

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 095**

51 Int. Cl.:  
**A23K 1/17** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/29** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 35/76** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02790317 .8**  
96 Fecha de presentación: **30.10.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1458856**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Fagos aislados y su uso en productos alimenticios o en comida para mascotas**

30 Prioridad:  
**13.12.2001 EP 01204879**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.10.2012**

73 Titular/es:  
**SOCIETE DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)**  
**CASE POSTALE 353**  
**1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:  
**BRUESSOW, HARALD;**  
**CHENNOUFI, SANDRA;**  
**SIDOTI, JOSETTE y**  
**BRUTTIN, ANNE**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 389 095 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 uso en productos alimenticios o en comida para mascotas

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a fagos aislados que tienen gran actividad lítica contra enterobacteriáceas, tales como las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella*, y a su uso en varios productos para humanos o para comida de mascotas, a fin de tratar o prevenir enfermedades bacterianas causadas por enterobacteriáceas patógenas tales como *Escherichia coli* o *Salmonella*, en particular para la terapia fágica de la gastroenteritis pediátrica. Asimismo se refiere a productos para humanos o de comida de mascotas preparados con ellos.

**Antecedentes de la presente invención**

15 En el pasado se han empleado antibióticos para tratar varias infecciones. El trabajo de Selman Waksman en la introducción y producción de los estreptomicetos y el descubrimiento de la penicilina por el Dr. Fleming, así como el trabajo de otros muchos en el campo de los antibióticos, es bien conocido. A través de los años ha habido adiciones y modificaciones químicas de los antibióticos "básicos" ideadas para hacerlos más potentes o para tratar personas alérgicas a estos antibióticos.

20 Sin embargo la prescripción y el empleo continuo y creciente de más antibióticos para diversas enfermedades ha provocado que cada vez un mayor número de bacterias haya desarrollado una resistencia a los antibióticos. Ahora se están usando dosis mayores o antibióticos más fuertes para tratar cepas bacterianas cada vez más resistentes. En consecuencia se han desarrollado múltiples bacterias resistentes a los antibióticos y algunas infecciones adquiridas en el hospital con bacterias Gram-positivas ya han resultado intratables. El uso de más antibióticos y el número de bacterias resistentes ha incrementado el tiempo necesario de tratamiento con los antibióticos. Cada vez se usan con mayor frecuencia antibióticos inespecíficos de amplio espectro, alguno de los cuales tiene efectos perjudiciales en el paciente. Asimismo parece aumentar el número de personas que presentan reacciones alérgicas a los antibióticos.

30 Por consiguiente se han buscado alternativas para identificar bacterias y luego matarlas.

Se han hecho intentos de tratar enfermedades bacterianas usando bacteriófagos, que son un grupo heterogéneo de virus que infectan las bacterias y fueron descubiertos por primera vez a comienzos del siglo 20 (d'Herelle, F., *The bacteriophage. Its role in immunity [El bacteriófago. Su papel en la inmunidad]*, traducido por Smith, G. H., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1922)). Actualmente los bacteriófagos son ampliamente usados en investigaciones científicas de biología molecular (p.ej. como vectores genéticos) y en diagnosis médica (p.ej. tipificación fágica de bacterias). Como los fagos infectan y matan bacterias de modo natural, se sugirió tradicionalmente que también se podían usar en terapéutica médica, puesto que las bacterias son una causa principal de enfermedades.

40 De hecho en la literatura se ha informado exhaustivamente del potencial uso terapéutico de los fagos en sistemas experimentales.

Así, por ejemplo, la patente US 5,688,501 (Merril, y otros) revela un método para tratar una enfermedad infecciosa bacteriana con bacteriófagos líticos o no líticos específicos para bacterias concretas.

45 La patente US 4,957,686 (Norris) también revela un procedimiento para mejorar la higiene dental, que consiste en introducir en la boca bacteriófagos que parasitan bacterias y tienen la propiedad de adherirse fácilmente a la película salival.

50 A pesar del reconocido valor e importancia de las nuevas terapias antimicrobianas, el potencial de la terapia fágica no ha alcanzado en ningún sentido práctico el uso que es habitual en la terapéutica moderna, ni se han definido métodos, composiciones u otros usos para terapias no tóxicas y eficaces de este tipo, que puedan administrarse de manera práctica y efectiva, en particular para la prevención eficiente y el tratamiento de infecciones relacionadas con *E. coli*, tales como las enfermedades diarreicas.

55 En efecto, la *E. coli* es una bacteria sumamente bien investigada, con dos miembros completamente secuenciados, la cepa no patógena K-12 (Blattner, F.R., y otros, 1997 *Science* 277, 1453-1474) y la cepa patógena O157:H7 (Perna, N.T. y otros, 2001, *Nature* 409, 529-533; Hayashi y otros, 2001, *DNA Research* 8, 11-22), que se parece a las cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC).

60 Aunque hay dos fagos de *E. coli* ( $\lambda$  y T4) que son los sistemas biológicos más cuidadosamente caracterizados (Karam, J.D., 1994, *Molecular biology of bacteriophage T4*. ASM Press, Washington, DC), aún existe la necesidad de desarrollar terapéuticas fágicas nuevas y útiles que puedan emplearse para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos bacterianos, tales como los serotipos de *E. coli*, asociados a la diarrea infantil y la del viajero.

65

También hay necesidad de desarrollar composiciones que incluyan fagos terapéuticos en vehículos aceptables para la administración a sujetos infectados con microorganismos bacterianos.

5 Por último hay necesidad de desarrollar un preparado bacteriófago que sea virulento y atóxico, de modo que resulte útil para tratar infecciones bacterianas relacionadas con *E. coli* o *Salmonella* patógenas.

### Resumen de la presente invención

10 Por tanto un objeto de la presente invención es el desarrollo de nuevos fagos terapéuticos que puedan servir para prevenir o tratar enfermedades infecciosas causadas por enterobacteriáceas patógenas, tales como las infecciones por *E. coli*, en particular trastornos diarreicos o urinarios en humanos o animales, o las infecciones por *Salmonella*.

15 Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar preparados de fagos aislados para dicha aplicación, que tengan un potencial sustancialmente lítico y sean virulentos, pero atóxicos, con el fin de emplearlos contra cepas enterobacteriáceas patógenas de *E. coli* y/o *Salmonella*.

20 También es un objeto de la presente invención procurar el empleo de estos preparados bacteriófagos en diversas composiciones nutricionales, productos alimenticios para mascotas, suplementos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de infecciones causadas por *E. coli* y/o *Salmonella* patógenas en humanos o animales.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición nutricional, un producto alimenticio para mascotas, un suplemento o una composición farmacéutica que contenga al menos un fago, tal como se ha descrito anteriormente.

Otro objeto más de la presente invención es facilitar el uso de fagos terapéuticos en composiciones nutricionales, productos alimenticios para mascotas, suplementos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de infecciones causadas por *E. coli* y/o *Salmonella* patógenas en humanos o animales.

30 Una ventaja importante de la presente invención es que los preparados bacteriófagos seleccionados según la misma tienen una amplia gama de huéspedes en las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, que no son tóxicos y por tanto se pueden emplear de manera segura en composiciones alimenticias para la prevención o el tratamiento eficiente de infecciones causadas por *E. coli* patógenas. Los fagos según la presente invención también se pueden usar para aplicaciones industriales. Pueden propagarse eficientemente en una cepa no patógena de *E. coli*, manteniendo una amplia gama de huéspedes. Los fagos matan eficientemente la célula huésped y se pueden purificar en gran medida mediante un método estándar de aislamiento de virus.

Dichos objetivos son resueltos según las reivindicaciones adjuntas.

### 40 Descripción detallada de la presente invención

En la siguiente descripción "NCC" designa la colección de cultivos Nestlé (Nestlé Research Center (NRC), Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Suiza).

45 Según un primer aspecto, a partir de muestras de heces humanas y del medio ambiente se han obtenido aislados de fagos de la familia Myoviridae que tienen una amplia gama de huéspedes y un potencial sustancialmente lítico contra cepas enterobacteriáceas patógenas de *E. coli* y/o *Salmonella*.

50 Se analizó con el ensayo de placas la presencia de bacteriófagos dirigidos contra *E. coli* en muestras de heces de niños hospitalizados con diarrea aguda. También se analizó la presencia de bacteriófagos en diferentes fuentes de agua. Estas aguas (de grifo, residuales, de alcantarilla, de estanques, de canales, de la calle y del mercado) son de Dhaka/Bangladesh y de Lausanne (agua residual). Se aislaron aproximadamente 45 fagos de la familia Myoviridae y fueron amplificados en *E. coli* no patógena de laboratorio K-12. Estos aislados evidenciaron una amplia gama de huéspedes en una gran colección de cepas patógenas de *E. coli*. Los fagos se pudieron purificar mediante métodos estándar de aislamiento de virus. Todos los fagos investigados en detalle resultaron ser similares a los T4 (fagos de virulencia obligada con cola contráctil). El diagnóstico estuvo basado en el gran tamaño del genoma (170 kb), en la modificación del ADN (resistencia a la digestión con endonucleasas de restricción) y en la morfología.

60 Se pueden propagar eficientemente en una cepa no patógena de *E. coli*, manteniendo una amplia gama de huéspedes en cepas de *E. coli* causantes de diarrea. Los fagos de tipo T4 matan eficientemente la célula huésped. Son el prototipo de los fagos virulentos que destruyen el genoma bacteriano durante el proceso de infección. Esta característica aumenta sustancialmente la seguridad del método de terapia fágica.

65 Los fagos identificados aquí están seleccionados del grupo formado por NCC-JS9, NCC-JS31, NCC-JS102.2, NCC-JS150, NCC-JS1, NCC-JS 10 (renombrado NCC-JS4) (**CNCM I-2763**), NCC-JS22, NCC-JS32, NCC-JS114.1, NCCJS140.1, NCC-JS146.1, NCC-JS65.1, NCC-JS65.2', NCC-JS76.2', NCC-JS12, NCC-JS152, NCC-JS66, NCC-

5 JS102.1, NCC-JS140.2, NCC-JS146.2, NCC-JS61.2, NCC-JS61.3, NCC-JS114.3, NCC-JS35 (renombrado NCC-JS94.1) (**CNCM I-2764**), NCC-JS94.2, NCC-JS98, NCC-JS104, NCC-JS94.3, NCC-JS110.1, NCC-JS110.2, NCC-JS110.3, NCC-JS1.4 (renombrado NCC-JSD.1) (**CNCM I-2765**), NCC-JSD.3, NCC-JSD.2, NCC-JSD.4, NCC-JSD.5, NCC-JS142, NCC-JS148 y NCC-JSL.1, NCC-JSL.2, NCC-JSL.3, NCC-JSL.4, NCC-JSL.5, NCC-JSF (renombrado NCC-JSL.6) (**CNCM I-2766**).

