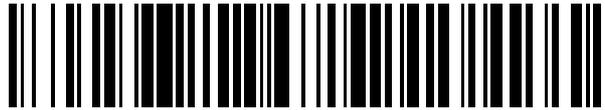


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 053**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04783131 .8**

96 Fecha de presentación: **03.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1663302**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54

Título: **Método para la vacunación de aves de corral mediante un lisado bacteriófago**

30

Prioridad:

**03.09.2003 US 499339 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**04.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**04.12.2012**

73

Titular/es:

**ALPHARMA, LLC (100.0%)  
Five Giralda Farms  
Madison NJ 07940, US**

72

Inventor/es:

**PASTERNAK, GARY R.;  
SULAKVELIDZE, ALEXANDER y  
BROWN, TORREY**

74

Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 392 053 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

Método para la vacunación de aves de corral mediante un lisado bacteriófago.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 1. Campo de la invención

La presente invención está dirigida al campo de la vacunación para el tratamiento o prevención de enfermedades bacterianas. En particular, está dirigida a una bacterina de lisado de fagos para uso en vacunación de aves.

10

## 2. Descripción de la técnica relacionada

*Salmonella en pollos*

15

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estima que entre el 50% al 75% de los casos de salmonella humana el microorganismo se adquiere de la carne, las aves de corral o los huevos, sirviendo las aves de corral como principal vehículo de transmisión. La *Salmonella* es parte de la flora intestinal colonizadora normal en muchos animales, incluyendo los pollos. Estudios realizados a principios de los años 1990 por el USDA indicaron que entre el 20% al 25% de los cuerpos de pollo y el 18% de los cuerpos de pavo estaban contaminadas con *Salmonella* antes de la venta. Véase Food Safety and Inspection Service (1995); 9 CFR Part 308; Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Proposed Rule; 60 Fed. Reg. 6774-6889.

20

Según el sistema de vigilancia CDC FoodNet/*Salmonella*, las cinco especies aisladas de *Salmonella* humana más comunes en los Estados Unidos durante 1990 a 1995 fueron *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport* y *S. hadar*. Además, según los datos de USDA/FSIS, los cinco serotipos de *Salmonella* más comunes aislados de pollos para consumo durante el mismo periodo fueron *S. heidelberg*, *S. kentuckii*, *S. hadar*, *S. typhimurium* y *S. thomson*.

25

Hay fuertes incentivos de salud pública, regulatorios y comerciales para que los productores reduzcan los niveles de contaminación por *Salmonella* en las aves de corral. Además de la enfermedad humana, la contaminación microbiana de animales que son muy susceptibles a patógenos microbianos conduce a menudo a enfermedades y a un aumento de la morbosidad animal. En operaciones comerciales de cría de animales en las que los animales pueden agolparse en instalaciones donde se han criado previamente otros animales, la probabilidad de tal contaminación es a menudo grande. Esto es particularmente cierto en el caso de la salmonella en la industria avícola. Véase Suzuki, S., "Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry". International Journal of Food Microbiology 21:89-105 (1994). La infección con especies de Salmonella puede causar enfermedades significativas en las manadas de aves de corral. Suzuki señala que tipos no tifoides de *Salmonella*, que incluyen *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, causan infecciones tanto manifiestas como asintomáticas en las aves de corral. Se pueden producir brotes agudos en aves jóvenes y bajo condiciones de estrés, con tasas de mortalidad que se aproximan al 20% en algunos casos y retrasos en el crecimiento de los polluelos de las manadas afectadas. La *S. enteritidis* puede causar pericarditis, focos hepáticos necróticos, endurecimiento del saco vitelino remanente, diversas anomalías ováricas, peritonitis y posible afectación renal. Consistente con esto, se pueden recuperar organismos desde el corazón, hígado, bazo, intestino ciego, saco vitelino, ovario, oviducto, peritoneo, huevo y heces de aves infectadas. Como otro ejemplo, Muir et al. ("Comparison of Salmonella typhimurium challenge models in chickens", Avian diseases, 42:257-264, 1998) compararon dos modelos diferentes de Salmonelosis aviar utilizando un desafío oral o propagación desde camadas infectadas. En ambos casos, la *S. typhimurium* fue recuperada fácilmente tanto del bazo como del hígado.

30

35

40

45

La protección contra la colonización por *Salmonella* requiere la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa que implica el sistema inmunitario mucosal. Las primeras tres semanas de vida son un periodo crítico bien conocido durante el cual los polluelos recién salidos del cascarón están en riesgo de colonización por *Salmonella* (Smith, "The development of the flora of the alimentary tract in young animals", Journal of Pathology and Bacteriology, 89:95-122, 1965; Barnes, et al., "The intestinal flora of the chicken in the period 2 a 6 weeks of age with particular reference to the anaerobic bacteria", British Journal of Poultry Science, 13:311-326, 1972). Se cree que la respuesta inmunitaria mucosal adaptativa, específica, mediada por tejido linfoide asociado al intestino es un determinante crítico de si se produce o no la colonización (Fukotome, et al., "Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated Salmonella enterica serovar enteritidis antigen", Developmental & Comparative immunology, 25:475-484, 2001; Muir, et al., "Immunity, vaccination and the avian intestinal tract", Developmental & Comparative immunology, 24:325-342, 2000).

50

55

60

65

La vacunación por vía del tracto intestinal aviar produce una respuesta inmunitaria mucosal adaptativa. Varios estudios recientes demuestran que la inmunización oral de los pollos produce una respuesta inmunitaria adaptativa al patógeno al que está dirigido la vacuna. Allen et al., por ejemplo, utilizando una cepa de *S. typhimurium* atenuada, demostraron que la inmunización oral dio como resultado una respuesta de IgA por parte de las células B en la lámina propia intestinal y en el bazo (Allen, et al., "Kinetics of the mucosa antibody secreting cell response and evidence of specific lymphocyte migration to the lung after oral immunization with attenuated *S. enterica* var. Typhimurium", FEMS Immunology and Medical Microbiology, 27:275-281, 2000). Fukotome, et al., demostraron que

- la inmunización intraocular con una preparación de antígeno de *Salmonella* liposomal produjo una respuesta inmunitaria secretora en el intestino que fue capaz de inhibir la adherencia de *S. enteritidis* a células HeLa en un modelo de la adhesión que se produce en la colonización intestinal. La inmunización con *Salmonella* puede proteger contra la colonización, como se muestra en los estudios de Van Immerseel, et al. ("The effect of vaccination with a *Salmonella enteritidis* aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens", *Vaccine*, 20:3034-3041, 2002). Ellos mostraron que la administración de una vacuna mutante viva dio como resultado protección contra la colonización del hígado y el bazo. En la revisión de estrategias para la inducción de inmunidad mucosal, Muir et al. describieron estudios que utilizaron *Salmonella typhirium* viva atenuada como vacuna para proteger a los pollos contra especies patógenas de *Salmonella* (véase Curtiss, et al., "Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry", *Veterinary Immunology and immunopathology*, 54:365-372, 1996; Hassan, et al., "Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella typhirium* strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes", *Infection and Immunity*, 62:5519-5527, 1994).
- La inmunización *in ovo* ha resultado ser muy exitosa para agentes tales como el virus de la Enfermedad de Newcastle (véase Muir, et al.), pero ha visto poco uso para agentes bacterianos. Quizás esto es atribuible a la variable respuesta inmunitaria que se sabe que se produce después de la inmunización oral, lo que puede, de hecho, dar como resultado a veces una respuesta supresiva en lugar de una beneficiosa. Un caso donde la vacunación *in ovo* ha resultado ser eficaz es en el estudio de Noor y colaboradores ("In ovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens", *British Journal of Poultry Science*, 36:563-573, 1995), que inyectaron *Campylobacter* matado por calor en el fluido amniótico en el día 16 de incubación, seguido de un refuerzo oral en algunos animales en el día 7 después de la salida del cascarón. Este procedimiento dio como resultado una sorprendente respuesta de IgA intestinal específica.
- Hasta la fecha, los métodos de vacunación para la reducción de la colonización de *Salmonella* han conseguido sólo un éxito parcial. Los métodos para la vacunación de *Salmonella* han empleado cepas atenuadas (Alderton, et al., "Humoral responses and Salmonellosis protection in chickens given a vitamin-dependent *Salmonella typhirium* mutant", *Avian Diseases*, 35:435-442, 1991; Hassan, et al., (1993) "Effect of infective dose on humoral immune responses and colonization in chickens experimentally infected with *Salmonella typhirium*", *Avian Diseases*, 37:19-26), o preparaciones de antígenos de *Salmonella* preparados por sonicación y extracción con detergentes de bacterias (Hassan, et al., (1993); Methner, et al., "Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonization in newly hatched chicks using live attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains, o a competitive exclusion product", *International Journal of Food Microbiology*, 35:223-230, 1993). Otros métodos inmunológicos han empleado la vacunación de manadas de ponedoras para promover la transferencia de anticuerpos maternos (Methner, et al., "Wirksamkeit maternaler Salmoneller-antikörper gegen eine orale Testinfektion von Küken mit *Salmonella enteritidis*", *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 110:373-377, 1997). Es probable que la naturaleza del antígeno, la ruta de administración y la localización anatómica de la respuesta inmunitaria adaptativa, y la elección del tiempo oportuno de inmunización sean todos ellos factores críticos. Es importante señalar que hay un informe en la bibliografía de patentes donde la inoculación *in ovo* con un bacteriófago aumentó la tasa de eclosión de huevos infectados simultáneamente con *Salmonella typhirium* (Taylor, et al., patente de EE.UU. 2.851.006). Este estudio no examinó, sin embargo, a los polluelos en cuanto a los niveles de colonización.
- La bibliografía científica describe el uso de una bacterina de *Salmonella* oral administrada *in ovo* y posteclosión para inducir una respuesta inmunitaria adaptativa y reducir el porcentaje de aves colonizadas por especies de *Salmonella*, actuando principalmente mediante el sistema inmunitario mucosal. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de métodos mejorados para proteger los animales, especialmente las aves de corral, contra la colonización y/o infección bacteriana mediante vacunación.
- Vacunación *in ovo***
- La conveniencia de inyectar materiales en huevos aviares durante la incubación ha sido reconocida desde hace algún tiempo. Inicialmente, el propósito de inyectar huevos era preparar diversas vacunas utilizando el huevo como medio de cultivo para la vacuna. Desarrollos más recientes han implicado inyectar huevos embrionados vivos con el fin de llevar a cabo algún efecto beneficioso o terapéutico sobre el embrión o el ave que sale finalmente del cascarón. Tales efectos beneficiosos incluyen aumento del crecimiento, disminución de las tasas de mortalidad posteclosión, aumento de las tasas de crecimiento potencial o tamaño final del pollo resultante, resistencia a las enfermedades debido a vacunación *in ovo*, aumento del porcentaje de eclosión de los huevos incubados, y características físicas mejoradas de otro modo de las aves nacidas.
- Los ejemplos de sustancias que han sido propuestas como alternativas de tratamiento viables (o material para vacuna cosechable) para la administración por inyección *in ovo* de embriones aviares incluyen vacunas de cultivos vivos, antibióticos, vitaminas, e incluso medios de exclusión competitiva (un organismo replicante vivo). Se describen ejemplos específicos de sustancias de tratamiento en la patente de EE.UU. N° 4.458.630, de Sharma et al, y la patente de EE.UU. N° 5.028.421, de Fredericksen et al.
- Se han descrito varias técnicas básicas para inyectar materiales en huevos embrionados vivos, que incluyen forzar

