



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 497**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03026432 .9**

96 Fecha de presentación : **19.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1533369**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54

Título: **Fagos aislados y su utilización como desinfectante en alimentos y para la higienización de un entorno de fabricación.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.08.2011

73

Titular/es: **NESTEC S.A.**
avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72

Inventor/es: **Breeuwer, Pieter;**
Boissin-Delaporte, Catherine;
Joosten, Henricus y
Lardeau, Annick

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 363 497 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fagos aislados y su utilización como desinfectante en alimentos y para la higienización de un entorno de fabricación

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a fagos aislados que tienen una fuerte actividad lítica contra cepas de *Enterobacter sakazakii* y su utilización como agente antimicrobiano en productos alimenticios, en particular en formulaciones para niños y para la higienización de entornos de fabricación.

10

Antecedentes de la invención

Las enterobacterias representan una parte predominante de la "flora de recontaminación" de los productos de la leche realizados a base de leche pasteurizada. Su presencia indica frecuentemente una higienización inadecuada y/o construcción defectuosa de los equipos de proceso. Los miembros del género *Enterobacter* se encuentran frecuentemente en productos en seco, tales como leche en polvo.

15

Entre las enterobacterias, las *E. sakazakii* pueden provocar serias infecciones, especialmente entre individuos muy jóvenes. Han sido implicadas en una forma rara pero grave de meningitis neonatal entre neonatos y niños, habiéndose implicado como modo de transmisión formulaciones en seco para niños.

20

La fabricación aséptica de formulaciones en seco para niños no es factible porque los costes de fabricación serían demasiado elevados. Por lo tanto, los fabricantes se basan en la utilización de desinfectantes y zonas de trabajo higiénicas específicas durante el proceso para conseguir productos seguros. No obstante, cantidades reducidas de bacterias pueden crecer hasta un número considerable cuando una formulación reconstituída para niños no es consumida rápidamente y mantenida a temperatura ambiente. Éste puede hacer el producto potencialmente peligroso para el niño que lo consume.

25

En vista de las deficiencias de la técnica anterior, el problema de la presente invención consiste en dar a conocer un alimento, en particular productos basados en la leche, tales como formulaciones para niños, que pueden ser seguras incluso después de almacenamiento en condiciones que favorecen el crecimiento de *E. sakazakii*. Asimismo, la invención está destinada a desarrollar un agente seguro que pueda ser utilizado para la decontaminación de *E. sakazakii* en cualquier producto alimenticio y para la higienización de entornos de fabricación.

30

El problema ha sido solucionado al dar a conocer preparaciones bacteriófagas y que a diferencia de los bacteriófagos conocidos en la técnica anterior (Grimon F. y otros, Current Microbiology, vol. 6, no.2, 1981, páginas 65-69 y Current Microbiology vol. 5, no.2, 1981, páginas 61-66), tienen un potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii* y que son seguras y no tóxicas.

35

40 Resumen de la invención

Es un objetivo de la presente invención desarrollar aislados de fagos nuevos y útiles con un potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii* y que pueden ser utilizado solos o en mezcla ("cocktail") para impedir o tratar productos alimenticios y entornos de producción de las contaminaciones producidas por *E. sakazakii*, en particular en formulaciones para niños.

45

Por lo tanto, es otro objetivo de la presente invención dar a conocer un producto alimenticio que contiene aislados de fagos seleccionados para la lisis de *E. sakazakii*, en particular una formulación basada en la leche, una composición nutritiva, un producto alimenticio para animales domésticos, un suplemento de dieta o para cualquier tipo de alimento con riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.

50

Otro objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un agente para la decontaminación de productos alimenticios y para la higienización de un entorno de producción, que comprende una cantidad efectiva de, como mínimo, un aislado de fago o cóctel, tal como se ha descrito anteriormente.

55

En otra realización, la presente invención se refiere a la utilización de, como mínimo, un aislado de fago o cóctel, tal como se ha descrito anteriormente, para la decontaminación de productos alimenticios y la higienización de un entorno de producción o en la preparación de una composición destinada a prevenir o tratar infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales.

60

Además, se describe un método de decontaminación de productos alimenticios o para la higienización de un entorno de fabricación que comprende la utilización de, como mínimo, un preparado bacteriófago con potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii* tal como se ha descrito en lo anterior.

65 También se describe un método para seleccionar un aislado de fago con potencial lítico sustancial contra *E.*

sakazakii, tal como se ha descrito en lo anterior.

Una ventaja principal de la presente invención es que da a conocer un decontaminante que tiene una elevada especificidad para *E. sakazakii*. Puede impedir la contaminación y crecimiento de *E. sakazakii* en cualquier producto alimenticio, siendo especialmente útil para productos basados en la leche, tales como formulaciones para niños. También puede ser eficaz para el tratamiento o prevención de infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales.

Otra ventaja de la presente invención es que proporciona un agente que ayuda a desinfectar, limpiar y decontaminar superficies de trabajo o equipo de proceso en fábricas, así como pisos, paredes y similares.

Otra ventaja de la presente invención es que da a conocer un agente que es ambientalmente seguro y no tóxico para humanos.

Descripción detallada de la invención

Dentro de la siguiente descripción, el término "FSM-fago" designa la colección de bacteriófagos de Microbiología para la Seguridad de Alimentos (Centro de Investigación Nestlé, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Suiza).

Un agente para decontaminación de alimentos y para higienización de un entorno de fabricación comprende, como mínimo, un aislado de fago con potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii*.

