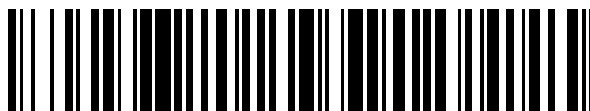


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 971**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2005 E 05706458 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1715755**

54 Título: **Uso de bacterias vivas para fomentar el crecimiento en animales**

30 Prioridad:

03.02.2004 US 541053 P

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

23.03.2015

73 Titular/es:

**PREVTEC MICROBIA INC. (100.0%)
1250 René-Lévesque Boulevard West, 38th Floor
Montréal, QC H3B 4W8, CA**

72 Inventor/es:

**NADEAU, ERIC y
FAIRBROTHER, JOHN MORRIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 531 971 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

Uso de bacterias vivas para fomentar el crecimiento en animales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del fomento del crecimiento en animales. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Escherichia coli* no patógena que expresa el factor de adhesión F4 (o K88), bien para fomentar el crecimiento en animales u homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales.

Antecedentes de la invención

El fomento del crecimiento es un asunto crucial para especialistas en ganadería y cría, que principalmente buscan optimizar la producción de animales sanos antes del sacrificio o para fines de investigación. Tal preocupación debe llevarlos a usar productos que fomentan el crecimiento que demostrarían ser beneficiosos para los animales y también para los seres humanos, en el caso de animales productores de carne.

En la técnica se ha divulgado, es decir, en la patente en EE UU no. 6 500 423, que el uso de una formulación que contiene una cepa de *E. coli* negativa para F4 de origen humano y una fracción volátil vegetal supuestamente mejora la ganancia de peso en lechones. El fomento del crecimiento observado se asoció con la fracción volátil vegetal y no con la cepa de *E. coli* negativa para F4.

Una advertencia principal en granjas y entornos de cría es la pérdida de peso, velocidad de crecimiento lenta junto con un recrudecimiento de enfermedades concomitantes, coste de fármacos, y mortalidad que produce una disminución en rendimientos animales y por último pérdidas económicas considerables. A este respecto, los animales tras el destete o tras la eclosión son particularmente vulnerables a agentes que dificultan el crecimiento.

Las infecciones causadas por condiciones no higiénicas o estrecha proximidad entre animales, por ejemplo, están entre los factores más comunes que producen la advertencia mencionada anteriormente.

Una solución convencional usada para aliviar este problema ha sido usar promotores de crecimiento antibióticos en piensos. Sin embargo, el uso de promotores de crecimiento antibióticos también es muy controvertido porque, como se sabe bien, incluso a dosis subterapéuticas, el uso continuado de antibióticos puede producir la selección de cepas bacterianas resistentes a antibióticos en los animales tratados (Arnold S *et al.*; Wegener HC *et al.*; y Schwarz *et al.*). De hecho, en los últimos diez años, ha habido una aparición de cepas de *Escherichia coli* más patógenas y más resistentes a antibióticos y/o cambios en la ganadería (destete temprano) y/o nuevas regulaciones europeas que prohíben el uso de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento o para el tratamiento profiláctico (prevención de enfermedades) y uso de altos niveles de metales pesados, tal como óxido de zinc en el pienso. El periodo de destete está particularmente asociado con mayor uso de antibióticos durante la producción animal.

Consecuentemente, ahora hay una resistencia creciente al uso de promotores de crecimiento antibióticos y metales pesados debido al recrudecimiento de la resistencia a antibióticos, reacciones alérgicas a residuos de antibióticos, y contaminación de tierra cultivada.

Otra advertencia a la que los especialistas en ganadería y cría también se tienen que enfrentar es la heterogeneidad de crecimiento entre rebaños de animales. Más específicamente, en un fin de producción de carne optimizada, por ejemplo, los granjeros buscan producir rebaños consistentes de animales que muestran la velocidad de crecimiento más homogénea posible antes del sacrificio, para evitar costes aumentados. Sin embargo, los animales generalmente presentan diferentes velocidades de crecimiento y diferentes vulnerabilidades a agentes infecciosos, entre otros.