fluidos a través de la cáscara del huevo utilizando presurización y formar físicamente una abertura en la cáscara de un huevo y añadir después el material deseado (p.ej., inyección utilizando disposiciones de jeringuillas y agujas). Un método tradicional ha sido la inyección de huevos con jeringuilla a mano.

- 5 Para administrar material a los huevos de una manera rutinaria, particularmente en la producción comercial de huevos, sería preferible emplear algún tipo de dispositivo de inyección automatizado. Por ejemplo, se han descrito varios dispositivos automáticos para inyectar huevos. Estos incluyen las patentes de Sandhage, patente de EE.UU. N° 3.377.989, y de Miller, patentes de EE.UU. Nos. 4.040.388; 4.469.047; y 4.593.645, y de Hebrank, patente de EE.UU. N° 4.681.063. Sandhage describe un dispositivo de inyección de huevos manual para inyectar unos cuantos  
10 huevos al mismo tiempo, pero no describe ningún método o sistema para manejar grandes números de huevos rápidamente y de manera precisa. La patente N° 4.040.388 de Miller describe un aparato automatizado para inyectar los extremos más pequeños de los huevos y resellar los agujeros producidos, y la patente N° 4.469.047 de Miller muestra un dispositivo automatizado algo diferente para inyectar huevos por sus extremos más grandes, del saco de aire. La patente N° 4.681.063 de Hebrank describe un sistema de inyección automatizado para los embriones dentro  
15 de los huevos que tiene un sistema de administración de fluidos avanzado que elimina el bombeo de fluidos mediante sistemas de manejo de fluidos convencionales y reduce o elimina de este modo la posibilidad de contaminación del fluido y proporciona una administración de volumen más precisa de tales fluidos. Existen otros dispositivos alternativos para la inyección automatizada de huevos, como se describe con más detalle más adelante.
- 20 Sigue habiendo una acuciante necesidad de eliminar infecciones en la producción de aves de corral, tanto por los beneficios de salud para el ave en sí como para disminuir la probabilidad de transmisión de microorganismos patógenos a través de la cadena alimentaria finalmente hasta el consumidor de productos de pollo y pavo al detalle. Sin embargo, antes de la presente invención los problemas asociados a todos los otros métodos para disminuir la contaminación de las manadas no han sido resueltos. Ejemplos de tales problemas incluyen el uso de antibióticos en  
25 los piensos y el coste de la descontaminación ambiental de las instalaciones de producción de aves de corral.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

Es un objeto de esta invención proporcionar una composición inmunogénica mejorada para uso en vacunación de  
30 aves.

Este y otros objetivos son abordados por una o más de las siguientes realizaciones.

- En una realización, esta invención proporciona una bacterina de lisado de fagos para uso en la vacunación de un animal necesitado de inmunización, que comprende una cantidad de bacterina de lisado de fagos suficiente para  
35 inducir una respuesta inmunitaria en dicho animal, en donde dicha bacterina comprende partículas de bacteriófagos y fragmentos bacterianos y es producida por lisis de una bacteria patógena por bacteriófagos que consisten en uno o más bacteriófagos líticos, y en donde dicha bacterina causa que el animal cree anticuerpos o cualquier otra respuesta adaptativa contra una enfermedad causada por dicha bacteria patógena en dicho animal, y en donde la bacterina de lisado de fagos está sustancialmente exenta de bacterias vivas, enteras, y en donde dicho animal necesitado de inmunización es un ave. En un modo preferido, la bacterina se administra por vía oral. La bacterina de lisado de fagos puede ser administrada en una pluralidad de dosis secuencialmente, y las dosis secuenciales pueden ser espaciadas a lo largo de un periodo de una a diez semanas. En otro modo preferido, al menos una dosis de dicha bacterina se administra *in ovo*.

- 45 Esta invención proporciona una bacterina de lisado de fagos que comprende partículas de bacteriófagos y fragmentos bacterianos producidos por lisis por fagos, estando dicha bacterina sustancialmente exenta de bacterias vivas, enteras.

- En otra realización, esta invención proporciona una bacterina de lisado de fagos producida inoculando una suspensión de bacterias vivas con un bacteriófago lítico para las bacterias e incubando la suspensión inoculada hasta que sustancialmente todas las bacterias en la suspensión son lisadas. Alternativamente, la bacterina de lisado de fagos es producida inoculando una suspensión de bacterias vivas con un bacteriófago lítico para las bacterias e incubando la suspensión inoculada hasta que una parte sustancial de las bacterias en la suspensión son lisadas, retirando después sustancialmente todas las bacterias vivas, enteras, de la suspensión para producir la bacterina.  
50

- Los huevos de incubadora pueden ser vacunados para reducir la infección de *Salmonella* en una manada (1) proporcionando una bacterina de lisado de fagos que comprende al menos un bacteriófago, y (2) inyectando dicha bacterina en un huevo fertilizado bajo condiciones apropiadas para disminuir o eliminar la colonización del ave nacida del huevo por microorganismos de *Salmonella*. La introducción de la bacterina puede ser llevada a cabo  
60 inyectando la bacterina *in ovo* en cualquier compartimiento del huevo, incluyendo el cuerpo del embrión. Por regla general, el huevo en el que la bacterina es introducida es incubado hasta la eclosión.

- Las aves de corral pueden ser vacunadas para reducir la colonización bacteriana de una manada (1) proporcionando una bacterina de lisado de fagos que comprende al menos un bacteriófago, y (2) tratando las aves con la bacterina bajo condiciones que permiten a la bacterina ser eficaz en causar una disminución o eliminación de la colonización de las aves por microorganismos patógenos. Las aves pueden ser tratadas con la bacterina de lisado de fagos  
65

mediante dosificación oral en el agua de bebida, por inyección o por pulverización. Las aves pueden ser tratadas con bacterina a cualquier edad, tal como dentro de los primeros cinco días después de la salida del cascarón, en el día de la eclosión, o la bacterina puede ser administrada a los huevos por inyección, incluyendo por inyección automatizada.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que compara la reducción en la contaminación por *Salmonella* obtenida a las tres semanas de edad por inyección de los huevos con lisado de bacteriófagos seguido de pulverización de los polluelos con el lisado.