Los fagos, de acuerdo con la siguiente invención, pueden ser obtenidos por cribado de bacteriófagos candidato para los que infectan cepas de *E. sakazakii* utilizando la prueba de ensayo local ("spot assay") (Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, y N.R. Krieg. Conceptos de Microbiología y aplicaciones, Capítulo 16 Virus: métodos de cultivo, patogenicidad p. 436-452, McGraw-Hill, Inc. Nueva York 1993) o en un cultivo líquido (H.W. Ackermann y M.S. DuBow. Viruses of Prokaryotes (Virus de procariotes) Volumen 1. Capítulo 6. Description and identification of new phages (Descripción e identificación de nuevos fagos) p. 103-142. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, USA). El método para seleccionar los bacteriófagos se indica en detalle en el ejemplo 1, preferentemente se seleccionaron los aislados de fagos con capacidad de infectar:

i) como mínimo, 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* procedentes del grupo que consiste en FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266. FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, sobre un medio sólido y,

ii) como mínimo, 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* del grupo que consiste en FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266, FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL, FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en medio líquido.

Los aislados de fagos pueden ser Fago FSM 67/33/1, Fago FSM F, Fago FSM 9/261, Fago FSM F/316 y Fago FSM 73/311/2, Fago FSM 73/261, Fago FSM 33/33/1, Fago FSM 28/145/2 y Fago FSM 10/261/1.

En una realización preferente, los aislados de fagos son Fago FSM 10/261/1, Fago FSM 73/261, Fago FSM 33/33/1, Fago FSM 67/33/1, Fago FSM F/316, Fago FSM 9/261 y Fago FSM 73/311/2 junto con sus correspondientes cepas de propagación y han sido depositados a título de ejemplo en el Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris CEDEX 15, FRANCIA, el 14/11/2003, con el número de depósito CNCM 1-3127, CNCM 1-3128, CNCM 1-3129, CNCM 1-3130, CNCM 1-3131, CNCM 1-3132 y CNCM 1-3133, respectivamente.

De manera ventajosa, los fagos depositados con capaces de lisar, como mínimo 80% de *E. sakazakii* de la colección del Centro de Investigación Nestlé compuesto por 39 cepas. Esta colección es representativa para el *E. sakazakii* que puede ser encontrado en productos alimenticios, en particular formulaciones para niños. Con el material de fago, de acuerdo con la invención, se puede obtener una cobertura aproximada de 97% utilizando un cóctel de fagos de, como mínimo, dos fagos. Preferentemente, los fagos no son capaces de reconocer bacterias no relacionadas tales como bacterias de ácido láctico gram-negativas.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de, como mínimo, un aislado de fago, según la invención, en cualquier producto alimenticio o suplemento nutritivo para prevenir la contaminación y el crecimiento de *E. sakazakii*. Los ejemplos para alimentos o productos farmacéuticos son leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados basados en la leche, helados, productos basados en cereales fermentados, materiales en polvo basados en la leche, formulaciones o tabletas para niños, suspensiones líquidas,

suplementos orales en seco, suplementos orales en húmedo, alimentación en seco por tubo. Los métodos para su preparación son habitualmente conocidos.

5 La composición, según la invención, puede comprender también excipientes habituales, en particular, edulcorantes, agentes de sabor o conservantes. Puede comprender además un microorganismo prebiótico y/o probiótico. Las composiciones de la invención pueden ser formuladas de acuerdo con cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en este sector.

10 En otra realización se prepara una composición alimenticia que contiene, como mínimo, un aislado de fago, de acuerdo con la presente invención. Esta composición puede ser una formulación nutricional completa, una formulación para niños, un producto de la leche, una bebida enfriada o estable en almacenamiento, agua, sopa, suplemento de dieta, sustitutivo de comida, barrita nutritiva o un artículo de pastelería. En una realización preferente se pueden añadir fagos a una formulación en polvo en estado seco para niños.

15 En otra realización, un producto alimenticio habitual puede ser enriquecido, como mínimo, con un aislado de fago, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, una leche fermentada, un yogur, queso fresco, leche cuajada, artículo de pastelería, por ejemplo un dulce o bebida edulcorada, barrita de pastelería, copos o barritas de cereal para desayuno, bebidas, leches en polvo, productos basados en soja, productos fermentados no de la leche o suplementos nutritivos para nutrición clínica.

20 Una vez que un aislado de fago, según la presente invención, ha sido seleccionado, dicho aislado de fago puede ser incluido solo o en un cóctel de fagos en un producto tal como se ha indicado anteriormente en una cantidad mínima aproximada de 10^4 pfu (unidad formadora de placas)/ml o gramo (dependiendo de si los fagos son añadidos en estado seco o líquido) y más preferentemente de 10^6 hasta aproximadamente 10^{11} pfu/ml o gramo. El aislado de fago puede ser preparado por secado por pulverización, liofilización o en un contenedor de muestra de líquido utilizando el producto como material de soporte, por ejemplo, leche en polvo para una formulación para niños. También se puede utilizar como suplemento a mezclar con el producto antes de servir, como base adicional (por ejemplo, bolsita).

30 Asimismo, la aplicación de fagos, según la invención, o la pulverización o aplicación de fagos de otro modo en un entorno de fabricación, se lleva a cabo con el objetivo de inhibir el crecimiento de las bacterias objetivo. Estas composiciones pueden ser preparadas por métodos convencionales. Para esta solicitud, la cantidad de fagos es preferentemente de, como mínimo, 10^6 pfu aproximadamente (unidad formadora de placas)/ml o gramo y más preferentemente desde 10^6 aproximadamente hasta 10^{11} pfu/ml o gramo, aproximadamente.

35 Los siguientes ejemplos se facilitan solamente a título ilustrativo y no deben ser considerados de modo alguno como limitativos de la materia objetivo de la presente solicitud. Los ejemplos están precedidos por una breve descripción de las figuras.

40 La figura 1 es un gráfico que muestra el crecimiento de la mezcla de cepas de *E. sakazakii* (FSMCC # 145, 286, 290, 305, 1987/2NL) en caldo BHI inoculado con 10^8 pfu/ml de cóctel de fagos (FSMCC-fago # 67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (●) o sin cóctel de fagos (▲).

45 La figura 2 es un diagrama que muestra el crecimiento de la mezcla de cepas de *E. sakazakii* (FSMCC # 145, 286, 290, 305, 1987/2NL) en formulaciones reconstituidas para niños inoculadas en 10^8 pfu/ml de cóctel de fagos (FSMCC-fago # 67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (●) o sin cóctel de fagos (▲).