10 En una forma de ejecución muy preferida de la presente invención los fagos NCC-JS 10, NCC-JS35, NCC-JS 1.4 y NCC-JSF se han depositado como ejemplo en el Instituto Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris cédex 15, FRANCIA, el 11 de diciembre de 2001, con los números de depósito CNCM I-2763, CNCM I-2764, CNCM I-2765 y CNCM I-2766.

15 Ventajosamente, los fagos depositados, por ejemplo, son capaces de lisar el 42 por ciento de la colección de *E. coli* causantes de diarrea del Centro de investigación Nestlé, compuesta por 50 cepas. Esta colección representa los serotipos más importantes de *E. coli* de diarrea infantil en los países desarrollados y de diarrea del viajero. Con el material fágico según la presente invención se puede lograr una cobertura del 60 por ciento, con un incremento de aislados de fagos individuales incluidos en el cóctel.

20 Sin embargo, aparte de las especies de *E. coli*, no hay ningún riesgo para otras bacterias comensales del intestino. El equilibrio ecológico del intestino se conserva (véase ejemplo 3, figura 2). Tras un tratamiento fágico de ratones ya no hay más fagos presentes en el intestino. Con el material fágico según la presente invención solo se incluye menos del 50 por ciento de serotipos de *E. coli* intestinal humano no patógenos.

25 Así, según otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un aislado de fagos - tal como se ha descrito arriba - en cualquier producto alimenticio o farmacéutico o en un suplemento o composición nutricional de administración oral. Como ejemplos de productos alimenticios o farmacéuticos cabe citar: leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos basados en leches fermentadas, helados, productos basados en cereales fermentados, polvos lácteos, fórmulas o tabletas infantiles, suspensiones líquidas, suplemento oral seco, suplemento oral húmedo, alimentación seca por sonda, comida para mascotas. La composición para administración oral puede ser en forma de cápsulas, cápsulas blandas, tabletas, pastas o pastillas, gomas, o soluciones o emulsiones bebibles. Los métodos para su preparación son de dominio público.

35 La composición empleada según la presente invención también puede incluir excipientes habituales, en particular edulcorantes, saborizantes o conservantes. Además puede contener un microorganismo prebiótico y/o probiótico. Las composiciones empleadas según la presente invención pueden formularse siguiendo cualquiera de las diversas técnicas bien conocidas en este campo.

40 Según una forma de ejecución se puede proporcionar una composición farmacéutica que contenga al menos uno de los bacteriófagos de la presente invención en cantidad suficiente para conseguir el efecto deseado en un individuo. Esta composición puede ser una tableta, un líquido, un suplemento oral seco, un suplemento oral húmedo, una alimentación seca por sonda, una alimentación húmeda por sonda, etc. La composición farmacéutica contendrá además vehículos y excipientes adecuados para suministrar la respectiva molécula activa de diferente naturaleza al tejido diana. El tipo de vehículo/excipiente y la cantidad del mismo dependerá de la naturaleza de la sustancia y del modo de suministro y/o administración del fármaco. Se entiende que la persona experta elegirá los componentes apropiados y la forma galénica, basándose en sus propios conocimientos.

45 En otra forma de ejecución se prepara una composición alimenticia para consumo humano. Esta composición puede ser una fórmula nutricional completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o no perecedera, agua, una sopa, un suplemento dietético, un sustituto alimenticio, una barra nutritiva o un producto de confitería.

50 La fórmula nutricional es preferiblemente para administrar por vía enteral, por ejemplo en forma de un polvo, de un concentrado líquido o de una bebida lista para el consumo. Si se desea producir una fórmula nutricional en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato secador adecuado, como por ejemplo un secador por atomización o un secador por liofilización, para convertirla en polvo.

55 En un ejemplo concreto los fagos pueden añadirse a una fórmula láctea con agua tibia, lo cual podría ser beneficioso para niños que padecen gastroenteritis por *E. coli* o infecciones por *Salmonella*, o que están en peligro de contraer dichas infecciones. La diarrea pediátrica por *E. coli* es infrecuente en los países industrializados del hemisferio norte, pero estas infecciones aún son muy corrientes en países como México, Brasil, India y China.

60 Los fagos también pueden usarse para prevenir o tratar la diarrea del viajero. Los turistas europeos que pasan sus vacaciones en el norte de África o los turistas americanos que viajan de EEUU a América central o al Caribe tienen un gran riesgo de adquirir infecciones ETEC.

65 Las *E. coli* también son una causa frecuente de infecciones urinarias en las personas, incluyendo los países industrializados. Los serotipos O de los aislados extraintestinales de *E. coli* son diferentes de los serotipos de las cepas de *E. coli* intestinales. Sin embargo la amplia gama de huéspedes de muchos fagos similares al T4 no deja

ninguna duda de que muchas de las cepas urinarias de *E. coli* se pueden lisar con fagos T4 aislados de muestras de heces.

5 Según otra forma de ejecución, un producto alimenticio usual se puede enriquecer con al menos un aislado de fagos conforme a la presente invención. Por ejemplo, una leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una leche cuajada, un producto de confitería como por ejemplo un dulce o una bebida edulcorada, una barra de confitería, barras o copos de cereales para el desayuno, bebidas, leches en polvo, productos basados en soja, productos lácteos no fermentados o suplementos nutricionales para alimentación clínica.

10 Los bacteriófagos según la presente invención deben emplearse en una cantidad de al menos  $1 \cdot 10^4$  ufp (unidades formadoras de placa)/ml y preferiblemente  $10^6$  ufp/ml.

15 Según otra forma de ejecución se pueden preparar productos alimenticios para mascotas. De hecho la *E. coli* es el principal causante de diarrea en los perros. Los serotipos de cepas EPEC y ETEC aislados de perros se solapan en parte con los de los humanos. Los perros albergan en su intestino serotipos de *E. coli* que producen con frecuencia infecciones por contacto en el tracto urinario. Estos aislados de *E. coli* procedentes de tracto urinario canino han mostrado relaciones genéticas muy parecidas con los aislados de *E. coli* extraintestinales humanos. La formulación de comida para mascotas es preferiblemente un producto nutricionalmente completo y equilibrado. También puede tener la forma de un suplemento dietético o de una composición farmacéutica. La formulación nutricionalmente completa para mascotas conforme a la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo en polvo, como croquetas secas o granulado u otra forma desecada, en forma extruida, semihúmeda o húmeda, como por ejemplo un trozo, barra o pudín. Puede ser refrigerada o un producto no perecedero. Esta comida para mascotas puede ser elaborada por métodos convencionales.

25 En otro ejemplo se pueden preparar complementos dietéticos para mejorar la calidad de la comida para mascotas. Como complementos dietéticos pueden ir encapsulados o pueden suministrarse en polvo envasado junto con una comida principal o por separado, sea húmedo o seco. Por ejemplo, un polvo que contenga bacteriófagos según la presente invención puede ir envasado en saquitos, en forma de polvo o en un gel o lípido u otro vehículo adecuado. Estas unidades en envase aparte se pueden suministrar junto con una comida principal o en envases de varias unidades para usar con una comida principal o un tratamiento, según las instrucciones del usuario.

30 Asimismo, la aplicación oral de fagos según la presente invención o la pulverización de fagos en el hogar podría ser beneficiosa, tanto para el perro como para el dueño de la mascota.

35 En una última forma de ejecución los fagos pueden ser valiosos en la producción de alimentos, para disminuir el nivel de contaminación de la carne con *E. coli* y/o *Salmonella*.

40 Los siguientes ejemplos se ofrecen solo como ilustración y de ningún modo deben interpretarse como limitativos del objeto de la presente invención. Todos los porcentajes están expresados en peso, a no ser que se indique de otro modo. Los ejemplos van precedidos de una breve descripción de las figuras.

**Figura 1:** curva de crecimiento (lecturas DO) de *E. coli* K12 en presencia de los fagos análogos a T4 NCC-J146.1 y NCC-JS94.1. Los cultivos de *E. coli* se desarrollaron a una DO de 0,1 y se infectaron con 1% de dichos fagos. Se tomaron muestras cada 10 minutos.

45 **Figura 2:** estudios de ratones *in vivo*. Se controló durante 42 días la flora de *E. coli* de cuatro ratones. Al agua se le añadió una mezcla de bacteriófagos (NCCJS94.1, NCC-JS4, NCC-JSD.1 y NCC-JSL.6) tres veces a distinta concentración (con tres cambios de agua). Un ratón de control recibió la misma agua (con los mismos cambios) sin la mezcla de fagos. Se recogieron las heces una o dos veces al día. La mezcla de bacteriófagos se aisló, se valoró y se determinó la flora de *E. coli*. La barra lineal representa el promedio de la flora normal.

50 **Figura 3:** infección fágica de ratones axénicos. Dos ratones axénicos se alimentaron forzosamente con *E. coli* K12 y se agregó fago NCCJS94.1 al agua hasta una concentración final de  $10^5$  ufp/ml durante una semana. A lo largo del ensayo se controló la flora normal y la presencia de fagos en las heces. A la tercera semana los ratones se alimentaron otra vez forzosamente con ECOR5, que es resistente al fago. Se añadió de nuevo NCCJS94.1 al agua y se recogieron las heces para analizar la presencia de *E. coli* y del fago.

55 **Figura 4:** después de tratar los cuatro ratones con fagos se realizó una autopsia cuando ya no se recuperaron más fagos de las heces (fig. 4A) y mientras se trataban otros cuatro ratones con fagos (fig. 4B). Se recogieron diferentes partes del intestino (duodeno, yeyuno, íleon, colon), el hígado y nodos linfáticos para analizar la presencia de *E. coli* y de fagos. Las columnas representan el promedio de cada grupo de ratones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: selección de fagos según la presente invención

#### 5 MATERIAL Y MÉTODOS

##### Preparación de muestras de heces

10 Las muestras de heces se guardaron en el hospital congeladas a -20°C y se trasladaron en hielo seco a Lausanne. La muestra descongelada (~10 g) se resuspendió en solución de ensayo (8,5 g/l de NaCl, 1g/l de triptona) hasta un volumen final de 30 ml. Luego las muestras de heces resuspendidas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos en tubos Falcon de 50 ml. Se filtró un ml de cada muestra de heces a través de un filtro previo Millex AP20 y seguidamente a través de un filtro Minisart de 0,45 µm. Una vez resuspendidas, todas las muestras de heces se guardaron a +4°C, porque los fagos T4 son sensibles a los ciclos repetidos de congelación-descongelación.

15

##### Cultivo bacteriano

20 Todas las cepas de *E. coli* se diseminaron en caldo Hershey que contenía 2 ml de tiamina (2 mg/ml) por litro en un tubo de vidrio con un volumen final de 5 ml, en agitación (240 rpm) a 37°C, para incubarlo por la noche. Después del cultivo las cepas se inocularon por estrías en una cápsula de Petri (agar de Hershey), a fin de obtener colonias individuales. Para evitar pasadas en serie en el caldo (que podrían seleccionar mutantes) se inició un nuevo cultivo a partir de 3 colonias individuales cada vez que era necesario. Los cultivos madre se guardaron a 4°C como cultivos por punción.

