

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 339**

51 Int. Cl.:

A23B 4/14 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2004 E 04768322 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2012 EP 1662888**

54 Título: **Desinfección de productos alimenticios**

30 Prioridad:

05.09.2003 GB 0320838

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.03.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (100.0%)
UNIVERSITY PARK
NOTTINGHAM, NOTTINGHAMSHIRE NG7 2RD,
GB**

72 Inventor/es:

CONNERTON, IAN FRANK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 397 339 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

Desinfección de productos alimenticios

- La presente invención se refiere al uso de bacteriófagos en la desinfección de productos alimenticios y, en particular, pero no exclusivamente, ganado o productos alimenticios contaminados con *Campylobacter spp.*, a un procedimiento de uso de dichos bacteriófagos para la desinfección y a bacteriófagos para su uso en dicho procedimiento.
- Campylobacter spp.* es una causa importante de enfermedad diarreica transmitida por producto alimenticios. La contaminación por *Campylobacter spp.* persistente de carne de ave es un problema significativo para productores e, igualmente, para minoristas. Se sabe que las aves actúan como reservorio para este patógeno; un porcentaje alto (aproximadamente 60 a 80 %) de aves alojan *Campylobacter jejuni* en sus tubos digestivos.
- En pollos de engorde, las especies de *Campylobacter* son organismos comensales más que una infección. La colonización del tubo digestivo de aves tiene lugar a una edad temprana, por ejemplo por medio de contaminación de agua de bebida o por el medio ambiente. La transferencia horizontal posterior dentro del recinto de engorde en el que los pollos se guardan es progresiva y rápida, de modo que todo el grupo se infectará antes de su sacrificio.
- Las aves se mantienen frecuentemente en ayunas antes de su sacrificio, lo que reduce la eliminación fecal de *Campylobacter spp.*, pero puede dar como resultado niveles superiores en el animal sacrificado. Un objetivo de la presente invención es reducir los niveles de *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli* presentes en las aves antes de su sacrificio y presentes en la carne de ave resultante.
- En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento de desinfección de ganado según la reivindicación 1.
- Campylobacter spp.* son organismos comensales que no afectan al ganado (especialmente aves y animales de caza); en consecuencia, la presente invención no está relacionada con el tratamiento de ninguna enfermedad presente en el ganado.
- Es una ventaja de la presente invención usar los bacteriófagos para tratamiento de fagos profiláctico, es decir, los bacteriófagos se administran a los pollos antes de su sacrificio con el fin de reducir la cantidad de especies de *Campylobacter spp.* que contaminan la carne de ave y que entran en la cadena alimenticia humana.
- Al menos uno de los bacteriófagos es de la familia *Myoviridae*.
- Los bacteriófagos, o cada bacteriófago, pueden administrarse al ganado en un intervalo de entre 10^2 y 10^9 ufp/ml⁻¹. Preferentemente, los bacteriófagos se administran al ganado a 10^9 ufp/ml⁻¹.
- El ganado son preferentemente pollos. En particular, el ganado pueden ser pollos de engorde. Alternativamente, el ganado se selecciona del grupo que consiste en patos, pavos, cerdos, ganado vacuno, cabras y ovejas.
- Los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran preferentemente por vía oral por medio de una solución antiácida y más preferentemente en el agua de bebida del ganado.
- Los bacteriófagos o cada bacteriófago pueden administrarse entre 1 y 4 días antes del sacrificio. Preferentemente, los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran 2 días antes del sacrificio.
- Campylobacter spp.* es preferentemente *Campylobacter jejuni*.
- Alternativamente, *Campylobacter spp.* puede ser *Campylobacter coli*.
- La presente invención también proporciona un procedimiento de desinfección de productos alimenticios según la reivindicación 11.
- Al menos uno de los bacteriófagos es de la familia *Myoviridae*.
- Los bacteriófagos, o cada bacteriófago, pueden administrarse al producto alimenticio en un intervalo de entre 10^2 y 10^9 ufp/ml⁻¹. Preferentemente los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran al producto alimenticio a 10^9 ufp/ml⁻¹.
- El producto alimenticio es preferentemente carne de ave fresca. Alternativamente, el producto alimenticio puede ser carne de ave congelada.
- El producto alimenticio puede seleccionarse también del grupo que consiste en carne de ternero, cordero, pavo, cerdo o cabra, fresca o congelada.
- La *Campylobacter spp.* es preferentemente *Campylobacter jejuni*. Alternativamente, la *Campylobacter spp.* puede ser *Campylobacter coli*.
- La presente invención también proporciona el bacteriófago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) aislado.
- La presente invención también proporciona el bacteriófago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) aislado.
- La presente invención también proporciona el uso del bacteriófago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) aislado como desinfectante según la invención.

La presente invención también proporciona el uso del bacteriófago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) aislado como desinfectante según la invención.

La presente invención también proporciona un kit según la reivindicación 23.

5 Opcionalmente, el kit contiene aparatos para administrar el bacteriófago a ganado o productos alimenticios. El aparato es preferentemente un dispensador con bomba de pulverización, un aerosol o una pipeta.