50 La figura 3 es un diagrama que muestra el crecimiento de la mezcla de cepas de *E. sakazakii* (FSMCC # 145, 286, 290, 305, 1987/2NL) sobre la superficie de discos de acero inoxidable tratados con 10^8 pfu/ml de fago en el cóctel de fagos (FSMCC-fago # 67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (●) o sin cóctel de fagos (▲).

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de fagos según la invención

55 Una colección de 114 aislados de fagos procedentes de la colección de bacteriófagos de Nestlé Food Safety Microbiology fueron comprobados contra 39 cepas de *E. sakazakii* procedentes de la colección de cultivos Food Safety Microbiology (FSMCC). Las cepas están indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.

	Origen	FSMCC n°		Origen	FSMCC n°
1	entorno fabricación	9/145/1	58	Saneamiento (fangos primarios)	64/33/2
2	“	9/145/2	59	“	64/311
3	“	9/145/3	60	Saneamiento (eliminación por canal en el lago)	66/311/1
4	“	9/145/4	61	“	66/311/2
5	“	9/145/5	62	“	67/33/1
6	“	9/261	63	“	67/33/2
7	“	9/261/2	64	“	67/300/1
8	“	10/145/1	65	“	67/300/2
9	“	10/145/2	66	“	67/311/1
10	“	10/145/3	67	“	67/311/2
11	“	10/145/4	68	Saneamiento (llegada de las aguas antes de filtración sobre arena)	61/MC9/1
12	“	10/261/1	69	“	61/MC9/2
13	“	10/261/2	70	“	61/MC9/3
14	“	10/261/3	71	Saneamiento (fangos primarios)	64/MC9/1
15	“	10/261/4	72	“	64/MC9/2
16	“	10/261/5	73	Saneamiento (eliminación por canal en el lago)	66/MC9/1

17	Agua saneamiento	16/145	74	"	66/MC9/2
18	Entorno fabricación	22/145/1	75	"	67/MC9/1
19	"	22/145/2	76	"	67/MC9/2
20	"	22/145/3	77	Saneamiento (entrada de agua)	73/33/1
21	"	22/145/4	78	"	73/33/2
22	"	22/145/4	79	"	73/261/1
23	"	23/16	80	"	73/261/2
24	"	23/145/1	81	"	73/300/1
25	"	23/145/2	82	"	73/300/2
26	"	23/145/3	83	"	73/311/1
27	"	23/145/4	84	"	73/311/2
28	"	23/145/5	85	"	73/MC9/1
29	"	23/1387	86	"	73/MC9/2
30	"	28/16	87	Saneamiento (salida de agua)	74/MC9/1
31	"	28/145/1	88	"	74/MC9/2
32	"	28/145/2	89	Saneamiento (agua biológica)	75/311/1
33	"	33/33/1	90	"	75/311/2
34	"	33/33/2	91	"	75/MC9/1
35	"	33/33/3	92	"	75/MC9/2
36	"	33/33/4	93	Saneamiento (entrada de agua)	76/33/1
37	"	33/33/5	94	"	76/33/2
38	"	46/MC9/1	95	"	76/311/1
39	"	46/MC9/2	96	"	76/311/2
40	"	58/MC9/1	97	"	76/311/3
41	"	58/MC9/2	98	"	76/311/4
42	"	58/MC9/3	99	"	76/311/5
43	Saneamiento	61/33/5	100	"	76/MC9/1
44	"	61/33/6	101	"	76/MC9/2
45	"	61/33/7	102	Saneamiento (salida de agua)	77/33/1
46	"	61/33/8	103	"	77/33/2
47	"	61/300	104	"	77/311/1
48	"	61/300/1	105	"	77/311/2
49	"	61/300/2	106	"	77/MC9/1
50	"	61/311/1	107	"	77/MC9/2
51	"	61/311/2	108	Saneamiento (agua biológica)	78/33/1
52	"	61/311/3	109	"	78/33/2
53	"	61/311/4	110	"	78/311/1
54	"	61/311/5	111	"	78/311/2
55	"	62/300/1	112	"	78/MC9/1
56	"	62/300/2	113	"	78/MC9/2
57	Saneamiento (fangos primarios)	64/33/1	114	Entorno fabricación	F/316

Tabla 1: Aislados de fagos investigados

Código FSM	Origen	Código FSM	Origen
Mal-16 (16)	Producto terminado: cereales	300	Entorno Fábrica Lácteos
33	Formulación niños	303	Entorno Fábrica Lácteos
261	Universidad Munich	305	Entorno Fábrica Lácteos
265	Desconocido	308	Entorno Fábrica Lácteos
266	Desconocido	309	Entorno Fábrica Lácteos
269	Entorno Fábrica Lácteos	311	Entorno Fábrica Lácteos
270	Entorno Fábrica Lácteos	313	Entorno Fábrica Lácteos
271	Entorno Fábrica Lácteos	314	Entorno Fábrica Lácteos
272	Entorno Fábrica Lácteos	316	Entorno Fábrica Lácteos
273	Entorno Fábrica Lácteos	318	Entorno Fábrica Lácteos
274	Entorno Fábrica Lácteos	322	Entorno Fábrica Lácteos
280	Entorno Fábrica Lácteos	323	Entorno Fábrica Lácteos
281	Entorno Fábrica Lácteos	1360	Entorno Fábrica Lácteos
284	Entorno Fábrica Lácteos	1387-2NL	Entorno Fábrica Lácteos
286	Entorno Fábrica Lácteos	MC7	Universidad de Wageningen
288	Entorno Fábrica Lácteos	MC8	Universidad de Wageningen
290	Entorno Fábrica Lácteos	MC9	Universidad de Wageningen
292	Entorno Fábrica Lácteos	MM10	Universidad de Wageningen
297	Entorno Fábrica Lácteos	MM11	Universidad de Wageningen
298	Entorno Fábrica Lácteos		

Tabla 2: Cepas de *Enterobacter sakazakii*

5 RASTREO EN MEDIO SÓLIDO

Aislamiento de las placas sin amplificación de fagos

Muestreo:

Tomar muestras de agua de saneamiento (aproximadamente 50 ml) para la investigación de bacteriófagos. Medir el pH de cada muestra utilizando tiras de papel de pH (si el pH es menor de 5, ajustar a 7 con NaOH 1N).