##### 25 Ensayo de placas

Se obtuvieron placas de fagos sobre agar de Hershey suplementado con tiamina y recubierto con una capa de agar blando de Hershey inoculado con 200 µl de un cultivo nocturno recién desarrollado y 100 µl de muestra de heces o de lisado celular. Las cápsulas de Petri se incubaron por la noche a 37°C.

30

##### Aislamiento de placas y amplificación de fagos

35 Las placas individuales, recogidas con palillos e inoculadas en 5 ml de caldo Hershey suplementado con tiamina, se inocularon con 1% de un cultivo recién desarrollado y 1% de lisado fágico. La incubación se efectuó a 37°C durante unas 5 horas, agitando a 240 rpm. Al producirse la lisis se añadieron 3 gotas de cloroformo mezclando suavemente. El lisado se dejó por la noche a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Para obtener reservas de fagos, el sobrenadante se recuperó cuidadosamente, evitando el cloroformo, y se transfirió a un tubo de vidrio con tapón de rosca. Se agregaron tres gotas de cloroformo fresco y la reserva de fagos se almacenó a 4°C. Para amplificar los fagos se usó la cepa K-12 o la O127:K63 (B74-9). Para los diferentes aislados fágicos se utilizó la siguiente nomenclatura: JS (iniciales de Josette Sidoti, que realizó la inspección de los fagos), seguido del número de identificación del paciente. En el caso de múltiples aislados del mismo paciente, a este número le siguió otro (p.ej. JS61.2). Si el segundo aislado provenía de una segunda muestra de heces del paciente (convaleciente), el segundo número se marcaba con apóstrofo (p.ej. JS65.2'). Para los fagos aislados del agua medioambiental, tras las iniciales se añadió una D (Dhaka) o una L (Lausanne) y un identificador del aislado fágico (p.ej. JSL.4).

45

##### Ensayo por puntos

50 Sobre una capa base de agar de Hershey suplementado con tiamina se vertió una mezcla de 3,5 ml de agar blando de Hershey con 200 µl de un cultivo de *E. coli* recién desarrollado. Una vez solidificado se depositaron sobre el agar blando 10 µl de extracto de heces filtrado, repartidos en 8 puntos según el sentido de las manecillas del reloj. La incubación se realizó por la noche a 37°C.

##### Lisis en tubos

55 Se inocularon 5 ml de caldo Hershey con 1% de un cultivo recién desarrollado. La incubación se mantuvo durante un tiempo, entre 3 y 5 horas, cuando las células de control no infectadas alcanzaron la fase de crecimiento estacionario. La densidad óptica en la célula inoculada con fagos se comparó visualmente con la densidad óptica en la célula de control infectada simuladamente.

##### 60 Purificación de fagos

65 Para purificar los fagos análogos a T4 se inoculó con 1% de K-12 un litro de medio de Hershey que contenía tiamina; las células se cultivaron hasta una DO de 0,1 y luego se infectaron con una mdi (multiplicidad de infección) mayor que 1. Se agregó NaCl al lisado hasta una concentración de 0,5 M y se incubó durante 1 hora a 4°C. Después de centrifugar a 10.000 rpm (16 min. a 4°C) en una centrífuga Sorvall RC5B se añadió polietilenglicol al sobrenadante hasta una concentración final del 10%. El lisado se incubó durante la noche a 4°C, agitando suavemente. Los fagos

precipitados con PEG se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 16 min. y el sedimento se resuspendió en 3 ml de tampón fágico (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM). El sedimento fágico resuspendido se aplicó sobre un gradiente discontinuo de CsCl (1,35 g/ml, 1,53 g/ml y 1,65 g/ml de CsCl). Los gradientes se centrifugaron en un rotor SW55 a 40.000 rpm durante 3 h a 4°C con una ultracentrífuga Beckman L8-60M.

## RESULTADOS

### Aislamiento de fagos

Los fagos de *E. coli* se pueden aislar de material clínico (p.ej. heces) o de muestras medioambientales (p.ej. del alcantarillado). Los trabajos previos indicaban que raramente se aíslan fagos de las muestras de heces de individuos sanos; los títulos de fagos eran bajos y la mayoría de aislados eran fagos templados (Furuse, K., 1987, Distribution of coliphages in the environment: general considerations [*Distribución de colifagos en el ambiente: consideraciones generales*]. En: Phage Ecology, p. 87-124, J.Wiley, Nueva York). En cambio las muestras de heces de pacientes con diarrea dieron una gran incidencia de fagos y mayores títulos, en comparación con las muestras de heces de los controles sanos, y la mayoría de aislados fueron de fagos virulentos. Para aumentar la posibilidad de aislamiento de fagos análogos a T4 trabajamos con muestras de heces de niños ingresados con diarrea aguda en la sala general de una gran clínica de diarrea en Dhaka/Bangladesh. En la tabla 1 se resumen los aspectos estadísticos del análisis de los fagos.

**Tabla 1. Estadísticas del análisis de fagos**

Nº de pacientes sucesivos con diarrea aguda inscritos en el programa de análisis	157
Nº de pacientes con pares de muestras de heces (agudos y convalecientes)	52
Nº de muestras de heces excluidas del análisis	17
Motivo de la exclusión	Infecciones por cólera o <i>Shigella</i> confirmadas
Periodo de muestreo	6.2.2000 hasta 25.2.2000
Lugar	Dhaka/Bangladesh
Edad del paciente (intervalo)	1 mes hasta 4 años
Sexo (V:H)	96:61
Nº de pacientes que dan placas de fagos sobre células indicadoras K 12 / nº de pacientes analizados (% de positivos)	26/140 (19)
Intervalo de títulos fágicos (ufp/g de heces)	30* - 5 x 10 <sup>4</sup>
Nº de pacientes con título > 10 <sup>3</sup> / > 10 <sup>4</sup> ufp/g	10/6
Nº de muestras de heces que dan placas de fagos sobre B74-9 / nº de muestras analizadas (% de positivos)	18/129 (14)
Intervalo de títulos fágicos (ufp/g de heces)	30* - 2 x 10 <sup>4</sup>
Nº de muestras de heces ensayadas tanto sobre K 12 y como sobre B74-9 para detectar fagos	118
- negativo en ambos	86
- positivo en ambos	4
- positivo solo en K 12	14
- positivo solo en B74-9	14
<i>Notas: * límite de detección del ensayo</i>	
<i>Etiología promedio de las enfermedades diarreicas en los niños de Bangladesh de &lt; 3 años: 26% rotavirus, 26% Campylobacter, 15% E. coli, 7% V. cholerae O1, 9% otros Vibrios, 4% Shigella, &lt; 1% Salmonella.</i>	

Se controlaron muestras de heces de 157 pacientes de diarrea aguda durante un periodo de tres semanas. Los pacientes no estaban seleccionados y el muestreo se realizó según la disponibilidad de enfermeras para tomar y guardar las muestras. De 52 pacientes se tomó una segunda muestra de heces al recibir el alta del hospital. Se excluyeron diecisiete muestras de heces, porque se pudo descartar una diarrea por *E. coli*: 5 pacientes tenían el cólera (demostrado por la detección de vibrios en heces tipo "agua de arroz" al microscopio de campo oscuro) y 12 pacientes tenían disentería por *Shigella* (diagnosticada por motivos clínicos: heces mucosas y sanguinolentas). En conjunto ambos patógenos suman el 11 por ciento de los pacientes hospitalizados. Esta cifra corresponde a la tasa media de detección de dichos patógenos en los pacientes de diarrea de este hospital (7% de *Vibrio cholerae*, 4% de especies de *Shigella* spp.).

Con un límite de detección de 30 ufp (unidades formadoras de placa)/g de heces, el 19 por ciento de las muestras de heces dio resultado positivo al ensayarlas sobre la cepa de *E. coli* K-12 no patógena de laboratorio. La mayor cantidad de fagos transmitidos a las heces por cualquiera de los pacientes fue de 5 x 10<sup>4</sup> ufp/g de heces, pero solo un 4 por ciento de ellos presentó un título tan alto de fagos en heces. Un porcentaje algo menor de pacientes tuvo fagos detectables en la cepa de EPEC patógena O127:K63 (una tasa de detección del 14%). Solo cuatro muestras de heces dieron resultado doblemente positivo de fagos en la cepa de laboratorio y en la cepa de *E. coli* patógena,

mientras que 14 fueron positivas solo para K-12 y otras 14 solo para la cepa de EPEC O127:K63. Aparentemente con las dos células indicadoras de *E. coli* diferentes detectamos dos poblaciones distintas de fagos con un mínimo solapamiento en la gama de huéspedes. Es interesante que la tasa de detección del 14% en la célula indicadora de *E. coli* patógena corresponde estrechamente a la tasa de detección media de cepas patógenas de *E. coli* en las muestras de heces de los pacientes de diarrea en Bangladesh (15%).

También se analizó la presencia de fagos en distintas fuentes de agua (de grifo, de sumideros, aguas residuales, de canales, estanques, de alcantarilla, del mercado, de la calle, de río, de acequias) de Dhaka/ Bangladesh. De casi un centenar de muestras (aproximadamente 10 de cada fuente de agua) se obtuvieron y amplificaron seis bacteriófagos diferentes. Uno de ellos era de agua del grifo, tres de agua de sumideros y una de aguas residuales). Las aguas del alcantarillado de Lausanne (Suiza) también dieron seis aislados de fagos.

En la cepa de *E. coli* de laboratorio la detección de fagos fue menor en las muestras de convalecencia que en las muestras de diarrea aguda (4 frente a 11 muestras positivas, 52 pares de muestras de heces estudiadas). En la cepa de *E. coli* patógena se aisló una cantidad de fagos comparable de las muestras de convalecencia y de las muestras de diarrea aguda (5 frente a 4 muestras positivas, 16 muestras de heces estudiadas).

Todas las placas detectadas en células K-12 se pudieron amplificar por crecimiento en cultivo líquido sobre K-12. Los títulos de fagos oscilaron entre  $2 \times 10^4$  y  $4 \times 10^{10}$  ufp/ml. La mediana del título fue  $10^9$  ufp/ml. No hubo ninguna correlación entre el título amplificado y el tamaño de placa (grande, mediano, pequeño o como punta de alfiler) o el título inicial de las heces. Análogamente, las placas detectadas en la cepa EPEC O127:K63 se pudieron amplificar hasta  $1.5 \times 10^8$  ufp/ml en esta cepa patógena de *E. coli*.

