

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 316**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/10** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2005 E 05824860 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1812585**

54 Título: **Bacteriófagos como agentes selectivos**

30 Prioridad:

**01.11.2004 US 624092 P**

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

**24.11.2014**

73 Titular/es:

**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)  
Industriestrasse 21  
3130 Herzogenburg , AT**

72 Inventor/es:

**STAVE, JAMES, W. y  
TEANEY, GEORGE, B.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 523 316 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

Bacteriófagos como agentes selectivos.

**Campo de la invención**

5 La presente memoria se refiere al campo de la microbiología y más particularmente se refiere al uso de bacteriófagos en ensayos y procesos microbiológicos.

**Antecedentes de la invención**

10 La contaminación bacteriana es la principal causa de infecciones transmitidas por los alimentos y el agua en el mundo que provoca gastroenteritis, diarrea, calambres, vómitos y a menudo fiebre. En los países subdesarrollados, estas infecciones matan aproximadamente 1,8 millones de personas al año, la mayoría de los cuales son niños. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que 76 millones de estadounidenses se enferman, más de 300.000 son hospitalizados y 5.000 personas mueren a causa de enfermedades transmitidas por alimentos solo cada año. Después de comer alimentos contaminados, los seres humanos desarrollan diferentes grados de la enfermedad que van desde molestias gastrointestinales breves y leves, tal como la denominada "intoxicación por alimentos", a la enfermedad potencialmente normal. Las infecciones transmitidas por los alimentos más comúnmente reconocidas son 15 las causadas por bacterias tales como, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* O157:H7. Por ejemplo, *Salmonella* se encuentra en el ambiente, particularmente en el intestino de aves, reptiles, animales de granja y seres humanos. La enfermedad en los seres humanos a menudo resulta de la ingestión de carnes, leche o huevos mal cocinados o de la contaminación cruzada de otros alimentos que se comen sin cocinar.

20 Las enfermedades nocivas tales como el cólera y la siguelosis pueden ser transmitidas por agua contaminada y son causadas por bacterias que a menudo se pueden rastrear hasta las fuentes a lo largo de ríos y lagos. Gran parte de la contaminación se puede rastrear hasta los sistemas de alcantarillado sanitario que fugan y desbordan, plantas de tratamiento de aguas residuales, lixiviados de tanques sépticos y materia fecal asociada a escorrentía pluvial de las áreas con altas densidades de fauna silvestre, animales domésticos o ganado. Los principales patógenos bacterianos que se ha demostrado que provocan enfermedades intestinales humanas asociadas al agua potable son: *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Salmonella paratyphi - A* (fiebre paratifoidea); otras especies de *Salmonella* (salmonelosis, fiebre entérica); *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. sonnei* (disentería bacilar); *Vibrio cholerae* (cólera); *Leptospira spp.*, (leptospirosis); *Yersinia enterocolitica* (gastroenteritis); *Francisella tularensis*, (tularemia); *Escherichia coli* (gastroenteritis) y *Pseudomonas aeruginosa* (diversas infecciones). Debido a la gravedad de las enfermedades provocadas por las bacterias transmitidas por el agua y la importancia del agua como recurso natural, se controlan con frecuencia los niveles de bacterias "indicadoras" denominadas bacterias coliformes. Estas bacterias indicadoras generalmente son inofensivas, pero hay algunas excepciones. Determinadas cepas de *E. coli* se han asociado a infecciones gastrointestinales en adultos, conocidas como diarrea del viajero, infecciones de las vías urinarias y meningitis neonatal. Determinadas cepas de *Klebsiella neumonia* se han asociado a infecciones gastrointestinales, 30 neumonía, infecciones urinarias intrahospitalarias, infecciones de heridas por quemadura, y como invasores secundarios en otras infecciones respiratorias. *Enterobacter* se ha asociado con infecciones intrahospitalarias del tracto urinario. *Citrobacter* se ha asociado a infecciones urinarias, infecciones de de heridas superficiales, osteomielitis, meningitis neonatal y gastroenteritis.

40 De manera similar, la contaminación bacteriana en procedimientos de diagnóstico médicos o biológicos presenta un obstáculo problemático y costoso de dichos diagnósticos. La contaminación bacteriana en una muestra biológica tal como sangre, saliva o cultivo tisular puede afectar en gran medida un resultado satisfactorio de muchos ensayos biológicos. Los enfoques frecuentes comprenden el tratamiento de muestras biológicas con dosis muy altas de antibióticos a menudo sin resultados satisfactorios.

45 La fermentación bacteriana industrial es otra área comercial afectada por la contaminación bacteriana. La producción industrial de etanol en los Estados Unidos en 2005 se estima en 4,4 mil millones de galones (16,7 mil millones de litros), hasta el doble del año anterior. El etanol se produce utilizando principalmente la fermentación con levadura (*Saccharomyces*), siendo el maíz la materia prima predominante. Otros organismos utilizados en menor medida para la producción de etanol comprenden las bacterias *Zymomonas mobilis*. Otras materias primas comprenden residuos de caña de azúcar, paja de arroz, cebada y trigo, residuos de patata, residuos de madera, residuos urbanos y residuos de la industria de bebidas. Con dichos materiales sirviendo como materia prima, no es sorprendente que la mayoría de las fermentaciones tengan lugar en presencia de contaminación bacteriana significativa. *Lactobacillus* son los principales contaminantes en la producción de etanol y su presencia y la producción de ácido láctico resultante reduce la proliferación de la levadura y el rendimiento en etanol. 50

55 Del mismo modo, los aminoácidos producidos por la fermentación son predominantemente lisina y ácido glutámico (1 millón de toneladas métricas en conjunto), con cantidades menores de treonina y triptófano. Esto representa un mercado de 3,5 mil millones de dólares en todo el mundo. El organismo principal que se utiliza para la producción es *Corynebacterium glutamicum*. Las materias primas para este proceso comprenden residuos de maíz en combinación

con los productos de desecho con alto contenido en nitrógeno. Los *Bacillus* spp. aportan una cantidad considerable de los contaminantes que pueden producirse, y al ser de crecimiento rápido, compiten con el *Corynebacterium* por los nutrientes. Otros productos de fermentación bacteriana comprenden metabolitos, vitaminas, antibióticos y enzimas producidos todos dentro de cultivos de microorganismos que son sensibles a la contaminación bacteriana.

5 Los métodos convencionales para la detección de contaminación bacteriana emplean cultivo bacteriano no selectivo o selectivo, o enriquecimiento, seguido de cultivo en placa de los cultivos en medios selectivos para la verificación de las colonias sospechosas. Este enfoque consume mucho tiempo y puede durar varios días antes de que se obtengan resultados. Los métodos alternativos, utilizando inmunoanálisis o tecnologías de detección basadas en ácidos nucleicos, son más rápidos. Sin embargo, estos métodos aún requieren una etapa de enriquecimiento para la producción de una  
10 señal detectable. El tiempo necesario para el enriquecimiento suficiente viene dictado por la tasa de crecimiento de las bacterias diana en la muestra.

La mayoría de los métodos de detección y recuento de bacterias de alta sensibilidad requieren una incubación durante la noche. Además, estos métodos a menudo adolecen de una falta de sensibilidad o especificidad o requieren un equipo costoso o considerable experiencia técnica para llevar a cabo. Un problema particular con estos métodos es que,  
15 durante la etapa de enriquecimiento, casi todas las bacterias en el cultivo gozan de crecimiento mejorado. La presencia de un gran número de bacterias no elegidas como diana en el cultivo de enriquecimiento produce interferencias con la detección de las bacterias diana, dando como resultado falta de sensibilidad, reactividad cruzada, los resultados positivos falsos y negativos falsos. Los científicos han intentado reducir este problema mediante la adición de antibióticos a los cultivos de enriquecimiento. Sin embargo, la presencia de antibióticos en los medios de  
20 enriquecimiento disminuye la tasa de crecimiento de las bacterias diana, alarga la cantidad de tiempo necesario para realizar el ensayo y no puede eliminar la reactividad cruzada.

Los ensayos de detección bacterianas más recientemente desarrollados combinan un cultivo bacteriano enriquecido con un bacteriófago lítico, un virus que infecta específicamente las bacterias diana. Los fagos líticos están entre los organismos más simples y más abundantes en la tierra. Los fagos infectan bacterias anfitrionas respectivas e inyectan  
25 ADN del fago. Dentro de bacterias infectadas, el ADN del fago se replica y a continuación se incorpora en nuevas partículas víricas construidas por el anfitrión bacteriano. Las nuevas partículas de fago se liberan a continuación de sus células bacterianas anfitrionas por un proceso conocido como "lisis", que destruye la célula bacteriana infectada. La lisis permite la infección por fagos posterior de las bacterias adyacentes en un modelo exponencial rápido. A diferencia de los fagos líticos, los fagos moderados refuerzan su virulencia, resiliencia y la capacidad en general del anfitrión bacteriano para proliferar. En los ensayos de detección de bacterias recién desarrollados, los bacteriófagos líticos se marcan de alguna manera y se detecta la presencia del marcador cuando el fago infecta bacterias diana presentes en la muestra. Al igual que con los ensayos que emplean inmunoanálisis o sistemas de detección a base de ácidos nucleicos, los ensayos que utilizan bacteriófagos como medios para la detección de bacterias diana también adolecen de la incapacidad de obtener resultados rápidos, muy sensibles causados por el tiempo requerido para cultivar y enriquecer  
30 las bacterias diana y la expansión simultánea de bacterias no elegidas como diana en la muestra que interfiere o reacciona de forma cruzada con detección de las bacterias diana.

Por lo tanto, lo que se necesita es un método de detección bacteriana que sea muy sensible a concentraciones mínimas de unas bacterias diana en una muestra, como un contaminante tóxico bacteriano en los alimentos, el agua, el medio ambiente, medicinas, agrícola, veterinario, farmacéutico o preparados de fermentación industrial sin embargo  
40 proporciona detección rápida sin crear la oportunidad para resultados de falsos positivos y negativos indeseables, y procedimientos de producción bacteriana que enriquecen el microorganismo diana y mejoran el rendimiento de la producción. El documento WO 9722713 describe la detección de *M. tuberculosis* entre otras bacterias utilizando fagos. Menshikov *et al.* describen el empleo de fagos para detectar bacterias (Menshikov *et al.*, kliniceskaa Laboratornaa Diagnostika, 1996, páginas 50-52).

#### 45 **Compendio de la invención**

La invención solamente está limitada por sus reivindicaciones.

La presente invención aborda los problemas descritos anteriormente proporcionando métodos rápidos y muy sensibles y composiciones para la detección de uno o más microorganismos en una muestra. También se proporcionan procedimientos y composiciones para enriquecer la proliferación o la reproducción de uno o más microorganismos de interés a la vez que reducen o evitan la proliferación o la reproducción de las bacterias indeseables. Los  
50 microorganismos preferidos son las bacterias y las levaduras. Los microorganismos de interés preferidos son las bacterias.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria contienen uno o más bacteriófagos líticos como agentes selectivos para reducir, eliminar o controlar la proliferación de bacterias no deseadas o indeseables sin inhibición de la proliferación o reproducción del microorganismo de interés. En una realización, la composición contiene un bacteriófago lítico adaptado para el almacenamiento antes de su uso en un medio de enriquecimiento, diagnóstico o selectivo. En otra realización, la composición contiene un grupo o conjunto de bacteriófagos líticos específicos para las bacterias no  
55

deseadas o indeseables. En otra realización, la composición comprende uno o más bacteriófagos líticos en medios de enriquecimiento para la propagación, la proliferación o cultivo de uno o más microorganismos selectos de interés. En otra realización, la composición comprende bacteriófagos líticos en los medios microbianos de cultivo en placa para el cultivo en placa, siembra en rayas, identificación, caracterización, recuento o aislamiento de una o más colonias de microorganismos específicos. Las composiciones pueden envasarse en kits con nutrientes, reactivos, antibióticos inclusive, o combinaciones de los mismos para el enriquecimiento, cultivo en placa, aislamiento, selección, identificación, recuento o detección del microorganismo de interés. Las composiciones son útiles en la producción de alcohol, aminoácidos (tales como, por ejemplo, lisina) u otra sustancia química, molécula, sustancia o producto en el cultivo bacteriológico, de levaduras u otro cultivo microbiológico de residuos agrícolas, industriales o de otras materias primas naturales o no estériles. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria también son útiles para detectar enfermedades en plantas y animales.

Los procedimientos proporcionados en la presente memoria pueden emplear una o más de las composiciones de los bacteriófagos líticos descritos en la presente memoria durante la preparación, el enriquecimiento o el cultivo en placas del microorganismo diana de interés para reducir o inhibir la proliferación de bacterias no deseadas. Por ejemplo, las composiciones se pueden utilizar en un sistema de fermentación industrial para reducir la proliferación de bacterias competidoras y aumentar la eficiencia y/o el rendimiento durante la fermentación industrial u otra producción comercial de grandes cantidades de unos microorganismos deseables, tales como la levadura en una cervecería o panadería o bacterias recombinantes en una instalación de producción de proteínas recombinantes.

En una realización de los métodos de detección proporcionados en la presente memoria, uno o más bacteriófagos se utilizan durante la etapa de enriquecimiento de un ensayo para la detección de un microorganismo diana para reducir o inhibir la proliferación de bacterias contaminantes y permitir que se detecte la proliferación inalterada del microorganismo diana.