Las muestras son sometidas a continuación a las siguientes etapas:

1. Centrifugación 10 min a 2500 g (para eliminar los restos grandes).
2. Filtración del sobrenadante utilizando un filtro de 0,20 µm (para eliminar bacterias).
3. Llevar a cabo las pruebas del modo siguiente o mantener las muestras a 4°C durante 1 o 2 días MÁXIMO.

Para el aislamiento de bacteriófagos, las muestras anteriormente mencionadas pre-tratadas han sido comprobadas en paralelo con o sin pre-amplificación. Una vez se ha detectado la presencia de fagos, se amplifican y se almacenan.

Rastreo sin pre-amplificación:

Etapas 1: Preparación del cultivo bacteriano:

Un cultivo de *E. sakazakii* con un crecimiento durante la noche a 30°C en una infusión de cerebro-corazón (BHI, Oxoid CM225) y a continuación 0,5 ml de este cultivo es transferido en 4 ml de BHI reciente e incubado durante 1 hora a 40°C.

Etapas 2: Añadir muestras a las bacterias:

Añadir en un tubo conteniendo 3 ml de BHI agar blando (caldo BHI + 0,6% agar) mantenido a 45 ± 1°C, 100 µl del cultivo de *E. sakazakii* (preparado tal como se ha indicado) + 100 µl de la muestra tratada a comprobar.

Etapa 3: Inoculación de platos Petri:

- 5 Mezclar el contenido del tubo con un Vortex (± 2 seg.). A continuación, verter todo el contenido del tubo sobre la superficie de un plato Petri conteniendo una delgada capa de agar BHI y dejar solidificar en el mango. Incubar las placas invertidas durante la noche a 30°C.

Etapa 4: Interpretación de resultados:

- 10 Observar la presencia o ausencia de placas de lisis en cada plato Petri.

Etapa 5: Controles

- 15 Preparar un control positivo (cepa *E. sakazakii* nº 261 + fago activo contra esta cepa a una concentración de 2-3 log Pfu/ml): Aplicar etapas 1 a 4.

Preparar un control negativo sin añadidura de fagos: Aplicar etapas 1 a 4 sin adición de fago o muestra a comprobar.

Rastreo con pre-amplificación:

- 20 *Etapa 1 – Día 1: Preparación del cultivo bacteriano:*
Se preparó un cultivo de *E. sakazakii* que había tenido crecimiento durante una noche a 30°C en infusión de Cerebro-Corazón (BHI, Oxoid CM225) y a continuación se transfirieron 0,5 ml desde cultivo en 4 ml de BHI reciente y se incubó durante 1h a 40°C.

- 25 *Etapa 2 – Día 1: Amplificación de fagos en la muestra:*
En un tubo con un contenido de 4 ml de caldo BHI, se añadieron 100 ml de cultivo de *E. sakazakii* (preparado igual que en la etapa 1) + 1 ml de muestra tratada a comprobar y se incubó durante 3-5h a 30°C con agitación a 150-200 rpm. Se dejaron durante una noche en banco.

- 30 *Etapa 3 – Día 2: Centrifugación durante 10 minutos a 2500 rpm.*

- 35 *Etapa 4 – Día 2: Preparación de cultivo bacteriano:*
Se preparó un cultivo de *E. sakazakii* con un crecimiento durante una noche a 30°C en infusión de Cerebro-Corazón (BHI, Oxoid CM225) y a continuación 0,5 ml de este cultivo se transfirieron en 4 ml de BHI reciente y se incubó durante 1 hora a 40°C.

- 40 *Etapa 5 – Día 2: Añadir muestras a las bacterias:*
Añadir en un tubo conteniendo 3 ml de BHI agar blando (caldo BHI + 0,6% agar) mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$, 100 μl del cultivo de *E. sakazakii* (preparado tal como se ha indicado) + 100 μl de la muestra obtenida en la etapa 3.

- 45 *Etapa 6 – Día 2: Inoculación de platos Petri:*
Mezclar el contenido del tubo con un Vortex (± 2 seg.). A continuación, verter la totalidad del tubo sobre la superficie de un plato Petri conteniendo una delgada capa de agar BHI y dejar que solidifique sobre el banco. Incubar placas invertidas durante una noche a 30°C.

- Etapa 7 – Día 3: Interpretación de resultados:* Observar la presencia o ausencia de placas de lisis en cada plato Petri.

- 50 Cuando se detecta la presencia de fagos, éstos se amplifican y almacenan.

Amplificación de una placa de lisis

- 55 *Etapa 1: Preparación de un cultivo bacteriano:*
Se preparó un cultivo de *E. sakazakii* con crecimiento durante una noche a 30°C en infusión de Cerebro Corazón (BHI, Oxoid CM225), a continuación 0,5 ml de ese cultivo fueron transferidos en 4 ml de BHI reciente y se incubó durante 1 hora a 40°C.

- 60 *Etapa 2: Amplificación de las pfu:*
En un tubo conteniendo 4 ml de caldo BHI, se añadieron 100 μl de cultivo de *E. sakazakii* (preparado tal como en la etapa 1) + 1 pfu aisladas (cortada de Agar) y se incubó durante 3-5 horas a 30°C con agitación a 150-200 rpm. Los tubos se dejan durante una noche en banco.

- 65 *Etapa 3: Centrifugación durante 10 minutos a 2500 rpm.*

Etapa 4: Filtración del sobrenadante utilizando un filtro de 0,20 µm (para eliminar bacterias)

Enumeración de fagos

Etapa 5: Preparación del cultivo bacteriano:

- 5 Se preparó un cultivo de *E. sakazakii* con crecimiento durante una noche a 30°C en infusión de Cerebro Corazón (BHI, Oxoid CM225) y a continuación 0,5 ml de ese cultivo fueron transferidos en 4 ml de BHI reciente e incubados durante 1 hora a 40°C.