#### Población diana de cepas de *E. coli* causantes de diarrea

Los aislados de fagos se seleccionaron con la gama de huéspedes más amplia en 50 cepas patógenas de *E. coli* procedentes de los principales serotipos aislados de pacientes de diarrea pediátrica a escala mundial. La tabla 2 revela algunas de estas cepas. Esta serie de cepas cubre 14 antígenos O somáticos diferentes que reflejan distintas cadenas laterales de carbohidrato del antígeno lipopolisacárido (LPS) y además 14 antígenos capsulares K distintos que también reflejan diferentes composiciones polisacáridas del material capsular bacteriano. Asimismo poseemos una colección de los principales serotipos de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) aislados a escala mundial de pacientes de gastroenteritis pediátrica y de diarrea del viajero adulto (tabla 2). Estas cepas de ETEC representan además 14 antígenos O diferentes y 13 antígenos H diferentes. Estos últimos son antígenos proteicos del flagelo bacteriano. Las cepas de ETEC también se han podido subdividir según su producción de enterotoxinas. Ocho cepas produjeron enterotoxinas termolábiles (LT) y enterotoxinas termoestables (ST). Dos cepas produjeron solamente la enterotoxina termolábil y cuatro solo la enterotoxina termoestable.

Tabla 2. Tipo patógeno, serotipo O, K y H de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea de la colección Nestec

Código Nestec	Serotipo O:K (H)	Tipo patógeno: factores de virulencia	Fagos en heces
B74-20	<b>O18</b> :K77	EPEC	16
B74-24	O20:K84	EPEC	4
B74-7	<b>O26</b> :K60	EPEC	10
B74-26	O44:K74	EPEC	-
B75-45	<b>O55</b> :K59	EPEC	7
B74-10	<b>O86</b> :K61	EPEC	13
B74-1	O111:K58	EPEC	10
B74-28	O112:K66	EPEC	6
L74-30	<b>O119</b> :K69	EPEC	5
B75-46	O124:K72	EPEC	0
B74-14	<b>O125</b> :K70	EPEC	5
B74-16	<b>O126</b> :K71	EPEC	-
B74-9	O127:K63	EPEC	-
M75-53	O128:K67	EPEC	-
R81-116	<b>O6</b> :H16	ETEC: LT+/ST+	15
R81-117	O8:H9	ETEC: LT+/ST+	0
R81-118	O15:H11	ETEC: LT+/ST+	12
R81-119	<b>O25</b> :H42	ETEC: LT+/ST+	12
R81-120	O78:H12	ETEC: LT+/ST+	11
R81-121	<b>O115</b> :H51	ETEC: LT+/ST+	8
R85-141	O128:H18	ETEC: LT+/ST+	0
R85-145	O148:H28	ETEC: LT+/ST+	14
R85-147	<b>O114</b> :H49	ETEC: LT+/ST-	-
R85-149	O159:H21	ETEC: LT+/ST-	-

R85-137	O20:H11	ETEC: LT-/ST+	7
R85-138	O27:H7	ETEC: LT-/ST+	1
R85-144	O63:H-	ETEC: LT-/ST+	-
R85-152	O153:H12	ETEC: LT-/ST+	9

*Nota: la primera columna indica el código interno NRC de la cepa de E. coli; la segunda columna indica el serotipo somático O, capsular K o flagelar H de la cepa; los serotipos con O en negrita indican cepas de E. coli aisladas también de diarrea canina (Sancak 1997); la tercera columna indica el tipo patógeno (EPEC: enteropatógeno, ETEC: E. coli enterotoxigénica; LT, ST son enterotoxinas termolábiles y termoestables); la cuarta columna indica el número de aislados de fagos de las heces que lisan la cepa de E. coli indicada (se ensayaron 32 aislados de fagos de heces).*

#### **Análisis de la gama de huéspedes de los fagos aislados**

5 En la primera ronda se aislaron 32 fagos de muestras de heces de pacientes con diarrea. Estos fagos se ensayaron sistemáticamente en las 50 cepas de *E. coli* causante de diarrea de nuestra colección combinada de células. En una segunda ronda se obtuvieron otros aislados de fagos con una amplia gama de huéspedes.

10 Como el ensayo de gama de huéspedes implica un gran número de combinaciones de fagos ( $n= 32 \times 50 = 1600$  en 50 cepas de *E. coli*) empleamos el ensayo por puntos para el análisis. En este ensayo se pueden analizar al mismo tiempo ocho lisados diferentes de fagos amplificados, depositando una gota del lisado de fago amplificado sobre la capa bacteriana en una cápsula de Petri. Los resultados se leen después de incubar durante la noche y se registran como positivos si el crecimiento de las bacterias ha sido perjudicado o impedido en el área donde se ha depositado la gota. Los resultados de algunos aislados de fagos se presentan en la tabla 3 y se resumen en la tabla 4.



ETEC LT-/ST+;CS4;CS6	X	X								X	X	X	X
ETEC LT+/ST+;CS1;CS3	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC LT+/ST+;CS5;CS6													
ETEC LT+/ST+;CS5;CS6													
EPEC	X	X	X	X	X					X	X		X
EPEC	X	X	X	X	X					X	X	X	X
EPEC	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC O6:H16	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC O8:H9													
ETEC O15:H11	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC O25:H42	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC O78:H12	X	X								X	X	X	X
ETEC O115:H51	X	X								X	X	X	X
ETEC O20:H11	X	X	X	X						X	X		
ETEC O27:H7										X			
ETEC O128:H18													
ETEC O63:H-	X	X								X	X	X	
ETEC O148:H28	X	X	X	X						X	X	X	X
ETEC O153:H12												X	X
EPEC O18:K77	X	X	X	X						X	X	X	X
EPEC O20:K84	X	X								X	X		
EPEC O26:K60	X	X								X	X	X	X
EPEC O55:K59			X							X			X
EPEC O86:K61	X	X	X	X	X					X		X	
EPEC O111:K58	X	X	X	X						X	X		X
EPEC O112:K66		X	X	X						X	X		
EPEC O119:K69	X	X								X	X		
EPEC O124:K72													
EPEC O125:K70	X	X								X	X		

Notas a la tabla 3: susceptibilidad de la cepa de *E. coli* indicada en la primera columna a la infección con la cepa de fago indicada en la primera fila. Véase la tabla 5 para la caracterización más detallada de las cepas de fago. La segunda fila proporciona información de la cepa de *E. coli* en la cual se ha propagado el fago (K: K-12 no patógena; O: O127:K63 patógena). "X" indica inhibición del crecimiento en el ensayo por puntos, el espacio en blanco significa crecimiento como punto de control (infección simulada).

Comparando distintos aislados de fagos del mismo paciente se obtuvieron resultados casi idénticos. Por ejemplo, se amplificaron dos placas diferentes de la muestra de heces del paciente 146. El fago NCC-JS146.1 dio positivo en 35 células, mientras que el fago NCC-JS146.2 infectó 36 de las 50 cepas ensayadas. Menos una excepción, hubo una coincidencia perfecta entre ambos fagos con respecto a la gama de huéspedes (tabla 3). Se vieron coincidencias similares para dos fagos aislados de la muestra aguda y convaleciente de un solo paciente: los fagos NCC-JS65.1 y NCCJS65.2' del paciente 65 infectaron respectivamente las cepas 26 y 25 de *E. coli*. De nuevo, exceptuando un caso, hubo una coincidencia perfecta de la gama de huéspedes (tabla 3). Esta gran correlación de resultados entre

aislados de fagos independientes del mismo paciente demuestra la fiabilidad del ensayo por puntos.

La gama de huéspedes fue radicalmente diferente para los fagos propagados en la cepa de laboratorio no patógena K-12 o en la cepa patógena O127:K63. Los primeros fagos pudieron crecer en una mediana de 26 cepas de *E. coli* patógenas, mientras que los últimos solo crecieron en una mediana de 1 cepa patógena, además de la célula de propagación (tabla 4). Esto queda ilustrado con la muestra de heces del paciente 114, que fue una de las pocas muestras de heces (n = 3) que produjo fagos tanto en K-12 como en O127:K63. El fago K-12 amplificado infectó 24 cepas patógenas, mientras que el fago amplificado O127:K63 solo infectó una cepa (tabla 4).

**Tabla 4: caracterización de los 36 fagos aislados de las muestras de heces de pacientes con diarrea pediátrica en Dhaka**

Código	Cepa de propagación	Tamaño de placa	Ensayo por puntos positivo
NCC-JS9	K	m	33
NCC-JS31	K	g	27
NCC-JS102.2	K	m	9
NCC-JS150	K	s	3
NCC-JS61.1	B	s	5
NCC-JS77.1	B	pp, t	0
NCC-JS83.1	B	s, t	1
NCC-JS20	B	s	7
NCC-JS1	K	m	28
NCC-JS4	K	m	35
NCC-JS22	K	m	17
NCC-JS32	K	s	21
NCC-JS114.1	K	m, t	24
NCC-JS	K	m	6
NCC-JS146.1	K	s	35
NCC-JS65.1	K	s	26
NCC-JS65.2'	K	m	25
NCC-JS89	B	m	1
NCC-JS114.2	B	s, t	1
NCC-JS124	B	m	2
NCC-JS76.1	B	s	4
NCC-JS77.2'	B	pp	0
NCC-JS83.2	B	m	1
NCC-JS86	B	m	1
NCC-JS76.2'	K	m	28
NCC-JS12	K	s	29
NCC-JS152	K	s	14
NCC-JS66	K	m	33
NCC-JS102.1	K	s	0
NCC-JS140.2	K	s	2
NCC-JS146.2	K	m	36
NCC-JS61.2	B	m	3
NCC-JS114.3	B	s	n.t.
NCC-JS94.1	K	m	n.t.
NCC-JS98	K	s	n.t.
NCC-JS122.1	K	g, t	n.t.

*Nota: primera columna, número de código NRC del fago aislado; la segunda columna proporciona información de la cepa de E. coli en la cual se ha propagado el fago ((K: K-12 no patógena; O: O127:K63 patógena); tercera columna, identificación del paciente por un código NRC (nombres, sexo, edad, los números de identificación de paciente de Dhaka eran accesibles, pero no se indican por motivos confidenciales); cuarta columna, a, muestra de heces aguda y c, convaleciente; quinta columna; tamaño de placa: g, grande, m, medio, s, pequeño, pp, punta de alfiler, t, turbia en contraste con placas claras; sexta columna, número de cepas infectadas según valoración del ensayo por puntos entre las 50 cepas de E. coli ensayadas.*

Varios fagos aislados de distintos pacientes estaban muy relacionados respecto a la gama de huéspedes (p.ej. los aislados NCC-JS4, NCC-JS146.1 y NCC-JS66 infectaron hasta 35 células, con una diferencia máxima de 4 células; los aislados NCCJS76.2' y NCC-JS12 que presentan solo 4 diferencias). Sin embargo solo se encontraron fagos con idéntica gama de huéspedes en los que tenían una gama de huéspedes muy limitada (los aislados NCC-JS83.1, NCC-JS89, NCC-JS114.2, NCC-JS83.2 y NCCJS86, que solo infectaron las cepas AD-24304 y O127:K63).

