g/l
cystein-hydroklorid	0,4 g/l
glukose	2,5 g/l
pH 7,2-7,4	

Ved dette aktiveringstrin inkuberes stammerne særskilt natten over anaerobt ved +35°C. Efter inkuberingen dannes der en blandet kultur ved podning af nogle få dråber af hver af de rene kulturer i næringsmediet. Efter inkuberingen, der udføres anaerobt i 2 dage, isoleres bakteriecellerne fra kulturmediet og oparbejdes til det sluttelige præparat, fx ved frysetørring.

Bakteriepræparatet kan også fremstilles af ikke-aktiverede, frisk optøede stammer. I dette tilfælde optøs de dybfrosne stammer, hvorefter blandingssuspensionen fremstilles direkte og inkuberes som beskrevet foran.

Terapeutiske forsøg

Kyllingeforsøg nr. 1

Præparatet fremstilledes ved den ovenfor beskrevne måde ved inkubering af 8 forskellige stammer af Lactobacillus,

isoleret fra kroen af 4 kyllinger og fra coecum af 4 kyllinger. En af stammerne var Lactobacillus fermentum, en Lactobacillus lactis og seks Lactobacillus acidophilus. Vedhæftningseffektiviteten af alle stammerne var over 10 bakterier pr. epitelcelle. De rene kulturer blev først inkuberet særskilt i MRS-medium ved + 35°C i en dag før fremstilling af den blandede kultur som beskrevet ovenfor. 1 ml af bakteriesuspensionen blev administreret til kyllingernes kro. Kyllingerne var 1 dag gamle.

Efter 24 timer blev kyllingerne inficeret med Salmonella infantis ved administration i kroen af ca. 1000 levende celler fra en 24 timer gammel kultur i et medium. Efter en uge blev kyllingerne kvalt med CO_2, indholdet og væggene af coecum og en del af tyndtarmen blev inkuberet i salmonella-berigelsesmedium natten over ved +35°C, tre løkkefulde af kulturen blev udstrøget på et medium der er selektivt for enterobakterier. Efter 24 timers inkubering blev salmonella-kolonier identificeret ved konventionelle metoder.

Der var to grupper kyllinger: behandlingsgruppen (behandlet med den blandede kultur) og salmonella-kontrolgruppen (ubehandlet), hver af dem bestående af 6 kyllinger. Resultat: I behandlingsgruppen var ingen af kyllingerne blevet inficeret medens der blev opsamlet salmonellaer fra alle kyllingerne i kontrolgruppen.

Kyllingeforsøg nr. 2

Præparatet og forsøget udførtes i overensstemmelse med foregående forsøg, dog med den forskel at de 6 bedst vedhæftende stammer udvalgtes blandt de 8 stammer som brugtes i forsøg nr. 1, 4 stammer isoleredes fra kroen og 2 stammer fra coecum. Disse 6 Lactobacillus-stammer blev anvendt i dette forsøg. Den mindste adhæsionseffektivitet var 20-30 bakterier pr. epitheliecelle.

Resultat: I behandlingsgruppen var ingen af kyllingerne inficeret, medens der konstateredes salmonellaer i 5 af de 6 kyllinger i kontrolgruppen.

Kyllingeforsøg nr. 3

Præparatet var og forsøget udførtes ligesom forsøg nr. 1 og 2, bortset fra at de to dårligst vedhæftende stammer blandt de seks stammer, der anvendtes i forsøg nr. 2, blev kasseret. De fire tilbageværende stammer, hvoraf de to var isoleret fra kroen og to fra coecum, dyrkedes. Den mindste adhæsionseffektivitet var 40-50 bakterier pr. epitheliecelle. Resultat: I behandlingsgruppen var ingen af kyllingerne inficeret medens der fandtes salmonellaer i hos alle kyllingerne i kontrolgruppen.