Etapa 6: Añadir fagos a bacterias:

- 10 Añadir en un tubo que contiene 3ml de agar BHI blando (caldo BHI + 0,6% agar) mantenido a una temperatura de 45 ± 1°C, 100 µl del cultivo de *E. sakazakii* (preparado anteriormente) + 100 µl de muestra diluida secuencialmente obtenida en la etapa 4.

Etapa 7: Inoculación de platos Petri:

- 15 Mezclar el contenido del tubo con un Vortex (± 2 seg.) y verter el contenido completo del tubo en la superficie de un plato Petri conteniendo una placa delgada de agar BHI. A continuación, se deja solidificar en banco y se incuban las placas invertidas durante una noche a 30°C.

Etapa 8: Interpretación de los resultados:

- 20 Enumerar las placas de lisis en cada plato Petri.

Almacenamiento después de amplificación

Etapa 1: Preparación de partes alícuotas:

- 25 Distribuir en crio-tubos aproximadamente 1,5 ml de la solución de fago amplificada y filtrada (obtenida en la etapa 4 del párrafo "Amplificación de una placa de lisis")

Etapa 2: Adición de glicerol:

- 30 En cada tubo se añade 15% de glicerol estéril y se mezcla con rapidez utilizando un Vortex.

Etapa 3: Congelación rápida de los tubos en nitrógeno líquido

Etapa 4: Almacenamiento de los tubos en un congelador a -20°C.

35

RASTREO EN MEDIO LÍQUIDO

Etapa 1, Día 0: Preparación del cultivo bacteriano:

- 40 Se preparó un cultivo de *E. sakazakii* con crecimiento durante una noche a 30°C en infusión de Cerebro Corazón (BHI, Oxoid CM225).

Etapa 2, Día 1: Preparación del cultivo bacteriano:

- 45 Transferir 0,1 ml de este cultivo en 4 ml de BHI reciente e incubación durante 6 horas a 40°C (fase de crecimiento estacionario de células). Diluir las células hasta 3log cfu/ml en Tryptone Salt (TS, Oxoid L42).

Etapa 3, Día 1: Ensayo de placas de microtitulación:

- 50 Se investigó la efectividad de los fagos contra *E. sakazakii* en un ensayo de placas de microtitulación. Cada una de las placas fue dotada de cada uno de los microorganismos de pruebas de la manera siguiente: pocillos externos, 200 µl de BHI estéril (control en bruto), otros pocillos 20 µl de *E. sakazakii* diluido preparado en la etapa 2. Almacenar durante una noche las microplacas a 4°C.

Etapa 4, Día 2: Ensayo de placas de microtitulación:

- 55 Sacar las placas de microtitulación del refrigerador. Añadir en pocillos de control negativo 180 µl de BHI y en los pocillos de pruebas 160 µl BHI además de 20 µl de suspensión de fago (concentración final de 8 log pfu/ml). Leer en 620 nm la densidad óptica (tiempo cero) de la placa de microtitulación utilizando un lector de microplacas Multiskan MCC340. A continuación, a 37°C en aire ambiente y se leyó OD_{620nm} después de 6h30 y 8h30 minutos de incubación.

Etapa 5, Día 3: Ensayo de placas de microtitulación

- 60 Después de la última lectura, las placas son dejadas a temperatura ambiente durante un total de 24 horas. Después de ello se lee nuevamente OD_{620nm}.

RESULTADOS

- 65 Después de la prueba sobre medio sólido, los aislados de fagos activos contra, como mínimo, 9 de las 39 cepas de *E. sakazakii* seleccionadas del grupo: FSM-16; 33; 261; 265; 266, 269; 270; 271; 272; 273; 274; 280; 281; 284; 286;

288;; 290; 292; 297; 298; 300; 303; 305; 308; 309; 311; 313; 314; 316; 318; 322.; 323; 1360; 1387/2NL; MC7; MC8; MC9; MM10 y MM11. De este modo, los 11 aislados de fagos (incluyendo los fagos Fago FSM 67/33/1, Fago FSM F/316, Fago FSM 9/261 y Fago FSM 73/311/2) son presentados en la tabla 3. Algunos aislados de fagos mostraron ser eficaces contra un mínimo de 20 de las 39 cepas bacterianas.

		Número de bacteriófagos (FSM-fagos)										
		F/316	73/26	9/261	28/14	23/16	10/26	22/14	28/16	33/33	67/33	73/31
Número de cepas de <i>Enterobacter sakazakii</i>	16	2	2	2	2	2		2	2	0	0	0
	33	2	0	2	2	0	0	0	0	2	2	2
	261	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	265	2	2	2						2	0	0
	266	2	2	2						2	2	0
	269	2	2	2						0	0	0
	270	2	0	2						0	2	0
	271	2	2	2						2	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	273	2	2	2						2	0	0
	274	2	2	2	0	0	2	0	0	0	2	2
	280	2	2	2						2	0	0
	281	2	2	2						2	0	0
	284	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	288	2	2	2						0	0	0
	290	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	297	2	2	2						0	0	0
	298		2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	300	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	303	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	0
	305	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	308		2	?							2	2
	309		2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	311	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	313	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	314	2	2	2						2	2	0
	316	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	318	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	322	2	2	2						2	2	0
	323	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	1360	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2
	MC7	0		0	2	2	0				0	0
	MC8	2		2	2	2	2				0	0
	MC9	2		2	2	2	2				2	2
	MM10	2		2	2	2	2				0	0
	MM11	2		0	2	2	2				2	0

5 Tabla 3: Selección de fagos según los resultados obtenidos en medio sólido.
Leyenda: 0 no activo; 2 activo.

Dichos fagos fueron comprobados además sobre medio líquido a efectos de seleccionar los aislados de fagos, de acuerdo con la presente invención. Los resultados se indican en la tabla 4.