Opcionalmente, el kit contiene uno o varios tampones para preparar el bacteriófago. Los tampones o cada tampón se seleccionan preferentemente de un tampón de almacenamiento y un tampón de administración. El tampón de almacenamiento puede comprender NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Tris 20 mM, pH 7,4, y gelatina al 0,1 %.

10 La presente invención se describirá ahora meramente a modo de ejemplo, con referencia a los ejemplos y la figura siguiente, de la que:

La figura 1 (a) es una micrografía electrónica del bacteriófago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) aislado.

La figura 1 (b) es una micrografía electrónica del bacteriófago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185).

1. Materiales y procedimientos

15 El procedimiento usado para el aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de ave se desarrolló por modificación de los procedimientos descritos por Gradjewski y col., (1985) y Salama y col., (1989).

Aislamiento de Campylobacter a partir de heces de pollo, hisopos cloacales y cuerpo de pollos sacrificados para su uso como bacteria huésped para el aislamiento de bacteriófagos.

20 *Campylobacter spp.* se aisló a partir de pollos mediante plaqueo directo usando agar CCDA modificado. Las diluciones se realizaron en diluyente de recuperación máxima (MRD; Nº Oxoid CM 733). Las placas se incubaron a 42 °C durante 48 h en condiciones microaerobias (5 % de oxígeno). Se confirmó que las colonias eran de *Campylobacter spp.* porque tenían una morfología de colonia típica, una morfología celular típica (por tinción Gram) y por ser positivas a oxidasa y catalasa. Se realizó un ensayo de hidrólisis del hipurato para distinguir *C. jejuni* de otras *Campylobacter spp.*

Preparación de un césped de bacterias huésped para el aislamiento de bacteriófagos

25 Las bacterias huésped para aislamiento de bacteriófagos se cultivaron como céspedes en placas con agar sangre (sangre de caballo desfibrinada al 5 % en base de agar sangre Nº 2) incubadas de forma microaerobia durante 18 h a 42 °C. Las bacterias se rascaron usando un hisopo estéril y se suspendieron en MgSO₄ 10 mM helado. Para cada césped, se añadieron 100 µl de suspensión celular a 5 ml de medio de recubrimiento NZCYM líquido (0,6 % de agar Select en caldo NZCYM), se mantuvieron a 45 °C y se vertieron inmediatamente sobre un agar NZCYM precalentado (1,2 % de agar Select en caldo NZCYM con 10 µg/ml de vancomicina). Se dejó que las placas se fijaran durante 10 min y después se secaron a 42 °C durante 30 min puestas boca abajo con las tapas abiertas. Cada muestra para el aislamiento de bacteriófagos se aplicó como una mancha de 10 µl al césped preparado.

Preparación de muestras para el aislamiento de fagos a partir de hisopos con heces/cloacales usando césped de bacterias huésped preparado

35 Una suspensión al 10 % de heces se preparó en tampón SM (NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Tris 20 mM, pH 7,4, y gelatina al 0,1 %). Los hisopos cloacales se emulsionaron en 2 ml de tampón SM. Después de 24 h de incubación a 4 °C (para permitir la disociación de los fagos), se centrifugó 1 ml de esta suspensión a 3.000 rpm durante 5 minutos para eliminar residuos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 13.000 rpm para eliminar bacterias. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm para eliminar cualquier bacteria remanente. El filtrado se dispuso después sobre céspedes bacterianos preparados como anteriormente. El filtrado también se dispuso en césped bacteriano de la cepa de *C. jejuni* permisiva universal PT14 (NCTC 12662), preparado como anteriormente. Se dejó que la suspensión de fagos se absorbiera en el agar blando durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, las placas se incubaron durante 24 h a 42 °C en condiciones microaerobias (5 % de O₂).

45 *Recogida de bacteriófagos después de la incubación en céspedes huésped y purificación de placas por el procedimiento de vertido en placa*

50 Se extrajeron placas de bacteriófago individuales a partir del recubrimiento usando una punta de pipeta y se suspendieron en 200 µl de medio SM. La multiplicación de los bacteriófagos se realizó añadiendo 10 µl de una suspensión de placas de fago individuales a 100 µl de suspensión celular de bacterias huésped. Se dejó que los bacteriófagos se absorbieran durante 30 minutos a 42 °C. Esta suspensión se añadió después a agar blando fundido y se vertió sobre la superficie de una placa con NZCYM precalentada. Una vez fijada, la placa se incubó durante 24 h a 42 °C en condiciones microaerobias (5 % de O₂).

Después se recogió una única placa en 200 µl de SM y el procedimiento completo se repitió un total de 3 veces.