Por tanto, hay una necesidad constante para agentes innovadores que fomentan el crecimiento de animales y que ventajosamente además contribuyen a homogenizar y optimizar el crecimiento animal.

El uso de una cepa recombinante de *E. coli* K-12 como una vacuna contra enfermedades gastroentéricas en mamíferos se divulga en el documento EP 0 060 129.

A.T.J Bianchi *et al.*, Vaccine, 1996, 14, 199-206 describen los requisitos para sensibilizar para una respuesta de células B mucosa secundaria contra fimbrias de *E. coli* F4 en un modelo de ratón y en lechones.

V. Snoeck *et al.*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 96, 219-227 divulgan el uso de pellas entéricas recubiertas de fimbrias de F4 para la vacunación oral de lechones lactantes para protegerlos contra infecciones de *Escherichia coli* enterotoxigénica.

65

L. Melin et al., Acta vet. Scand., 2002, 43, 231-245 se refiere a un estudio dirigido a examinar el efecto de diferentes medidas profilácticas relacionadas con el pienso en cerdos expuestos a tres serotipos patógenos de *E. coli* a través del medio ambiente.

5 **Compendio de la de la invención**

Un objeto de la presente invención es el uso de una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4+ para fomentar el crecimiento en un animal.

10 Otro objeto de la presente invención es el uso de una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4+ para homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales.

Dicha cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva se usa por vía oral.

15 Según la presente invención, en el uso para fomentar el crecimiento en un animal dicho animal se alimenta por vía oral con una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺.

En el uso para homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales, dichos animales se alimentan por vía oral con una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺.

20 Debido al uso de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺, la invención encuentra una ventaja en situaciones en donde el fomento del crecimiento rápido y la homogenización del crecimiento de un animal son particularmente necesarios. Por ejemplo, el uso de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺ en animales criados para la producción de carne permite llevar estos animales a peso de mercado o peso de sacrificio en un periodo de crecimiento más corto que el de sus equivalentes sin tratar.

25 La presente invención puede además encontrar una ventaja para el fomento del crecimiento y la homogenización del crecimiento de animales de laboratorio, tal como ratas y ratones. Como se puede apreciar, llevar estos animales de laboratorio a un peso determinado más rápido y más homogéneamente preferiblemente proporciona muestras más homogéneas y fácilmente disponibles de animales.

30 Otra ventaja de la presente invención es que no hay recurso al uso de antibióticos para fomentar el crecimiento en animales. Por tanto, se alivian problemas tales como el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a antibióticos o alergias a antibióticos que afectan particularmente a animales destetados.

35 Además, puesto que no se añaden metales pesados tal como óxido de zinc al pienso de los animales, también se evita la contaminación de la tierra. En otras palabras, la presente invención también proporciona usos y métodos ecológicos.

40 La eficacia mejorada de conversión de pienso lograda por el método presente permite que los animales tratados alcancen cualquier peso deseado mientras que consumen menos pienso que los animales sin tratar hechos crecer al mismo peso. Además, mientras se practica el método de la presente invención, no se observan ni efectos secundarios tóxicos ni disminución en estado de salud general debido a la bacteria en los animales tratados.

45 La invención y sus ventajas se entenderán mejor tras leer la siguiente descripción no restrictiva de formas de realización preferidas de la misma, hecha con referencia a las figuras acompañantes.

Breve descripción de las figuras

50 La **figura 1** es una fotografía que muestra el patrón de electroforesis en gel de campo pulsado del ADN genómico digerido con XbaI de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4+ usada según la presente invención. La cepa preferida es la cepa coliPROtec.

55 La **figura 2** es un gráfico que muestra el porcentaje de ganancia de peso en cerdos para cada periodo después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺.

La **figura 3** es un gráfico que muestra el porcentaje de ganancia de peso en ratones después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺.

60 **Descripción detallada de la invención**

La originalidad de la presente invención proviene de nuevos usos para cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺. Más particularmente y según un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva para fomentar el crecimiento en un animal, en donde dicha cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva se usa por vía oral.

Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz viva de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ para homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales, en donde dicha cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva se usa por vía oral.

5 En ambos usos, el/los animal(es) se alimenta(n) por vía oral con una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺.