		Número de bacteriófagos (FSM-fagos)										
		67/33/1	10/261/	F/316	9/261	33/33/1	73/311/	28/145/	73/261/	23/16	28/16	22/145/
Número de cepas de <i>Enterobacter sakazakii</i>	16	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	0
	33	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	261	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
	265	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
	266	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2
	269	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
	270	2	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0
	271	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	273	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	274	2	2	2	0	2	2	?	0	0	2	2
	280	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	281	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0
	284	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0
	288	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	290	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	297	2	?	2	2	?	2	0	0	0	0	0
	298	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	300	0	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
	303	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
	305	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
	308	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
	309	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
	311	2	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0
	313	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	314	0	?	2	2	?	0	2	0	0	0	0
	316	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	318	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
322	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	
323	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	
1360	0	0	2	2	2	0	0	2	0	0	0	
1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	0	
MC7	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	
MC8	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	

MC9	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0
MM10	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
MM11	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	0

TABLA 4: Selección de fagos según los resultados obtenidos en medio líquido.
Leyenda: 0 no activo; 2 activo.

5 Tal como se puede deducir de la tabla 4, algunos aislados de fagos reconocen más del 80% de las 39 cepas de *E. sakazakii*. No obstante, otros aislados no reconocen incluso el 10% de las cepas comprobadas. Los fagos aislados que son activos además en medio líquido contra un mínimo de 9 de las 39 cepas de *E. sakazakii* seleccionadas del grupo: FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266, FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-10 1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11 son aislados de fagos seleccionados que pueden ser utilizados en la presente invención. Preferentemente, los siguientes 8 aislados de fagos Fago FSM 67/33/1 (CNCM I-3130), Fago FSM F/316 (CNCM I-3131), Fago FSM 9/261 (CNCM I-3132), y Fago FSM 73/311/2 (CNCM I-3133), Fago FSM 73/261 (CNCM I-3128), FMS 33/33/1 (CNCM I-3129) Fago FSM 28/145/2, Fago FSM 10/261/1 (CNCM I-3127).

15 Se apreciará que un técnico en la materia puede examinar y seleccionar con facilidad otros aislados de fagos, de acuerdo con la presente invención, sometiéndolos a las pruebas de rastreo sobre medio sólido y líquido que se han explicado con detalle en lo anterior.

20 **Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia del cóctel de bacteriófagos contra una mezcla de varias cepas de *Enterobacter sakazakii* en BHI y formulación para niños reconstituida (RIF)**

A efectos de evaluar la eficacia del cóctel de fagos contra la mezcla de cepas de *E. sakazakii*, se llevó a cabo el experimento siguiente.

25 Se utilizó una mezcla de las cepas de *E. sakazakii* FSM-145, 286, 290, 305 y 1387/2NL tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y en la publicación P. Breeuwer y otros, 2003, *Journal of Applied Microbiology* 95: 967-973. El cultivo individual durante una noche (18h a 30°C) de estas cepas es diluido en BHI reciente, diluido 1:1 e incubado durante 2 horas a 30°C. Una mezcla de estas cepas es llevada a cabo mezclando cantidades iguales de cada material. A 30 continuación, el caldo BHI o RIF son inoculados con 100 µl de la mezcla de *E. sakazakii* (preparada tal como se ha descrito en lo anterior) de manera que la concentración final es aproximadamente de 10 cfu/ml.

El cóctel de aislados de fago que contienen Fago FSM 67/33/1 (CNCM I-3130), Fago FSM F/316 (CNCM I-3131), Fago FSM 9/261 (CNCM I-3132), y Fago FSM 73/311/2 (CNCM I-3133) ha sido comprobado. Para ello se añade una 35 cantidad variable de cada fago a los tubos conteniendo la mezcla de *E. sakazakii* para alcanzar la concentración final de 8 log pfu/ml aproximadamente. El control negativo sin adición de fago (BHI o RIF 9,9 ml + mezcla de *E. sakazakii* 100 µl) se incluye asimismo.

40 Todos los inoculados son incubados a 30°C y se toman muestras a varios intervalos de tiempo: 0 – 2 – 4 – 6 horas. Para cada muestra, se determinó el número de bacterias presentes en el medio por métodos de contaje de placas de tipo estándar.

Resultados:

45 Los resultados son presentados en las figuras 1 y 2. Éstas muestran que una mezcla bacteriana crecerá alcanzando un elevado número en ausencia del cóctel de fagos mientras que no hay crecimiento observado en presencia del cóctel de fagos durante un periodo mínimo de 6 horas y hasta 24 horas.

50 Como conclusión, estos experimentos demuestran que la adición de un preparado de bacteriófagos, de acuerdo con la presente invención, contra *E. sakazakii* en formulaciones para niños reconstituidas (RIF) debe prevenir el crecimiento de *E. sakazakii* durante un mínimo de 6 horas.

Ejemplo 3: Efecto en preparado bacteriófago para saneamiento ambiental

55 A efectos de evaluar la eficacia del cóctel de fagos en superficies contaminadas artificialmente mediante una mezcla de cepas de *E. sakazakii*, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Etapa 1: Preparación de células bacterianas

60 Se utilizó una mezcla de cepas *E. sakazakii* (FSM-145, 286, 290, 305 y 1387/2NL (ver ejemplos 1 y 2)). El cultivo individual durante una noche (18h a 30°C) de estas cepas es centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C. La pastilla de células es recogida y diluida en BHI para conseguir una concentración de células aproximada de 8 log cfu/ml. Una mezcla de estas cepas es llevada a cabo mezclando iguales cantidades de cada material.

Etapa 2: Adherencia

65 Se sumergen discos de acero inoxidable de 1 cm² en la solución bacteriana preparada tal como se describe en la etapa 1. Se deja a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora.