2. Caracterización y selección de bacteriófagos

55 *Primera etapa de amplificación para permitir la caracterización y la selección*

Se prepararon diez placas de vertido para cada bacteriófago exactamente como para la purificación de placas (anteriormente) usando la placa final recogida. Después de la incubación, se añadieron 5 ml de tampón SM a cada

placa. Las placas se agitaron después cuidadosamente durante 16 h a 4°C para arrastrar el bacteriófago por lavado de la superficie de las placas. La suspensión de bacteriófagos resultante se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm para eliminar las bacterias. La valoración de bacteriófagos de esta suspensión se determinó usando la técnica de Miles y Misra y se encontró que era aproximadamente de 10⁹ ufp/ml (unidades formadoras de placas/ml).

5 Caracterización y selección

El espectro lítico de cada bacteriófago nuevo se determinó disponiendo 10 µl de cada bacteriófago sobre céspedes bacterianos de un banco de cepas de *Campylobacter* de ensayo. Estas cepas incluían cepas de referencia NCTC, cepas con tipos de fagos conocidos (cepas PT), aislados de pollos de engorde, aislados de pollos de corral, aislados de carne de ave y de muestras fecales humanas. Solo los bacteriófagos que mostraron lisis confluyente en una variedad amplia de cepas se seleccionaron como candidatos para el ensayo. Se ha encontrado que algunos fagos no se comportan bien en los ensayos a pesar de tener una amplia variedad de huéspedes. Estos se han eliminado de las soluciones madre de fagos potencialmente útiles.

Estabilidad

La estabilidad de los bacteriófagos seleccionados se evaluó mediante valoración periódica de material mantenido a 4 °C en tampón SM. Las valoraciones disminuyeron en más de 2 puntos logarítmicos después de la liofilización, por lo que este procedimiento de conservación no se siguió posteriormente. Se encontró que las valoraciones de algunos de los bacteriófagos disminuían rápidamente en varios puntos logarítmicos incluso a 4 °C en tampón SM. Solo se seleccionaron los bacteriófagos que mantuvieron su valoración durante 3 meses a 4 °C, en tampón SM.

Unión de bacteriófagos a material no específico

Se encontró que los fagos tanto de pollo de engorde como de fuentes de carne de ave variaban significativamente en su capacidad para adherirse a superficies (plástico) y (no específicamente) a bacterias que no estimulan su replicación. Los fagos que presentan adherencia no específica no serán eficaces para la aplicación de tratamiento con fagos. Los fagos se seleccionaron, por lo tanto, basándose en su recuperación eficaz a partir de superficies plásticas para iniciar la infección por *Campylobacter*, y su recuperación después de la exposición a bacterias no permisivas y vesículas de membrana generadas por estas bacterias.

Electroforesis en gel de campo pulsado

Los bacteriófagos de *Campylobacter* tienen genomas inusualmente grandes (Sails y col., 1998). A pesar de ello su ADN es resistente a un gran número de enzimas de restricción (un mecanismo de supervivencia esencial para fagos). Por lo tanto, la caracterización y discriminación de fagos usando procedimientos moleculares es difícil. Sails y col., (1998) informaron de que el fago usado en su estudio se incluye en 3 clases basadas en el tamaño del genoma (determinado por PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado). Se usó PFGE para caracterizar los fagos recién aislados a partir de aves y determinar los tamaños de sus genomas. Los tamaños de todos los aislados de pollos de engorde fueron aproximadamente de 130 kb. Estos fagos se incluyen en la clase III de la distribución en grupos avanzada por Sails y col., (1998). No obstante, algunos fagos aislados a partir de carne de ave fueron de aproximadamente 180 kpb y pertenecían al grupo II.

Microscopía electrónica

Las micrografías electrónicas del fago (figuras 1 a y b) han revelado hasta la fecha que todos los fagos de pollos de engorde son similares a los examinados por Sails y col., (1998), que tienen cabezas icosaédricas con colas contráctiles largas y que pertenecen a la familia *Myoviridae*. Los fagos más grandes aislados a partir de carne de ave eran de la misma familia pero tenían estructuras de collar distintas.

3. Producción en masa de la mayor parte del bacteriófago más adecuado en el laboratorio

Las bacterias multiplicadas en un cultivo en placa de agar sangre durante la noche de una cepa apropiada se suspendieron en 2 ml de MgSO₄ 10 mM. Se añadió un ml de esta suspensión bacteriana a un matraz cónico de 150 ml que contenía 40 ml de caldo nutriente N° 2 (CM 67). A esto, se añadieron 100 µl de aproximadamente 10⁸ ufp/ml de fagos. El matraz se dispuso en un frasco de gases en condiciones microaerobias y se incubó con agitación a 100 rpm a 42 °C durante 48 h. Los residuos bacterianos se eliminaron por centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,2 µm. La valoración de la suspensión de bacteriófagos fue aproximadamente de 10⁹ ufp/ml.

Concentración de bacteriófagos por centrifugación

Después, se recogieron bacteriófagos por centrifugación a 40.000 g durante 2 h a 4 °C. Los sedimentos se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 (un tampón adecuado para alimentar pollos). La valoración de este bacteriófago concentrado fue generalmente de aproximadamente 10¹⁰ ufp/ml. La estabilidad en este tampón a 4 °C se encontró que era equivalente a la del tampón SM, es decir, disminuyó muy poco en viabilidad durante un periodo de 3 meses. Se pueden preparar lotes de hasta 1 litro aumentando la escala del procedimiento.