Los antibióticos que no alteran la proliferación o el enriquecimiento del microorganismo diana o deseable están comprendidos opcionalmente en las composiciones y procedimientos proporcionados en la presente memoria. Una combinación de antibióticos y bacteriófago en la composición permite la inhibición de dos tipos diferentes de bacterias no elegidas como diana. Por ejemplo, bacterias gram negativas y gram positivas. La velocidad y eficiencia de cualquier enriquecimiento depende en parte de la concentración y la composición de las bacterias competidoras presentes en la muestra. La eliminación o reducción de las bacterias contaminantes reduce la competencia por los nutrientes, y la concentración de sustancias que inhiben o que interfieren en el cultivo, aumentando de este modo la eficiencia de la etapa de enriquecimiento del proceso global. El tratamiento con fagos de la muestra en el método de detección aumenta la relación de diana a bacterias competidoras en la muestra, que requieren de este modo menos tiempo para el enriquecimiento para obtener una señal significativa y la mejora de la relación señal global a ruido en el ensayo.

En una realización preferida, la composición de bacteriófagos contiene una o más bacteriófagos y uno o más anticuerpos. Cada uno puede seleccionarse para tener un tipo diferente de especificidad para las bacterias no elegidas como diana. Cuando se combina con una muestra, la especificidad conferida por la acción de un anticuerpo específico coordinado con el bacteriófago en el método de detección da como resultado especificidad y sensibilidad superiores.

En otra realización de los métodos de detección proporcionados en la presente memoria, se utilizan uno o más bacteriófagos durante el cultivo microbiano en placa para reducir la proliferación de bacterias no deseadas en los medios de cultivo en placa y aumentar la capacidad para detectar, identificar, enumerar o caracterizar el microorganismo diana.

Todavía en una realización adicional más, los presentes métodos proporcionan una forma de reducir o eliminar la reactividad cruzada en el análisis y resultados de falsos positivos.

Las composiciones de bacteriófagos proporcionadas en la presente memoria se estabilizan preferentemente en una forma anhidra como un componente de una formulación del medio en polvo. En otra composición preferida, los bacteriófagos se estabilizan en una forma anhidra y se añaden a los medios de enriquecimiento o a los medios de cultivo durante la redisolución de los medios antes de la introducción de los microorganismos que van a cultivarse o sembrarse en placas o antes de la introducción de la muestra a analizar la presencia del microorganismo diana o, alternativamente, añadir directamente a la muestra. Alternativamente, el bacteriófago está en forma anhidra o líquida y se añade en cualquier momento antes o durante el proceso de enriquecimiento o de cultivo en placa, preferiblemente antes de la adición de microorganismo en la muestra.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método muy sensible para la detección de un microorganismo o clase de microorganismos diana en una muestra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método muy específico para la detección de un microorganismo o clase de microorganismos diana en una muestra.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un ensayo de detección de microorganismos en donde se impide que las bacterias que interfieren no elegidas como diana crezcan, se reduzcan o eliminen.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método rápido para la detección de un microorganismo diana en una muestra, particularmente una bacteria diana tales como un alimento, agua, contaminante del medio ambiente, industrial o farmacológico.

5 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento rápido para la proliferación o la reproducción selectiva de un microorganismo deseado en un medio de enriquecimiento, proceso o cultivo.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar composiciones para su utilización durante el enriquecimiento de un microorganismo diana, en donde las composiciones contienen uno o más agentes selectivos que inhiben, reducen o eliminan las bacterias no elegidas como diana sin reducir significativamente el enriquecimiento del microorganismo diana.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un medio de enriquecimiento microbiano para la proliferación de un microorganismo diana y reducir al mínimo o evitar la proliferación de bacterias no elegidas como diana.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para evitar o reducir la proliferación bacteriana indeseable en las reacciones de fermentación industrial.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos mejorados de detección de microorganismos con la reducción de respuestas de falsos positivos debido a la inhibición o reducción de la presencia de bacterias reactivas de forma cruzada o no específicamente reactivas en la muestra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos mejorados de detección de microorganismos con la reducción de las respuestas de falsos negativos debido a la inhibición o reducción de la presencia de bacterias que compiten o interfieren y al aumento de productividad del microorganismo diana.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento y composición para reducir la competencia microbiana en un medio de cultivo, aumentando de este modo la eficiencia y la velocidad de un proceso de enriquecimiento de un método analítico.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit de detección de microorganismos que contiene reactivos de detección y un componente de medios de enriquecimiento o el grupo de componentes para la detección rápida, sensible y específica de un microorganismo en una muestra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición de bacteriófagos que mejora el rendimiento del producto en un proceso industrial de producción microbiológica.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones y reivindicaciones dadas a conocer.

### 30 **Descripción detallada de la invención**

Los métodos y composiciones para la detección y producción de uno o más microorganismos en una muestra o proceso se describen en la presente memoria. También se describen procedimientos y composiciones para el enriquecimiento del cultivo o la reproducción de uno o más microorganismos de interés, mientras se reduce o evita el cultivo o la reproducción de bacterias indeseables.

35 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden contener uno o más bacteriófagos líticos como agentes selectivos para reducir, eliminar o controlar la proliferación de bacterias no deseadas o no deseables en una muestra sin inhibición de la proliferación o la reproducción de un microorganismo de interés, y los procedimientos descritos en el presente documento utilizar las composiciones para enriquecer el microorganismo diana o deseable durante el cultivo de microorganismos. Estas composiciones preferiblemente aumentan la sensibilidad y la especificidad de la detección y disminuyen las cantidades de resultados de falsos positivos o falsos negativos.

40 Los bacteriófagos o fagos, son virus bacterianos que se unen a un organismo anfitrión que lleva un receptor de unión específica. Los bacteriófagos se emplean en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria debido a que presentan un alto grado de especificidad al unirse y lisar bacterias anfitrionas. Hay varias ventajas de utilizar fagos sobre los antibióticos. Los fagos sólo se multiplican en presencia de bacterias anfitrionas, y en presencia de un anfitrión apropiado aumentan en concentración proporcionando aún mayor disuasión para la proliferación de microorganismos no deseados. Los fagos pueden ser mucho más específicos que los antibióticos, y pueden seleccionarse fagos específicos para dirigirse a cepas bacterianas específicas. Los fagos son activos a concentraciones bajas y son capaces de infectar bacterias que son resistentes a los antibióticos. En comparación con los antibióticos, se necesitan concentraciones menores de fagos durante un período más corto para lograr la misma cantidad de destrucción bacteriana. Por lo tanto, los bacteriófagos son capaces de eliminar bacterias contaminantes más rápida y eficazmente que los antibióticos convencionales. Además, los preparados de fagos son muy simples y económicas de

preparar y son sumamente estables. Las composiciones de fagos tienen una larga vida útil y los costes de producción son bajos, lo que hace el empleo de fagos económicamente viable.

#### *Composiciones de bacteriófagos*

5 Las composiciones de bacteriófagos proporcionadas en la presente memoria contienen una o más cepas de fagos adecuados para la infección y destrucción de las especies y cepas bacterianas indeseables o contaminantes. En una realización, la composición contiene un bacteriófago lítico aislado específico para una o más bacterias no deseadas o no deseables que está adaptado al almacenamiento antes de su uso en un enriquecimiento o medio de cultivo en placa. En otra realización, la composición contiene un grupo o conjunto de bacteriófagos líticos específicos para las bacterias no deseadas o no deseables. En otra realización, la composición comprende uno o más bacteriófagos líticos en medios de enriquecimiento para la propagación, proliferación o cultivo de uno o más microorganismos seleccionados de interés. En otra realización, la composición comprende bacteriófagos líticos en los medios de cultivo en placa microbiana sólidos o semisólidos para el cultivo en placas, siembra en rayas, aislamiento, selección, caracterización, recuento o identificación de una o más colonias de microorganismos específicos. En otra realización, la composición comprende bacteriófagos líticos para controlar las bacterias u otros microorganismos no deseados en cultivos de levaduras, hongos o células eucariotas superiores tales como células vegetales o animales.

#### *Bacteriófagos*

20 Los bacteriófagos de las composiciones proporcionadas en la presente memoria comprenden cualquier bacteriófago lítico específico para una bacteria que no sean el microorganismo diana que debe detectarse o enriquecerse. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "bacteriófago", "bacteriófago lítico" y "fago" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a virus especializados en bacterias que infectan tipos específicos de bacterias y se replican en el anfitrión bacteriano y finalmente destruyen la célula bacteriana mientras que liberan numerosa prole de fagos en el medio. Los fagos no líticos o moderados son también útiles en la composición descrita en la presente memoria siempre que los fagos no líticos o moderados se hayan modificado para provocar la lisis o evitar la proliferación de las bacteria anfitrionas. Un procedimiento para la modificación de dichos fagos se describe en la publicación de patente de Estados Unidos 2003/0180319.

30 Un bacteriófago es específico para una célula bacteriana cuando infecta la célula bacteriana dada y no infecta a las células bacterianas de otras especies o cepas. La especificidad de un fago para su anfitrión se determina en dos niveles. El primer nivel de referencia implica la interacción de los componentes de fagos con elementos complementarios en la superficie celular bacteriana, lo que determina la capacidad de los fagos para unirse a la célula e inyectar su ADN. Hay pruebas sustanciales de que la reproducción de fagos, la ingeniería genética de los elementos fibrosos, y la hibridación, puede alterar la especificidad del fago a este nivel. El segundo nivel de referencia sobre la especificidad es durante los hechos que ocurren dentro de la célula bacteriana, después de la inyección del ADN del fago. Por lo tanto, el bacteriófago contenido en las composiciones descritas en la presente memoria comprende fago genéticamente modificado o recombinante que se ha alterado para aumentar la afinidad de unión, la infecciosidad, el tamaño de la serie, la multiplicidad de infección (m.o.i.) o la capacidad lítica de las bacterias para ser eliminadas de una muestra o cultivo.

40 Se han aislado actualmente fagos específicos para más de 100 géneros de bacterias (Ackermann, 1996 *Arch. Virol.* 141(2):209-18), y se han encontrado prácticamente en todas partes que se han buscado. Se ha identificado un gran número de fagos que infectan a diferentes cepas de *E. coli*. Más de 20.000 cepas de bacterias (siendo 7.000 de *Salmonella*) se han evaluado para la identificación de fagos (He y Pan, 1992, *J. Clin. Microbiol.* 30(3):590-4). Una serie de fagos dirigidos específicamente a *Citrobacter* y *E. coli* pero no *Salmonella* se han descrito también, lo que demuestra que puede montarse un grupo de fagos para dirigirse a un conjunto específico de organismos.

45 Para la erradicación de una determinada bacteria, se selecciona un bacteriófago que puede infectar la célula bacteriana, replicándose dentro de la célula bacteriana y lisando la célula bacteriana. Una amplia variedad de bacteriófagos están disponibles para cualquier célula bacteriana dada, por ejemplo, de la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549 Manassas, VA., EE.UU.) o por aislamiento de fuentes naturales que albergan las células anfitrionas. Una lista de los tipos de fagos está publicada como Catalogue of Bacteria & Bacteriophages. (American Type Culture Collection, Rockville, Md. 1989). Depositarios de microorganismos similares publican datos equivalentes. Estos datos son útiles para incluir la identificación de los reactivos de bacteriófagos en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria.

55 Además de presentar especificidad y actividad antimicrobianas, los fagos tienen capacidad para producir autoampliación sustancial en un corto periodo. En condiciones óptimas de infección y del medio de cultivo del anfitrión, una combinación de fago/bacteria dada da lugar a un número constante de la prole de fagos. Para la detección de una determinada célula bacteriana, se utiliza un bacteriófago preferiblemente que le da un tamaño de la serie óptimo o máximo, que es el número de la prole producida por célula. Preferiblemente, el tamaño de la serie de una célula bacteriana lisada es de aproximadamente 10 a 10.000 partículas de fago de prole de una única célula infectada. A fin de aumentar la tasa de infección de una muestra se prefieren tamaños de las series altos para eliminar las bacterias

contaminantes más rápidamente. El tiempo de la serie preferido del fago incluido en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria es de dos minutos a cuatro horas. Se prefieren tiempos de series breves para la destrucción más rápida de las bacterias contaminantes. Una sola célula bacteriana puede ser infectada por varias partículas de fago (multiplicidad de infección, m.o.i.), y la irrupción del fago depende de la multiplicidad. Para producir altos rendimientos, generalmente se utiliza una m.o.i. de 10. Se prefieren m.o.i. superiores porque dan lugar a lisis más eficaz a concentraciones más bajas de bacterias no deseadas.

Un ejemplo de un fago candidato para ser incluido en la composición descrita en el presente documento es phi29 de *B. subtilis*, por que da una serie de 1.000 en un ciclo vital de 35 minutos. Se prefieren fagos similares ricos con gran tamaño de la serie y ciclo de vida corto. Los diferentes tipos de bacteriófagos pueden obtenerse de proveedores comerciales o de depositarios biológicos tales como la American Type Culture Collection (ATCC) o la Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Braunschweig, Alemania, el German National Resource Centre for Biological Material. Dichos bacteriófagos comprenden, pero no se limitan a, fagos de *Actinoplanes/Micromonospora* (Ap3, AP4, Mm1, Mm3 Mm4, Mm5, phiUW 51); fagos de *Amycolatopsis* (W2, W4, W7, W11); fagos de *Bacillus* (GA-1, Phi 29, SPβ); fagos de *Cellulomonas* (02, 03, 05, 06, 08, 011, 013); fagos de *Escherichia* (lambda, M13, M13, mp18, MS2, Mu, P1, PhiX174, Qβ, R17, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, U3); fagos de *Lactococcus* (P001, P008); fago de *Methanothermobacter* (psi M2 (ΨM2)); fagos de *Nocardia/Rhodococcus/Gordonia* (N4, N5, N13, N18, N24, N26, N36); fagos de *Nocardiooides* (X1, X3, X5, X6, X10, X24); fagos de *Nocardiosis* (D3, D4); fagos de *Promicromonospora* (P1, P2, P3, P4); fagos de *Pseudomonas* (Psp1, Psp2, Psp3, Psp4, Psp5); fagos de *Pseudonocardia* (W3); fagos de *Saccharomonospora* (Tm1, Tm2, Tm3); fagos de *Saccharopolyspora* (Mp1, Mp2); fago de *Saccharothrix* (W1); fago de *Sporichthya* (Sp1); fagos de *Streptomyces* (P23, P26, S1, S2, S3, S4, S6, S7, SH10, phi *A. streptomycini* III, phi8238, phiC31); fagos de *Terrabacter* (Tb1, Tb2); fago de *Tsukamurella* (Ts1).