**Potencial lítico de los fagos aislados**

La lisis celular se valoró visualmente como falta de turbidez en el tubo incubado con la cepa de *E. coli* y el fago. El ensayo se evaluó cuando la cepa de *E. coli* no infectada había alcanzado la máxima turbidez. Así, por ejemplo, los aislados de fago NCCJS4, NCC-JS146.1, NCC-JS66 y NCC-JS146.2, que en el ensayo por puntos presentaban una gama de huéspedes amplia y muy parecida en las cepas de *E. coli* patógenas, difirieron mucho en su capacidad de lisar las cepas (tabla 5). El fago NCC-JS4 lisó 13 de las 50 células de *E. coli* ensayadas, mientras que los fagos NCC-JS146.1, NCC-JS66 y NCC-JS 146.2 solo lisaron de 4 a 5 cepas de *E. coli* que eran un subgrupo de las cepas lisadas por el fago NCC-JS 10.

**Tabla 5: lisis de las cepas patógenas de *E. coli* indicadas en caldo de cultivo por los fagos de heces (códigos NCC-JS) con la gama de huéspedes más amplia en el ensayo por puntos**

Fago JS → E. coli ↓	4	D.1	146.1	66	146.2	L.6	94.1	122.1	Lisis
ETEC LT+/ST+									0
ETEC LT+/ST+									0
ETEC LT+/ST-	+								1
ETEC LT+/ST-									0
ETEC LT+/ST-									0
ETEC LT+/ST+									0
ETEC LT+/ST+									0
ETEC LT+/ST-	+		+	+	+				4

ETEC LT+/ST-								0
ETEC LT+/ST-		+				+		2
EPEC: A/E+	+						(+)	2
EPEC: A/E+	+							1
EPEC: A/E+	+					+		2
EPEC: A/E+								0
EPEC: A/E+								0
ETEC LT+/ST+;CFA 1								0
ETEC LT-/ST+;CS4;CS6								0
ETEC LT-/ST+;CS6								0
ETEC LT-/ST+;PCF O166								0
ETEC LT+/ST+;CS1;CS3								0
ETEC LT-/ST+;CFA1		+						1
ETEC LT-/ST+;CS4;CS6								0
ETEC LT+/ST+;CS1;CS3		+				(+)		2
ETEC LT+/ST+;CS5;CS6								0
ETEC LT+/ST+;CS5;CS6								0
EPEC		(+)					+	2
EPEC		(+)						1
EPEC								0
ETEC O6:H16								
ETEC O8:H9						+		1
ETEC O15:H11								0
ETEC O25:H42	+		+	+	+			4
ETEC O78:H12								0
ETEC O115:H51							(+)	1
ETEC O20:H11								0
ETEC O27:H7								0
ETEC O128:H18								0
ETEC O63:H-								0
ETEC O148:H28	+							1
ETEC O153:H12								0
EPEC O18:K77	+							1
EPEC O20:K84	+		+	+	+		+	5
EPEC O26:K60	+							1
EPEC O55:K59	+		+	+	+	+		5

<b>EPEC O86:K61</b>									<b>0</b>
<b>EPEC O111:K58</b>							+		<b>1</b>
<b>EPEC O112:K66</b>	+		+	+					<b>3</b>
<b>EPEC O119:K69</b>							+		<b>1</b>
<b>EPEC O124:K72</b>	+								<b>1</b>
<b>EPEC O125:K70</b>									<b>0</b>

5 Nota: en la primera columna se indica el número NRC de los aislados de *E. coli* con sus códigos NRC (véanse respectivamente las tablas 3 y 2 para mayor información sobre las cepas). En las columnas 2-9 "+" y "(+)" significa lisis y lisis parcial, respectivamente, de la cepa de *E. coli* indicada en la fila correspondiente, por el fago de la columna indicada. Columna 10: número de aislados de fagos diferentes que lisan la cepa de *E. coli* indicada (número total de fagos ensayados: 8).

10 El crecimiento de las células K-12 no infectadas e infectadas con fagos fue seguido por lecturas de DO (figura 1). Se observaron dos tipos distintos de desarrollo de la DO. En el primer tipo las células infectadas siguieron el desarrollo de la DO de las células no infectadas hasta unos 70 a 90 minutos después de la infección. A esta fase le siguió un descenso de la DO en las células infectadas y aproximadamente a los 150 minutos de la infección se alcanzó la DO de fondo. En un segundo tipo de infección, manifestado por la mayoría de los fagos, las células infectadas con fagos mostraron una desviación mucho más temprana del desarrollo de la DO respecto a la célula de control no infectada.

15 El descenso hasta los niveles de fondo se observó aproximadamente a los 190 minutos de la infección (figura 1).

#### Purificación de los fagos

20 Se inocularon seis fagos distintos en volúmenes de un litro de cultivos de K-12 y se obtuvieron títulos de fagos entre  $6 \times 10^7$  y  $10^{10}$  unidades formadoras de placa (ufp)/ml. Los fagos del lisado se precipitaron con polietilenglicol y el sedimento de fagos resultante se siguió purificando por centrifugación con gradiente de densidad de CsCl. Las bandas de fago localizadas en el gradiente de CsCl se recuperaron y se dializaron para liberarlos de la disolución salina.

25 La tabla siguiente documenta la eficiencia del procedimiento de purificación de fagos mediante el control de la cuantía de la capacidad de infección viral recuperada. Los mayores títulos iniciales de capacidad de infección por fagos se observaron con el fago NCC-JS10; sin embargo este fago fue el más difícil de recuperar. La recuperación del fago fue del 0,3 al 5% del material infeccioso inicial. Para otros fagos la recuperación fue en general del 10%, como mínimo, y podía llegar hasta el 40% de la capacidad de infección inicial en el lisado crudo.

30

**Tabla 6: recuperación de fagos análogos a T4 después de precipitar con polietilenglicol (PEG) y dializar tras la centrifugación con gradiente de densidad (CsCl)**

Fago	Lisado	PEG	CsCl
NCC-JS146.1 (1)	$6 \times 10^{10}$	$3 \times 10^9$ (5%)	$1,8 \times 10^{10}$ (30%)
NCC-JS146.1 (2)	$6 \times 10^{10}$	$2 \times 10^9$ (3%)	$9 \times 10^9$ (15%)
NCC-JS114.3 (1)	$1 \times 10^{12}$	$6 \times 10^{11}$ (60%)	$4 \times 10^{11}$ (40%)
NCC-JS114.3 (2)	$1 \times 10^{12}$	$4 \times 10^{11}$ (40%)	$2 \times 10^{11}$ (20%)
NCC-JS94.1 (1)	$4 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{10}$ (8%)	$6 \times 10^{10}$ (15%)
NCC-JS94.1 (2)	$4 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{10}$ (5%)	$3 \times 10^{10}$ (8%)
NCC-JS4 (1)	$1 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{11}$ (2%)	$8 \times 10^9$ (0,8%)
NCC-JS4 (2)	$1 \times 10^{13}$	$1 \times 10^{11}$ (1%)	$3 \times 10^9$ (0,3%)
NCC-JS4 (3)	$1 \times 10^{11}$	$2 \times 10^9$ (2%)	$5 \times 10^9$ (5%)

Nota: la primera columna identifica el aislado de fagos, los resultados de los ensayos independientes están diferenciados por el número entre paréntesis; la segunda columna indica la cantidad total de fago en 1 litro de lisado celular, expresada en unidades formadoras de placa; la tercera columna indica la cantidad total de unidades formadoras de placa en el sedimento de PEG con el porcentaje de recuperación respecto a la cantidad en el lisado entre paréntesis; la cuarta columna indica la cantidad total de unidades formadoras de placa en la banda del fago dializado del gradiente de densidad de CsCl con el porcentaje de recuperación respecto a la cantidad en el lisado entre paréntesis.

**Ejemplo 2: caracterización de fagos con un tamaño de genoma de 170 kb**

## MATERIAL Y MÉTODOS

5 **Electroforesis en campo pulsado (PFGE)**

10 Unos bloques de PFGE de agarosa al 1% que contenían  $10^6$  unidades formadoras de placa del fago indicado se incubaron durante la noche en un tampón de lisis (EDTA 0,05 M, Tris 10 mM pH 8,0, 1% de SDS y 50 µg de proteinasa K) y se lavaron tres veces durante una hora en 10 ml de of TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Estos bloques se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (TBE al 0,5%: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) durante 20 horas a 6 V/cm, 14°C con un tiempo de pulso de 1-20 seg. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos.

15 **Purificación de ADN**

Los fagos purificados se trataron con proteinasa K a una concentración final de 1 mg/ml durante 2 h a 37°C y se añadió acetato sódico 3 M de pH 4,3. Se extrajo dos veces ADN con fenol-cloroformo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol. Después de centrifugar, los sedimentos se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en 50 µl de TE. El ADN se digirió con enzimas de restricción según las indicaciones facilitadas por el fabricante.

20 **Microscopía electrónica**

25 Se aplicó una gota de la suspensión de fagos a rejillas de cobre recubiertas con Formvar-carbono durante 5 min.; la suspensión se eliminó con una pipeta e inmediatamente se sustituyó por una mezcla de soluciones A y B (A: 2% de molibdato amónico a pH 7,0; B: 7,5 mg de bacitracina en agua destilada). Después de 1 minuto se eliminó el líquido con papel de filtro. Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 a 80 kV (ampliación: 176.000x o 224.000x).

30 **Resultados**

Para caracterizarlas con mayor detalle se eligieron doce muestras de heces de distintos pacientes, que presentaban fagos con un genoma de 170 kb. Investigamos la morfología de estos fagos por microscopía electrónica y todos ellos eran Myoviridae con largas colas contráctiles. La gran semejanza morfológica con el bien conocido colifago T4 es obvia. Por ejemplo, la cabeza alargada medía unos 110 nm por 75 nm. Un cuello separaba la cabeza de la vaina de la cola, la cual, con una subestructura anular, medía unos 95 nm de longitud y 18 nm de anchura. La cola termina con una estructura en forma de placa basal a la cual van unidas unas púas cortas y unas fibras largas. Las fibras de la cola son de unos 150 nm de longitud y están dobladas por una articulación situada aproximadamente en la mitad de la fibra. Se observaron fagos con una vaina de cola contraída de 40 nm. En estos fagos el tubo interno de la cola se prolonga más allá de la vaina de la cola contraída. Diferentes procedimientos de tinción negativa revelaron de manera selectiva varias características morfológicas de estos fagos. Por ejemplo, la estructura anular de la vaina de la cola y sus cambios estructurales tras la contracción de la cola se visualizó mejor por tinción con acetato de uranilo, mientras que las fibras de la cola se vieron mejor con contraste negativo de ácido fosfotúngstico. Ocasionalmente se pudieron ver filamentos en el cuello.