10 La Figura 2 es un gráfico que compara la reducción en la contaminación por *Salmonella* obtenida a la edad de mercado por inyección de los huevos con lisado de bacteriófagos seguido de pulverización de los polluelos con el lisado.

La Figura 3 es un gráfico que compara la reducción en la contaminación por *Salmonella* obtenida a la eclosión por inyección de los huevos con lisado de bacteriófagos.

15 La Figura 4 es un gráfico que compara la reducción en la contaminación por *Salmonella* obtenida a las tres semanas de edad por inyección de los huevos con lisado de bacteriófagos seguido de pulverización de los polluelos, en comparación con inyección de los huevos sola o pulverización de los polluelos sola.

20 La Figura 5 es un gráfico que compara la reducción en la contaminación por *Salmonella* obtenida a la edad de mercado por inyección de los huevos con lisado de bacteriófagos seguido de pulverización de los polluelos, en comparación con inyección de los huevos sola.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

25 La bacterina se define en medicina como una vacuna compuesta por bacterias debilitadas o muertas que causarán que el cuerpo cree anticuerpos o cualquier otra respuesta inmunitaria adaptativa contra la enfermedad causada normalmente por las bacterias en la vacuna.

30 Para esta invención, la bacterina de lisado de fagos se define como una composición que comprende bacterias y/o fragmentos de bacterias matadas por bacteriófagos líticos que inducirán una respuesta inmunitaria, bien celular o bien humoral. Los componentes bacterianos en tal composición son producidos por infección de bacterias por bacteriófagos líticos seguido de la producción de nuevas partículas de bacteriófagos liberadas en una lisis posterior de las bacterias, en lo que se denomina un estallido lítico. Sustancialmente todas las bacterias en la suspensión son matadas por la infección, lo que significa que al menos 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 99% de las bacterias en la suspensión son matadas por los bacteriófagos. Preferiblemente, las bacterias vivas residuales son retiradas por medios tales como centrifugación o filtración, para hacer a la bacterina bacteriológicamente estéril, particularmente en cuanto al organismo bacteriano huésped utilizado para preparar la bacterina.

35 En los primeros días de la investigación de bacteriófagos, se reportó que los lisados de bacteriófagos podrían ser eficaces en incitar inmunidad protectora contra diversas cepas bacterinas (d'Herelle, F, *Le Bacteriophage: Son Role dans l'immunité*, Paris, Masson et Cie, 1921). Muchos trabajadores de ese periodo creían que los lisados de fagos eran superiores a las preparaciones de bacterias enteras para vacunación para prevenir enfermedades (Wollman, et al., "Le phenomene d'Herelle et la reaction de fixation", *Comptes Rendues de la Societé de Biologie*, 85:772, 1921; Hauduroy, P., *Le bacteriophage de d'Herelle*, Paris, Librairie le François, 1925, pp. 161-168; Compton, A., "Immunization in experimental plague by subcutaneous inoculation with bacteriophage. (Comparison of plain and formaldehyde-treated phage-lysed plague vaccine.)", *Journal of Infectious Disease*, 46:152-160, 1930; Le Louet, GM., "The bacteriophage as an agent of vaccination against the 'barbone' disease", *Journal of the American Veterinary Association*, 67:713-717, 1925). A pesar de los numerosos ejemplos de eficacia, los lisados de fagos no fueron superiores en todos los sistemas examinados. Quizá debido a un insuficiente entendimiento del sistema inmunitario en aquellos días, y a la variabilidad de los resultados observados, el estudio de los bacteriófagos como inmunógenos fue abandonado.

40 Más recientemente, Parry et al. mostraron que la *E. coli* viva fue superior a organismos matados por calor en incitar inmunidad mucosal específica (Parry, et al., "intestinal immune response to *E. coli* antigens in the germ-free chicken", *Immunology*, 32:731-741, 1977). Se pensó que las razones eran alteraciones de las bacterias que conducían a su degradación prematura en el tracto intestinal. La lisis mediada por bacteriófagos no altera la célula bacteriana mediante fijación química con, por ejemplo, reticuladores de aldehído, como se hace para algunas vacunas bacterianas atenuadas. Ni tampoco desnaturaliza macromoléculas, que es como el tratamiento por calor mata a las bacterias. Por tanto, los lisados de fagos comprenden un medio para matar eficazmente bacterias a la vez que alteran mínimamente su antigenicidad. Preferiblemente, la bacterina de lisado de fagos contiene principalmente fragmentos bacterianos producidos por el estallido causado por bacteriófagos líticos, junto con partículas de bacteriófagos liberadas por el estallido.

45 La preparación de lisados de bacteriófagos que se pueden utilizar en la bacterina de lisado de fagos de esta invención se puede llevar a cabo por procedimientos estándar, tales como los enseñados en las publicaciones internacionales números WO 01/50866, WO 01/50872, WO 01/51066 y la solicitud de patente 60/497.319. Típicamente, un cultivo de bacterias del serotipo para el que se desea inmunidad se cultiva hasta una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0,1 a 0,3 en un medio adecuado para el cultivo de las bacterias, y el cultivo bacteriano se

inocula con bacteriófagos conocidos por ser líticos para las bacterias. El cultivo inoculado con los fagos se incuba bajo condiciones que favorecen la infección por los fagos hasta que sustancialmente todas las bacterias son lisadas, lo que ocurre por regla general después de 4 a 8 horas de fermentación, cuando la OD<sub>600</sub> puede variar de 0,1 a 1,45. El lisado resultante se trata con nucleasas para degradar los ácidos nucleicos bacterianos y de los fagos y se filtra y/o centrifuga para retirar las bacterias vivas, enteras, residuales antes del uso como vacuna. La bacterina de lisado de fagos utilizada para vacunación puede contener diversos materiales fisiológicamente aceptables, pero preferiblemente estará sustancialmente exenta de bacterias vivas, enteras, y será estéril por cultivo. Para administración oral, o para administración *in ovo* donde la vacuna es ingerida oralmente por el embrión del pollo, los valores de endotoxina pueden oscilar de 10.000 a 200.000 EU/ml, determinado por el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus*, y son lo más preferiblemente mayores que 60.000 EU/ml y menores que o iguales a 500.000 EU/ml.

La vacunación utilizando la bacterina de lisado de fagos se realiza por regla general por inyección o administración oral. La inyección puede ser por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intrapleural, intravesicular o intratecal. La administración oral incluye vía rectal, inhalación, ocular, ótica o nasal, así como por la boca. La bacterina de lisado de fagos puede ser administrada por vía oral en, por ejemplo, agua mineral, opcionalmente con 2,0 gramos de bicarbonato de sodio añadido para reducir la acidez de estómago. La dosis y duración de la terapia dependerá de diversos factores, que incluyen la edad del paciente, el peso del paciente, y la tolerancia de la bacterina de lisado de fagos. Por regla general, la vacuna puede ser administrada en una dosis única o en una serie de dosis espaciadas secuencialmente para potenciar la respuesta inmunitaria. La cantidad de material bacteriano y de bacteriófago en cada dosis puede ser la misma o las cantidades pueden ser variadas para promover el efecto del estímulo. Las variaciones en el procedimiento de inmunización dentro de la experiencia de la técnica están dentro de la contemplación de esta invención.

La bacterina de lisado de fagos de esta invención se puede utilizar para desarrollar una respuesta inmunitaria protectora potenciada en aves necesitadas de protección contra la infección bacteriana.

La presente invención se puede utilizar en muchas industrias de cría de animales. Esto incluye, pero no se limita a, la reproducción, cría, almacenamiento y matanza de pollos, pavos, patos, gansos y otras especies aviares. Donde sea apropiado, la aplicación de un cóctel de bacteriófagos está dentro de la contemplación de la presente invención, incluyendo un modo preferido donde cada bacteriófago puede ser cultivado en una cepa bacteriana huésped independiente, dando como resultado la eficacia contra un intervalo más amplio de cepas bacterianas del que podría conseguirse mediante el uso de un único bacteriófago y cepa huésped. En una realización, la concentración de fagos de trabajo puede oscilar de  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml.

La presente invención proporciona el uso de la bacterina de lisado de fagos de la invención en la fabricación de una vacuna de bacterina oral para prevenir las enfermedades causadas por *Salmonella* en manadas de aves de corral reduciendo sustancialmente el porcentaje de aves colonizadas por especies de *Salmonella* en todo el ciclo de crecimiento hasta la edad de mercado. En una realización preferida, se prepara por fermentación y filtración una bacterina de lisado de fagos de *Salmonella* de proporciones iguales de *S. enteritidis*, *S. agona* y *S. newport*. El lisado es preferiblemente estéril con respecto a las bacterias. La vacuna puede ser administrada por vía oral por inyección en huevos de incubadora, por ejemplo en el Día 18 de incubación, y/o pulverizada sobre las plumas de polluelos recién salidos del cascarón.