4. Seguimiento

55 Resistencia a fagos

La selección de cepas de *Campylobacter* resistentes a fagos se consideró como un problema posible en el uso de tratamiento de fagos. Las bacterias desarrollan resistencia a fagos mediante mutación espontánea y las colonias resistentes a fagos son visibles después de una incubación prolongada a una multiplicidad de infección alta. Ninguna de las cepas de *Campylobacter* aisladas en el ejemplo 1 (véase más adelante) era resistente a CP8 (N° de acceso NCIMB 41184) (aunque pudieron producirse colonias resistentes mezclando fagos y bacterias *in vitro*). No obstante,

fue posible aislar colonias resistentes a fagos CP34 (N° de acceso NCIMB 41185) en las aves tratadas con fagos pero no en las no tratadas del ejemplo 2 (véase más adelante). Con el fin de establecer la frecuencia de resistencia a CP34 (N° de acceso NCIMB 41185) después de la intervención, se seleccionaron 10 colonias de las placas de aislamiento de cada ave y se analizaron para determinar la resistencia a CP34 (N° de acceso NCIMB 41185).

5 Durante los primeros 3 días después de la intervención no se detectaron cepas de *Campylobacter* resistentes. No obstante, en los días 4 y 5, 2 de cada 10 aislados de colonias individuales recuperados a partir de un ave tratada con un fago individual demostraron resistencia al fago. No hubo correlación entre aves que tenían recuentos más altos que la media de *Campylobacter* y el aislamiento de colonias resistentes. Esto, junto con la baja frecuencia de resistencia (20 % o inferior), añade peso a observaciones anteriores de que la adquisición de resistencia a fagos está asociada con una ventaja competitiva reducida.

10 Para investigar adicionalmente la naturaleza de la resistencia a fagos y establecer si las variantes resistentes eran tan eficaces en la colonización como la cepa original, se usaron dos aislados de HPC5 (HPC5-14 y HPC5-20) para recolonizar aves. Se advirtió que estas cepas crecían poco en placas de agar sangre, dando colonias discretas pequeñas pero conservaban la motilidad. Los resultados mostraron que, mientras que la colonización se logró en 5 días, los aislados de colonias de *Campylobacter* recuperados a partir de estas aves habían recuperado su sensibilidad a fagos CP34 (N° de acceso NCIMB 41185) lo que indica una presión de selección fuerte contra resistencia a fagos *in vivo*. Este experimento demuestra que, aunque puede tener lugar una resistencia a fagos, al menos con esta combinación huésped/fago, no es probable que se reduzca significativamente la eficacia del tratamiento. Las variantes resistentes parecen ser menos aptas y deben volver a su estado sensible para colonizar eficazmente, y ya que el fago también persiste probablemente estas cepas sensibles serán una vez más vulnerables al ataque. La aplicación de fagos justo antes del sacrificio se considera como el mejor modo para evitar problemas asociados con el desarrollo de resistencia a fagos dentro del recinto de engorde.

Presencia y supervivencia de fagos en pollos para venta al por menor

25 La recuperación de fagos a partir de muestras de pollo enriquecidas se investigó durante un periodo de 11 días a 4 °C usando los procedimientos de Atterbury y col. (2003). La recuperación permaneció constante entre el 40-44 % de la valoración inoculada durante un periodo de 7 días. El día 7 hubo un descenso de la valoración del 44 % al 35 %. Esta disminución continuó durante el transcurso del periodo de tiempo hasta alcanzar el 19 % al final del estudio. Esto contrasta con la recuperación de fagos a partir de pollo congelado en la que la recuperación inicial fue cercana al 100 % pero descendió rápidamente al 22 % un día después de la inoculación. La recuperación posterior se encontraba en el intervalo del 22 al 28 %.

Se encontró que el límite de detección de fagos era de 2×10^3 ufp por 10 cm^2 de área de piel de pollo.

35 Por lo tanto, los bacteriófagos están presentes de forma natural en la superficie de aves y pueden sobrevivir durante periodos relativamente largos en ausencia de un huésped que se replica e incluso sobrevivir a la congelación a -20 °C. Los bacteriófagos permanecerán activos contra la *Campylobacter* presente en la piel de pollo y es capaz de reducir la contaminación superficial (véase el ejemplo 3).