La cepa usada en la presente invención se caracteriza en que expresa el factor de adhesión F4, mientras que es no patógena. Según un aspecto preferido de la invención, la cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ se selecciona del grupo que consiste en coliPROtec (número de acceso IDAC 210105-01), JG1329, M226, P03-7586(175) o pMK005. Más preferiblemente, la presente invención contempla usar la cepa coliPROtec y/o mutantes o variantes de la misma (véase el ejemplo I para más detalles).

15 La cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ depositada en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) el 21 de enero, 2005 con el número de acceso IDAC 210105-01 es un objeto de la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos “mutantes” y “variantes de la cepa coliPROtec se usan para cepas que tienen todas las características identificativas de la cepa coliPROtec, como se proporciona en el ejemplo I. Las cepas mutantes o variantes se pueden identificar como que tienen un genoma o parte del mismo que hibrida en condiciones muy rigurosas con el genoma de la cepa coliPROtec.

Según los aspectos mencionados anteriormente de la invención, la cepa descrita anteriormente se usa en una “cantidad eficaz”. Mediante la expresión “cantidad eficaz”, se entenderá que la cantidad de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ es la cantidad que provocará la respuesta biológica de un tejido, sistema o animal que busca el investigador o el veterinario, por ejemplo. En otras palabras, tal cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ es la cantidad que es suficiente para fomentar el crecimiento en un animal así como homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales.

Se entenderá que una cantidad eficaz preferida de la cepa contemplada por la presente invención es al menos aproximadamente 5^{E7} unidades formadoras de colonias (UFC), y más preferiblemente varía desde aproximadamente 5^{E7} hasta aproximadamente 5^{E9} UFC de la cepa de interés por animal. Mediante “aproximadamente”, se quiere decir que el valor de UFC de dicha cepa puede variar dentro de un cierto intervalo dependiendo del margen de error del método usado para evaluar el número de UFC para tal cepa.

La cantidad eficaz que se va a usar puede variar según un número de factores. Por ejemplo, el tipo de animal, peso inicial del animal, fase de crecimiento del animal, medio ambiente, es decir, instalaciones animales, tipo y administración de producción, estado higiénico de las instalaciones, estrés después del destete o la eclosión, pienso y suplementos usados, salud del animal y enfermedades concomitantes o tratamiento, pueden ser factores que se deben considerar.

Como se ha mencionado anteriormente, los objetivos de fomento del crecimiento y homogenización del crecimiento se alcanzan en un animal. Como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a cualquier animal joven o adulto adecuado para usarse según la presente invención. Más preferiblemente, el término “animal” se refiere a un animal tras el destete o tras la eclosión.

Puesto que en un animal tras el destete o tras la eclosión, la alimentación y cuidado maternos ya no están disponibles, los agentes promotores del crecimiento son de la mayor importancia. Tal preocupación es particularmente crucial, por ejemplo, en el caso de animales criados por su carne.

En el contexto de la presente invención, los animales preferidos que se van a usar pueden ser cualquiera de los siguientes: animales de granja tal como cerdos y más preferiblemente cerdos tras el destete; aves de corral tal como pollos, patos, gansos, gallinas o pavos, preferiblemente pollos y más preferiblemente pollos de engorde; ganado tal como vacas, novillos, toros, o bueyes; animales de caza tal como avestruces o bisontes; animales domésticos, por ejemplo, gatos o perros; y animales de laboratorio, tal como ratones o ratas. Por supuesto, estos animales están todos caracterizados en que el fomento del crecimiento y la homogenización del crecimiento son características deseadas, en particular cuando la producción de carne es el fin.

En vista de lo anterior, se entenderá que los animales pueden recibir la cepa de la invención durante sustancialmente la totalidad de su periodo de crecimiento, o durante solo una parte de su periodo de crecimiento, por ejemplo la parte inicial y/o el periodo que lleva al sacrificio.

Según un aspecto preferido de la invención, el animal tras el destete es preferiblemente un cerdo, preferiblemente de edad desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 28 días, en el inicio de los ensayos. El cerdo de interés tiene más preferiblemente 17 días de edad.