Las vacunas de bacterina se pueden producir tanto para especies de *Salmonella* tifoideas como no tifoideas. Las especies de *Salmonella* no tifoideas para las que se producen vacunas de bacterina pueden incluir cepas de *Salmonella* de los Serogrupos B y D.

#### *Tratamiento de los huevos fertilizados*

La invención contempla el tratamiento de huevos aviares fertilizados por inyección de bacterina de lisado de fagos que contiene al menos un bacteriófago, o, más preferiblemente, un cóctel de bacteriófagos. Aunque esta realización describe el tratamiento de pollos, la invención contempla el tratamiento de pollos, pavos, patos, gansos y otras especies aviares. Después de que los huevos fertilizados son recogidos en el Sitio de Recogida de Huevos Fertilizados, los huevos fertilizados pueden ser inyectados inmediatamente con bacterina de lisado de fagos, o pueden ser incubados e inyectados con bacterina de lisado de fagos en cualquier día hasta el día de la eclosión. Preferiblemente, los huevos son inyectados entre los días 17 y 19 de incubación, sin embargo esto puede variar con la raza y el tipo de incubador utilizado. Lo más preferiblemente, los huevos son inyectados en el día 18 de incubación. Es práctica común bien conocida por los expertos en la técnica inyectar huevos fertilizados con vacunas para enfermedades aviares tales como la enfermedad de Marek durante la incubación. La bacterina de lisado de fagos se puede inyectar en huevos fertilizados o se puede mezclar con vacunas e inyectar en cualquier punto durante la incubación del huevo. No ha sido posible eliminar de manera consistente la *Salmonella* de las manadas de ponedoras, y, por consiguiente, la *Salmonella* puede estar presente dentro y sobre la superficie de los huevos fertilizados; las condiciones en incubadoras promueven la multiplicación del organismo, y los polluelos pueden llegar a infectarse según rompen la cáscara para salir del huevo. Un lavado agresivo de los huevos y el uso de desinfectantes de fuerza suficiente para eliminar toda la contaminación bacteriana no es deseable con huevos fertilizados. En este marco, inyectar bacterina de lisado de fagos directamente en los huevos puede proporcionar un

medio mejorado de inmunizar polluelos, pavipollos, anadones, ansarinos o crías de otras especies aviares recién salidas del cascarón.

*Tratamiento de polluelos recién nacidos y aves más maduras*

5 Después de que las aves salen del cascarón, las aves pueden ser pulverizadas con bacterina de lisado de fagos antes de ser transferidas a un gallinero o a una granja. Inmediatamente después de nacer, los polluelos son pulverizados con diversas vacunas virales (Newcastle, bronquitis, INDIA) que son ingeridas mientras los animales se arreglan las plumas con el pico. Un pequeño porcentaje de polluelos son positivos a *Salmonella* en este punto del tiempo (véanse los comentarios anteriores acerca de la *Salmonella* en los huevos); sin embargo, una vez  
10 introducidos en los gallineros, la contaminación se extiende rápidamente a todos los animales en el gallinero. La aplicación de la bacterina de lisado de fagos inmediatamente después de la eclosión y antes de la transferencia a los gallineros puede reducir el riesgo de que la bacteria se extienda entre los polluelos durante su alojamiento y crecimiento. Durante la cría en el gallinero o granja, las aves pueden ser provistas con bacterina de lisado de fagos en su agua de bebida, comida, o en ambos.

*Administración de bacteriófagos a huevos aviares*

Esta invención contempla la administración de bacterina de lisado de fagos a huevos por inyección. Un método tradicional de inyectar huevos es la inyección a mano. Aunque los operadores expertos pueden inyectar huevos a mano con algún éxito, la velocidad y precisión del procedimiento es limitada. Adicionalmente, la inyección a mano de  
20 huevos, incluso por operadores expertos, no siempre puede garantizar la administración con precisión continua y repetida de materiales a una ubicación particular deseada dentro de cada huevo. Como alternativa, las sustancias activas pueden ser inyectadas en los huevos mediante maquinaria automatizada. tal como el sistema Invoject (Embrex, Inc., Research Triangle Park, NC).

25 De manera similar, una técnica alternativa para tratar las aves de corral para obtener resultados deseados ha sido la inyección a mano de polluelos muy jóvenes -típicamente de un día-. Como en la inyección a mano de huevos, la velocidad y precisión son limitadas. Además, la inyección tan pronto después de la eclosión ocasiona un estrés significativo a los polluelos jóvenes.

30 Dependiendo del propósito para el que se están tratando los huevos, la ubicación de la inyección variará. Para ciertos fines, se necesita que la sustancia a ser inyectada en el huevo sea administrada al fluido amniótico cerca del extremo pequeño del huevo, para otros fines se necesita que el material sea administrado al extremo del saco de aire del huevo, y pueden incluso surgir ocasiones en que una sustancia se deba administrar al embrión en sí. No obstante, donde los huevos se están incubando para producir aves de corral vivas, se debe tener cuidado en evitar lesionar los embriones durante la inyección y administración de sustancias fluidas. Los huevos individuales, sin  
35 embargo, pueden variar ampliamente en tamaño, con diferencias asociadas acompañantes en la distancia entre la cáscara y la ubicación a la que se desea la administración de una sustancia fluida. Estas diferencias pueden complicar la tarea de suministrar de manera consistente una sustancia deseada a una ubicación particular dentro de cada uno de un gran número de huevos a una velocidad rápida.

40 Como se esperaría, cuando un dispositivo de inyección se pone en contacto con un gran número de huevos -lo que de hecho es el propósito de tal máquina- se puede producir contaminación de una cualquiera o más de las agujas. Por ejemplo, una aguja que se encuentra con un huevo que ha muerto durante la incubación puede llegar a ser contaminada fácilmente por los materiales presentes en el huevo muerto.

45 Como otra consideración en la inyección de huevos, donde se van a administrar vacunas específicas u otros materiales sensibles, la cantidad específica administrada es a menudo un parámetro importante. Esto es especialmente cierto cuando se deben administrar cantidades muy pequeñas de materiales. Por ejemplo, en algunos tratamientos de embriones aviares, a menudo se desean cantidades de microlitros. Los grandes sistemas de bombas y tuberías utilizados hasta ahora en las máquinas de inyección hace que una administración exacta y  
50 precisa de tales cantidades pequeñas sea bastante difícil.

Varios dispositivos de inyección sellan el agujero de inyección después de la inyección para impedir la fuga y contaminación. La patente de EE.UU. N° 4.593.646, de Miller et al., describe un método y aparato para la inyección automática de huevos en la que placas de soporte sostienen y posicionan apropiadamente una pluralidad de dispositivos de inyección y huevos. Cada huevo es sellado después de la inyección coagulando mediante calor la albúmina situada cerca del agujero de inyección. Después se aplica un sellante adicional a la cáscara exterior sumergiendo cada huevo en un baño del sellante. La patente N° 4.593.646 no describe sellar el huevo antes de la  
55 inyección.

60 La patente de EE.UU. N° 4.040.388, de Miller, describe un método y aparato para la inyección automática de huevos en el que el extremo pequeño del huevo orientado hacia abajo es puncionado. La parte del dispositivo que punciona el huevo es calentada en el método de la patente N° 4.040.388, supuestamente esterilizando el exterior del huevo (previniendo así la infección durante la inyección) y sellando también el agujero coagulando por calor una pequeña parte de la albúmina del huevo. La patente N° 4.040.388 no describe sellar el huevo antes de la inyección.  
65

5 La patente de EE.UU. N° 2.477.752, de Kiss, describe un método para inyectar huevos fértiles con el fin de producir polluelos que tienen un plumón de colores predeterminados. La patente N° 2.477.752 describe inyectar el huevo manualmente con una jeringuilla y después de eso sellar la abertura en el huevo. Aunque la patente afirma que se debe tener cuidado para impedir que entre aire en el huevo, no se proporciona ningún método para impedir la entrada de aire. Sellar el huevo antes de la inyección no se describe.

10 La patente de EE.UU. N° 5.136.979, de Paul et al. describe un aparato y método para inyectar una pluralidad de huevos a la misma profundidad y ubicación incluso cuando los huevos son de tamaños variables y están desalineados. El aparato incluye un medio para esterilizar las secciones de punción del huevo y la aguja después de cada inyección.

La patente de EE.UU. N° 5.056.464, de Lewis, describe un aparato y método para inyectar una pluralidad de huevos en el que se utiliza un aparato de copa de succión para sujetar cada huevo.