Kyllingeforsøg nr. 4

Præparatet var og forsøget udførtes ligesom forsøg nr. 3, dog med den forskel at de rene kulturer ikke blev aktiveret. Særskilt dyrkning af de rene kulturer i 2 dage ved +35°C og kombinering lige før de blev indgivet i kyllingerne blev også afprøvet. Desuden undersøgtes den stimulerende effekt af en pasteuriseret, finhakket kro på præparatets beskyttelseskapacitet. Den hakkede kro var udtaget fra en seks dage gammel kylling som havde fastet i to dage før den blev dræbt. Før kroen blev hakket blev den vasket 5 gange med 100 ml pufret natriumkloridopløsning.

Grupper:

Gruppe I: De rene kulturer dyrkedes særskilt 2 dage ved +35°C sammen med pasteuriseret, hakket kro.

Gruppe II: De rene kulturer dyrkedes sammen i 2 dage ved +35°C sammen med pasteuriseret, hakket kro.

Gruppe III: Som gruppe I, bortset fra at der anvendtes upasteuriseret, hakket kro.

Gruppe IV: Som gruppe II, bortset fra at der anvendtes upasteuriseret, hakket kro.

Gruppe V: De rene kulturer dyrkedes særskilt i 2 dage ved +35°C og kombineredes netop før de blev givet til kyllingerne. Dyrkningen udføres uden hakket kro.

Gruppe VI: Som gruppe V, dog med den forskel at alle stammerne dyrkedes sammen helt fra begyndelsen.

Gruppe VII: Salmonella kontrolgruppe.

Resultater:

Kyllinger	Grupper						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	+	-	-	-	+	-	+
2	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	+	-	+
4	+	-	-	-	+	-	+
5	+	-	-	-	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+

I foranstående tabel betyder tegnet + at kyllingen var blevet inficeret med Salmonella, medens tegnet - viser at der ikke kunne isoleres nogen Salmonella fra kyllingen.

Inhiberingsvirkning konstateres i de grupper (II, IV og VI), hvor de vedhæftende bakteriestammer dyrkedes sammen. De gode resultater af gruppe III skyldes antagelig effektivitetsforbedrende bakterier som var til stede i den hakkede kro.

Kyllingeforsøg nr. 5

Præparatet fremstilledes ved at man særskilt dyrkede stammer af Clostridium og stammer af Lactobacillus, isoleret fra coecum af en voksen høne, i 2 dage ved +35°C i deres egne næringsmedier. Stammerne kombineredes lige før de blev indgivet i kyllingerne. Forsøget gennemførtes som beskrevet foran. Resultat: I behandlingsgruppen konstateredes der salmonellaer i 2 af 6 kyllinger, medens alle kyllingerne i kontrolgruppen var inficeret med salmonella.

Foruden inhibering af salmonella konstateredes der forbedring af helbredet og hurtigere vækst af de kyllinger som var behandlet med bakteriepræparatet.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et bakteriepræparat til forebyggelse af salmonellainfektioner hos fjerkræ, ved hvilken fremgangsmåde bakteriestammer af naturligt i fordøjelseskanalen hos fuldvoksne fjerkræindivider forekommende bakteriearter fortrinsvis stammer hørende til slægten Lactobacillus og eventuelt Clostridium, dyrkes enten særskilt eller sammen på i og for sig kendt måde under anaerobe betingelser i et næringsmedium hvortil der eventuelt er sat overfladeepitelceller fra fjerkræets fordøjelseskanal, fortrinsvis kroen, hvorefter de dyrkede bakterier isoleres fra næringsopløsningen og oparbejdes til et præparat, fx ved frysetørring, k e n d e t e g n e t ved at der til dyrkning af præparatet i hovedsagen kun bruges bakteriestammer hvis vedhæftningsevne til overfladeepitelceller fra fjerkræets fordøjelseskanal er mindst 10 bakterier pr. epitelcelle.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at der til dyrkningen bruges mindst 2 og fortrinsvis 4 til 8 forskellige stammer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved at de til dyrkningen valgte stammer hører til slægten Lactobacillus.