Otros bacteriófagos con un alto nivel de especificidad se pueden desarrollar mediante el cribado de muestras utilizando los procedimientos descritos en la patente de Estados Unidos nº 6.322.783. Los fagos específicos para determinadas bacterias se pueden seleccionar también utilizando técnicas de rutina en el laboratorio debido a la capacidad del fago a mutar rápidamente, produciendo de este modo mutantes de espectro de anfitriones.

#### Aislamiento de fagos

Debido a que los bacteriófagos son específicos para una determinada especie o cepa de bacterias, se suelen encontrar asociados a sus bacterias anfitrionas específicas. Las fuentes bacterianas de fagos comprenden, pero no se limitan a muestras de aguas residuales; heces; suelo; profundidades oceánicas; aguas termales; desechos tales como de hospitales, granjas, y laboratorios; procesamiento de alimentos; envases de carne y corrales; y procesos agrícolas e industriales. Los fagos también pueden aislarse de los ríos y lagos, estanques, pozos, acuíferos, así como de otras fuentes de agua (como por ejemplo el agua salada). Las fuentes de agua de lugares poco probables de contaminación son también fuentes preferibles.

Los procedimientos para el aislamiento de fagos son los siguientes. Generalmente, la muestra sospechosa de contener un bacteriófago se filtra en primer lugar y luego se enriquece. En un cultivo que contiene una bacteria anfitriona, se centrifuga una muestra y el sobrenadante se separa y se pasa a través de un filtro de microporos, tales como los filtros disponibles en el mercado de la compañía Millipore®, con poros lo suficientemente pequeños para impedir el paso de bacterias (aproximadamente 0,45 μm a 0,2 μm) pero lo suficientemente grandes para permitir el paso del fago. El sobrenadante filtrado se mezcla a continuación a diferentes diluciones con un cultivo puro de bacterias anfitrionas específicas. Las diluciones de bacterias y el sobrenadante se extienden sobre una placa de agar-agar nutritivo u otro sustrato nutritivo sólido para el cultivo bacteriano. Después de aproximadamente 8 a 24 horas, se manifiesta un césped bacteriano con manchas claras redondas, llamadas placas. Cada placa contiene muchos millones de partículas de fagos, toda la prole de un fago que se inmovilizó sobre el agar-agar. Un palillo de dientes estéril, u otro dispositivo similar, se introduce en una placa y se transfiere a un cultivo reciente de las bacterias en medio nutritivo líquido. De esta manera, se cultiva una solución madre homogénea del clon de fago y el fago puede estudiarse con más detalle o utilizarse para aplicaciones tales como, pero sin limitarse a, ensayos de selección y detección de bacterias y procesos de producción.

Se propagan cepas de bacteriófagos individuales (es decir, monofagos) y a continuación se prueba la actividad contra cepas de múltiples bacterias para seleccionar fagos con especificidad para las cepas bacterianas deseadas. Cuando se intenta controlar la proliferación de una amplia variedad de especies bacterianas y cepas, se hacen esfuerzos para seleccionar los fagos que son líticos y específicos para más de una cepa bacteriana. También es posible seleccionar fagos apropiados basándose en las secuencias de proteínas que codifica ADN o ARN implicadas en la unión y/o la entrada del fago en su anfitrión específico, o basándose en las secuencias de aminoácidos o propiedades antigénicas de dichas proteínas.

*Formulaciones de fagos*

- Las composiciones de fagos pueden tomar la forma de lisados relativamente crudos de cultivos bacterianos o preparados de virus muy purificados. Los fagos pueden formularse de varias maneras para el almacenamiento y expedición. En una realización, el fago se estabiliza en forma anhidra y se incluye como un componente de una formulación del medio en polvo, solo o incorporado en un polvo que contiene otras sustancias, tales como medios de cultivo, excipientes, agentes de carga, etc.
- En otra realización, fagos se secan por congelación o liofilizan en un polvo seco y se añaden a los medios de enriquecimiento como complemento durante la redisolución de un medio en polvo o se añaden después durante el proceso de enriquecimiento si se desea. Los fagos pueden almacenarse secos o liofilizados en papel de filtro o como una suspensión anhidra o liofilizada, que puede facilitar la expedición. La mayor parte de los fagos pueden liofilizarse en leche descremada (p. ej., 20%). Se han descrito muchos procedimientos para la liofilización de fagos y son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, T. Kieser *et al.* PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS, publicado por la John Innes Foundation, ISBN 0-7084-0623-8, capítulo 12). Los fagos también están disponibles en forma líquida o suspensión.
- En otra realización, el fago está en forma líquida y se combina con el medio por pulverización sobre un polvo del medio y se mezcla para distribución uniforme o el fago líquido se combina con medio líquido y se mezcla. El fago líquido está presente solo en una solución acuosa solo o en solución con otras sustancias tales como azúcares, polímeros, proteínas, sales, tampones o detergentes.
- El medio con el que el bacteriófago se combina puede estar en forma líquida, sólida o semisólida o incorporado en una película del medio tales como las placas Petrifilm™ (3M, St. Paul, Minnesota).
- En otra realización, las suspensiones líquidas de fago se congelan con o sin crioprotector. Las composiciones líquidas se conservan refrigeradas, por ejemplo, a aproximadamente + 4°C, o crioprotegidas en glicerol (p. ej., al 50%) y se congelan en nitrógeno líquido a -80°C. Los fagos se recuperan de los viales liofilizados o de nitrógeno líquido descongelado de la forma siguiente. Se preparan cultivos de bacterias anfitrionas que crecen activamente durante aproximadamente una a 48 horas y el fago liofilizado asépticamente se rehidrata con medio nutritivo. Los cultivos bacterianos se cultivan en una placa de agar-agar nutritivo como una capa de anfitrión con agar-agar blando (por ejemplo, como se describe en Adams, M.H. (1959) BACTERIOPHAGES, Interscience Publishers, Inc., Nueva York) y se añaden gotas de fago rehidratado o descongelado a la capa de anfitrión con agar-agar. Las placas se cultivan durante la noche y los fagos se aíslan de las placas resultantes empleando procedimientos convencionales.
- Para propagar los fagos, se preparan placas con la capa de anfitrión con agar-agar blando como anteriormente y se cubre con aproximadamente 0,5 ml del fago concentrado. Alternativamente, el fago se añade directamente al anfitrión con agar-agar derretido antes del vertido sobre las placas. Para cantidades mayores, pueden prepararse matraces en T de gran tamaño con el agar-agar recomendado, y aproximadamente 12 ml de anfitrión con agar-agar blando derretido se vierten en la superficie. Se deja entonces que el fago corra sobre la superficie endurecida. Los fagos también pueden añadirse directamente al agar-agar blando derretido antes del vertido como se ha descrito anteriormente. Después de aproximadamente 24 horas de incubación, el agar-agar blando se raspa la superficie de las placas de agar-agar y se centrifuga a aproximadamente 1.000 rpm durante aproximadamente 25 minutos para sedimentar los restos celulares y el agar-agar. El sobrenadante se pasó a través de un filtro, preferiblemente un filtro de 0,45 µm a 0,22 µm, y el filtrado se almacena a aproximadamente 4°C a 8°C. Los lisados continúan siendo viables en condiciones de refrigeración durante largos períodos.
- Los fagos también se puede propagar por proliferación de bacterias anfitrionas en caldos de cultivo, inoculación con fagos, incubando durante suficiente tiempo para provocar la lisis de las células bacterianas y filtrando el lisado resultante a través de un filtro de 0,45 a 0,2 µm.
- Los fagos también se conservan en los cultivos de bacterias lisadas y se conservan congelados para su posterior redisolución en medio de cultivo nutritivo. Los cultivos de bacterias lisadas se conservan congelados, por ejemplo con glicerol (p. ej., 10-50%) o DMSO (p. ej., 5%), en medios nutritivos y almacenados en nitrógeno líquido. Los cultivos de bacterias lisadas también pueden liofilizarse y conservarse congelados en leche descremada (p. ej., 20%), o una solución de sacarosa (p. ej., 12%) en el medio nutritivo. Los lisados bacterianos congelados se descongelan rápidamente en un baño de agua a aproximadamente 37°C, y la totalidad de la alícuota se inocula en medio reciente. Los procedimientos para la proliferación, lisis y almacenamiento de cultivos bacterianos que albergan partículas de fago son bien conocidos en la técnica.
- Los preparados de fagos pueden ser monovalentes, por que contienen un tipo de bacteriófago, o polivalentes, que contienen más de un tipo de fago. Los preparados polivalentes, también conocidos como mezclas de fagos o grupos de fagos, se formulan para que incluyan varias especies de fagos para dirigir más de una cepa o especie bacteriana. La combinación en un cóctel de fagos puede incluir varios fagos dirigidos a diferentes cepas bacterianas o puede tener acciones más amplias gracias al contener fagos dirigidos a varias especies bacterianas. Los mezclas de fagos pueden



incluir una mezcla de fagos específicos para varias especies bacterianas no relacionadas para eliminar bacterias contaminantes en un cultivo diseñado para enriquecer una bacteria diana.

5 En una realización, se utiliza una combinación de fagos donde la combinación contiene el fago específico para *Enterococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.*,  
 10 *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Staphylococcus spp.* En esta realización, la mezcla carece de fago específico para *Salmonella spp.* y por lo tanto es útil para enriquecer una muestra para *Salmonella* cuando se cultiva en medios nutritivos con este cóctel de fagos como aditivo. Pueden diseñarse preparados de fagos similares para el enriquecimiento específico de una bacteria diana deseada incluyendo fagos que son específicos para bacterias no deseadas y omitiendo fagos específicos para las bacterias diana. Los fagos  
 15 específicos para los géneros de bacterias pueden combinarse para crear una mezcla antibacteriana de amplio espectro. En una realización preferida para la detección de bacterias patógenas en muestras de alimentos, se seleccionan fagos que son específicos para los miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* distintos de la diana del método de detección.

20 Las mezclas de fagos pueden adaptarse a las bacterias que son frecuentes en algunas muestras. En una realización preferida, se seleccionan los fagos que son específicos para otras bacterias más predominantes o en mayor concentración en la muestra distintas del microorganismo que va a detectarse. Las bacterias más frecuentes se aíslan a partir de una alta dilución de una determinada muestra y se ensaya la sensibilidad a diversas cepas de bacteriófagos de manera análoga a la prueba de sensibilidad antimicrobiana. Una vez se conoce el perfil de una muestra bacteriana y se determina el perfil de sensibilidad del fago, se formula el cóctel de fagos apropiado para una muestra determinada para  
 25 evitar la proliferación de las bacterias competidoras y enriquecer el organismo diana.

En otra realización, pueden combinarse fagos específicos para géneros bacterianos para crear una mezcla antibacteriana de amplio espectro para su uso cuando se cultivan levaduras, hongos o células eucariotas superiores tales como células vegetales o animales.

30 Las concentraciones de fagos en medios de cultivo sólidos, semisólidos o líquidos útiles para el control de microorganismos indeseables en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria son preferiblemente de  $10^3$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de placas por ml (UFP/ml).

En otra realización, se incorporan antibióticos en medios específicos para toda una clase de microorganismos de la que se excluye el microorganismo diana, tales como las bacterias gram positivas (tales como, pero sin limitarse a, lactobacilos y estafilococos) y los fagos se añaden a los medios para eliminar las bacterias gram negativas de  
 35 reacción cruzada con el reactivo de detección específica o el método empleado.

#### *Kits para ensayos de detección*

Un kit para detectar una célula bacteriana en una muestra, también se proporciona en el presente documento. Los kits presentes pueden utilizarse en métodos tales como RCP, BAX, identificación bioquímica tales como API, microidentificación, análisis de ácidos grasos y ensayos enzimáticos tal como COLILERT® (Idexx Laboratories, Inc.). El  
 40 kit comprende medios de cultivo de microorganismos y uno o más bacteriófagos específicos para bacterias potencialmente competidoras, interfirientes o indeseables. La preparación de bacteriófago es un componente íntegro de los medios de cultivo, es un componente por separado inmovilizado sobre un sustrato sólido, o se proporciona como un aditivo líquido o sólido en polvo por separado. Ejemplos de sustratos sólidos son las fibras, filtros fibrosos, filtros de membrana, y partículas tales como perlas de látex, oro coloidal, partículas magnéticas, partículas de sílice, y otras  
 45 partículas conocidas en la técnica. El kit comprende opcionalmente instrucciones impresas, una o más referencias positivas, una o más referencias negativas o combinaciones de las mismas.