15 La patente de EE.UU. N° 4.903.635, de Hebrank, describe un sistema de inyección automatizado de alta velocidad en el que los huevos son alzados utilizando dispositivos de succión y se utilizan dispositivos independientes para formar una abertura en la cáscara del huevo y para inyectar una sustancia fluida.

20 Algunos dispositivos de inyección de huevos administran material a través del extremo pequeño del huevo a la albúmina. Inyectar material a través del extremo grande del huevo y al saco de aire que está por encima de la albúmina no es apropiado para la administración de todos los materiales. La administración a la albúmina, sin embargo, aumenta el riesgo de fuga de albúmina e ingreso de aire y contaminantes después de la inyección. Los métodos para inyectar material en la albúmina de los huevos de una manera rápida deben proporcionar preferiblemente medios para impedir que entren en la albúmina aire y contaminantes, y medios para impedir la fuga de albúmina, después de la inyección.

25 Convencionalmente, la inyección física se ha dirigido por regla general a posiciones preferidas dentro del huevo a fin de administrar la sustancia a regiones específicas en desarrollo del embrión. Como entienden los expertos en la técnica, según progresa el periodo de incubación hacia la madurez (es decir, la eclosión), el embrión y sus membranas, p.ej., la celda de aire, el alantoides y el saco vitelino, cambian de manera correspondiente tanto en volumen como en posición dentro de la cáscara del huevo. Adicionalmente, el volumen cuantitativo de los fluidos encerrados varía también; por ejemplo, la densidad del alantoides (fluido, sólido) varía en función del tiempo a lo largo del periodo de incubación.

30 Por tanto, la selección tanto del sitio como del tiempo de tratamiento puede afectar a la eficacia de la sustancia inyectada, así como a la tasa de mortalidad de los embriones tratados. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. N° 4.458.630, de Sharma et al, la patente de EE.UU. N° 4.681.063, de Hebrank, y la patente de EE.UU. N° 5.158.038, de Sheeks et al.

35 En una realización preferida, esta invención contempla el uso de un inyector de huevos automatizado. Un ejemplo de tal inyector es el sistema Embrex Invoject®.

40 En una realización preferida, los patógenos serán un miembro del género *Salmonella*. En una realización más preferible, los patógenos incluirán *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. kentuckii*, *S. hadar*, y *S. typhimurium*.

45 **Cócteles de bacteriófagos**

Esta invención también contempla bacterinas de lisado de fagos generadas utilizando cócteles de bacteriófagos, que pueden ser adaptados a los patógenos que son prevalentes en una cierta situación. Por regla general, se aislarían inicialmente las bacterias patógenas de una fuente particular (p.ej., una manada o ubicación contaminada tal como un gallinero) y se realizaría un ensayo de susceptibilidad de los patógenos a diversas cepas de bacteriófagos, análogo al ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Una vez que se determina cada perfil de susceptibilidad a los fagos de los patógenos, se puede formular el cóctel de fagos apropiado a partir de las cepas de fagos a las que son susceptibles los patógenos, y administrar al paciente o aplicar en el entorno. Dado que los cócteles de fagos estarán constituidos típicamente por fagos activos contra patógenos aviares y humanos transmitidos por los alimentos, el aislamiento de tales fagos sería de lo más exitoso partiendo de los desechos de granjas de aves de corral y plantas de procesamiento de aves de corral. Por regla general, el cóctel de fagos incluirá uno o más bacteriófagos acordes con esta invención. Por tanto, puede ser apropiado utilizar ciertos cócteles de fagos en establecimientos agrícolas en los que haya ciertos patógenos humanos tales como *Salmonella* y *Campylobacter* inherentes a las aves de corral o el ganado y que contaminan el entorno de tales animales de manera regular, dando como resultado una fuente continua de infección por tales patógenos.

50 Los cócteles de bacteriófagos se pueden aplicar por administración contemporánea de los diversos fagos -esto es, se pueden aplicar al mismo tiempo (p.ej., en la misma aplicación), o se pueden aplicar en aplicaciones independientes espaciadas en el tiempo, de tal modo que sean eficaces al mismo tiempo.

60 Otras bacterias que pueden ser lisadas por fagos para producir la bacterina dentro de la contemplación de la

presente invención incluyen, entre otras, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* de los serotipos K88 y F18, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium bovis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus garvieae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, especies de *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*. Otras bacterias dentro de la contemplación de la invención, tales como por ejemplo las expuestas arriba, se cultivan utilizando medios y métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estas bacterias son lisadas añadiendo bacteriófagos al medio de cultivo siguiendo los métodos descritos en la presente memoria, y la concentración de fagos se optimiza teniendo como objetivo una lisis que produzca el máximo rendimiento de antígenos. Se pueden aislar fagos líticos específicos para estas bacterias por métodos análogos a los descritos en la solicitud de patente internacional WO 01/50866.

La invención será descrita ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los dibujos. Los ejemplos son solamente para ilustración y no limitan el alcance de la presente invención de ningún modo, la cual es definida solamente por las reivindicaciones. Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas de la misma, se apreciará que son posibles numerosas variaciones, modificaciones y realizaciones, y por consiguiente todas esas variaciones, modificaciones y realizaciones han de ser consideradas dentro del espíritu y alcance de la invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Preparación de bacterina de lisado de bacteriófagos

Se produce un lisado de fagos de tres serotipos de *Salmonella* (5 cepas) por lisis independiente de las bacterias por seis bacteriófagos clonales, o monófagos. Las cepas de *Salmonella* se obtuvieron de diversas fuentes ambientales, tales como instalaciones de producción y procesamiento de aves de corral. Se aislaron bacteriófagos existentes en la naturaleza a partir de diversas fuentes ambientales de los Estados Unidos, incluyendo aguas de Chesapeake Bay, y se utilizaron sin modificación adicional. Cada uno de los monófagos fue aislado utilizando técnicas estándar de mezcla de diluciones en serie a partir de la fuente de fagos putativa con agar superior que fue llevada después a placa sobre un césped de especies de *Salmonella* contenido en agar de fondo. Las placas fueron incubadas durante una noche y se inspeccionaron las áreas de lisis bacteriana, o "placas". Las placas se aislaron, se eluyeron y se volvieron a llevar a placa en serie hasta que fueron clonales, lo que es determinado por varios rasgos, que incluyen un patrón de digestión por restricción estable, una morfología estable y homogénea por microscopía electrónica, y un intervalo de huéspedes y título lítico estables contra cepas de *Salmonella* huéspedes. Los bacteriófagos particulares se describen con más detalle en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 60/497.319. Los bacteriófagos son fagos líticos de ADN de doble hebra con cola que pertenecen a la familia Siphoviridae, clasificados por Ackerman y Berthiaume (1995, "Atlas of virus diagrams", CRC Press, Boca Raton, CL), o son fagos de ADN isométricos no clasificados.

Un lisado de fagos de *Salmonella* que contiene 3 serotipos de *Salmonella* que comprenden 4 cepas se puede preparar como sigue. Se puede utilizar un total de seis monófagos para preparar los lisados. Las cepas de *Salmonella* y los fagos utilizados para lisarlas se indican como sigue:

Cepas de <i>Salmonella</i>	Bacteriófagos
<i>S. Enteritidis</i> 378	SPT-1
<i>S. Enteritidis</i> 236	SIT-128, SDT-15
<i>S. Newport</i> 388	SBA-178, SBA-1781
<i>S. Agona</i> 121	SSE-121

Los bacteriófagos de *Salmonella* aislados SPT-1, SBA-178, SBA-1781, SIT-128, SSE-121 y SDT-15 descritos anteriormente fueron depositados el 24 de junio de 2003 en el ATCC y recibieron los Nos. de Acceso del Depósito ATCC PTA-5281, PTA-5284, PTA-5282, PTA-5285, PTA-5283 y PTA-5280, respectivamente. Se preparan lisados de fagos de *Salmonella* independientes como sigue, utilizando cada monófago enumerado en la tabla. Estos se mezclan en igual proporción.

Las reservas de fagos de trabajo fueron bacteriófagos clonales concentrados, mantenidos en suero salino tamponado con fosfato a 4°C en ampollas de vidrio selladas con un septo de caucho y anillo de retención, o como preparaciones preparadas a la misma concentración en gluconato de calcio al 5% y posteriormente liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente. Las preparaciones liofilizadas se suspenden en agua exenta de pirógenos o suero salino estéril tamponado con fosfato inmediatamente antes del uso. Se diluyen viales desechables individuales de semillas de bacteriófagos hasta 10<sup>8</sup> pfu/ml en agua, suero salino tamponado con fosfato o caldo Luria.