65

Según otro aspecto preferido de la invención, el animal tras el destete es preferiblemente un ratón, preferiblemente de edad desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 28 días, en el inicio de los ensayos. El ratón de interés tiene más preferiblemente 21 días de edad.

5 Según aún otro aspecto preferido de la invención, el animal tras la eclosión es preferiblemente un pollo, preferiblemente de edad desde aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 7 días, al inicio de los ensayos. El pollo de interés tiene más preferiblemente 1 día de edad. Se entenderá que la expresión "aproximadamente 1 día de edad" significa 24 horas o menos después del nacimiento o eclosión.

10 Según un aspecto preferido de la presente invención, la cantidad eficaz que se puede dar a los cerdos preferiblemente varía desde 5^{E7} a 5^{E9} UFC/cerdo y es más preferiblemente de aproximadamente 1^{E9} UFC/cerdo.

Según otro aspecto preferido, la cantidad eficaz que se puede dar a los pollos varía desde aproximadamente 5^{E7} a 5^{E9} UFC/pollo y es más preferiblemente de 5^{E8} UFC/pollo.

15 Según aún otro aspecto preferido, la cantidad eficaz que se puede dar a los ratones varía desde aproximadamente 5^{E7} a 5^{E9} UFC/ratón y es más preferiblemente de 5^{E8} UFC/ratón.

20 En el contexto particular de los métodos de la invención, la cantidad eficaz de la cepa se puede alimentar al animal como una dosis única o se puede dar según una pauta, mediante lo cual es eficaz. Mediante el término "alimentación", se debe entender que una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ de la invención se suministra al animal en tratamiento de modo que la cepa finalmente alcance el aparato digestivo, y más preferiblemente los intestinos.

25 Por ejemplo, y según un aspecto preferido de la invención, la alimentación se puede hacer alimentando por vía oral la cepa al animal de interés.

Según un aspecto preferido de la invención, la cepa preferiblemente se alimenta al animal en forma liofilizada. Según otro aspecto preferido, la cepa de la invención se diluye o resuspende con un diluyente o soporte.

30 Según la presente invención, la cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ se usa para "fomentar el crecimiento" en un animal o para "homogenizar el crecimiento entre los animales de un rebaño". Estas expresiones se refieren al uso de la cepa de *Escherichia coli* para aumentar la velocidad de crecimiento de un animal. En otras palabras, tras el tratamiento con la cepa de interés, el peso del animal aumenta más rápidamente y más homogéneamente comparado con sus equivalentes no tratados. Más particularmente, la expresión "homogenización del crecimiento" en el contexto de la presente invención se refiere a un control relativo sobre la velocidad de crecimiento en un rebaño de animales. Este tipo de control tiene un interés particular en el campo de la cría animal y producción de carne en que todos los animales en un grupo determinado idealmente deben alcanzar su pico de crecimiento más rápido, en relativamente el mismo tiempo entre el grupo, con cantidades convencionales de pienso junto con un agente promotor del crecimiento no tóxico. Cuando estas condiciones se cumplen, los costes de alimentación, costes de sacrificio y costes de transporte se pueden optimizar todos.

40 Para evaluar el fomento del crecimiento y la homogenización del crecimiento, se pueden determinar un número de parámetros conocidos en el campo. Más específicamente, tales parámetros, evaluados solos o en combinación, pueden abarcar:

- i. Peso corporal medio (PCM): media de los pesos corporales de un grupo de animales;
- ii. Ganancia de peso diaria media (GPD): aumento medio en peso por día, por grupo de animales, durante un periodo particular;
- 50 iii. Ingesta de pienso (IP): cantidad de pienso ingerido por animal o por grupo de animales durante un periodo particular; y
- iv. Relación de conversión de pienso (RCP): ingesta de pienso por animal o por grupo de animales durante un periodo particular/ganancia de peso para el mismo animal o grupo de animales durante el mismo periodo particular.