Obtención de segmentos de secuencias de nucleótidos genómicos de fagos

40 El ADN genómico de fagos se digirió con la enzima de restricción Dral y se ligó en el plásmido pUC18 (Ready to Go, Pharmacia). Después de la transformación, los plásmidos con insertos de ADN se secuenciaron usando cebadores M13 directos (I.D. de secuencia N° 8) e inversos (I.D. de secuencia N° 9) y la secuencia se comparó con bases de datos de ADN. La traducción de las secuencias también se comparó con bases de datos de proteínas. Las bases de datos usadas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Aunque la mayor parte de los insertos contenían ADN originario claramente de *Campylobacter*, se obtuvieron secuencias huésped únicas que parecían derivar de fagos. La clonación de ADN de fagos es extremadamente problemática debido a la amplia sustitución y modificación de bases, lo que evita la replicación en el huésped de *E. coli*. Los cebadores (véase la tabla 1 y el listado de secuencias adjunto) se diseñaron basándose en las secuencias de fagos presuntas y se usaron para amplificar ADN a partir de aislados de bacteriófagos. Uno de estos pares de cebadores amplifica fácilmente el producto de ADN genómico de CP8 (N° de acceso NCIMB 41184) pero no de ninguno de los otros fagos y representa un procedimiento para distinguir CP8 (N° de acceso NCIMB 41184) y fagos similares. Estos cebadores son útiles para realizar un seguimiento de fagos CP8 (N° de acceso NCIMB 41184) a lo largo de las fases de postratamiento, sacrificio, preparación y almacenamiento, ya que distinguen el fago de ensayo de cualquier bacteriófago natural encontrado en la superficie de carne de ave.

Tabla 1

Secuencia del fago	ID de secuencia N°	Cebadores	ID de secuencia N°
CP8-85	1	CPPP1	2
		CPPP2	3
CP8-92	2	CPPP3	5
		CPPP4	6
CP8-93	7	M13F	8
		M13R	9

55 Se apreciará que la clonación de ADN a partir de estos bacteriófagos es difícil. Esto es debido a niveles altos de metilación y sustitución que sirven para proteger el genoma del bacteriófago de endonucleasas de restricción presentes en las bacterias.

Como tal, solo se clonaron fragmentos pequeños de ADN. No se encontraron homologías significativas cuando se

analizaron bases de datos de secuencias de ADN y secuencias de proteínas usando el ADN clonado aislado.

Ejemplo 1 Uso del fago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) para reducir *Campylobacter* en pollos

Un aislado de pollo de engorde de pasaje bajo, GII C8 de *C. jejuni* (tipo de fago: 35; serotipo termoestable: no tipable), se seleccionó para su uso como la cepa de colonización debido a que era sensible a CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) y era típica de las cepas aisladas de recintos de engorde. Los grupos fueron tal como se han descrito en la tabla 1. Las aves se dividieron en 4 grupos (n = 10 aves cada uno) dependiendo del régimen de infección y los controles usados. Las aves del grupo 1 fueron controles no infectados. Las aves de los grupos 3 y 4 se infectaron el día 22 con 10^6 ufc de GII C8 de *C. jejuni*. A las aves de los grupos 2 y 3 se les administraron 5×10^8 ufp de CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) en CaCO_3 al 30 % (antiácido) el día 25. Se sacrificaron dos aves de cada grupo cada día durante 5 días. Los puntos de muestreo de las aves sacrificadas incluyeron: buche, molleja, intestino delgado, intestino grueso, ciego, músculo y órganos, incluidos hígado, páncreas, cerebro y corazón. Se enumeraron fagos y *Campylobacter*. Las aves de control negativo de *Campylobacter* permanecieron negativas a lo largo del ensayo mostrando que se habían logrado medidas de contención suficientes. En la tabla 1 se proporciona un resumen de los resultados de este experimento. Las muestras de heces mostraron que las aves analizadas fueron colonizadas por *Campylobacter* a aproximadamente 10^7 ufc/ml en el momento de administrar el fago (periodo de 3 días). La *Campylobacter* se aisló solo a partir del sistema digestivo de las aves, no de cualquier otro órgano.

Tabla 1 Resumen de la intervención con fagos que muestra el número promedio de las *Campylobacter* recuperadas a partir de contenidos del ciego por día

Día	Grupo de control <i>Campylobacter</i> (ufc/g promedio) GRUPO 4	Grupo fago + <i>Campylobacter</i> (ufc/g promedio) GRUPO 3
1	$1,6 \times 10^7$	$< 10^2$
2	$2,5 \times 10^6$	$< 10^4$
3	$7,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^7$
4	$5,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
5	$2,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$

Estos resultados indican una reducción amplia del número de *Campylobacter* durante 2 días después del tratamiento con fagos. Después de este periodo, el número aumentó a un nivel comparable a los controles los días 4 y 5. Los aislados de *Campylobacter* de recolonización de este experimento no eran resistentes a fagos y pudo demostrarse que eran genotípicamente idénticos a la cepa colonizadora inicial (tipo fla).

Ejemplo 2 Uso de bacteriófagos CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) para reducir el número de las *Campylobacter* en pollos y determinación de la dosis óptima de este bacteriófago

Un aislado de fagos de pollo de engorde CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185), se seleccionó por dos motivos:

1) Tenía una variedad amplia de huéspedes contra aislados de recintos de engorde similar al CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184).