Además, el kit comprende opcionalmente reactivos y medios para la separación de un componente en la muestra de otro. Los medios para la separación comprenden, pero no se limitan a, reactivos y equipos de extracción líquido-líquido, así como sustancias sólidas tales como filtros, perlas de látex, partículas coloidales como por ejemplo bacterias,  
 50 partículas magnéticas, medios para centrifugación, sustancias sólidas con características definidas tales como carga electrónica, la porosidad y superficies hidrófilas/hidrófobas, dispositivos de flujo lateral, dispositivos inmunocromatográficos y otras bien conocidos en la técnica.

Los reactivos útiles para separaciones comprenden, pero no se limitan a, anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos, estreptavidina, avidina, biotina, carbohidratos, proteínas, péptidos, proteína A, proteína G, moléculas pequeñas y otros  
 55 ligandos de unión bien conocidos en la técnica. Dichos reactivos y medios para separar pueden ser dirigidos hacia, y ser útiles para la separación, cualquier componente de todo el proceso de ensayo como por ejemplo la preparación de la muestra, enriquecimiento, proliferación o reproducción, y pruebas. Dichos reactivos y medios para la separación, y combinaciones de los mismos, son bien conocidos para los expertos en la técnica y se contemplan en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria. Los medios para realizar separaciones en los kits diseñados para detectar componentes de microorganismos utilizando anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos y

otros ligandos de unión son bien conocidos en la técnica y están dentro del alcance de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

5 El rendimiento de un análisis bioquímico completo generalmente requiere aislar la molécula en forma pura de otras moléculas en un extracto de una muestra biológica, a continuación, caracterizarla y analizar su función. Los análisis bioquímicos pueden caracterizar una molécula, cuantitativa o semicuantitativamente, y los ensayos de detección pueden oscilar desde el simple tipo de análisis proporcionado por determinaciones espectrofotométricas, la actividad enzimática y la tinción de gel para determinar la concentración y pureza de proteínas y ácidos nucleicos, a análisis más detallados.

10 Los reactivos para la detección del organismo de interés están opcionalmente provistos con el kit y comprenden ligandos detectables tales como anticuerpos o secuencias de ácidos nucleicos específicas para el organismo que debe detectarse o enzimas o sustratos u otras moléculas o indicadores químicos o bioquímicos. Los ligandos pueden conjugarse con un marcador detectable que es colorimétrico, radiactivo, fluorescente, quimioluminiscente, bioluminiscente, electroquímico, enzimático o metabólico, u otros marcadores utilizados rutinariamente en la técnica. Dichos reactivos son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Procedimientos de utilización de las composiciones de bacteriófagos

15 Los procedimientos proporcionados en la presente memoria emplean una o más de las composiciones de bacteriófagos líticos descritas anteriormente durante el enriquecimiento o de cultivo en placa de un microorganismo deseable o diana de interés para reducir, inhibir o eliminar la proliferación de bacterias no deseadas.

20 En una realización, las composiciones son útiles en un sistema de fermentación industrial para reducir la proliferación de bacterias competidoras y aumentar la eficiencia y el rendimiento durante la fermentación industrial u otra producción comercial de grandes cantidades de un organismo deseable, tal como levaduras en una fábrica de cerveza o panadería, o bacterias recombinantes en una instalación de producción de proteínas recombinantes, o células o tejidos eucarióticos en un proceso industrial o farmacéutico. El aumento de producción de microorganismos da como resultado una mayor producción del producto producido por este organismo. Una lista de productos frecuentes producidos utilizando microorganismos se exponen a continuación en la Tabla 1. Los procedimientos de enriquecimiento de microorganismos proporcionados en la presente memoria son particularmente útiles cuando la materia prima o el material de aporte no es estéril y por lo tanto contiene un microorganismo contaminante. Por ejemplo, el enriquecimiento de levaduras (tal como, pero no limitado a, *Saccharomyces* o *Zymomonas mobilis*) en una reacción de fermentación que contiene materia prima aumenta la producción de etanol. Otras materias primas comprenden la caña de azúcar, paja de arroz, cebada y desperdicios de trigo, desperdicios de patata, desperdicios de madera, residuos urbanos y residuos de la industria de bebidas. Con dichos materiales que sirven como materias primas no es sorprendente que la mayoría de las fermentaciones tengan lugar en presencia de contaminación bacteriana significativa. Los lactobacilos son los principales contaminantes en la producción de etanol y su presencia y la producción de ácido láctico resultante reduce el rendimiento de etanol y reduce la proliferación de la levadura.

35 Los aminoácidos producidos por fermentación son predominantemente lisina y ácido glutámico (1 millón de toneladas métricas en conjunto), con cantidades menores de treonina y triptófano. Esto representa unos 3,5 miles de millones de dólares en el mercado mundial. El organismo principal utilizado para la producción es *Corynebacterium glutamicum*. Las materias primas para este proceso comprenden residuos de maíz combinados con productos residuales con alto contenido en nitrógeno. Las especies de bacilos aportan una considerable cantidad de las contaminaciones que pueden ocurrir, y que al ser de crecimiento rápido, compiten con las *Corynebacterium* por los nutrientes.

TABLA 1: Productos de fermentación industrial

Metabolito	Producido por
Ácido Cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
Acetona y butanol	<i>Clostridium acetobutyricum</i>
Riboflavina	<i>Ashbya gossipii</i>
Vitamina B12	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
	<i>Propionibacterium shermanii</i>
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Goma de xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>
Antibióticos y relacionados	Producidos por
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>
Estreptomina	<i>Streptomyces griseus</i>
Cefalosporina	<i>Cephalosporium acrimonium</i>
Griseofulvina	<i>Griseofulvina Penicillium</i>
Ciclosporina	<i>Tolypocladium inflatum</i>

Giberelina	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Enzimas	Producidas por
Amilasas	<i>Aspergillus oryzae</i>
Glucamilasa	<i>Aspergillus niger</i>
Celulasa	<i>Reesii Trichoderma</i>
Invertasa	<i>Saccharomyces cervisiae</i>
Lactasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Lipasa	<i>Saccaromycopsis lipolytica</i>
Pectinasa y proteasa	Especies de <i>Aspergillus</i>
Proteasa	Especies de <i>Bacillus</i>
Cuajo microbiano	<i>Mucor pusillus</i> y <i>Mucor meihei</i>

5 Los expertos en la técnica entienden que, cuando se utiliza en un procedimiento de enriquecimiento para la producción, tal como la fermentación industrial, la producción recombinante u otra producción comercial, la muestra a la que se añade la composición de bacteriófago es una cantidad sumamente grande tal como el contenido de una cuba de producción, recipiente, reactor (tal como un reactor microbiológico para la producción de un producto biológico utilizando bacterias o levaduras) o fermentador.

Alternativamente, la composición de bacteriófagos se utiliza en un método para la detección de un microorganismo diana en una muestra. En una realización, uno o más bacteriófagos se utilizan durante la etapa de enriquecimiento de un método para la detección de una diana bacteriana para reducir o inhibir la proliferación de bacterias contaminantes y preferentemente permitir la proliferación de las bacterias diana que deben detectarse.

10 En otra realización, se utilizan uno o más bacteriófagos durante el cultivo en placa microbiana para reducir la proliferación de bacterias no deseadas en los medios de recubrimiento y aumentar la capacidad de aislar, detectar, enumerar o identificar el microorganismo diana. Medios de cultivo en placas adecuados comprenden tanto los medio sólidos y/o semisólidos.

#### *Poblaciones de dianocitos*

15 Los procedimientos descritos en la presente memoria son útiles para la detección, la proliferación, la reproducción, el enriquecimiento, el aislamiento, la caracterización, la recuento o identificación de cualquier microorganismo de interés. Los expertos en la técnica apreciarán que no hay límite a la gama de poblaciones de microorganismos diana aparte de la disponibilidad del fago específico necesario para eliminar contaminantes competidores o indeseables. Preferiblemente, los microorganismos diana son las bacterias. Un compendio de las bacterias para las que los procedimientos y composiciones son útiles es el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Lippincott Williams & Wilkins). Las células bacterianas diana contempladas por los presentes procedimientos comprenden, pero no se limitan a, células bacterianas que son alimentos, agua o contaminantes ambientales, patógenos de importancia agrícola, médica o veterinaria, y las células bacterianas útiles en procesos farmacéuticos, industriales o comerciales. Las células bacterianas diana específicas comprenden, pero no están limitadas a, todas las especies de *Salmonella*, todas las cepas de *E. coli*, entre otras, pero no limitadas a *E. coli* O157:H7, todas las especies de *Listeria*, entre otras, pero no limitadas a *L. monocytogenes*, coliformes, todas las especies de *Legionella* y todas las especies de *Campylobacter*.

30 Las bacterias patógenas también pueden incluir, pero no están limitadas a *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces israelii*, *Bacillus* spp. (*Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*), *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Brucellae* (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*), *Costridium* spp. (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*), *Corynebacterium diphtheriae*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, enterococos (*Enterococcus faecalis*), *Escherichia coli*, *Eubacterium alactolyticum*, *Enterobacter* spp. (*Enterobacter cloacae*), *Francisella tularensis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiellae* (*Klebsiella pneumoniae*), *Legionella* spp. (*Legionella pneumophila*), *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus*, (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella* (*Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis typhi*), *Serratia* spp., estafilococos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Shigella* spp. (*Shigella dysenteriae*), *Spirillum minus*, estreptococos, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio* spp. (*Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*), *Xanthomonas maltophilia*, y *Yersinia* spp. (*Yersinia pestis*).

40 Las células bacterianas diana contempladas por los presentes procedimientos también comprenden, pero no se limitan a, células bacterianas que se encuentran por ser sistemas contaminantes de importancia comercial, tales como las utilizadas en las industrias de fermentación comercial, la producción de etanol, la producción de antibióticos, la producción de aminoácidos, productos farmacéuticos, la producción de vino, la producción farmacéutica, el tratamiento de residuos, el tratamiento de agua, biodegradación, etc. Dichas bacterias comprenden, pero no se limitan a,

organismos tales como *Lactobacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Brevibacterium spp.* y *Acetobacter spp.* durante la producción de etanol. Otros ejemplos de bacterias comprenden las enumeradas en W. Levinson *et al.*, MEDICAL MICROBIOLOGY & IMMUNOLOGY, McGraw-Hill Cos., Inc., 6<sup>a</sup> ed., páginas 414-433 (2000). Todos los cultivos de bacterias se cultivan usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 Los expertos en la técnica entienden que el término "microorganismo diana" significa una sola especie, cepa o estirpe, así como grupos o familias de organismos. Por ejemplo, el procedimiento es útil para la detección de *Salmonella enteritidis*, así como todas las *Salmonella*.

10 Los procedimientos proporcionados en la presente memoria para la detección de una diana proporcionan alta sensibilidad de detección en un corto período de tiempo sin necesidad de prolongados enriquecimientos del cultivo. Por ejemplo, los presentes procedimientos pueden proporcionar la detección o cuantificación de menos de aproximadamente 100, menos de aproximadamente 50 o menos de aproximadamente 10 células bacterianas en una muestra. Preferiblemente, los presentes procedimientos pueden proporcionar la detección o cuantificación de menos de aproximadamente cinco, menos de aproximadamente cuatro, menos de aproximadamente tres, o menos de aproximadamente dos células bacterianas en una muestra. Más preferiblemente, los procedimientos pueden proporcionar la detección y cuantificación de una sola célula bacteriana en una muestra.

15 Un tiempo de generación bacteriana se define por la tasa de crecimiento bacteriano en condiciones nutritivas convencionales (medio de cultivo, pH, temperatura, etc.) durante la fase de crecimiento exponencial. Las bacterias diana preferiblemente tienen un tiempo de generación de 10 minutos a 36 horas. Son preferibles las bacterias que tienen tiempos de generación más cortos dentro de este intervalo, reduciendo de este modo el tiempo requerido para la etapa de enriquecimiento en el ensayo de detección. Sin embargo, la presente invención es particularmente útil para las bacterias diana con largos tiempos de generación ya que evita o inhibe la proliferación de microorganismos no selectivos de crecimiento más rápido.

#### *Empleo de bacteriófagos como agentes de selección en medios de cultivo*

25 Cuando se utiliza como agente de selección en medios de cultivo, el bacteriófago se añade al medio de cultivo similar a cualquier aditivo de cultivo que se añade de forma rutinaria. El empleo de bacteriófagos en lugar de antibióticos reduce el tiempo de incubación necesario debido a que el bacteriófago no perjudica la proliferación de todas las bacterias, inclusive la diana, a la vez que destruye las bacterias contaminantes. Como se utiliza en la presente memoria, contaminante se define como un organismo o agente presente en el cultivo que no pretende, ni desea estar presente antes, durante o al término del período de cultivo. Los medios de cultivo de actuación rápida, no selectivos, se evitan tradicionalmente en muchas aplicaciones debido a que el potencial de contaminación de las especies para superar al cultivo es una preocupación. El tratamiento con bacteriófagos permite el empleo de medios de cultivo de actuación rápida en ausencia de antibióticos, alentando de este modo el rápido crecimiento a la vez que impide la proliferación excesiva de bacterias contaminantes.

30 En una realización, las muestras se enriquecen en presencia de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFP/ml de cada bacteriófago durante aproximadamente 40 horas a 35°C aunque la temperatura puede variar. El número de unidades formadoras de placa puede ajustarse mayor o menor para conseguir más o menos infección. El tiempo de incubación es preferiblemente inferior a 40 horas, preferiblemente inferior a 18 horas, preferiblemente inferior a 10 horas, preferiblemente inferior a 6 horas o preferiblemente inferior a 2 horas. Los tiempos de incubación pueden ajustarse dependiendo del tiempo de la serie.