Las semillas bacterianas congeladas son rápidamente derretidas inmediatamente antes de la inoculación. Las bacterias se preparan como un cultivo de una noche en LB de la cepa deseada de *Salmonella*. Se prepara un subcultivo de bacterias inoculando el contenido de un vial de 0,5 ml de la bacteria en un matraz que contiene 70 ml de medio de crecimiento bacteriano. Se prepara un subcultivo de semillas de trabajo inoculando las semillas de

trabajo en un matraz que contiene un volumen apropiado de medio de crecimiento bacteriano. Los cultivos bacterianos de semillas de trabajo se incuban en un agitador a  $150 \pm 10$  rpm durante 1 día a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

El cultivo de semillas de producción se prepara inoculando el subcultivo de semillas de trabajo bacteriano en un fermentador de 10 L que contiene el medio de crecimiento bacteriano. El inóculo constituye aproximadamente el 5% del volumen total del fermentador de producción. Un volumen óptimo predeterminado de la reserva de semillas de bacteriófagos que representa uno de los monofagos se añade junto con el inóculo. La(s) reserva(s) de semillas de bacteriófagos apropiada(s) para la bacteria huésped dada se añade junto con el inóculo. Los bacteriófagos se añaden a una predeterminada multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) establecida para cada par huésped bacteriano-bacteriófago. La fermentación se lleva a cabo a  $37^\circ\text{C}$  con un seguimiento periódico o continuo de la  $OD_{600}$  hasta que se ha producido una lisis óptima para cada par huésped-bacteriófago.

Las suspensiones celulares bacterianas que contienen fagos son limpiadas de bacterias vivas y fragmentos grandes de bacterias bien por centrifugación a baja velocidad o bien por filtración de flujo tangencial. Los fluidos sobrenadantes que contienen antígenos de *Salmonella* y bacteriófagos son filtrados después a través de un filtro inerte de  $0,22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro para retirar las bacterias intactas. Después, todos los filtrados se tratan con DNasa I y RNasa A. Después de la digestión con las nucleasas, los antígenos de *Salmonella* y bacteriófagos son recogidos, lavados, concentrados e intercambiados en suero salino tamponado con fosfato por filtración de flujo tangencial. El proceso de filtración de flujo tangencial retira componentes del medio, los ácidos nucleicos digeridos y las nucleasas. El producto resultante se filtra después a través de un filtro inerte de  $0,22 \mu\text{m}$  y se maneja asépticamente.

Ejemplo 2. Inyección de huevos de pollo y tratamiento de los polluelos

El objetivo de este ejemplo era determinar los efectos de inyectar huevos y tratar polluelos en un establecimiento comercial utilizando una preparación de bacteriófagos específica para *Salmonella*. Las especies de *Salmonella* son un tipo de bacteria patógena Gram negativa encontrada a menudo en los intestinos de los animales (incluyendo los seres humanos) y en los entornos en los que se crían y procesan animales productores de alimentos (p.ej., en la tierra, el agua, la vegetación y en las superficies de los equipos, suelos y paredes). Las especies patógenas principales incluyen: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. hadar*, *S. kentuckii*, y *S. thomson*. La *Salmonella* puede causar salmonelosis, una enfermedad grave y a veces fatal. Para una completa discusión de la *Salmonella* y los riesgos para la salud humana planteados por el patógeno, véase US FDA CFSAN, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, enero de 1996, con actualizaciones (disponibles en [www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html](http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html)), el sistema de vigilancia de Salmonella CDC/Foodnet y los datos de FSIS/USDA en <http://www.foodsafety.gov> y <http://www.cdc.gov/foodnet/>.

Los bacteriófagos empleados en este experimento consistieron en un cóctel de cinco bacteriófagos dirigidos contra especies patógenas de *Salmonella*. Específicamente, la preparación consiste en cinco bacteriófagos clonales que tienen como objetivo *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. hadar* y *S. kentuckii*. Para realizar este experimento, se emparejaron al azar dos incubadoras de huevos. En el momento de la transferencia de los huevos fertilizados a la incubadora, los huevos de una incubadora fueron procesados de la manera usual en el establecimiento comercial, lo que incluyó inyección de los huevos con la vacuna para la enfermedad de Marek. Los huevos de la otra incubadora fueron inyectados con fagos específicos para *Salmonella* mezclados con la vacuna de Marek. Se introdujeron 200 ml de un cóctel de bacteriófagos a  $10^{10}$  pfu/ml de fagos en una bolsa de vacunas de 1600 ml después de la retirada previa de 200 ml de diluyente para dar cabida a los fagos. La inyección de 0,1 ml de la mezcla fagos/vacuna por huevo dio así como resultado la inyección de una dosis de  $1,25 \times 10^8$  pfu/huevo.

En el momento de la eclosión, los polluelos de la incubadora de control que recibieron la vacuna de Marek pero no los fagos fueron procesados y trasladados primero. Se recogieron 40 polluelos antes de la vacunación por pulverización y se colocaron en cajas de huevos etiquetadas para el muestreo para *Salmonella*. Los restantes 960 polluelos fueron pulverizados con 7,0 ml de vacuna de Newcastle/Bronquitis por 100 polluelos, después se llevaron a la granja para su establecimiento. Los polluelos de la granja permanecieron en las cajas para polluelos hasta que los polluelos tratados con fagos fueron entregados a la granja, de tal modo que fueron colocados cerca de agua y comida aproximadamente al mismo tiempo.

Los polluelos de los huevos tratados con fagos recibieron una segunda aplicación de fagos en el procesamiento de los polluelos con vacunas por pulverización. De nuevo, antes de la vacunación por pulverización, se recogieron 40 polluelos y se colocaron en cajas de huevos etiquetadas para muestrear para *Salmonella*. Cada caja de 100 polluelos fue pulverizada con 7,0 ml de vacuna de Newcastle/Bronquitis que contenía bacteriófagos a una concentración de  $2,5 \times 10^9$  pfu/ml. Esto dio como resultado una dosis de  $1,7 \times 10^6$  pfu/polluelo.

Los polluelos alojados en la granja fueron dispuestos en matriz de tal modo que no hubiera rastro de ningún fago en las cámaras que alojaban las aves de control. Se utilizaron cacerolas con polvos desinfectantes y se mantuvieron en cada puerta de las cámaras cerradas. El camino del flujo de paso fue diseñado para aislar los fagos. 960 polluelos de cada incubadora se pusieron en el gallinero de ensayo (1960 aves en total), con 60 aves por corral.

Los polluelos fueron muestreados periódicamente para determinar la tasa de contaminación con *Salmonella*. Para el

muestreo de las aves recién nacidas recogidas antes de la vacunación por pulverización, se recogieron los tractos gastrointestinales, se diluyeron en agua de peptona tamponada, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 horas, después se ensayaron cualitativamente en cuanto a *Salmonella* utilizando enriquecimiento con tetracionato y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa suplemental utilizando el kit de ensayo BAX<sup>®</sup> PCR (DuPont Qualicon, Inc., Wilmington, DE) según las instrucciones del fabricante.

Se muestreó un segundo grupo a las tres semanas de edad. Se recogieron los ciegos de 10 aves/corral, para un total de n=320. La recogida de especímenes se produjo a lo largo de dos días. Se registraron los pesos de los polluelos antes de recoger los ciegos. Los ciegos fueron ensayados cualitativamente en cuanto a la incidencia de *Salmonella*, utilizando enriquecimiento con tetracionato y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa suplemental utilizando el kit de ensayo BAX<sup>®</sup> PCR (DuPont Qualicon, Inc., Wilmington, DE) según las instrucciones del fabricante. Cualesquiera positivos del grupo tratado con fagos fueron aislados para un ensayo de la sensibilidad a fagos.

Se muestreó un tercer grupo a la edad de mercado. Se recogieron los ciegos de 10 aves/corral, para un total de n=160. Se registraron los pesos de los polluelos antes de recoger los ciegos. Los ciegos fueron ensayados cualitativamente en cuanto a la incidencia de *Salmonella*, utilizando enriquecimiento con tetracionato y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa suplemental utilizando el kit de ensayo BAX<sup>®</sup> PCR (DuPont Qualicon, Inc., Wilmington, DE) según las instrucciones del fabricante. Cualesquiera positivos del grupo tratado con fagos fueron aislados para un ensayo de la sensibilidad a fagos. Este muestreo se hizo a una edad de mercado de 39 a 40 días. La edad de mercado puede variar entre 42 a 60 días para ponedoras, dependiendo del peso objetivo del ave, y puede ser más largo para pollos de asar.

Los resultados de este experimento se ilustran en las Figuras 1 y 2 con los datos de apoyo mostrados en la Tabla 1 y 2. Los datos demuestran que el tratamiento con fagos produjo una reducción estadísticamente significativa en la incidencia de *Salmonella* en las aves tratadas con fagos. El ensayo a las 3 semanas de edad mostró que sólo el 0,6% de las aves tratadas con fagos fueron positivas a *Salmonella*, en comparación con el 11% de las aves de control. A la edad de comercialización, 1% de las aves tratadas con fagos fueron positivas a *Salmonella*, en comparación con el 16%. Los resultados indican que la aplicación de fagos en el huevo combinada con el tratamiento por pulverización de los polluelos es una útil intervención para la reducción de *Salmonella* durante la producción de aves de corral.