Etapa 3: Lavado y secado

5 Para retirar las células no fijadas, se retiran los discos de acero inoxidable y se lavan 3 veces en una solución de fosfato tampón (PBS: pH 7,0, Merck). El exceso de líquido es absorbido con papel Watman y los discos son secados a continuación durante 30 minutos bajo flujo laminar. Para determinar el nivel de células fijadas, se aplica la etapa 6 en algunos discos.

Etapa 4: Adición de cóctel de fagos

10 La mitad de los discos de acero inoxidable se sumergen en la solución de cóctel de fagos de 8 log pfu/ml conteniendo los siguientes fagos Fago FSM 67/33/1 (CNCM I-3130), Fago FSM F/316 (CNCM I-3131), Fago FSM 9/261 (CNCM I-3132), y Fago FSM 73/311/2 (CNCM I-3133). Dejar el contenedor a temperatura ambiente con agitación suave durante 6 horas. Retirar algunos discos a varios intervalos para numeración de bacterias. En paralelo, llevar a cabo controles sin añadidura de fagos.

15 *Etapa 5: Lavado*

A intervalos definidos, algunos discos son retirados, lavados 3 veces en PBS estéril y secados con rapidez sobre papel absorbente estéril.

Etapa 6: Liberación de las células y enumeración

20 Después de la etapa 5, poner cada disco en tubos que contienen 9 ml de TS. Los tubos son colocados en un baño de sonicado (lleno de agua y mezcla de hielo) durante 1 minuto a 50 KHz posteriormente; los tubos son agitados durante 10 segundos utilizando un Vortex. La enumeración de células se ha llevado a cabo utilizando un método estándar de placas.

25 **Resultados:**

Los resultados se indican en la figura 3, que muestra que las bacterias de *E. sakazakii* en la mezcla de cepas (FSMCC # 145, 286, 290, 305, 1987/2NL) no pueden ser recuperadas ya de la superficie de los discos de acero inoxidable tratados con 10^8 pfu/ml de fago en el cóctel de fagos (fago FSMCC # 67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2), mientras que sin cóctel de fagos las bacterias permanecen viables y pueden incluso crecer ligeramente.

30 Como conclusión, el tratamiento de superficies de acero inoxidable con un mínimo de 10^8 fagos por ml resulta en la exterminación de las bacterias *E. sakazakii*.

REIVINDICACIONES

1. Aislado de fagos, con potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii* seleccionado del grupo que consiste en CNCM I-3127, CNCM I-3128, CNCM I-3129, CNCM I-3130, CNCM I-3131, CNCM I-3132 y CNCM I-3133.
2. Cóctel de fagos que contiene, como mínimo, un aislado de fagos, según la reivindicación 1.
3. Producto alimenticio que contiene, como mínimo, un aislado de fagos o cóctel de fagos con sustancial potencial lítico contra *E. sakazakii*, en el que el aislado de fagos o cóctel de fagos está de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, adoptando dicho producto alimenticio la forma de un producto basado en la leche, un compuesto nutritivo, alimento para animales domésticos, suplemento de dieta o cualquier producto alimenticio con riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.
4. Producto alimenticio, según la reivindicación 3, en el que el producto basado en la leche es una leche fermentada, un yogur, una cuajada, un queso, un queso fresco, un producto fermentado, una leche con cuajada, una bebida, un material en polvo basado en leche, una formulación para niños o una formulación para niños en polvo en estado seco.
5. Producto alimenticio, según una de las reivindicaciones 3 a 4, en el que el aislado de fagos o cóctel de fagos se encuentra en una cantidad efectiva para impedir la contaminación y el crecimiento en *E. sakazakii* dicho producto.
6. Producto alimenticio, según la reivindicación 5, en el que el aislado de fagos se encuentra presente en una cantidad mínima de $1,10^4$ pfu por ml, o gramo si es sólido, del producto alimenticio.
7. Agente para descontaminación de producto alimenticio con prevención de contaminación y crecimiento de *E. sakazakii* e higienización de un entorno de fabricación, que comprende una cantidad efectiva de, como mínimo, un aislado de fagos o cóctel de fagos, según una de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Agente, según la reivindicación 7, en el que el aislado de fagos se encuentra presente en una cantidad mínima de $1,10^4$ pfu por ml, o gramo si es sólido.
9. Agente, según una de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el producto alimenticio es un producto basado en la leche, tal como leche fermentada, yogur, cuajada, queso, queso fresco, productos fermentados basados en la leche, leche con cuajada, bebidas, materiales en polvo basados en la leche, formulación para niños, formulación en polvo en estado seco para niños; producto fermentado no procedente de la leche; producto basado en soja, formulación nutritiva, producto de la leche, bebida enfriada o estable en almacenamiento, agua, sopa, suplemento de dieta, sustitutivo de comida, barrita o elemento de pastelería nutritivo, producto alimenticio para animales domésticos, bebida dulce o edulcorada, helado, barrita de pastelería, copos o barritas de cereales para desayuno o suplementos nutritivos para nutrición clínica o cualquier otro alimento con riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.
10. Utilización de, como mínimo, un aislado de fago o cóctel de fagos, según una de las reivindicaciones 1 a 2, para descontaminación de productos alimenticios y para higienización de entorno de fabricación, en el que el producto alimenticio es un producto basado en la leche, tal como leche fermentada, yogur, cuajada, queso, queso fresco, productos fermentados basados en la leche, leche con cuajada, bebidas, materiales en polvo basados en la leche para niños, formulación para niños, formulación en polvo en estado seco; producto fermentado no procedente de la leche; producto basado en soja, formulación nutritiva, producto de la leche, bebida enfriada o estable en almacenamiento, agua, sopa, suplemento de dieta, sustitutivo de comida, barrita o elemento de pastelería nutritivo, producto alimenticio para animales domésticos, bebida dulce o edulcorada, helado, barrita de pastelería, copos o barritas de cereales para desayuno o suplementos nutritivos para nutrición clínica o cualquier otro alimento con riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.
11. Utilización de, como mínimo, un aislado de fago, según una de las reivindicaciones 1 a 2, en la preparación de una composición destinada a prevenir o tratar infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales en la que el aislado de fagos se encuentra presente en una cantidad eficaz para prevenir la contaminación y crecimiento de *Enterobacter sakazakii*.
12. Utilización, según una de las reivindicaciones 10 a 11, en la que el aislado de fago o cóctel de fagos es utilizado en una cantidad mínima de $1,10^4$ pfu por ml.