40 De acuerdo con el procedimiento, se añaden mezclas de bacteriófagos a cualquiera de los cultivos de pequeño volumen o a reacciones de fermentación industrial a gran escala. Debido a que los bacteriófagos se multiplican en presencia de la bacteria anfitriona, no se necesitan altas concentraciones en los cultivos de fermentación a gran escala, reduciendo de este modo los costes asociados al mantenimiento de un cultivo libre de contaminantes.

45 La adición de bacteriófagos se utiliza para controlar una amplia gama de microflora autóctona en cultivos bacterianos. El tratamiento con un grupo de bacteriófagos elimina una mezcla de bacterias competidoras del medio nutritivo. Una combinación de amplio espectro de bacteriófagos puede reducir drásticamente el número total de bacterias contaminantes de una muestra permitiendo de este modo un mayor acceso a los nutrientes para las bacterias diana a detectar y menos exposición a sustancias potencialmente inhibidoras producidas por las bacterias indeseables. Esto optimiza las condiciones de crecimiento para las bacterias diana lo que permite una reproducción más rápida y menor tiempo para producir detecciones positivas.

50 Otras ventajas de los presentes procedimientos son la reducción de respuestas de falsos negativos y falsos positivos mediante el ensayo de detección. En presencia de las altas concentraciones de microorganismos competidores en un cultivo, las bacterias diana nunca pueden alcanzar una concentración que sea lo suficientemente alta para ser detectada por el método analítico, independientemente del tiempo permitido para el enriquecimiento, lo que da como resultado un falso negativo. No es esencial que las bacterias diana sean el único organismo en la muestra o incluso el organismo en mayor concentración. Es suficiente que la productividad de las bacterias diana sea tal que la concentración sea

detectable por el método analítico. El empleo de fagos para inhibir o retardar la proliferación de microorganismos competidores en el enriquecimiento mejora la productividad de las bacterias diana y reduce las respuestas de falsos negativos por el método analítico. El fago también proporciona un significativo tiempo de enriquecimiento reducido para conseguir un nivel detectable y permite medidas correctivas antes y minimiza el coste.

5 Las respuestas de falsos positivos también se reducen empleando los presentes procedimientos. Se sabe que pueden ocurrir reacciones de falsos positivos cuando un ensayo de detección presenta reactividad cruzada, o reactividad no específica a las bacterias no elegidas como diana. Por ejemplo, surgen respuestas de falsos positivos cuando se emplean anticuerpos en el ensayo de detección que unen el organismo diana y también reaccionan de forma cruzada con bacterias no elegidas como diana presentes en la muestra. Los fagos presentan perfiles de especificidad de unión para las bacterias que son diferentes de los perfiles de especificidad de los anticuerpos. Cuando los anticuerpos, las moléculas de ácidos nucleicos, los productos químicos, bioquímicos, enzimáticos u otros medios que se utilizan para detectar el organismo diana presentan reactividad cruzada o reactividad no específica a los organismos no selectivos, pueden utilizarse fagos para reducir la concentración del organismo causal a límites detectables por debajo y de este modo reducir las respuestas de falsos positivos.

#### 15 *Ensayos de detección*

Los procedimientos descritos en la presente memoria proporcionan la detección, identificación, recuento o caracterización de las bacterias diana en una muestra, tal como, pero no limitada a, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., coliformes, coliformes fecales, y *Listeria* spp. Los procedimientos reducen los problemas que se encuentran normalmente cuando el cultivo de bacterias antes del análisis, enriqueciendo las poblaciones de células diana o minimizando las especies competidoras. En una realización, se incuba una muestra en presencia de una mezcla de bacteriófagos que es específica y tiene capacidad para lisar una o más especies de bacterias indeseables y no es específica para o no lisa las especies bacterianas diana. Después de la incubación de la muestra con bacteriófagos se detecta, identifica, enumera o caracteriza la presencia de las células bacterianas diana replicadas. Existen ensayos de detección general en la técnica y pueden modificarse para incorporar la adición de una etapa de selección en la que los bacteriófagos actúan como mediadores. Ejemplos de ensayos de detección de bacterias se encuentran en las patentes de EE.UU. nº 5.498.525; nº 6.555.331; nº 6.322.783; publicación de patente de Estados Unidos 2004/0137430; Blackburn 1993 *J. Appl. Bacteriol.* 75:199-214; Peplow *et al.* 1999 *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1055-1060 y Swaminathan *et al.* 1994 *Annu. Rev. Microbiol.* 48:401-426. Preferiblemente, el microorganismo de interés se detecta utilizando inmunoanálisis, RCP, procedimientos químicos, bioquímicos, enzimáticos o de cultivos.

Cualquier ensayo o combinación de ensayos de detección, caracterización o identificación bacteriana puede emplearse en los presentes procedimientos. Muchos de dichos ensayos bacterianos son conocidos en la técnica y muchos están disponibles en el mercado. Para los ensayos en los que la bacteria es un patógeno de alimentos, los ejemplos de dichos ensayos comprenden, pero no se limitan a los inmunoanálisis, tales como el RAPIDCHEK *E. coli* O157, análisis con *Salmonella* y *Listeria* disponibles en el mercado de Strategic Diagnostics Inc. (Newark, Delaware); el análisis VIP *E. coli* disponible en el mercado de BioControl Systems Inc. (Bellevue, Washington); los análisis REVEAL disponibles en el mercado de Neogen Corporation, Lansing, Michigan; los análisis IMMUNOCARD STAT! *E. coli* O157:H7 disponibles en el mercado de Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, Ohio; el OXOID *Listeria* Rapid Test disponible en el mercado de Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra; el análisis VIDAS ECO o la tecnología Vitek disponible en el mercado de bioMérieux Inc. (Hazelwood, MO); y el Unique *Salmonella* Assay disponible en el mercado en Tecra International Pty Ltd. (Chatswood, Australia).

Los ensayos adicionales para caracterizar o identificar bacterias patógenas de los alimentos comprenden, pero no se limitan a, ensayos de aglutinación, tales como el REMEL *E. coli* O157 Latex de REMEL, Inc. (Lenexa, KS), REMEL *E. coli* H7 Latex de REMEL, Inc., y el REMEL *Salmonella* Latex de REMEL, Inc.; kits de caracterización de bacterias tales como el sistema REMEL MicroID de REMEL, Inc., y el sistema bioMérieux api20E de bioMérieux-Vitek, Inc.; análisis de reacción en cadena de la ADN polimerasa (RCP) tales como el BAX *E. coli* O157:H7, análisis con *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. de DuPont Qualicon Inc., Wilmington, DE; pruebas de motilidad para determinar la presencia y la estructura de tipos de flagelos tales como los flagelados H7; y pruebas de toxicología que identifican las características de las toxinas producidas por una bacteria. Las pruebas realizadas por los servicios externos, tales como el Serotipado H 1-58 tal como el realizado por el *E. coli* Reference Center (Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad Estatal de Pennsylvania, University Park, PA) y la prueba H Serology, (realizada también por la *E. coli* Reference Center), se utilizan también para este fin en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, el ensayo de caracterización y la identificación supone colocar la flora microbiana aislada del enriquecimiento del cultivo primario en condiciones de cultivo secundario eficaces para indicar la identidad bacteriana. En tales casos, las bacterias del enriquecimiento primario pueden rayarse directamente sobre varias placas de agar-agar de alta selectividad o colocarse en otro medio muy selectivo. Debido al grado de selectividad del medio, el posterior crecimiento de una colonia sola puede proporcionar una base para la identificación de una cepa bacteriana.

Los procedimientos de cultivo primario o secundario eficaces para indicar la identidad bacteriana, comprenden los que contienen sustancias químicas específicas, enzimas o sustratos enzimáticos que cuando son actuados por bacterias específicas, producen cambios detectables tales como un cambio de color, pH, potencial redox, fluorescencia, turbidez, luminiscencia, agregación o cualquier otro cambio, como por ejemplo agar-agar y caldo cromógenos muchos de los cuales están disponibles en el mercado y se describe en el manual DIFCO.

Algunos ejemplos de agar-agar para seleccionar, caracterizar o identificar bacterias *E. coli* O157 comprenden Cefixie-Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey agar ("CT-SMAC"); disponible de Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD; y RAINBOW Agar O157, disponible en Biolog. Inc., Hayward, CA. Algunos ejemplos de agar-agar selectivos para el enriquecimiento e identificación de bacterias *Salmonella* comprenden placas ASAP *Salmonella* (disponibles en AES Laboratoire, Combourg, Francia), placas de desoxicolato de xilosa y lisina (XLD) y placas Brilliant Green Sulfadiazine (BGS), ambas disponibles en Becton, Dickinson and Company. Otros ejemplos de agar-agar para la caracterización de bacterias comprenden Eosin Methylene Blue (EMB), Phenol Red Sorbitol Agar, Blood Agar, y agar Luria Bertani (LB), todos disponibles en Becton, Dickinson and Company. Un ejemplo de agar-agar selectivos para el enriquecimiento y la identificación de bacterias *Listeria* es placas ALOA *Listeria monocytogenes* en AES Laboratoire, Combourg, Francia. El listado de ejemplos de agar-agar y medios para seleccionar, caracterizar, enumerar o identificar bacterias no es restrictivo, y cualquier entorno que indica, detecta, selecciona, caracteriza, enumera o identifica bacterias está dentro del alcance de los procedimientos. Los presentes procedimientos contemplan el empleo de fagos como agentes selectivos en cualquiera y todas las etapas de cultivo en un proceso, así como un medio directo para detectar, identificar, tipificar, enumerar o caracterizar células bacterianas provenientes de dichas etapas.

Los procedimientos descritos en la presente memoria, principalmente el enriquecimiento del cultivo y la detección, permiten la detección rápida de microorganismos tales como las células bacterianas. Por ejemplo, los procedimientos pueden realizarse en menos de aproximadamente 48 horas, más preferiblemente en menos de aproximadamente 32 horas, más preferiblemente en menos de aproximadamente 16 horas y aún más preferiblemente en aproximadamente ocho horas o menos.

#### 25 *Enriquecimiento de cultivos bacterianos en ensayos de detección*

Todos los procedimientos normalizados para la detección de microorganismos requieren una etapa de enriquecimiento de la muestra en el medio de crecimiento. La etapa de enriquecimiento amplía el número de microorganismos diana en la muestra. El presente procedimiento contempla la utilización de bacteriófagos como agentes selectivos en medios microbiológicos para inhibir la proliferación de determinadas bacterias no elegidas como diana durante el enriquecimiento. En una realización preferida, se utiliza un grupo de bacteriófagos durante el enriquecimiento para inhibir o destruir los organismos competidores en un kit de ensayo o prueba para microorganismos tales como *Salmonella* en los alimentos o *Legionella* o coliformes en agua.

La etapa de enriquecimiento está opcionalmente acompañada por una etapa de inmunoseparación, tal como mediante la utilización de perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos. Los anticuerpos también pueden ser fijados sobre un soporte sólido para aislar los microorganismos diana. Son preferibles los anticuerpos que tienen especificidad para los receptores de superficie en el microorganismo diana. Los anticuerpos preferiblemente tienen mínima reactividad cruzada con otros microorganismos y son específicos para un tipo de célula. Sin embargo, en caso de que se utilice un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con otras cepas o especies, el tratamiento de la muestra antes de la detección con un grupo de bacteriófagos evitará la proliferación o eliminará cualquier bacteria contaminante de la muestra que reacciona de forma cruzada con anticuerpos. Por ejemplo, se han desarrollado anticuerpos que son específicos para *Salmonella*. No todos los anticuerpos contra *Salmonella* son específicos y algunos pueden reaccionar de forma cruzada con células distintas de *Salmonella*. Este problema se supera evitando la proliferación de células distintas de *Salmonella* que reaccionan de forma cruzada antes de la detección mediante la adición a la mezcla de enriquecimiento de un grupo de bacteriófagos específico para las células distintas de *Salmonella* que reaccionan de forma cruzada.

Durante el proceso de enriquecimiento convencional, los microorganismos no selectivos pueden proliferar en exceso la diana. Una estrategia común ha sido añadir un agente de selección tal como un antibiótico al medio para oponerse a la proliferación de organismos no selectivos. Ejemplos de agentes de selección comprenden antibióticos, colorantes, sales biliares, detergentes y otras sustancias conocidas por los expertos en la técnica. Por desgracia, la adición de antibióticos inhibe la proliferación de organismos no selectivos, pero también puede afectar a la proliferación de la diana. Los antibióticos que alteran la proliferación de las bacterias diana están preferiblemente ausentes en los procedimientos descritos en la presente memoria.

Un procedimiento particularmente preferido es aquel en donde la especificidad total del procedimiento global se determina por una combinación de bacteriófagos, antibióticos y el procedimiento de detección (tal como un inmunoanálisis, análisis bioquímico o RCP).

*Aumento de señal en análisis de bioluminiscencia*

La bioluminiscencia tiene quizás la mayor sensibilidad intrínseca entre los procedimientos de detección bioquímicos. La expresión del gen bacteriano (*lux*) de luciferasa puede detectarse con alta sensibilidad midiendo la luz emitida por las células que expresan el gen en presencia de un sustrato adecuado. Varios investigadores han incorporado *lux* en un genoma de fago para expresar *lux* en una bacteria diana (Loessner *et al.* 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4):1133-1140.; Duzhii *et al.* 1994. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* (3):36-8). Los fagos se puede utilizar de esta manera para detectar directamente el organismo diana. En los presentes procedimientos, también se puede utilizar fagos en combinación con este procedimiento de detección, como con otros procedimientos de detección, para mejorar el rendimiento del procedimiento de detección como se demuestra mediante el siguiente ejemplo.