45 Para diferenciar los aislados de fagos análogos a T4 usamos en este estudio técnicas basadas en ADN. El fago T4 contiene hidroximetilcitosina glicosilada en vez de citosina. Esta modificación hace el ADN del T4 resistente a la digestión con la mayoría de enzimas de restricción. Solo se conocen unos pocos enzimas que corten el ADN del T4 (*EcoRV*, *NdeI*, *PacI*, *Swal*, *SspI* y *SphI*). No obstante, de nueve aislados de fagos análogos a T4 seleccionados de distintos pacientes ninguno fue digerido por *EcoRV*, *NdeI*, *Swal* o *SphI*, y solo dos fueron digeridos por *SspI*, pero todos fueron cortados, al menos parcialmente, por *PacI*.

55 En la siguiente etapa sondamos el ADN del fago digerido por *PacI* en Southern blots con ADN marcado por T4. Algunos aislados mostraron una considerable hibridación cruzada con la sonda de T4, mientras que otros mostraron una hibridación cruzada más débil o carecían de homología del ADN con T4 en las condiciones de hibridación muy rigurosas.

60 Estas hibridaciones Southern se confirmaron por PCR usando un par de cebadores (FR60 y FR61) de la secuencia del gen 32 de T4 que son diagnósticos (Repoila y otros, 1994, genomic polymorphism in the T-even bacteriophages [*polimorfismo genómico en los bacteriófagos T pares*]. EMBO J 13: 4181-4192) para el subgrupo T-pares del fago tipo T4. Los fagos que tuvieron hibridación cruzada con ADN T4 en los puntos de transferencia dieron un resultado claramente positivo en este ensayo, mientras que los aislados de fagos que no tuvieron hibridación cruzada con T4 dieron bandas débiles o ninguna banda de PCR. Los aislados de fagos con resultado negativo del producto de PCR para el gen 32 se probaron de nuevo en un ensayo de PCR basado en una serie de cebadores (cebador Mzial y caps8) en la secuencia del gen 23 de T4, que permite detectar los subgrupos pseudo-T-pares y esquizo-T-pares del fago tipo T4, así como los T-pares (Tetard y otros, 2001, Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages [*Filogenia de los principales genes de cabeza y cola de los diversos bacteriófagos*]).

de tipo T4]. J. Bacteriol. 183 (1): 358-366). Todos los fagos, menos dos, dieron el producto de amplificación del g 23 diagnóstico (tabla 7). Las excepciones fueron el aislado de heces JS98 y el aislado suizo de aguas residuales JSL.3. Ambos fagos presentaban al microscopio electrónico una morfología de tipo T4 bastante habitual. En los Southern blots el JSL.3 dio una fuerte hibridación cruzada con otro aislado suizo de aguas residuales, JSL.5, pero solo de carácter débil con algunos otros fagos, incluyendo T4. El JSL.5 dio una reacción cruzada débil con varios aislados, pero en particular no con T4.

**Tabla 7. Resumen de los ensayos diagnósticos de PCR de los genes 32 y 23**

Fagos	Nº (%)	Diagnos
Nº total de fagos ensayados	47 (100)	
Nº de positivos en la PCR del gen 32	24 (51)	Fagos T-pares
Nº de negativos en el gen 32, pero positivos en la PCR del gen 23	21 (45)	Pseudo-y esquizo-T-pares
Nº de negativos en la PCR de los genes 32 y 23	2 (4)	Morfología de T4, parientes genéticamente más distantes

### Ejemplo 3: ensayos in vivo con fagos según la presente invención

#### MATERIAL Y MÉTODOS

##### Animales experimentales:

Su utilizaron ratones macho C3H de ocho semanas (en grupos de 5 o según lo anotado) para ensayos de infección. Cada ratón se mantuvo en una jaula con una parte superior filtrada. Como agua de beber se usó Vittel® estéril. Las heces se recogieron una vez al día y se resuspendieron en un ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato). Para enumerar *E. coli* se recubrió agar Drigalski (Biorad) con diluciones decimales de las heces resuspendidas. Se añadieron fagos al agua de beber. Se filtraron 0,5 ml de heces resuspendidas y se enumeraron los fagos. Se sacrificaron los ratones cuando aún había fagos en el agua y se realizó una autopsia. Se extrajeron varios órganos (colon, duodeno, íleon, yeyuno, nodos linfáticos e hígado) para analizar la presencia de *E. coli* y de fagos.

##### Actividad fágica combinada en un modelo murino in vivo:

En las dos primeras semanas se usó agua normal y luego Vittel® estéril. A la tercera semana se añadió una mezcla de cuatro fagos análogos a T4 (JS94.1, JSD.1, JS4 y JSL.6) al agua de beber, hasta una concentración final de  $10^3$  unidades formadoras de placa (ufp)/ml los primeros dos días y luego  $10^5$  ufp/ml hasta el final de la semana. A la cuarta semana se dio Vittel® estéril. Se agregaron por segunda vez fagos al agua, hasta una concentración final de  $10^7$  ufp/ml. Los fagos se controlaron a lo largo de todo el ensayo.

##### Efecto dosis-respuesta de los fagos

Igual que anteriormente se dieron los mismos fagos, alternando con agua. Se utilizaron cuatro ratones y cada uno recibió una sola concentración de fagos. El primer ratón recibió fagos a una concentración final de  $10^3$  ufp/ml, el segundo tuvo una concentración de  $10^4$  ufp/ml, el tercero recibió  $10^5$  ufp/ml y el último  $10^6$  ufp/ml de fagos. Los fagos se controlaron a lo largo de todo el ensayo.

##### Infección por fagos en ratones axénicos

Su utilizaron ratones macho C3H de ocho semanas. Como agua de beber se usó Vittel® estéril a lo largo de todo el ensayo. Se emplearon cuatro ratones. Dos de ellos fueron alimentados forzosamente con *E. coli* K12 (0,5 ml a una concentración de  $10^8$  ufp/ml). Se recogieron las heces una vez al día y se enumeraron las células de *E. coli* en placas Drigalski. Una semana después se dieron fagos a una concentración de  $10^5$  ufp/ml. Se recogieron las heces cuatro veces al día. Se recubrieron placas Drigalski con diluciones de las heces resuspendidas y se enumeraron los fagos. Tres días después se dio agua y al comienzo de la siguiente semana tuvo lugar una segunda alimentación forzada con *E. coli* ECOR5. Los fagos fueron administrados en las mismas condiciones y las heces resuspendidas se trataron como anteriormente.

#### Resultados

En una primera etapa se investigó la flora normal de *E. coli*. Se dio agua a cinco ratones durante dos semanas y luego se usó Vittel® estéril. Se recogieron las heces cada día y después de resuspenderlas se contaron las células de *E. coli* en un medio selectivo. En ratones corrientes encontramos que la flora normal de *E. coli* variaba desde  $10^5$  hasta  $10^7$  ufp/g (fig. 2). El promedio marcado con la recta negra es lineal ( $R^2 = 0,0002$ ) e igual a  $10^6$  ufp/g, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Poulsen y otros (1994, Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ Hybridisation [*Distribución espacial de Escherichia coli* en el intestino grueso de ratón, inferido por hibridación in situ de ARNr]. Infect. Immun. 62(11): 5191-5194). Dos semanas después

se introdujo una mezcla diluida de fagos análogos a T4 directamente en el agua de beber. Durante un par de días se añadió una concentración de  $10^3$  ufp/ml al agua y se recuperaron los fagos de las heces a una concentración de  $10^3$  ufp/ml, lo cual indica que los fagos pudieron sobrevivir a través del tracto intestinal. La flora normal de *E. coli* no se ve afectada por la presencia de fagos. Aunque se aumente la concentración hasta  $10^5$  ufp/ml durante una semana, el nivel de *E. coli* aún es de unas  $10^6$  ufp/ml y los fagos recuperados de las heces oscilan entre  $10^5$  y  $10^6$  ufp/g. Cuando se dio solamente agua Vittel® estéril, ya no se recuperaron más fagos de las heces. Se observó lo mismo cuando se dieron nuevamente dos veces fagos a los ratones, a una concentración final de  $10^5$  ufp/ml y  $10^7$  ufp/ml respectivamente. La cantidad de fagos recuperada de las heces es proporcional a la recibida, lo cual indica que hay poca o ninguna amplificación de los fagos en el intestino del ratón. Tan pronto como el ratón bebió agua pura, ya no se pudo recuperar ningún fago de las heces. La flora normal de *E. coli* permaneció sin cambios, lo cual significa que la presencia de fagos en el intestino no afectó a la flora. Se practicó una autopsia cuando hubo fagos en el intestino y los resultados se muestran en la figura 4B. Se recogieron diferentes órganos. Los fagos se encontraron sobre todo en el colon y en el duodeno, mientras que en los nodos linfáticos o en el hígado no se halló ningún fago. Esto sugiere que los fagos no pasan al sistema sanguíneo. La *E. coli* está presente a un nivel muy bajo en los ratones corrientes, pues solo se observó un par de células en el colon y en el íleon.

#### Actividad lítica en ratones axénicos

La capacidad infecciosa de los fagos se ensayó en un modelo murino axénico. Se colonizaron dos ratones macho axénicos C3H de ocho semanas de edad con *E. coli* K12. Se obtuvo un nivel de  $10^8$  ufp/g, que es mayor que en los ratones corrientes, pero normal para ratones axénicos (Poulsen y otros). Cuando se añadieron fagos al agua de beber, en medio día se recuperaron fagos de las heces a una concentración realmente alta, lo cual indica que los fagos lisaron K-12 en el intestino y se multiplicaron. En este medio día el nivel de *E. coli* descendió llamativamente. Un día después aún había un gran nivel de fagos, pero la *E. coli* pudo sobrevivir y mantener una concentración de  $10^5$  ufp/g. Incluso cuando los fagos se quitaron del agua, aún estaban presentes en las heces y en 3 días se había observado un descenso de dos unidades logarítmicas.

Tras una alimentación forzada con ECOR5, que es un aislado de *E. coli* de flora humana normal, los ratones se colonizaron de nuevo a un nivel elevado de *E. coli* (unas  $10^{10}$  ufp/g). El ECOR5 no es afectado por el fago JS94.1, ya empleado en este ensayo y por esta razón la colonización fue rápida y estable. Incluso al agregar nuevamente fagos al agua de beber, el recuento de células permaneció invariable, mientras que el título de fagos alcanzó la concentración dada a los ratones en el agua.

Cuando ya no hubo presencia de fagos en el intestino se realizó una autopsia y los resultados están representados en la figura 4A. La *E. coli* parece colonizar sobre todo el colon y la parte delgada del intestino. También se determinó el título de fagos y no se halló ninguno (datos no representados) en cualquiera de los órganos ensayados.