55 Ventajosamente, la cepa de la invención se puede usar sola o en asociación con un soporte de pienso aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "soporte de pienso aceptable" se refiere a cualquier soporte, diluyente o excipiente que sea compatible con la cepa de la invención y que se puede dar a un animal sin efectos adversos. Los soportes de pienso aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina, glucosa, dextrosa, o soluciones tamponadas. Tal soporte ventajosamente es no tóxico para la cepa y no dañino para el animal. También puede ser biodegradable. El experto en la materia sabrá cómo seleccionar soportes adecuados, tal como soportes que no sean dañinos para el medio ambiente. También preferiblemente, este soporte es un soporte de pienso aceptable sólido o líquido adecuado.

60 Un soporte de pienso aceptable sólido adecuado es un soporte ingerible no tóxico. Por ejemplo, este soporte de pienso aceptable sólido puede ser un pienso sólido común tal como el componente de una dieta animal típica que

consiste en productos de cereales, tal como harina de cebada, harina de maíz o pienso de trigo, productos de nueces y semillas, tal como torta de nueces molidas descascarilladas, o torta de semilla de algodón extraída, junto con cantidades minoritarias de, por ejemplo, harina de plumas, harina de algas, harina de hueso, harina de hueso, caliza, sal, urea y vitaminas; o puede ser un diluyente o soporte sólido inerte sin valor nutricional, por ejemplo, caolín, talco, carbonato de calcio, tierra de batán, conchas de ostras molidas o caliza molida; o puede ser almidón o lactosa.

Un soporte de pienso aceptable líquido adecuado es, por ejemplo, agua y preferiblemente agua potable; leche tal como leche entera o desnatada; o un medio de cultivo tal como caldo de soja y tripsona (TSB).

Los siguientes ejemplos ilustran la amplia gama de potenciales aplicaciones de la presente invención y no se pretende que limiten su ámbito. Se pueden hacer modificaciones y variaciones a los mismos sin separarse del espíritu y ámbito de la invención. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica para ensayar la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Ejemplos

Ejemplo I: Descripción de la cepa de *Escherichia coli* (cepa coliPROtec) y sus clones

Según una característica preferida de la invención, se usa una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ (denominada de aquí en adelante como la cepa coliPROtec o JFF4). La cepa coliPROtec se depositó en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá el 21 de enero, 2005 y se le atribuyó el número de acceso IDAC 210105-01.

1. Origen

La cepa se aisló de heces de un cerdo sano en el Laboratorio de *Escherichia coli* en la Facultad de Medicina veterinaria, Universidad de Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Los animales se compraron de una granja local situada en Monteregie, Quebec, Canadá.

2. Estabilidad de la cepa

La expresión de fimbrias F4, una proteína inmunógena, de la cepa coliPROtec se estabilizó usando pases *in vitro*. Se hicieron tres (3) fermentaciones consecutivas de 10 l. Después de cada fermentación, el cultivo se inoculó en agar y se probaron 10 colonias para la expresión de fimbrias F4 usando una prueba de aglutinación en portaobjetos. Se juntaron bacterias de colonias F4⁺ y se usaron para la fermentación consecutiva. La cepa se congeló después en caldo de soja tripsona (TSB) suplementado con glicerol al 20%. Después de descongelar, la expresión de F4 en la cepa no era totalmente estable y se necesitaron varias fermentaciones consecutivas (aproximadamente 10) para obtener una cepa estable. La cepa estable se liofilizó después de aproximadamente 15 pases desde el cerdo. El cultivo liofilizado se usó para producir el inóculo maestro de coliPROtec.

3. Análisis bioquímicos

Se hizo una identificación de la cepa usando el sistema API. El código de identificación 5544572 obtenido se refiere a una cepa de *Escherichia coli*.

4. Virotipado

El virotipado de la cepa coliPROtec se hizo por hibridación de colonias y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados del virotipado mostraron que la cepa coliPROtec era positiva para F4 mientras que era negativa para las siguientes toxinas:

LT, STa, STb, STaH, Stx1, Stx2, VT2vp1, VT2vh, Aero, Tsh, CDT3, CDT4, CNF1, CNF2, HlyA, HlyC, Ehx, East1.

Además, la cepa coliPROtec también era negativa para las siguientes adhesinas o putativas adhesinas:

F5, F6, F18, F41, F17, fimbrias P, AIDA, AFA, SFA, CS31a, daaE, Paa, aggR, ARF/1, Eae, CFAI, CFAll(CS1coo), CFAll(CS3cst).