10 La sensibilidad intrínseca de los ensayos de bioluminiscencia es insuperable, pero a menudo no se realiza. La detección de la luz por debajo del nivel de fotones individuales se consigue fácilmente, sin embargo surgen limitaciones en primer lugar en conseguir los fotones emitidos al detector y en segundo lugar en distinguirlos de las falsas señales de fondo como por ejemplo la fosforescencia. En muestras complejas, los fotones emitidos son oscurecidos fácilmente por dispersión o absorción por otros componentes de la muestra. La geometría de la muestra es también un factor en la distribución eficiente de los fotones emitidos al detector. La luz emitida se observará más fácilmente si las células que expresan luciferasa se separan de los componentes opacos del medio y de las posibles fuentes de fondo y se colocan en una capa delgada con acoplamiento óptico cerca del detector. El tratamiento de la muestra con fagos disminuye las células no infectadas, no luminiscentes en el cultivo mientras que favorece una proliferación mejor, más rápida de las células diana luminiscente debido a la competencia reducida de nutrientes.

20 La reducción de las células no elegidas como diana en cultivos en suspensión reduce la dispersión de la luz por estas células. La lisis de las células no elegidas como diana por bacteriófagos reduce el ruido en el ensayo mejorando de este modo la relación señal a ruido. Una relación señal a ruido mejorada permite la detección de una señal fiable en el cultivo mucho antes y por lo tanto requiere menos tiempo para la etapa de enriquecimiento.

25 La invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo, y no pretenden limitar ni definir la invención modo alguno.

Ejemplo 1

*Cultivo de un nuevo bacteriófago utilizando un cultivo de E. coli como anfitrión*

30 Se cultiva *E. coli* en medio líquido utilizando procedimientos normalizados a temperatura ambiente o a una temperatura elevada en un recipiente de cultivo, tales como un matraz, hasta que la concentración de *E. coli* alcanza un valor deseado. Ejemplos de medios comúnmente utilizados para la proliferación de *E. coli* comprenden los caldos Tryptic Soy Broth (TSB) y Brain Heart Infusion (BHI). En la etapa cuando el número de células de *E. coli* se propaga a, por ejemplo, de 2 a  $3 \times 10^6$  por ml de medio de cultivo (p. ej., D.O. = 0,2), el bacteriófago se añade entonces al medio de cultivo. Una vez se ha añadido el bacteriófago al medio de cultivo, el cultivo se mantiene sustancialmente bajo las mismas condiciones que el cultivo anterior con el fin de permitir que la *E. coli* sea infectada con el bacteriófago resultante en la reproducción y amplificación del bacteriófago y por último a la lisis de las células *E. coli*. Como consecuencia, cuando el cultivo se mantiene durante un período predeterminado de tiempo, se obtiene un líquido de cultivo del bacteriófago en donde hay pocos o ningún superviviente de *E. coli*. El líquido de cultivo se purifica a continuación, de acuerdo con procedimientos convencionales para eliminar restos de células *E. coli*, por ejemplo, por centrifugación o filtración a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,2  $\mu\text{m}$ , produciendo de este modo un lisado de cultivo bacteriano líquido, estéril, aclarado, que contiene el bacteriófago.

40 El bacteriófago según la presente invención también puede obtenerse a partir de cultivos de bacterias que crecen en medios de cultivo de agar-agar sólido o semisólido que contiene, por ejemplo, polipeptona y extracto de levadura, utilizando procedimientos normalizados bien conocidos por los expertos en la técnica. En este cultivo, puede ser posible utilizar un medio de cultivo de agar-agar de dos capas teniendo las capas diferentes concentraciones de agar-agar. El cultivo que utiliza dicho medio de cultivo de agar-agar de dos capas de este tipo puede llevarse a cabo añadiendo *E. coli* y fagos a la capa superior, semisólida e incubando el medio de cultivo a temperatura ambiente o a temperatura elevada. El cultivo resultante de los fagos puede entonces procesarse disolviendo la capa semisólida de agar-agar con un líquido adecuado, tales como medios de cultivo líquido, agua, solución salina, tampón o similares, y separando los materiales sólidos, p. ej., restos de células, procedentes de fagos solubles por centrifugación o filtración, dando de ese modo un líquido clarificado que contiene altas concentraciones de fago.

50 La superficie de *E. coli* tiene una configuración de receptor capaz de absorber un bacteriófago. Absorción, o fijación, precede a la inyección de los genes de la bacteriófago (ADN o ARN), en las células de *E. coli*. Una vez que los genes del fago se encuentran dentro de la célula bacteriana, redirigen los procesos metabólicos de la célula anfitriona para producir partículas de bacteriófago que se acumulan hasta que finalmente la serie célula revienta liberando la prole de bacteriófagos en el líquido de cultivo.

En el cultivo de algunos bacteriófagos como se describió anteriormente, se prefiere añadir una pequeña cantidad de un metal tal como magnesio, manganeso, calcio o similar al medio de cultivo para cultivar las bacterias, tales como *E. coli*. Los procedimientos adecuados para el aislamiento de cepas de bacteriófagos puros a partir de una muestra que contiene bacteriófagos son bien conocidos, y dichos procedimientos pueden ser adaptados por el experto en la técnica a la luz de la orientación proporcionada en la presente memoria. El aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras adecuadas procede por lo general filtrando las muestras a través de un filtro de 0,45 µm o 0,25 µm para eliminar organismos vivos, mezclando el filtrado con caldo nutritivo, inoculando el caldo con una alta concentración de una cepa bacteriana anfitriona, p. ej., *E. coli*, e incubando para enriquecer la mezcla con bacteriófagos que pueden infectar la cepa anfitriona. Después del enriquecimiento, la mezcla se filtra para eliminar los residuos bacterianos dejando bacteriófagos líticos en el filtrado. Las diluciones en serie del filtrado se colocan en placas en un césped confluyente de bacterias *E. coli*, y la infección de una sola célula bacteriana por un solo fago da como resultado la producción y liberación en la zona circundante, de muchos fagos, que a su vez infectan y lisan bacterias vecinas. Sin embargo, el agar-agar limita la propagación física de los fagos en toda la placa en una cantidad limitada de tiempo, produciendo pequeñas áreas visiblemente claras denominadas placas donde los bacteriófagos han destruido las células bacterianas dentro del césped confluyente de crecimiento bacteriano. Puesto que una placa con una morfología distinta surgió de una partícula de fago que se replicó en las bacterias dentro de esa área del césped bacteriano, la pureza de un preparado de bacteriófagos se puede asegurar eliminando el material en esta placa con una pipeta pasteur estéril, palillo de dientes o un dispositivo similar (un "rascador de placa"), y utilizando este material como inóculo para ulteriores ciclos de crecimiento de los fagos. El bacteriófago producido en dichos ciclos representan una única cepa o "monofago". Cada fago es identificado únicamente por su tamaño, morfología estructural, composición de proteínas, y la secuencia genómica. Por consiguiente, la pureza de un preparado de fagos (como por ejemplo la confirmación de que es un monofago y no un preparado de fagos polivalentes) se evalúa mediante una combinación de técnicas tales como la microscopia electrónica, SDS-PAGE, análisis del producto de la digestión de la restricción de ADN y ultracentrifugación analítica.

## 25 Ejemplo 2

*Utilización de bacteriófagos en medios de enriquecimiento microbiano para suprimir la proliferación de organismos reactivos de forma cruzada como medio para reducir la aparición de resultados de falsos positivos*

En el campo de experimentación con patógenos de alimentos es frecuente analizar muestras de alimentos para detectar la presencia de bacterias *Salmonella*. Los procedimientos para realizar dichas pruebas comprenden el cultivo de una muestra de alimentos en un medio de enriquecimiento primario que produce la reproducción de cualquier *Salmonella* presente junto con otros microorganismos en la muestra. El líquido de cultivo resultante se analiza con un ensayo de detección tal como un inmunoanálisis. Se sabe que algunos anticuerpos contra *Salmonella* útiles en dicho inmunoanálisis presentan reactividad cruzada con microorganismos íntimamente relacionados, como *Citrobacter spp.* (*J. Bacteriology*, 1978, 134(2), págs. 462-469). Dicha reactividad cruzada puede provocar respuestas de falsos positivos. En los casos en que un análisis de detección presente reactividad cruzada es útil para inhibir selectivamente la proliferación de organismos de reacción cruzada y con ello reducir la cantidad de respuestas de falsos positivos.

En este experimento, se cultivaron individualmente *Citrobacter freundii* y *Salmonella enteritidis* en caldo de soja trípico (TSB) durante 18 horas a 37°C. Los recuentos de células vivas para cada cultivo se determinaron mediante técnicas convencionales de dilución en placas. Muestras de fago FF2-20-1 específico para *C. freundii* (proporcionado por Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware) se formularon a 10<sup>7</sup> UFP/ml en medio TSB. Se añadió cultivo de *C. freundii* a los medios de TSB con y sin el fago FF2-20-1 hasta concentraciones finales de 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000, y 100.000 unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml). Cada tratamiento con *C. freundii* se inoculó junto con 0, 1, 10, y 100 ufc/ml de *S. enteritidis*. Todas las muestras se incubaron a 35°C durante 18 horas. Después de 18 horas de incubación, todas las muestras se analizaron con un inmunoanálisis de flujo lateral (LFI), que detecta específicamente *C. freundii* y no reacciona de forma cruzada con *S. enteritidis*. Cuanto mayor sea el nivel de desarrollo de la señal (resultado de la carta de colores) en el LFI, mayor será la concentración de *C. freundii*. Además, las concentraciones de *S. enteritidis* y *C. freundii* en todos los tratamientos se determinaron cultivando en placas diluciones en serie en un medio indicador selectivo (medio ASAP, AES, Comborg, Francia) que pueden distinguir entre *Salmonella* y *Citrobacter*.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 2 y demuestran que la adición de bacteriófagos específicos para *C. Freundii* en el cultivo reduce en gran medida la concentración de bacterias *C. Freundii* contaminantes en cultivos de *S. enteritidis* después de 18 horas de incubación. En los cultivos que no contenían *Salmonella* o fagos, el *Citrobacter* alcanzó muy altas concentraciones (aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/ml). Un análisis de detección que emplea anticuerpos de *Salmonella* que presenta reactividad cruzada para *Citrobacter* daría una respuesta de falso positivo a dicho cultivo cuando no hayan *Salmonella* presentes. La adición de fagos específicos al enriquecimiento evita el crecimiento de organismos con reactividad cruzada disminuyendo de este modo las respuestas de falsos positivos.



Tabla 2

Concentración de inoculación de <i>C. freundii</i> (ufc/ml)	Concentración de inoculación de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	0		1		10		100	
	Resultado de la carta de colores LFI de <i>C. freundii</i>							
	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago
0	1	1	3	3	4	3	3	3
1	3	11	2	2	3	11	5	11
10	3	11	3	11	3	11	3	11
100	2	11	5	11	4	11	3	11
1000	2	11	5	11	5	11	4	11
10.000	3	11	3	11	5	11	5	11
100.000	10	11	11	11	11	11	11	11

Concentración de inoculación de <i>C. freundii</i> (ufc/ml)	Concentración de inoculación de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	0		1		10		100	
	Concentración resultante de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago
0	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3
1	<1E3	1,4E8	<1E3	<1E3	<1E3	8,0E7	<1E3	1,6E7
10	<1E3	5,0E7	<1E3	8,0E7	<1E3	8,0E7	<1E3	7,0E7
100	<1E3	1,2E8	<1E3	3,0E7	<1E3	5,0E7	<1E3	7,0E7
1000	<1E3	4,0E7	<1E3	5,0E7	<1E3	1,1E8	<1E3	8,0E7
10.000	<1E3	1,9E8	<1E3	2,7E8	<1E3	2,6E8	<1E3	1,3E8
100.000	<1E3	2,9E8	<1E3	1,4E8	<1E3	8,7E7	<1E3	3,5E8

Ejemplo 3

Utilización de bacteriófagos en medios de enriquecimiento microbiano como un medio para mejorar la productividad del organismo diana y disminuir resultados de falsos negativos

5

Se cultivaron individualmente *Citrobacter freundii* y *Salmonella enteritidis* en caldo de soja tréptico (TSB) durante 18 horas a 37°C. Se determinaron los recuentos de células vivas para cada cultivo por técnicas convencionales de dilución con siembra en placas. Se formularon muestras de fago FF2-20-1 específico para *C. freundii* (Strategic Diagnostics Inc.) a  $1 \times 10^7$  UFP/ml en medio TSB. El cultivo de *C. freundii* se añadió a medios TSB con y sin el fago FF2-20-1 hasta concentraciones finales de 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000, y 100.000 ufc/ml. Cada tratamiento con *C. freundii* se inoculó junto con 0, 1, 10, y 100 ufc/ml de *S. enteritidis*. Todas las muestras se incubaron a 35°C durante 18 horas. Después de 18 horas de incubación, se evaluaron las muestras con un inmunoanálisis de flujo lateral (LFI) que detecta *S. enteritidis* y no reacciona de forma cruzada con *C. freundii*. Cuanto mayor sea el nivel de desarrollo de la señal (resultado de la carta de colores) en la LFI, mayor será la concentración de *Salmonella*. Además, se determinaron las concentraciones de *S. enteritidis* por siembra en placas con diluciones en serie de todos los tratamientos en medio agar-agar selectivo ASAP (AES, Comborg, Francia).