2) La disponibilidad de la cepa de *C. jejuni* HPC5 (serotipo termoestable UT; tipo de fago: RDNC; reacciona con fagos pero no se ajusta a un tipo de fagos designado) que se aisló al mismo tiempo que el fago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) y que se había usado previamente en el ensayo de colonización para determinar su potencial de colonización. La cepa se usó para multiplicar el fago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) en el laboratorio minimizando la restricción de huéspedes potencial.

El experimento de intervención se realizó del mismo modo que en el ejemplo previo. Brevemente, los pollos se infectaron con 10^6 ufc de la cepa de *C. jejuni* HPC5 de 20 días de edad (2 días antes que previamente para realizar un seguimiento del número de *Campylobacter* en los controles durante un periodo más largo antes de la administración de fagos). Los fagos se administraron a un intervalo de dosis (10^5 ufp, 10^7 ufp y 10^9 ufp) en CaCO_3 al 30 % (antiácido) a los 25 días de edad. Las valoraciones tanto de fagos como de bacterias en aves sacrificadas se realizaron durante 5 días y se compararon con controles colonizados con HPC5 de *C. jejuni*. En las primeras 24 h después de la intervención hubo un descenso brusco de 4 puntos logarítmicos en la valoración de *Campylobacter* en el ciego con las dosis de 10^5 y 10^7 y un descenso de 2 puntos logarítmicos en el intestino superior e inferior en los animales tratados con fagos en comparación con los controles. La dosis más elevada de fagos (10^9 ufp) fue inesperadamente la menos eficaz en las primeras 24 h pero aun así dio como resultado un descenso superior a 2 puntos logarítmicos en la valoración de *Campylobacter* en el ciego de aves tratadas con fagos en comparación con los controles 48 h después del tratamiento.

Los resultados muestran que un descenso reproducible en el número de *Campylobacter* de al menos 2 puntos logarítmicos para CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185), un descenso brusco inicial que se mantuvo durante 4 a 5 días. Una dosis de entre 10^5 ufp y 10^7 ufp se encontró que era óptima en este experimento. El número de fagos alcanzó un máximo a aproximadamente 10^7 ufp/g en el intestino superior e inferior a los 27 días y en el ciego a los 29 días. No hubo correlación entre la dosis inicial y el número de fagos aislados después del tratamiento con fagos. Todas las muestras contenían entre 10^5 y 10^8 ufp/g. Los picos altos de fagos corresponden aproximadamente a los valles mínimos de la bacteria tal como cabría esperar de una relación huésped-presa. Después, el número de *Campylobacter* comenzó a aumentar, lo que corresponde a una caída en niveles de fagos. Esto se había anticipado y confirma la suposición de los inventores de que el periodo apropiado de intervención (antes del sacrificio) es crítico

para alcanzar el beneficio máximo.

Las aves de control negativo de *Campylobacter* permanecieron negativas a lo largo del ensayo mostrando que se habían logrado medidas de contención suficientes. Un resumen de los resultados de este experimento con fagos CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) se da en la tabla 2 y se comparan con los resultados de los que se informó previamente para fagos CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184). La reducción inicial en el número de *Campylobacter* de colonización con fagos CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) no fue tan grande como se había observado con los fagos CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) donde se observó una caída superior a 5 puntos logarítmicos en niveles de *Campylobacter*. Esta comparación ilustra la importancia de una selección de fagos cuidadosa para el éxito de la intervención.

10 **Tabla 2 Resumen de la intervención con CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) en comparación con el ensayo CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) que muestra el número promedio de *Campylobacter* recuperadas a partir de los contenidos del ciego por día**

CP8 (Nº DE ACCESO NCIMB 41184) Ensayo con huésped GIIIC8		
Día	Grupo de control <i>Campylobacter</i> : (ufc/g promedio)	Grupo fago + <i>Campylobacter</i> : (ufc/g promedio)
12	1,6 x 10 ⁷	< 10 ⁶
3	2,5 x 10 ⁶	< 10 ⁶
4	7,6 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁶
5	5,6 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷
	2,1 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷

CP34 (Nº DE ACCESO NCIMB 41185) Ensayo con huésped HPC5

Día	Grupo de control <i>Campylobacter</i> : (ufc/g promedio)	Grupo fago + <i>Campylobacter</i> : (ufc/g promedio)		
		Dosis 10 ⁹ ufp	Dosis 10 ⁷ ufp	Dosis 10 ⁵ ufp
1	5,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶
2	3,7 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶
5	6,3 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	9,5 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶

15

Ejemplo 3 Desinfección de pollo usando bacteriófagos

La desinfección directa de productos de ave procesados con fagos puede no ser un medio eficaz para controlar *Campylobacter* porque los fagos requieren el crecimiento de su huésped para su replicación. Las *Campylobacter* no se multiplican a temperaturas de refrigeración y niveles de oxígeno atmosféricos. No obstante, los fagos son bien conocidos por su capacidad para sobrevivir permaneciendo latentes durante largos periodos, hasta que la multiplicación del huésped es posible. Por ejemplo, al ingerir material contaminado un huésped nuevo. Usando un bacteriófago seleccionado para unirse a *Campylobacter* eficazmente y no unirse a bacterias no huéspedes, usando los procedimientos indicados, se ha analizado la capacidad del fago para reducir el número de *Campylobacter* añadiéndolo a *Campylobacter* que no crece en la superficie de la piel de pollos.