#### Diferentes fagos sobreviven al paso por los intestinos

Alternadamente se dio agua Vittel® estéril una semana y fagos a una concentración final de  $10^7$  ufp/ml a la semana siguiente. Se ensayaron cuatro fagos diferentes (JS4, JSD.1, JSL.6 y JS94.1 respectivamente). Se trataron cuatro ratones con fagos y el último ratón sirvió de control y solo recibió agua Vittel® estéril. Los fagos se controlaron a lo largo de todo el ensayo.

En este ensayo dimos a cinco ratones los fagos análogos a T4 que componían la mezcla del ensayo anterior uno por uno. Todos los fagos reaccionaron igualmente. Los fagos se añadieron al agua y un día después se recuperaron de las heces a la misma concentración que se había dado. Cuando se eliminaron los fagos del agua, transcurridas 24 horas ya no se encontraron más fagos en las heces. Cualquiera que fuese el fago empleado en el agua de beber se obtuvieron los mismos resultados.

Si se dan cuatro concentraciones distintas de estos fagos a cuatro ratones diferentes, se puede observar un efecto dosis- respuesta. Si se usa una concentración muy baja ( $10^3$  ufp/ml), los fagos están presentes en las heces, pero no de manera estable. Al aumentar esta concentración en una unidad logarítmica, los fagos estuvieron presentes en las heces a lo largo del tratamiento y se recuperaron a un nivel elevado. Con una o más unidades logarítmicas se observó lo mismo.

#### Ejemplo 4: comida seca para mascotas

Se prepara una mezcla alimenticia compuesta aproximadamente por 58% en peso de maíz, 5,5% en peso de gluten de maíz, 22% en peso de carne de pollo, 2,5% de achicoria desecada,  $10^6$  ufp/ml de cóctel de bacteriófagos, sales, vitaminas y minerales hasta completar el resto. La mezcla se introduce en un aparato de acondicionamiento y se humidifica. La mezcla humidificada se introduce luego en una extrusora de cocción, donde se gelatiniza. La matriz gelatinizada atraviesa una placa perforada al salir de la extrusora y se corta en pedazos adecuados para alimentar perros, se seca a unos  $110^\circ\text{C}$  durante 20 minutos y se enfría, para formar un granulado.

Esta comida para perros puede prevenir o tratar trastornos infecciosos causados por enterobacteriáceas patógenas

tales como infecciones por *E. coli* o *Salmonella*, gastroenteritis, enfermedades diarreicas o urinarias en mascotas.

**Ejemplo 5: fórmula nutricional**

- 5 Se prepara una composición nutricional que contiene por 100 g de polvo: 15% de hidrolizado proteico, 25% de grasas, 55% de carbohidratos (incluyendo 37% de maltodextrina, 6% de almidón, 12% de sacarosa), trazas de vitaminas y oligoelementos para cumplir las necesidades diarias, 2% de minerales y 3% de humedad, y  $10^6$  ufp/ml de un cóctel de bacteriófagos.
- 10 Se mezclan 13 g de este polvo con 100 ml de agua. La fórmula resultante está pensada especialmente para prevenir gastroenteritis, diarrea o enfermedades urinarias en humanos.

**REIVINDICACIONES**

- 5       **1.** Preparación de aislado de fagos con potencial lítico contra enterobacteriáceas patógenas, para usar en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por enterobacteriáceas patógenas en humanos o en animales, de modo que las enterobacteriáceas patógenas están escogidas de cepas de *E. coli* o *Salmonella*, y el preparado es un fago Myoviridae virulento y no tóxico análogo a T4, elegido del grupo formado por CNCM I-2763, CNCM I-2764, CNCM I-2765 y CNCM I-2766.
- 10       **2.** El aislado de fagos según la reivindicación 1, en que las infecciones son gastroenteritis y enfermedades diarreicas o urinarias en humanos o en animales.
- 3.** El aislado de fagos según la reivindicación 1 o 2, en que la cantidad del aislado de fagos es de al menos  $1 \cdot 10^4$  ufp (unidades formadoras de placas)/ml.
- 15       **4.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la administración a un individuo de una cantidad efectiva de al menos una preparación de aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición que la contenga.
- 20       **5.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento o la prevención de gastroenteritis por *E. coli* en niños, que consiste en administrar una composición que contenga al menos un aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25       **6.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento o la prevención de la diarrea del viajero o de infecciones por ETEC en un individuo, que consiste en administrar una composición que contenga al menos un aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30       **7.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento o la prevención de infecciones urinarias en humanos o animales, que consiste en administrar una composición que contenga al menos un aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35       **8.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento o la prevención de la diarrea por *E. coli* en mascotas, que consiste en administrar una composición que contenga al menos un aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40       **9.** El aislado de fagos según una de las reivindicaciones 1 a 8, el cual se suministra en forma de un producto alimenticio o comida para mascotas, una composición nutricional, un suplemento o una composición farmacéutica.
- 10.** Uso de una preparación de aislado de fagos con potencial lítico contra enterobacteriáceas patógenas, para preparar un producto alimenticio o una comida para mascotas, una composición nutricional o un suplemento, en la cual las enterobacteriáceas patógenas están escogidas de cepas de *E. coli* o *Salmonella* y el preparado es un fago Myoviridae virulento y no tóxico análogo a T4, seleccionado del grupo constituido por CNCM I-2763, CNCM I-2764, CNCM I-2765 y CNCM I-2766.
- 45       **11.** El uso según la reivindicación 10, en que la cantidad del aislado de fagos es de al menos  $1 \cdot 10^4$  ufp (unidades formadoras de placas)/ml.
- 50       **12.** Un producto alimenticio o una comida para mascotas, una composición nutricional, un suplemento o una composición farmacéutica que lleva al menos un aislado de un fago Myoviridae virulento y no tóxico análogo a T4, seleccionado del grupo constituido por CNCM I-2763, CNCM I-2764, CNCM I-2765 y CNCM I-2766.
- 13.** El producto alimenticio o la comida para mascotas según la reivindicación 12, que contiene una cantidad del aislado de fagos o de una mezcla de aislados de fagos de al menos  $1 \cdot 10^4$  ufp (unidades formadoras de placas)/ml.
- 55       **14.** El producto alimenticio o la comida para mascotas según la reivindicación 12 o 13, en que la cantidad del aislado de fagos es de al menos  $1 \cdot 10^4$  ufp (unidades formadoras de placas)/ml.

FIG. 1.