5. Huella de ADN

La cepa coliPROtec se caracterizó usando electroforesis en gel de campo pulsado (figura 1).

Se seleccionaron clones particulares de la cepa, para los que la expresión de fimbrias F4 era estable después de la fermentación, después de pases repetidos *in vitro*.

6. Tabla resumen y hoja de datos

Las cepas usadas en los siguientes experimentos se describen en detalle en la siguiente tabla 1 y hoja de datos.

5

Tabla 1

| Cepas de <i>Escherichia coli</i> de tipo salvaje no patógenas F4⁺ | | |
|---|-----------------|---------------------------------|
| Nombre | Serotipo | Fuente |
| JFF4 (coliPROtec) | O8:K87 | heces de un cerdo sano |
| JG1329 | O8:K87 | heces de un cerdo |
| M226 | O9 | heces de un cerdo |
| P03-7586(175) | O8 | heces de un cerdo |
| Cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante no patógena F4⁺ | | |
| pMK005 | O9 | plásmido pMK005 que codifica F4 |
| Cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 negativa | | |
| p82-862 | O115:KV165 | heces de cerdo |

| HOJA DE DATOS de la cepa coliPROtec | |
|--|--|
| | Determinada con método estándar de serotipado usando el antígeno "O" y en el "Statens Serum Institut 5 Artillerivej 2300 Copenhagen S Dinamarca" |
| PATOTIPO | NEGATIVA PARA LAS SIGUIENTES TOXINAS <ul style="list-style-type: none"> • LT, STa, STb, STaH, Stx1, Stx2, VT2vp1, VT2vh, Aero, Tsh, CDT3, CDT4, CNF1, CNF2, HlyA, HlyC, Ehx, East1 NEGATIVA PARA LOS SIGUIENTES FACTORES DE VIRULENCIA <ul style="list-style-type: none"> • F5, F6, F18, F41, F17, fimbrias P, AIDA, AFA, SFA, CS31a, daaE, Paa, aggR, ARF/1, Eae, CFA1, CFAll(CS1coo), CFAll(CS3cst) Confirmación por PCR e hibridación de colonias |
| MEDIO PARA EXPRESIÓN DE FIMBRIAS | |
| ANTIBIOGRAMA RESISTENTE A: | Ampicilina, tetraciclina, espectinomicina, tiamulina, tilosina |
| ANTIBIOGRAMA SENSIBLE A: | Apramicina, ceftiofur, cefalotina, gentamicina, neomicina, trim/sulfametoxazol |
| MEDIO DE ALMACENAMIENTO | Medio de liofilización: dextrano T-40 al 5%, sacarosa al 7%, glutamato monosódico al 1% |
| FUENTE DEL AISLADO | Aislado en el Laboratorio de <i>Escherichia coli</i> , Fac. Med. vet., Saint-Hyacinthe, 1999, de heces de un cerdo normal |

10

Ejemplo II: Cerdos destetados

Efectos de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺, en forma oral, en el crecimiento de cerdos

15

A - Efecto de coliPROtec en la ganancia de peso en cerdos destetados

1. Cepa de *Escherichia coli*:

20

La cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva coliPROtec resuspendida en TSB se alimentó por vía oral a cerdos destetados. Esta cepa se describe en el ejemplo I.

2. Experimentos

25

2.1 Animales

Se realizaron cinco (5) ensayos para un total de 45 cerdos tratados y 45 sin tratar. Estos cerdos venían de diferentes granjas comerciales.

30

2.2 Ensayos

Los ensayos se realizaron en la Facultad de medicina veterinaria, Universidad de Montreal, con el siguiente plan.