10

15

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 3 y demuestran que la adición de bacteriófagos específicos para *C. freundii* aumenta en gran medida la productividad de *S. enteritidis* en cultivos contaminados con *C. freundii* después de 18 horas de incubación. Los cultivos de referencia no tratados con bacteriófago presentaban reducción de proliferación de *S. enteritidis* debido a la presencia de *C. freundii* que contamina el cultivo. En algunos cultivos contaminados con *C. freundii*, la concentración de *Salmonella* con el fago fue de hasta  $10^8$  ufc/ml mientras que la concentración de *Salmonella* en los cultivos correspondientes sin fago fue inferior a  $10^3$  ufc/ml. Dicha reducción drástica en la productividad de *Salmonella* en presencia de microorganismos competidores puede conducir a resultados

20

de falsos negativos en los ensayos de detección. La adición de fago al enriquecimiento puede mejorar la productividad de las bacterias diana y evitar resultados falsos negativos.

Tabla 3

Concentración de inoculación de <i>C. freundii</i> (ufc/ml)	Concentración de inoculación de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	0		1		10		100	
	Resultado de la carta de colores LFI de <i>C. freundii</i>							
	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago
0	0	0	11	11	11	11	11	11
1	0	0	11	11	11	11	11	11
10	0	0	11	6	11	10	11	11
100	0	0	11	1	11	5	11	10
1000	0	0	11	2	11	5	11	9
10.000	0	0	0	1	11	3	11	6
100.000	0	0	11	1	11	2	11	6

Concentración de inoculación de <i>C. freundii</i> (ufc/ml)	Concentración de inoculación de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	0		1		10		100	
	Concentración resultante de <i>S. enteritidis</i> (ufc/ml)							
	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago	Fago	Sin fago
0	<1E3	<1E3	1,3E8	2,5E8	1,6E8	1,7E8	2,2E8	7,0E7
1	<1E3	<1E3	7,0E7	2,1E8	1,0E8	7,0E7	1,0E8	9,0E7
10	<1E3	<1E3	2,1E8	<1E3	8,0E7	3,0E7	1,8E8	6,0E7
100	<1E3	<1E3	5,0E7	<1E3	2,1E8	5,2E6	8,0E8	1,0E6
1000	<1E3	<1E3	8,0E7	<1E3	1,1E8	8,0E5	2,3E8	1,8E6
10.000	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	3,2E8	1,0E5	2,2E8	2,2E6
100.000	<1E3	<1E3	2,1E8	<1E3	3,5E8	5,0E5	1,3E8	1,2E6

Ejemplo 4

5 Empleo de bacteriófagos para reducir el tiempo de enriquecimiento y aumentar la sensibilidad del procedimiento

Se cultivaron individualmente *Citrobacter freundii* (ATCC 9809) y *Salmonella enteritidis* en caldo de soja trípico (TSB) durante 18 horas a 37°C. Los recuentos de células vivas para cada cultivo se determinaron por técnicas convencionales de dilución con siembra en placas. Muestras de fago FF2-20-1 específico para *C. freundii* se formularon para 10<sup>8</sup> ufp/ml en medio TSB. Se añadió cultivo de *C. freundii* a medio TSB con y sin el fago FF2-20-1 a una concentración final de 10<sup>5</sup> ufc/ml. Cada tratamiento de *C. freundii* se inoculó junto con 0, 0,02, 0,1, 2,0 y 10 ufc/ml de *S. enteritidis*. Todas las muestras se incubaron a 35°C y se tomaron muestras periódicamente durante un periodo de 24 horas. En cada periodo de muestreo, se analizó una submuestra de cada tratamiento por un inmunoanálisis de flujo lateral (LFI) que detecta *S. enteritidis* y no reacciona de forma cruzada con *C. freundii*. Cuanto mayor sea el nivel de desarrollo de la señal (resultado de la carta de colores), en el LFI, mayor será la concentración de *S. enteritidis*. Además, se determinó la concentración de *S. enteritidis* en todos los tratamientos a las 24 horas por diluciones en serie con siembra en placas en un medio de agar-agar selectivo indicador (BGS Media, Difco).

Tabla 4

Concentración inicial de fagos (ufp/ml)	† Concentración inicial de <i>Salmonella</i> (ufc/ml)	Triplicado	Resultado de la carta de colores LFI de <i>Salmonella</i> en el momento del muestreo						Concentración final de <i>Salmonella</i> (ufc/ml)
			3 h	6 h	9 h	12 h	15 h	24 h	
	0	1	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		2	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		3	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
	0,02	1	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		2	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		3	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>

ES 2 523 316 T3

0	0,1	1	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		2	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		3	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
	2	1	-	-	-	-	1	9	4x10 <sup>7</sup>
		2	-	-	-	-	0,5	9	3x10 <sup>7</sup>
		3	-	-	-	-	1	9	1x10 <sup>7</sup>
	10	1	-	-	-	0,5	2	11	8x10 <sup>7</sup>
		2	-	-	-	0,5	2	11	9x10 <sup>7</sup>
		3	-	-	-	0,5	3	11	8x10 <sup>7</sup>
10 <sup>8</sup>	0	1	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		2	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
		3	-	-	-	-	-	-	<10 <sup>5</sup>
	0,02	1	-	-	-	1	11	6	3,1x10 <sup>8</sup>
		2	-	-	-	1	11	6	4,1x10 <sup>8</sup>
		3	-	-	-	1	11	9	2,2x10 <sup>8</sup>
	0,1	1	-	-	-	2	11	9	4,4x10 <sup>8</sup>
		2	-	-	-	2	11	9	4,5x10 <sup>8</sup>
		3	-	-	-	2	11	9	4,0x10 <sup>8</sup>
	2	1	-	-	2	11	11	6	8,5x10 <sup>8</sup>
		2	-	-	4	11	11	6	1,3x10 <sup>9</sup>
		3	-	-	4	11	11	6	1,1x10 <sup>9</sup>
	10	1	-	-	8	11	11	7	8,3x10 <sup>8</sup>
		2	-	-	7	11	11	7	1,3x10 <sup>9</sup>
		3	-	-	8	11	11	7	1,1x10 <sup>9</sup>

† Todos los grupos de tratamiento contenían una concentración inicial de 10<sup>5</sup> ufc/ml de *C.freundii* en el momento de la inoculación de *S. enteritidis*.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 4, más arriba, y demuestran que la presencia de bacteriófagos contra *C.freundii* en cultivos que contienen tanto *C. freundii* como concentraciones muy bajas de *S. enteritidis* producen una reducción significativa en la cantidad de tiempo de enriquecimiento requerido para detectar *Salmonella*. Del mismo modo, la presencia de fago de *C. freundii* dio como resultado una sensibilidad mejorada. Con fago, los cultivos de *Salmonella* que contienen las concentraciones de partida de 0,02 ufc/ml, se detectaron fácilmente mientras que sin fago, la concentración más baja de *Salmonella* que se detectó fue de 2 ufc/ml. Sin el fago, dos grupos de tratamiento, que contienen 0,02 y 0,1 ufc/ml de *S. enteritidis*, nunca alcanzaron concentraciones detectables utilizando el LFI y por lo tanto son falsos negativos. La adición del fago redujo el número de respuestas de falsos negativos utilizando el procedimiento de detección LFI.

10 Ejemplo 5

*Empleo de bacteriófagos para reducir los resultados de falsos positivos al detectar Salmonella en la carne de vacuno*

Muestras de 25 gramos de carne de vacuno (35) se enriquecieron en 225 ml de medio RapidChek (Strategic Diagnostics Inc.) a 42°C durante 24 horas. Un conjunto adicional de 35 muestras de carne de vaca se enriquecieron en condiciones similares en medio RapidChek de *Salmonella* enriquecido con una mezcla de cinco fagos dirigidos específicamente a *E. coli* y *Citrobacter spp.*

*E. coli* y *Citrobacter* son contaminantes microbiológicos frecuentes de la carne de vaca, están estructuralmente muy estrechamente relacionados con *Salmonella*, y con frecuencia reaccionan de forma cruzada con anticuerpos dirigidos contra antígenos de *Salmonella* empleados en inmunoanálisis para detectar *Salmonella* en los alimentos. Los cinco fagos utilizados en este ejemplo se seleccionaron específicamente para lisar *E. coli* y *Citrobacter spp.* que reaccionan de forma cruzada con anticuerpos de *Salmonella*.

A las 24 horas, todas las muestras se analizaron utilizando un inmunoanálisis de flujo lateral (LFI) para la detección de *Salmonella spp.* Además, todas las muestras se sembraron en estrías para Brilliant Green Sulfa Agar (BGS) y Xylose Lysine Tergitol 4 Agar (XLT4) para la detección selectiva de *Salmonella spp.* y se incubaron durante 48 horas a 37°C.

Trece de 35 muestras se describieron como LFI positivo del tratamiento sin fagos, ninguno de las cuales se confirmaron como positiva utilizando metodología de cultivo (placas XLT4 y BGS). No se describieron resultados positivos de LFI de las muestras enriquecidas utilizando el medio RapidChek enriquecido con fagos ni fueron ninguna de estas muestras

positivas utilizando procedimientos de cultivo. Por lo tanto, hubo 13 de 35 resultados falsos positivos sin el fago y ninguno con el fago.

#### Ejemplo 6

##### *Mejora de especificidad de los análisis bioquímicos para la detección de coliformes en el agua*

5 Los coliformes son una clase general de bacterias que habitan en el intestino del hombre y de otros animales y utilizan la enzima beta-D-galactosidasa para fermentar el azúcar lactosa. Aunque algunos coliformes se encuentran en el intestino del hombre, la mayoría se encuentra en todo el entorno y tienen poca importancia sanitaria (Greenberg, A.E. y Hunt, D.A. (Eds.) 1985 LABORATORY PROCEDURES FOR THE EXAMINATION OF SEAWATER AND SHELLFISH, 5ª ed. The American Public Health Association, Washington, DC). Los coliformes fecales son miembros del grupo coliforme total de bacterias. Se caracterizan por su capacidad de fermentar la lactosa a 112,1°F (44,5°C) y se consideran indicadores de contaminación fecal más específicos que son los coliformes que fermentan la lactosa sólo a 95°F. (35°C). *E. coli* y algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* son las principales coliformes fecales (THE DRINKING WATER DICTIONARY, Copyright © 2000, American Water Works Association).

15 Numerosos productos comerciales están disponibles para la detección de coliformes que dependen de la enzima beta-D-galactosidasa para convertir un sustrato incoloro en una molécula coloreada o fluorescente, o provocar otras reacciones bioquímicas tales como la formación de gas, y de ese modo indicar la presencia de coliformes en una muestra de agua. Ejemplos de dichos productos son Colilert® de IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.; Colitag™, CPI International, Santa Rosa, CA; m-ColiBlue24® de Hach Company, Loveland, CO.; ColiGel™, E\*Colite™ y PathoGel™ de Charm Sciences, Inc. Malden, MA.; Colifast®, Oslo, Noruega; ColiTrak®, BioControl Systems, Inc., Bellevue, WA.; y otros.

20 Una limitación de estas técnicas es que otras bacterias aparte de las coliformes expresan beta-D-galactosidasa y provocan resultados de falsos positivos. Por ejemplo, la Guía de Resolución de Problemas para el producto m-ColiBlue24 de Hach Company afirma que la cantidad de falsos positivos de la prueba de coliformes totales es del 26,8%, debido a la presencia en las muestras de agua de las bacterias positivas a beta-D-galactosidasa conocidas que no son coliformes. Del mismo modo, numerosas bacterias marinas provocan resultados de falsos positivos en dichos análisis, como por ejemplo *Vibrio spp.*, y por lo tanto su uso para pruebas de calidad del agua marina es limitado (J.M. Pisciotta, *et al.*, 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), págs. 539-544).

25 Los bacteriófagos, como se describe en la presente memoria, reactivan a bacterias que se sabe provocan resultados falsos positivos en dichos análisis bioquímicos, pueden incorporarse al análisis para evitar o reducir la proliferación de dichas bacterias y de este modo reducir las reacciones de falsos positivos. Muchos de dichos análisis son conocidos por los expertos en la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarse a, análisis de agua tales como Enterolert™, IDEXX Laboratories, Inc., y medios microbiológicos, inclusive medios cromógenos, tales como los contenidos en el DIFCO MANUAL (11ª edición, 1998, Difco Laboratories, División de Becton Dickinson and Company, Sparks, MD.), todos los cuales se incluyen por referencia en el presente documento. Dichos análisis bioquímicos se pueden utilizar para la recuento, caracterización, identificación, clasificación o el aislamiento de microorganismos en cualquier campo de operación, como por ejemplo pero sin limitarse a pruebas en alimentos, agua y aire, diagnósticos médicos, diagnósticos veterinarios, ensayos agrícolas y medioambientales, procesos industriales, comerciales y farmacéuticos, la calidad del producto y similares.