25 Este experimento se llevó a cabo usando la cepa de *C. jejuni* de referencia NCTC 12662 y el fago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184). Seis aves negativas a *Campylobacter* y fagos se sacrificaron, desplumaron y pelaron. Se dispusieron secciones de piel que medían 2 cm² en placas de Petri estériles. Se añadieron *Campylobacter* a diferentes densidades celulares (entre 10⁶ y 10⁷ ufc/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los fagos se aplicaron después a diferentes densidades (10⁷, 10⁵ y 10³ ufp/ml) para proporcionar un intervalo de diferentes valores de multiplicidad de infección de entre 10⁵ y 10³. Las muestras de piel de pollo se almacenaron después a 4 °C. Los fagos y *Campylobacter* se enumeraron a 24 h, 72 h y 120 h después de la inoculación y se compararon con los controles inoculados solo con *Campylobacter*. Las muestras se digirieron en 20 ml de MRD y los recuentos de *Campylobacter* y fagos se realizaron tal como se ha descrito previamente. A la multiplicidad de infección más elevada, hubo una reducción de 1 punto logarítmico (90 %) en el número de *Campylobacter* en comparación con controles en cada uno de los días de muestra. Esto representa la capacidad de los fagos para absorberse a *Campylobacter* y permanecen funcionales hasta que el crecimiento de *Campylobacter* es posible debido a requisitos de temperatura y gaseosos adecuados. Después, los fagos pueden lisar sus huéspedes y producir una reducción en el número de *Campylobacter*.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Nottingham

<120> Desinfección de productos alimenticios

<130> JL4509

5 <140> documento PCT/GB2004/003775

<141> 06/09/2004

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

<210>1

10 <211> 701

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Bacteriófago CP8

15 <400> 1

```

aaaatTTTTa atcatataat tcaatggtaa tttattactc caatctattc tagattcatc      60
aaaaataatt tTcatattct tagttaaatt aggaaagtct ctgtgaacga atacacaatt      120
acatattcTt actaaatgTt tattagcaac agactctgaa aattctgtat accatTTTga      180
aatatTTTgtc atactTatat ttaatTTtatc cgctatTTtct gcagTtaaca tataatcTTt      240
agttacgaag tTcattTTtaa ccccaaataa aataagccgg gtatgctacc atcattacta      300
cggctacgcc tgcgTaaact aagtcaaatg taaatctatt atcacctaTt tTtgattTga      360
agTTTTtcat tTaatctcct tTatcTTTTa atgaaataat tataatataa aataactTaa      420
atgTTTctTta aatattaaat attaaagTtT atcaagataa taaatactct aaaaatacat      480
agaggccaaa atgtataaac tattattaga aaattctcTt aaagagtcta caaactTaat      540
taacgaaggg tatagatgca gatTTTtacc aagTtatgTt gggTgatatc tTaaaagata      600
aaatcaaatc atTTtataggg acatcatatt gctgaagTtc aacctatgct gcaaccatct      660
ggctatgTtTt tTgcaagaca aagaaaccca agacacattt g                          701

```

<210>2

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Bacteriófago CP8

<400> 2

25 gtctctgtga acgaatacac aa

22

<210>3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Bacteriófago CP8
 <400> 3

gtagtataac gacttcaagt tg 22

10 <210>4
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

15 <223> Bacteriófago CP8
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (114)..(114)
 <223> "n" puede ser cualquier nucleótido

20 <400> 4

aaataaaata caagacgaaa agaatcgaga acttggttaac aacattaaag aacttgaaaa	60
caaaccatt agaactgaaa caaatacat agcagtcag gattgtaaag ttcnaatatt	120
taaagtagac accaatatta cctcagctaa aggtatacct ttatttttag gaaatatagg	180
taaaatacaa ttatctaattc aaaaataagg aatcactatg aaaattaaaa agtttttatt	240
ggccttaata ccctttattt ttgtgggttg tactgcagtt agaaccgagt ttatttacc	300
aaaaatacca gatgttaaag aaccacctat gacacaagat tataatctaa ctgtaataaa	360
aataaataat gtagaatatt attctttaag ccctgaagat gctaagattt tatcagagaa	420
ctggatcaag ttt	433