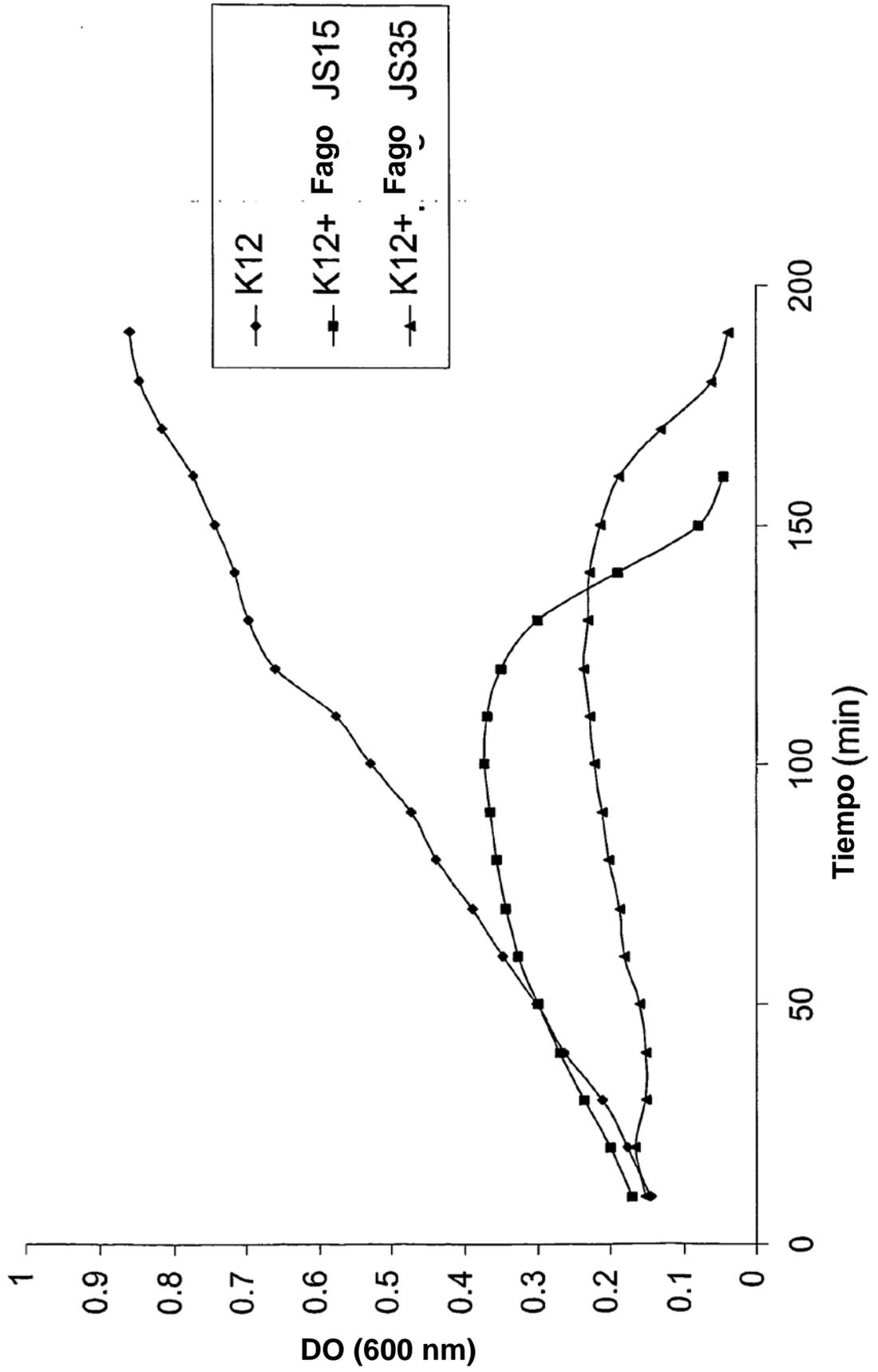


FIG. 2

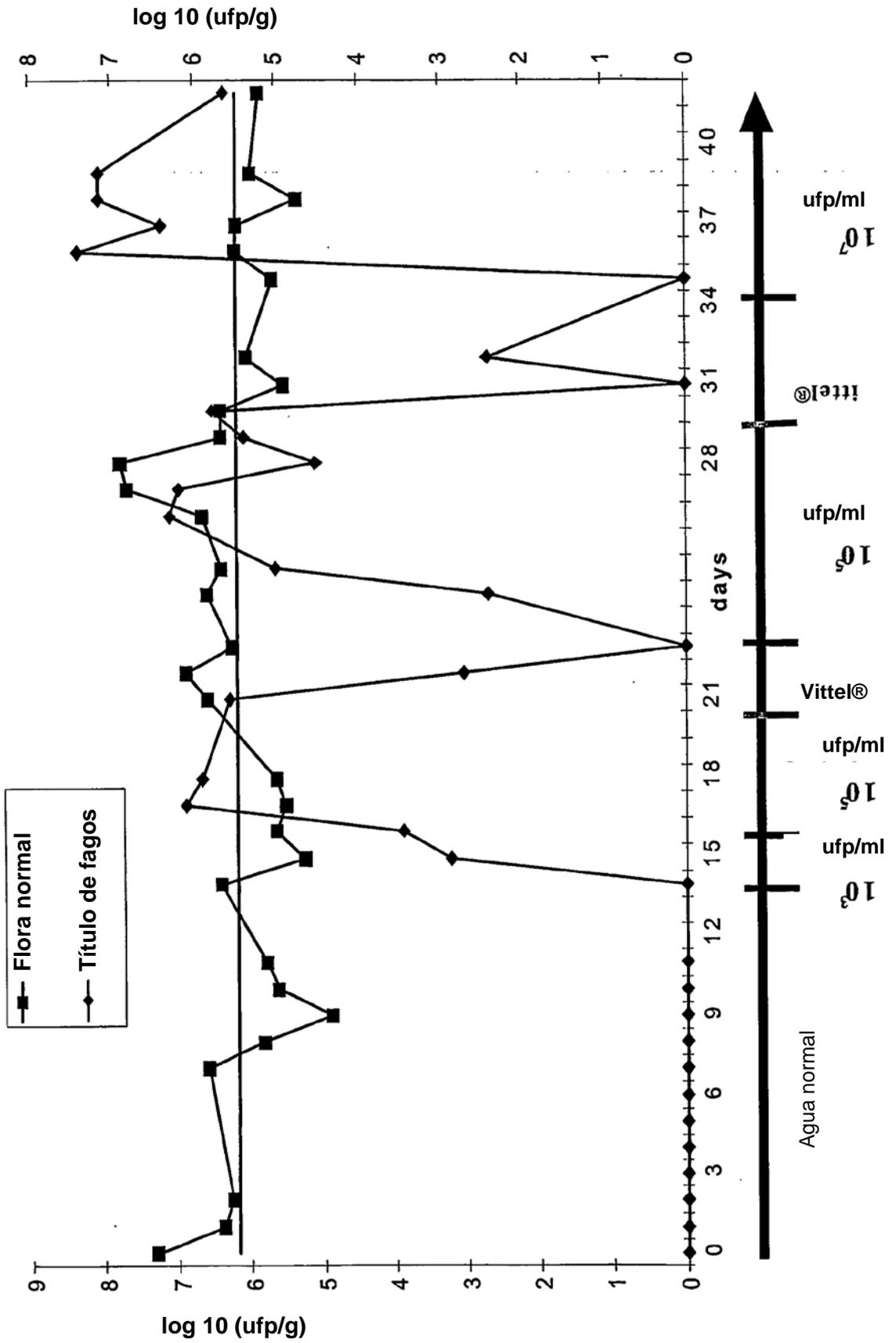


FIG 3

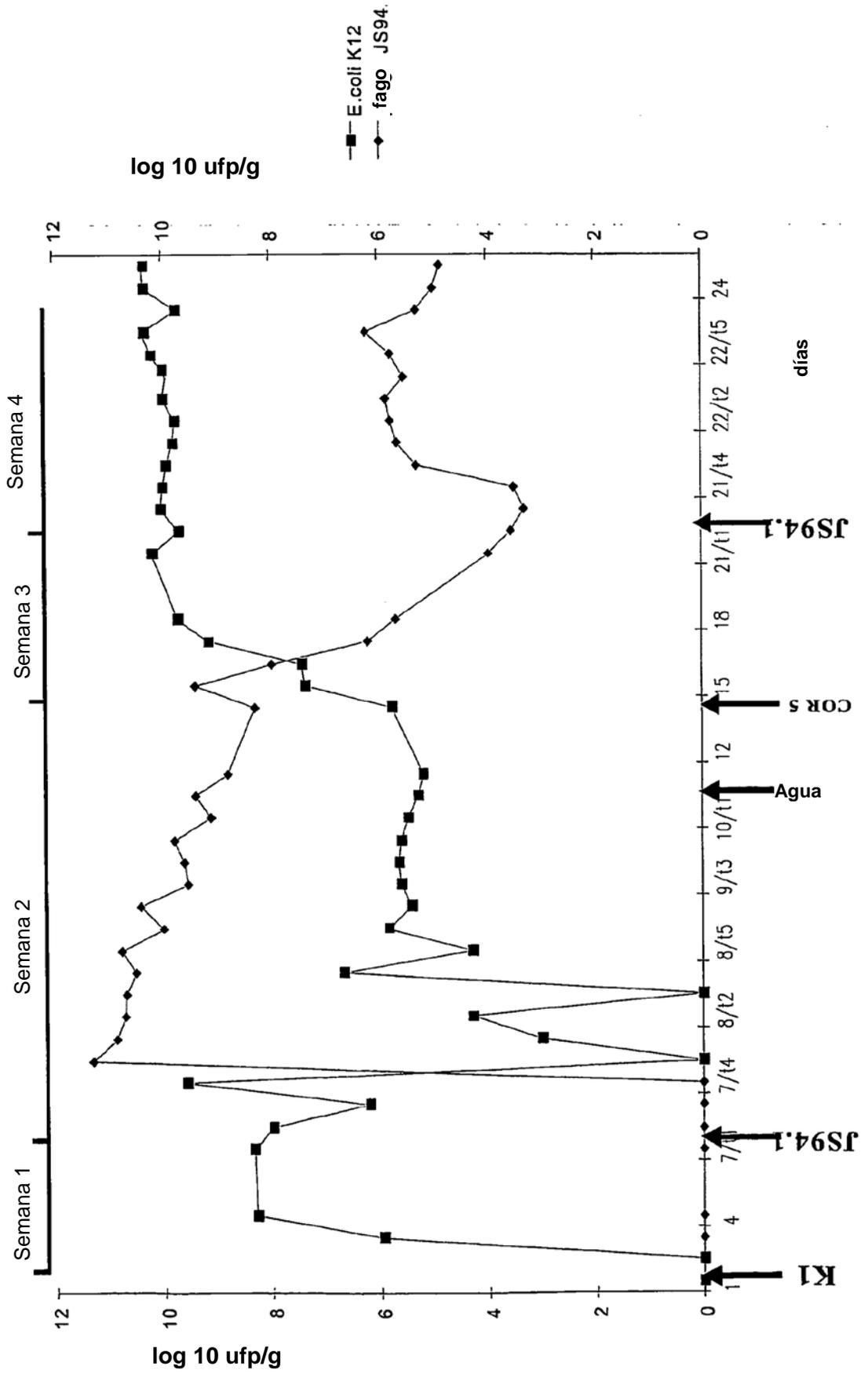


FIG 4A

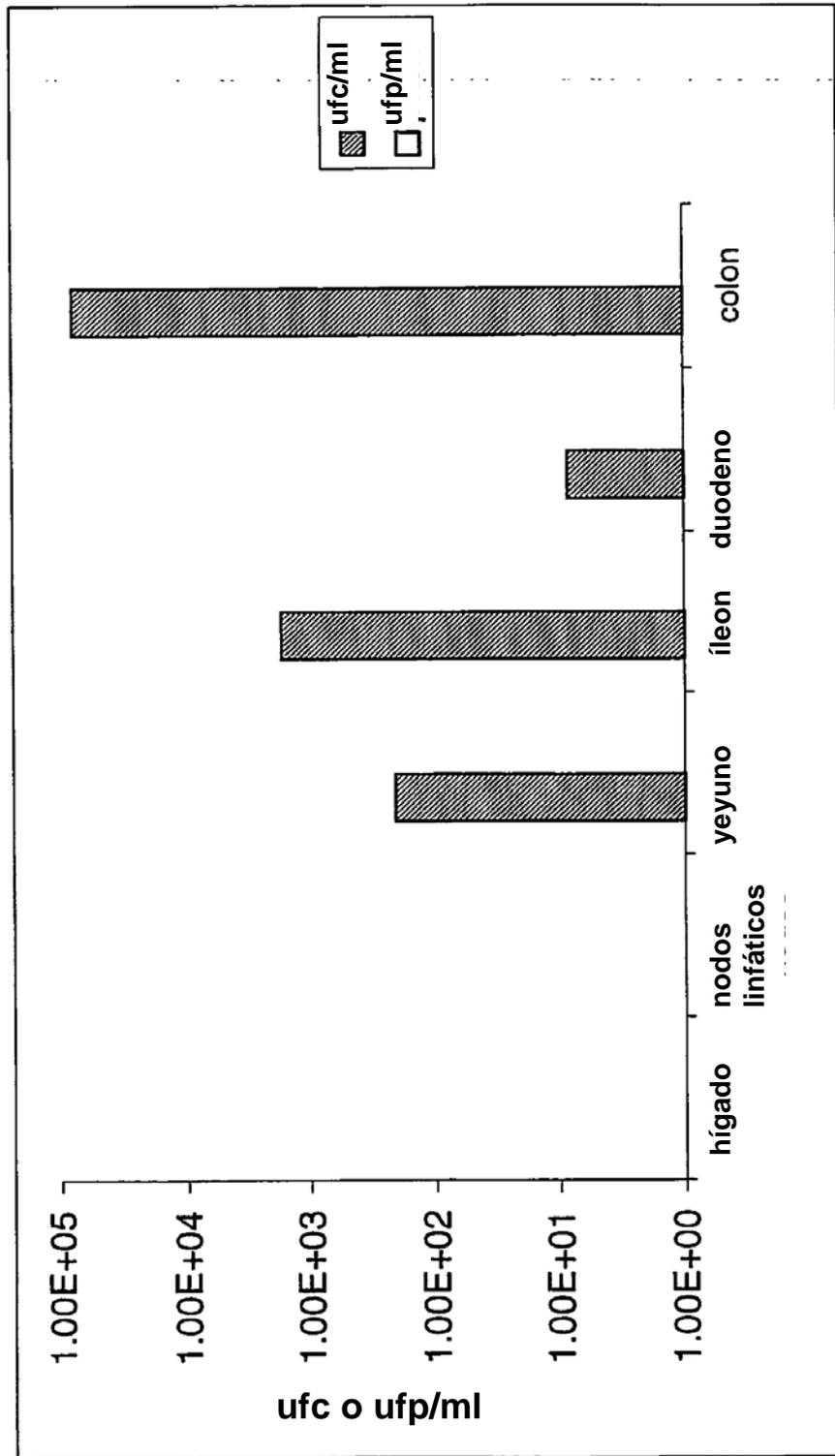


FIG 4B