#### Ejemplo 7

##### *Mejora de especificidad de un método analítico para coliformes fecales en muestras de agua por bacteriófagos*

40 Un cultivo de bacterias coliformes no fecales *Klebsiella oxytoca* (Strategic Diagnostics Inc.) se sembró en estrías en una placa con TSA (Difco) y se incubó durante la noche a 37°C. Una sola cepa de las colonias se transfirió a 10 ml de TSB (Difco) y se incubó durante la noche a 37°C. Se prepararon diluciones en serie de diez veces del cultivo TSB de *K. oxytoca* en agua con peptona (Difco). El bacteriófago Kss3.2-5 (Strategic Diagnostics Inc.) infecta a *K. oxytoca* provocando lisis bacteriana. Se prepararon 50 ml de solución de fago Kss3.2-5 a una concentración de  $10^7$  ufp/ml en agua destilada estéril. Tubos Colilert para la detección de coliformes en agua se adquirieron en IDEXX Laboratories. Cinco tubos Colilert se redisolviéron con 10 ml de la solución de fago y cinco tubos Colilert se redisolviéron con 10 ml de agua destilada estéril. Todos los tubos se mezclaron hasta que se disolvió el reactivo en polvo. Un ml de las diluciones bacterianas  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  se mezclaron en cada uno de los tubos Colilert con y sin fago. Un ml de agua con peptona se añadió a dos tubos y sirvió como referencias negativas. Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 18 horas según las especificaciones del fabricante.

55 *K. oxytoca* produjo resultados positivos claros en el ensayo Colilert lo que indica la presencia de una coliforme, sin embargo, *K. Oxytoca* no es una coliforme fecal y por lo tanto los resultados no son suficientes para indicar la presencia de contaminación fecal y bacterias potencialmente patógenas en la muestra. En presencia de fago, todas las diluciones ensayadas de este cultivo de bacterias produjeron resultados negativos mejorando la especificidad de la prueba para coliformes fecales.

Fago	Dilución de <i>Klebsiella oxytoca</i>				
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	ninguna
Sin	+++	+++	+++	+++	-
Con	-	-	-	-	-

## Ejemplo 8

*Reducción en respuestas de falsos positivos en un método analítico para coliformes totales en muestras de agua por bacteriófagos*

5 *Aeromonas veronii* (American Type Culture Collection, ATCC 51106), una bacteria no coliforme, se cultivó durante 6 horas a 30°C en TSB en una sola cepa de colonias. El cultivo TSB se diluyó por un factor de diez en agua con peptona. Se rehidrataron cuatro tubos Colilert (IDEXX Laboratories) con agua desionizada estéril. Un ml de cultivo diluido de *A. veronii* se inoculó en tubos Colilert por duplicado. Dos tubos más se inocularon con 1 ml de agua con peptona como referencias negativas. Uno de los tubos con *A. veronii* y uno de los tubos con referencia negativa recibieron 10<sup>7</sup> ufp/ml (concentración final) del fago 15-11 de *Aeromonas* (Strategic Diagnostics Inc.) en medio TSB. La otra serie recibió el mismo volumen de medio TSB sin fago. Los tubos se incubaron durante la noche a 37°C según las especificaciones del fabricante. Después de la incubación, el tubo con *A. veronii* sin el fago se había vuelto de color amarillo brillante, indicando falsamente la presencia de una coliforme. El tubo con *A. veronii* sin el fago permaneció incoloro indicando una respuesta negativa. Por lo tanto, la presencia del bacteriófago eliminó la respuesta de falso positivo producida por el *A. veronii* en el análisis.

## Ejemplo 9

*Nuevas composiciones de bacteriófagos y procedimientos de recuento de bacterias diana*

En este ejemplo se vislumbra que un medio de agar-agar utilizado para la detección y recuento de bacterias coliformes podría hacerse más específico para la detección y recuento de coliformes fecales, reduciendo al mínimo la proliferación de coliformes no fecales utilizando fagos específicos incorporados en el medio sólido o semisólido.

Se preparó MI Agar (Difco) utilizado para la detección de bacterias coliformes rehidratando el medio como indica el fabricante, se hirvió durante un minuto y se enfrió a 50°C. Se añadió a continuación fago kss3.2-5 de *Klebsiella* (Strategic Diagnostics Inc.) a la mitad del medio de agar-agar fundido a una concentración final de 2,6 × 10<sup>8</sup> unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml). Alícuotas de cinco ml de MI Agar fundido con y sin fago se superpusieron a continuación en placas que contenían agar-agar tripticasa soja (TSA) y se enfriaron a temperatura ambiente. La cepa 1055-1 de *Klebsiella oxytoca*, coliforme no fecal, se cultivó en caldo de tripticasa soja (TSB) durante 18 horas a 37°C. Se prepararon diluciones en serie de diez veces de cultivo de *K. oxytoca* en agua con peptona y las diluciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup> se aplicaron a la superficie de ambos tratamientos con MI Agar solidificado y se incubaron a 37°C durante 18 h. Se contaron las colonias bacterianas bajo la fuente de luz UV para discernir las coliformes según las instrucciones del fabricante. Los datos demuestran que la incorporación del fago en el medio de agar-agar solidificado provoca una reducción en el número de bacterias no coliformes.

Dilución de <i>K. Oxytoca</i> aplicada a la placa	Número de colonias	
	MI Agar	MI Agar w/fago
10 <sup>-8</sup>	66	0
10 <sup>-9</sup>	11	0

## Ejemplo 10

## Nuevas composiciones de bacteriófagos y procedimientos de recuento de coliformes fecales

En este ejemplo se demuestra el empleo de fagos para aumentar la especificidad de un procedimiento desde un procedimiento general de recuento de coliformes hasta un procedimiento de recuento de coliformes fecales. La cepa 4157 de *E. coli*, coliforme fecal, se cultivó en caldo de tripticasa soja (TSB) a 37°C durante 18 horas y se diluyó en serie en sstf (PBS) (Sigma). Además, la cepa 1055-1 de *Klebsiella oxytoca*, coliforme no fecal, se cultivó en agar-agar con tripticasa y soja (TSA) a 37°C durante 18 horas y se diluyó en serie en PBS. Se rehidrataron con agua potable estéril treinta tubos Colilert para la detección de bacterias coliformes (IDEXX Laboratories). Se añadieron cien microlitros (100 µl) de una dilución  $10^{-8}$  del cultivo de *E. coli* a cada uno de los 30 tubos. Además, se añadieron 100 µl de la dilución  $10^{-6}$  de *Klebsiella* a cada uno de los 20 tubos. Por último, se añadieron 100 µl de fago kss3.2-5 de *Klebsiella* (Strategic Diagnostics Inc.) diluido en PBS hasta una concentración final de  $10^8$  unidades formadoras de placas por ml a 10 de los tubos que contenían tanto *E. coli* como *K. Oxytoca*. Todos los tubos se taparon, se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Después de 18 horas en los tubos se evaluó la presencia de color amarillo que indica la presencia de bacterias coliformes. el número de tubos positivos se utilizó para calcular el número más probable (NMP) de bacterias (Blodgett, R. 1998; actualización de enero de 2001; Apéndice 2; Most Probably Numbers from Serial Dilutions. En: US FOOD, DRUG AND ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. Edición 8, Revisión A/1998), utilizando las tablas suministradas en la Guía del Usuario del producto de Coilert. La composición de los medios que contienen bacteriófago dio lugar a un nuevo procedimiento con mejor especificidad para la recuento de coliformes fecales. La adición del fago eliminó eficazmente los coliformes no fecales *K. oxytoca* del análisis lo que permite el recuento de sólo los coliformes fecales, *E. coli*.

Tratamiento	nº de total de tubos	nº de tubos positivos	índice NMP/100 ml
<i>E. coli</i>	10	3	3,6
<i>E. coli</i> + <i>K. oxytoca</i>	10	10	> 23,0
<i>E. coli</i> + <i>K. oxytoca</i> + Fago kss3.2-5	10	3	3,6

Aunque en la práctica o pruebas de la presente invención pueden emplearse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, los procedimientos y materiales adecuados se han descrito anteriormente. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo a título ilustrativo y no pretenden ser limitativos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar un microorganismo diana en una muestra que contiene bacterias no elegidas como diana que comprende:
  - 5 formar una mezcla de reacción combinando la muestra con un medio nutritivo y una composición de bacteriófagos que comprende bacteriófagos específicos para las bacterias no elegidas como diana en la muestra, en donde las bacterias no elegidas como diana compiten con el microorganismo diana por los nutrientes en los medios, y en donde el bacteriófago lisa las bacterias no elegidas como diana en la muestra sin lisar el microorganismo diana, reduciendo de este modo la aparición de un resultado de la detección de falso negativo mediante la inhibición de la proliferación de bacterias no elegidas como diana a la vez que permitiendo al microorganismo diana proliferar en el medio, y
  - 10 detectar el microorganismo diana.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además la incubación de la mezcla de reacción durante el tiempo suficiente para permitir la lisis de las bacterias no elegidas como diana en la muestra y una proliferación en el número de bacterias diana a concentraciones detectables.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de bacteriófagos comprende dos o más bacteriófagos específicos para diferentes bacterias no elegidas como diana.
4. El método de la reivindicación 1 en donde el microorganismo diana es una bacteria.
5. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de bacteriófagos comprende un bacteriófago que lisa bacterias gram negativas.
- 20 6. El método de la reivindicación 1 en donde el microorganismo diana es *Salmonella* y la composición de bacteriófagos comprende un bacteriófago específico para la lisis de *E. coli* o *Citrobacter*.
7. El método de la reivindicación 1 en donde el microorganismo diana es *Salmonella* y la composición de bacteriófagos comprende un primer bacteriófago específico para la lisis de *E. coli* y un segundo bacteriófago específico para la lisis de *Citrobacter*.
- 25 8. El método de la reivindicación 1 en donde la mezcla de reacción comprende además un antibiótico.
9. El método de la reivindicación 8 en donde el antibiótico inhibe la proliferación de bacterias gram positivas.
10. El método de la reivindicación 1 en donde el microorganismo diana se detecta utilizando un producto químico, una enzima, una molécula de ácido nucleico o un anticuerpo.
- 30 11. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de bacteriófagos reduce la proliferación de bacterias no elegidas como diana que reaccionan de forma cruzada con un reactivo de detección utilizado para detectar el microorganismo diana, reduciendo de este modo la aparición de un resultado de la detección falso positivo.
12. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de bacteriófagos aumenta la sensibilidad de detección.
13. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de bacteriófagos inhibe la proliferación de microorganismos competidores acortando de ese modo el tiempo necesario para permitir una proliferación en el número de bacterias diana a concentraciones detectables.
- 35 14. Un método para enriquecer un microorganismo diana en una muestra que contiene bacterias no elegidas como diana que comprende:
  - 40 formar una mezcla de incubación combinando la muestra con una composición de bacteriófagos que comprende bacteriófagos específicos para las bacterias no elegidas como diana en la muestra, e
  - incubar la mezcla de incubación,
  - en donde el bacteriófago lisa las bacterias no elegidas como diana en la muestra, dejando viable el microorganismo diana.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la mezcla de incubación comprende además un antibiótico.
- 45 16. El método de la reivindicación 14, en donde la muestra es una muestra industrial, biológica, alimentaria, farmacéutica, comercial o de fermentación.

17. El método de la reivindicación 14, en donde la composición de bacteriófagos mejora el rendimiento del microorganismo diana.
18. El método de la reivindicación 14, en donde la muestra es un reactor microbiológico para la producción de un producto biológico.
- 5 19. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra industrial, biológica, alimentaria, farmacéutica, comercial o de fermentación.
20. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de bacteriófagos mejora el rendimiento del microorganismo diana.
- 10 21. El método de la reivindicación 1, donde la composición de bacteriófagos es un líquido o está en un sustrato sólido o semisólido.
22. Un método para detectar un microorganismo diana en una muestra que contiene bacterias no elegidas como diana que comprende:
- 15 formar una mezcla de reacción combinando la muestra con una composición de bacteriófagos que comprende bacteriófagos específicos para las bacterias no elegidas como diana en la muestra, en donde las bacterias no elegidas como diana en la muestra reaccionan de forma cruzada con un reactivo de detección utilizado para detectar el microorganismo diana, y en donde el bacteriófago lisa las bacterias no elegidas como diana sin lisar el microorganismo diana, reduciendo de este modo la aparición de un resultado de detección de falsos positivos, y detectar el microorganismo diana.
- 20 23. El método de la reivindicación 22, que comprende además la incubación de la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para permitir la lisis de las bacterias no elegidas como diana en la muestra y una proliferación en el número de bacterias diana a concentraciones detectables.
24. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos comprende dos o más bacteriófagos específicos para diferentes bacterias no elegidas como diana.
- 25 25. El método de la reivindicación 22, en donde el microorganismo diana es una bacteria.
26. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos comprende un bacteriófago que lisa bacterias gram negativas.
27. El método de la reivindicación 22, en donde el microorganismo diana es *Salmonella* y la composición de bacteriófagos comprende un bacteriófago específico para la lisis de *E. coli* o *Citrobacter*.
- 30 28. El método de la reivindicación 22, en donde el microorganismo diana es *Salmonella* y la composición de bacteriófagos comprende un primer bacteriófago específico para la lisis de *E. coli* y un segundo bacteriófago específico para la lisis de *Citrobacter*.
29. El método de la reivindicación 22, en donde la mezcla de reacción comprende además un antibiótico.
30. El método de la reivindicación 29, en donde el antibiótico inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas.
- 35 31. El método de la reivindicación 22, en donde el microorganismo diana se detecta usando un producto químico, enzima, molécula de ácido nucleico o anticuerpo.
32. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos aumenta la sensibilidad de detección.
33. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos inhibe el crecimiento de microorganismos competidores acortando de ese modo el tiempo necesario para permitir una proliferación del número de bacterias diana a concentraciones detectables.
- 40 34. El método de la reivindicación 22, en donde la muestra es una muestra industrial, biológica, alimentaria, farmacéutica, comercial o de fermentación.
35. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos mejora el rendimiento del microorganismo diana.
- 45 36. El método de la reivindicación 22, en donde la composición de bacteriófagos es un líquido o está en un sustrato sólido o semisólido.