2.2.1 Grupos de ensayo

| GRUPO NO. (n) | DESCRIPCIÓN |
|----------------------|--------------------|
|----------------------|--------------------|

| | |
|--------|--|
| 1 (45) | Sin tratar |
| 2 (45) | Tratados con coliProtec (con 5 ^E 9/cerdo) |

2.2.2 Plan del ensayo

| DÍA NO. | DESCRIPCIÓN |
|---------|--|
| 1 | Llegada de los cerdos destetados de 17 días de edad |
| 1 a 4 | Periodo de adaptación |
| 5 | Tratamiento de los animales con una dosis única de coliPROtec o TBS solo (grupo control) |
| 20 | Pesado de los animales; Final del experimento |

5 2.2.3 Parámetros evaluados

En los presentes ensayos, los parámetros evaluados fueron el peso y la ganancia de peso diaria de los cerdos destetados los días 5 y 20 en los grupo 1 y 2.

10 3. Resultados

15 Durante los estudios de inocuidad de la cepa de coliPROtec, se observó un efecto positivo del producto sobre la ganancia de peso de los animales. Como se muestra en las tablas 2 y 3, los cerdos tratados con solo una dosis oral de coliPROtec al principio del periodo tras el destete tenían una ganancia de peso diaria mayor en 53 g cuando se comparan con los animales sin tratar. Específicamente, 2 semanas después del tratamiento, los cerdos tratados pesaban 849 g más que los cerdos sin tratar.

Tabla 2: Peso de los animales

| Día | Peso (kg) | | Prueba T | Grupo 2 frente a grupo 1 (g) |
|-----|-----------|---------|-----------|------------------------------|
| | Grupo 1 | Grupo 2 | | |
| 5 | 6,053 | 6,137 | p = 0,754 | +84 |
| 20 | 12,055 | 12,904 | p = 0,020 | +849 |

20 Tabla 3: Ganancia de peso diaria

| Días | Ganancia de peso diaria (g) | | Prueba T | Grupo 2 frente a grupo 1 (g) |
|--------|-----------------------------|---------|-----------|------------------------------|
| | Grupo 1 | Grupo 2 | | |
| 5 a 20 | 405 | 458 | p = 0,007 | +53 |

4. Análisis y conclusión

25 El día 5 tras el destete, dando coliPROtec, el peso de los grupos 1 y 2 (sin tratar y tratados con coliPROtec) no era estadísticamente diferente. Sin embargo, el día 20 tras el destete (15 días después del tratamiento), los animales tratados pesaban 849 g más y demostraron una ganancia de peso diaria de 53 g más que los animales sin tratar. Estas diferencias eran estadísticamente significativas.

30 De importancia, los promotores de crecimiento antibióticos generalmente aumentan la ganancia de peso desde el 3,3 al 8,8% (Doyle, M.E., Food Research Institute, University of Wisconsin, 2001). Como se demuestra aquí, la cepa coliPROtec aumentó la ganancia de peso diaria en el 11% durante las 2 semanas después de una dosis única.

35 B - Efectos de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺ vivas, en forma oral, en el crecimiento de cerdos destetados

1. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas usadas se describen en el ejemplo I.

40 2. Experimentos

2.1. Animales

45 Se usaron cuarenta y nueve (49) cerdos destetados de 17 días de edad, originarios de una granja de cerdos convencional, limpia en los presentes experimento. Estos lechones tenían un peso corporal de 5 ± 1 kg.

2.2. Ensayos

2.2.1 Grupos de ensayo

Al destetar, los cerdos se transfirieron al animalario, estancias de contención, Laboratorio de Higiene Veterinaria y Alimentaria, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Los análisis de laboratorio se produjeron en el Laboratorio ECL, FMV, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá.

5

| GRUPO NO. (n) | DESCRIPCIÓN |
|---------------|---|
| 1 (7) | cerdos sin tratar |
| 2 (7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4-negativa P82-862 |
| 3 (7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JFF4 (coliPROtec) |
| 4 (7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JG1329 |
| 5 (7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ M226 |
| 6 (7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ P03-7586(175) |
| 7(7) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante no patógena F4 ⁺ pMK005 |

2.2.2 Plan de ensayo

| DÍA no. | DESCRIPCIÓN |
|------------------|--|
| 0 | Llegada de los cerdos destetados de 17 días de edad al animalario. |
| 1 | Identificación, agrupamiento y pesado de cerdos. Agrupamiento según sexo y peso del animal. Muestreo de heces para evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR). |
| 1 y 4 | Aproximadamente 5E9 UFC de bacterias <i>Escherichia coli</i> en caldo de soja y tripsona (TSB) por cerdo dadas por vía oral usando un tubo esofágico. El grupo control recibió TSB solo. |
| 1, 4, 9, 14 y 17 | Pesado de los animales; muestreo de heces para evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR). |
| 17 | Eutanasia de los animales. |