### Ejemplo 3. Inyección de huevos

El objetivo de este ejemplo era comparar los niveles de reducción de *Salmonella* obtenidos contaminando intencionadamente primero huevos con *Salmonella*, inyectando después los huevos con una preparación de bacteriófagos específica para *Salmonella* a los niveles obtenidos pulverizando polluelos, y comparando cada grupo con un grupo tratado tanto por inyección de huevos como pulverización de polluelos.

Los bacteriófagos empleados en este experimento consistieron en un cóctel de cinco bacteriófagos dirigidos contra especies patógenas de *Salmonella*. Específicamente, la preparación consiste en cinco bacteriófagos clonales que tienen como objetivo *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. hadar*, *S. kentuckii* y *S. thomson*. Para realizar este experimento, se recogieron huevos de la incubadora. 40 de estos huevos fueron recogidos al azar y muestreados para contaminación natural por *Salmonella* machacando el huevo entero en 50 ml de agua de peptona tamponada y ensayando para *Salmonella* como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. 440 huevos fueron contaminados con 10<sup>7</sup> cfu de una mezcla de *S. kentuckii*, *S. heidelberg*, *S. hadar* y *S. typhimurium*. Para la contaminación, se dejó que los huevos llegaran a la temperatura ambiente durante 2 h. El inóculo de *Salmonella* se preparó combinando alícuotas iguales de cultivos individuales de una noche de cada cepa. Cada huevo fue inoculado con 20 µl (bucles de 2 x 10 µl) del cóctel de *Salmonella* a temperatura ambiente. La suspensión del cóctel fue esparcida sobre el extremo romo (celda de aire) del huevo, y se dejó secar. Después de la inoculación, los huevos fueron incubados durante una noche, después se muestrearon diez huevos como anteriormente para determinar el nivel de contaminación por *Salmonella* preparando una muestra del enjuague de la cáscara en 50 ml de agua de peptona tamponada, y una muestra de la cáscara del huevo/membrana en 10 ml de agua de peptona tamponada, y una muestra del contenido del huevo en 50 ml de agua de peptona tamponada. Cada muestra de enjuague y cáscara de huevo se diluyó en serie hasta 10<sup>-5</sup> o a 10<sup>-4</sup> respectivamente desde el pre-enriquecimiento inicial, utilizando agua de peptona tamponada, y todas las diluciones fueron incubadas para llevarlas a placa. El contenido del huevo se diluyó a 10<sup>-2</sup> en agua de peptona tamponada y se incubó para llevarlo a placa. Todas las muestras y diluciones serán incubadas a 37°C durante 24 horas. Después, una alícuota de 10 µl de cada muestra se llevó a placa y se incubó durante una noche. El punto de extinción de cada serie de dilución de *Salmonella* se registrará para estimar el número logarítmico de *Salmonella* en la muestra original.

En el día 18 de la incubación, 50 ml de un cóctel de bacteriófagos a 5 x 10<sup>10</sup> pfu/ml de fagos se introdujo en una bolsa de vacuna de Marek de 400 ml. La inyección de 0,1 ml de la mezcla fagos/vacuna por huevo dio así como resultado la inyección de una dosis de 5,6 x 10<sup>8</sup> pfu/huevo. La preparación de los fagos fue idéntica a la descrita en el Ejemplo 1 anterior. Para los huevos de control, se introdujeron 50 ml de suero salino tamponado con fosfato en una bolsa de vacuna de Marek de 400 ml idéntica. Un grupo de 220 huevos fue inyectado manualmente con 0,1 ml de la preparación de control, mientras que un segundo grupo de 220 huevos fue inyectado con 0,1 ml de la

preparación de fagos y los huevos se incubaron hasta la eclosión.

5 En el día de la eclosión, se recogieron los tractos gastrointestinales, los sacos vitelinos y los enjuagues enteros de las plumas del ave de 20 polluelos de cada grupo. Cada muestra se ensayó cualitativamente en cuanto a la presencia de *Salmonella*, y 10 muestras gastrointestinales y 10 muestras de enjuagues de las plumas de cada grupo fueron también ensayadas cuantitativamente por dilución en serie, y llevadas a placa como anteriormente.

10 Después de la recogida de muestras del día de la eclosión, grupos de 80 polluelos fueron pulverizados con 28 ml de una solución de fagos a  $5 \times 10^9$  pfu/ml, o bien 28 ml de una solución de control. A las tres semanas de edad y a la edad de mercado, se muestrearon los ciegos y enjuagues de las plumas en cuanto a *Salmonella* utilizando ensayos tanto cuantitativos como cualitativos como se describe anteriormente.

15 El muestreo de los huevos inoculados a las 24 horas documentó que el 100% de los huevos estaban contaminados con *Salmonella* recuperable de lavados de huevos enteros, fracciones de cáscara y membrana, y del contenido del huevo. La Figura 3 muestra que el tratamiento con fagos produce una reducción estadísticamente significativa de la contaminación intencionada por *Salmonella* en los tractos gastrointestinales pero no en las plumas de las aves muestreadas en la eclosión. La contaminación persistente de las plumas, probablemente adquirida de las cáscaras de los huevos durante la eclosión, dado que las cáscaras no fueron previamente pulverizadas con fagos, conduce después a contaminación gastrointestinal de los polluelos de huevos inyectados con fagos. Se produjo  
20 sustancialmente menos colonización en las aves de huevos inyectados que fueron pulverizados posteriormente, como se ve en las Figuras 4 y 5, que muestran las aves a las 3 semanas y a la edad de mercado. El principal beneficio es por inyección, dado que la pulverización de las aves sola tiene poco efecto, como se ve en la Figura 4.

25 Para fines de claridad de comprensión, la invención precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo junto con realizaciones específicas, aunque serán evidentes otros aspectos, ventajas y modificaciones para los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una bacterina de lisado de fagos para uso en vacunación de un animal necesitado de inmunización, que comprende una cantidad de bacterina de lisado de fagos suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en dicho animal,  
 5 en donde dicha bacterina comprende partículas de bacteriófagos y fragmentos bacterianos y es producida por lisis de una bacteria patógena por bacteriófagos que consisten en uno o más bacteriófagos líticos, y en donde dicha bacterina causa que el animal cree anticuerpos o cualquier otra respuesta adaptativa contra una enfermedad causada por dicha bacteria patógena en dicho animal, y  
 10 en donde la bacterina de lisado de fagos está sustancialmente exenta de bacterias vivas, enteras, y en donde dicho animal necesitado de inmunización es un ave.
2. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde dicha bacteria patógena es *Campylobacter*, *E. coli* 0157:H7, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella abortus*,  
 15 *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium bovis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus garvieae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, especies de *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Vibrio anguillarum*, o *Vibrio vulnificus*.
3. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde la bacterina se administra por vía oral.
4. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde la bacterina de lisado de fagos se administra en una pluralidad de dosis secuenciales.
5. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 4, en donde la pluralidad de dosis secuenciales se administra a lo largo de un periodo de una a diez semanas.
6. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde la bacterina de lisado de fagos se administra *in ovo*.
7. Uso de una bacterina de lisado de fagos en la fabricación de una vacuna para un animal necesitado de inmunización, que comprende una cantidad de bacterina de lisado de fagos suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en dicho animal,  
 en donde la bacterina causa que el animal cree anticuerpos o cualquier otra respuesta inmunitaria adaptativa contra una enfermedad causada por dicha bacteria patógena en dicho animal,  
 35 en donde la bacterina comprende partículas de bacteriófagos y fragmentos bacterianos y es producida por lisis de una bacteria patógena por bacteriófagos que consisten en uno o más bacteriófagos líticos, y en donde la bacterina está sustancialmente exenta de bacterias vivas, enteras, y en donde dicho animal necesitado de inmunización es un ave.
8. La bacterina de lisado de fagos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacterina se deriva de una o más cepas patógenas de *E. coli*.
9. La bacterina de fagos de la reivindicación 8, en donde las cepas de *E. coli* comprenden los serotipos K88 y F18.
10. La bacterina de fagos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacterina se deriva de una o más especies patógenas de *Yersinia*.
11. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 10, en donde las especies de *Yersinia* comprenden *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*.
12. La bacterina de lisado de fagos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacterina se produce inoculando una suspensión de bacterias vivas con un bacteriófago lítico para las bacterias e incubando la suspensión inoculada hasta que sustancialmente todas las bacterias en la suspensión son lisadas.
13. La bacterina de fagos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacterina se produce inoculando una suspensión de bacterias vivas con un bacteriófago lítico para las bacterias e incubando la suspensión inoculada hasta que una parte sustancial de las bacterias en la suspensión son lisadas, retirando después sustancialmente todas las bacterias enteras de la suspensión para producir la bacterina.
14. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde dicha ave es un pollo, pato, ganso o pavo.
15. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde dicha bacterina se proporciona al ave en su agua de bebida, su comida o ambos.
16. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde dicho ave es pulverizado con bacterina.

17. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 16, en donde dicho ave es pulverizado con bacterina inmediatamente después de la eclosión y antes de la transferencia a los gallineros.
- 5 18. La bacterina de lisado de fagos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacterina se deriva de una o más especies de *Salmonella*.
19. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 18, en donde dicha especie de *Salmonella* es *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. kentuckii*, *S. hadar*, *S. newport*, *S. agona* o *S. typhimurium*.
- 10 20. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 1, en donde dicha bacterina se administra por inyección.
21. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 20, en donde dicha bacterina se administra *in ovo* por inyección.
- 15 22. La bacterina de lisado de fagos de la reivindicación 21, en donde dicha bacterina se inyecta entre los días 17 y 19 de incubación.

Figura 1

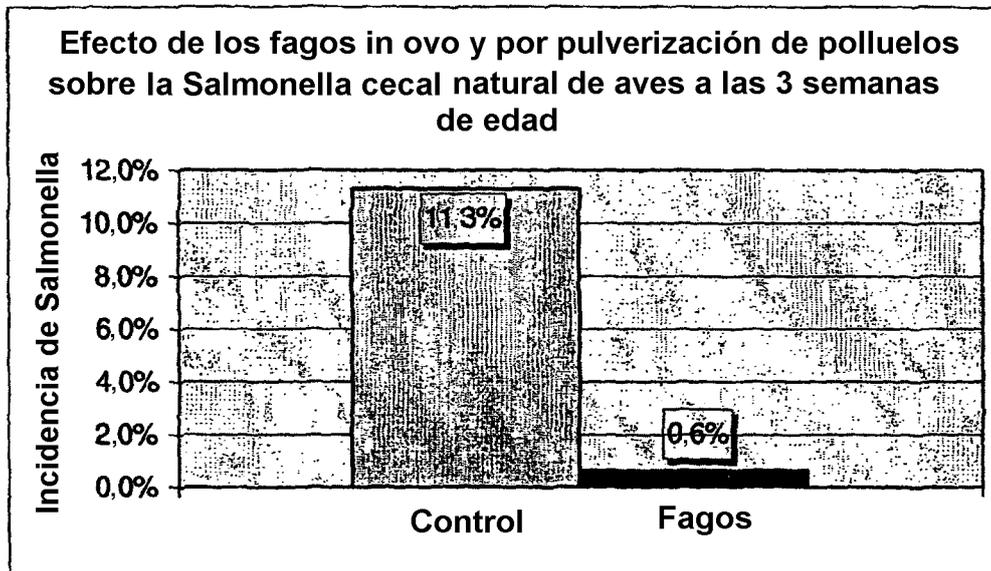


Tabla 1

Incidencia de Salmonella a las 3 semanas de edad			
	Control	Fagos	Test Chi cuadrado
Positivo	18	1	$p=0,000018$
Negativo	141	159	
% Positivo	11,3%	0,6%	

Figura 2

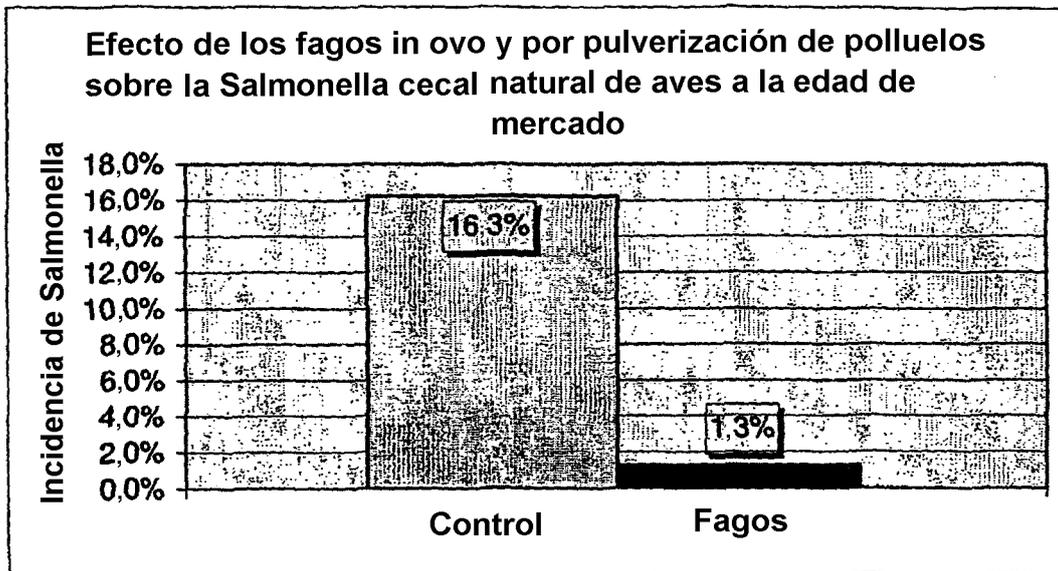
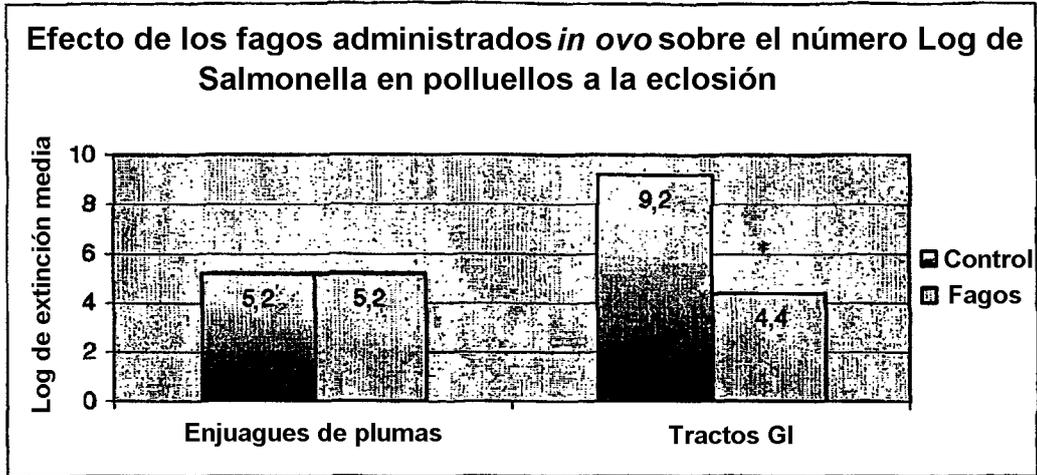


Tabla 2

Incidencia de Salmonella a la edad de mercado			
	Control	Fagos	Test Chi cuadrado
Positivo	13	1	p=0,000276
Negativo	67	79	
% Positivo	16,3%	1,3%	

Figura 3



\*p<0,05 por ANOVA

Figura 4

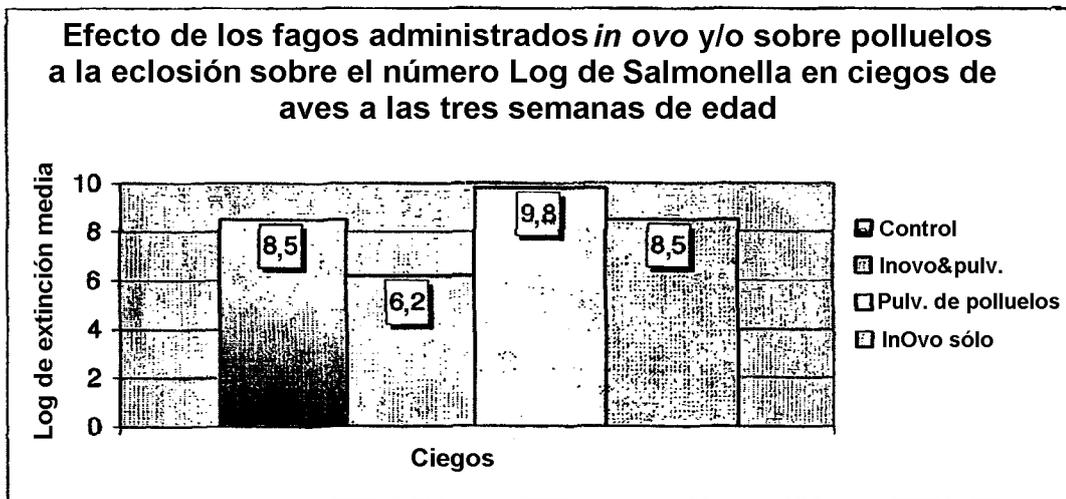


Figura 5