FIG. 1

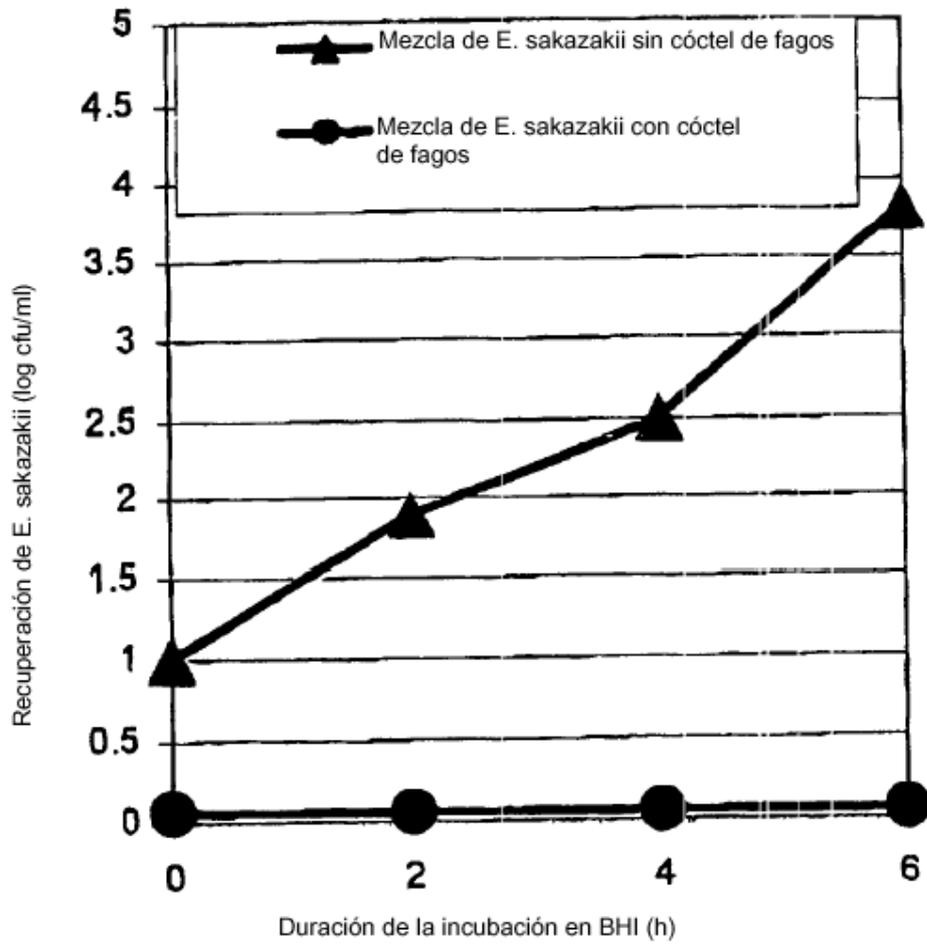


FIG. 2

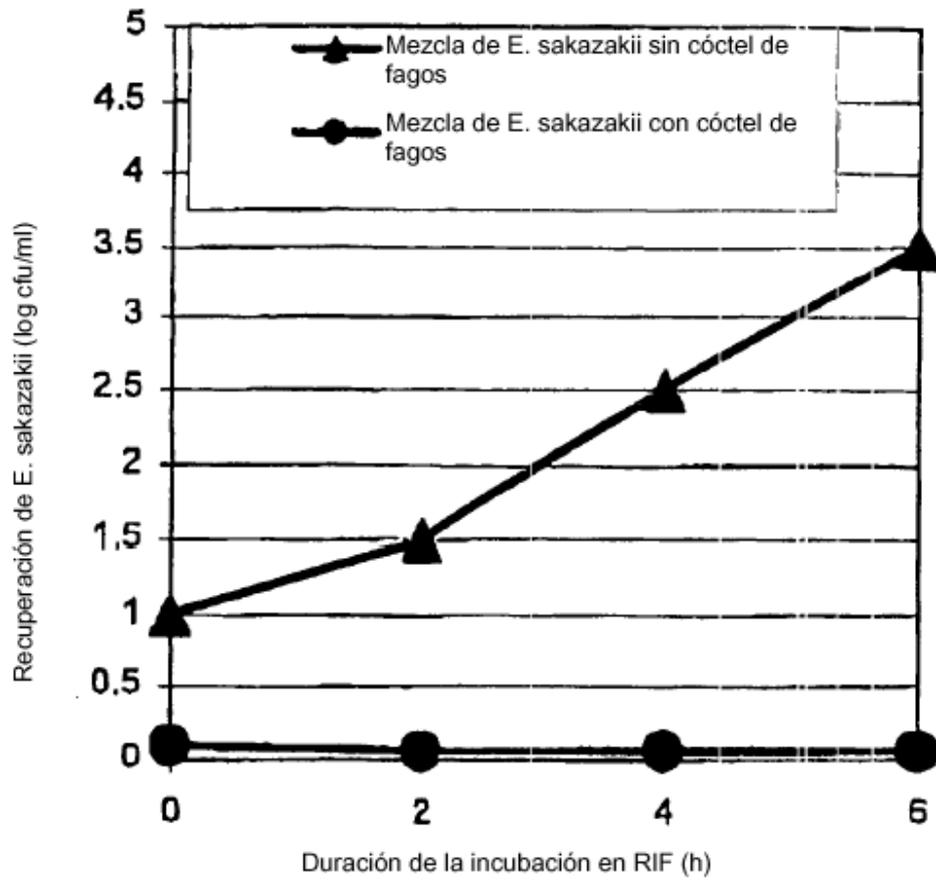


FIG. 3