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Bacteriófago CP8
 <400> 5

30 **gaatcgagaa cttgtaaca a** 21

	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> ADN		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Bacteriófago CP8		
	<400> 6		
	cttggtggat actgtgttct		20
10			
	<210> 7		
	<211> 101		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Bacteriófago CP8		
	<400> 7		
	caaaagcaac ttataaagaa ctgagtttac ctttccttga gttggttttt tatttgattt		60
	atctataaaa actttgttta atgttaaaaa atttttgggt a		101
20			
	<210> 8		
	<211> 16		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Bacteriófago M13		
	<400> 8		
	gtaaaacgac ggccag		16
30			
	<210> 9		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Bacteriófago M13		
35	<400> 9		

agcggataac aatttcacac agga

24

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de desinfección de ganado que comprende administrar al menos un bacteriófago, seleccionado del grupo que consiste en CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) y CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) en una cantidad eficaz a dicho ganado para reducir el número de *Campylobacter spp* presentes en el tubo digestivo de dicho ganado.
- 5 2. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 1 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran al ganado en un intervalo de 10^2 a 10^9 ufp/ml¹.
3. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 2 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran al ganado a 10^5 ufp/ml¹.
- 10 4. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el ganado son pollos.
5. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 4 en el que el ganado son pollos de engorde.
6. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el ganado se selecciona del grupo que consiste en patos, pavos, cerdos, ganado vacuno, cabras y ovejas.
- 15 7. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran por vía oral por medio de solución antiácida.
8. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran por vía oral en el agua de bebida del ganado.
9. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran entre 1 y 4 días antes del sacrificio.
- 20 10. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 9 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran 2 días antes del sacrificio.
11. Un procedimiento de desinfección de productos alimenticios que comprende administrar al menos un bacteriófago, seleccionado del grupo que consiste en CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) y CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185), en una cantidad eficaz al producto alimenticio para reducir la cantidad de *Campylobacter spp* en dicho producto alimenticio.
- 25 12. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 11 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran al producto alimenticio en un intervalo de 10^2 a 10^9 pfu/ml¹.
13. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en la reivindicación 12 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran al producto alimenticio a 10^5 ufp/ml¹.
- 30 14. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que el producto alimenticio es preferentemente carne de ave fresca.
15. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que el producto alimenticio es carne de ave congelada.
- 35 16. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que el producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en carne fresca o congelada de ternera, cordero, pavo, cerdo o cabra.
17. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran a dicho producto alimenticio en forma de aerosol.
- 40 18. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 en el que los bacteriófagos, o cada bacteriófago, se administran antes del sacrificio.
19. Bacteriófago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) aislado.
20. Bacteriófago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) aislado.
21. El uso del bacteriófago CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) aislado como desinfectante.
22. El uso del bacteriófago CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185) aislado como desinfectante.
- 45 23. Un kit que comprende:
 - a) al menos un bacteriófago aislado seleccionado del grupo que consiste en CP8 (Nº de acceso NCIMB 41184) y CP34 (Nº de acceso NCIMB 41185);
 - y opcionalmente
 - b) instrucciones de uso del kit.
- 50 24. Un kit tal como se ha reivindicado en la reivindicación 23 en el que el kit contiene aparatos para administrar los bacteriófagos, o cada bacteriófago, al ganado o al producto alimenticio.

25. Un kit tal como se ha reivindicado en la reivindicación 23 o 24 en el que el aparato es un dispensador con bomba de pulverización, un aerosol o una pipeta.

26. Un kit tal como se ha reivindicado en la reivindicación 23, 24 o 25 en el que el kit contiene uno o varios tampones para preparar los bacteriófagos o cada bacteriófago.

5 27. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en el que *Campylobacter spp* es *Campylobacter jejuni*.

28. Un procedimiento tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en el que *Campylobacter spp* es *Campylobacter coli*.

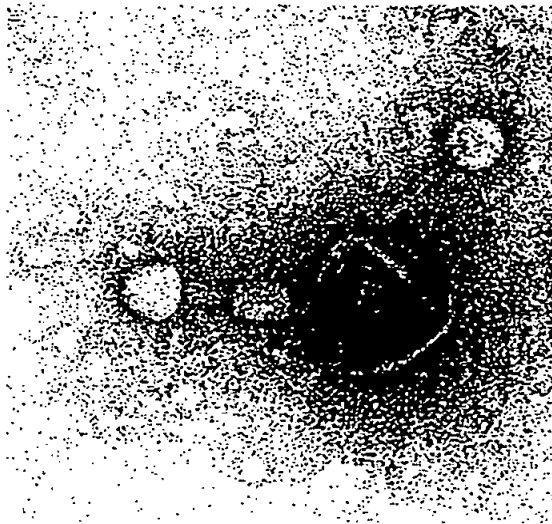
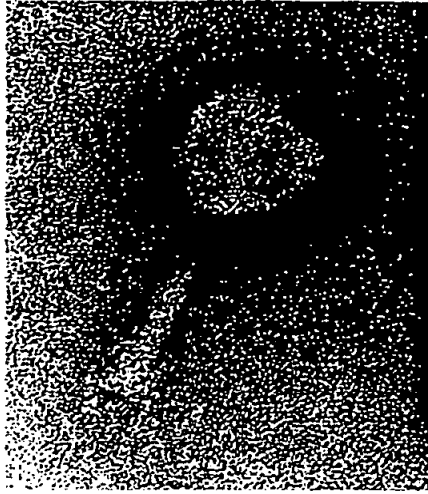


Figura 1a



Figura 1b