2.2.3 Parámetros evaluados

Durante el ensayo, los cerdos tuvieron acceso *ad libitum* a pienso y agua. Se observaron dos veces al día para la salud general y la presencia de diarrea. Desde el día 0 al día 14, los cerdos se alimentaron con un pienso de iniciación comercial que contenía proteína al 23% sin adición de óxido de zinc o antibióticos. Durante los 3 últimos días, el pienso contenía proteína al 19%.

3. Resultados

3.1 Estado de *Escherichia coli* F4⁺ y ETEC patogénico de cerdos

Al principio del ensayo, por tanto antes del tratamiento, algunos cerdos de todos los grupos estaban colonizados por una cepa F4⁺ que poseía la toxina STb (tabla 4). Todos los cerdos del grupo control (grupo 1) y del grupo tratado con la cepa de *Escherichia coli* F4⁻ (grupo 2), estaban colonizados por esta cepa F4:STb el día 9 (tabla 5). Aunque esta cepa (O45:F4:STb) no es una cepa ETEC habitual que causa diarrea tras el destete en cerdos, no se puede excluir que sea patógena. Sin embargo, ningún animal demostró signos clínicos asociados con diarrea tras el destete durante el ensayo.

Puesto que ambos grupo control estaban colonizados por esta cepa F4⁺, es difícil evaluar el efecto de las cepas F4⁺ probadas en el rendimiento de crecimiento animal.

Tabla 4: Identificación del estado de cerdos para excreción de cepa *Escherichia coli* F4⁺ antes del tratamiento (Día 1; análisis de PCR en heces)

| | Número de cerdos con heces positivas para F4 | Otros factores de virulencia identificados |
|-----------------------|--|--|
| Grupo 1* ¹ | 1 | LT y STb |
| Grupo 2 | 1 | STb |
| Grupo 3 | 2 | LT y STb |
| Grupo 4 | 1 | LT y STb |
| Grupo 5 | 1 | LT y STb |
| Grupo 6 | 3 | LT y STb |
| Grupo 7 | 1 | STb |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4; grupo 3 a 7, cepas F4⁺ los días 1 y 4.

Tabla 5: identificación del estado de cerdos para excreción de cepas de *Escherichia coli* F4⁺ durante el ensayo

| | Número de cerdos con heces positivas para F4 | | | | |
|---------------------|--|-------|--------|--------|--|
| Día 1* ¹ | Día 4 | Día 9 | Día 14 | Día 17 | |

| | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|
| Grupo 1* | 1 | 3 | 7 | 4 | 0 |
| Grupo 2 | 1 | 2 | 7 | 3 | 0 |
| Grupo 3 | 2 | 4 | 6 | 5 | 5 |
| Grupo 4 | 1 | 7 | 7 | 6 | 0 |
| Grupo 5 | 1 | 6 | 6 | 5 | 6 |
| Grupo 6 | 3 | 1 | 1 | 7 | 4 |
| Grupo 7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4; grupo 3 a 7, cepas F4-positivas los días 1 y 4.

3.2 Salud general y evaluación de diarrea

5 Todos los animales tuvieron buena salud durante el ensayo. Algunos animales de los grupos 2, 3, 4, 6 y 7 presentaron diarrea leve, pero solo durante un día.

3.3 Evaluación de rendimiento de crecimiento

10 Tabla 6: Peso de cerdos después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| | Peso corporal (kg) | | | | |
|-----------------|--------------------|-------|-------|--------|--------|
| | Día 1* | Día 4 | Día 9 | Día 14 | Día 17 |
| Grupo 1* | 4,91 | 5,43 | 6,74 | 9,09 | 10,23 |
| Grupo 2 | 4,86 | 5,40 | 7,11 | 9,23 | 11,20 |
| Grupo 3 | 4,91 | 5,77 | 7,23 | 9,34 | 10,91 |
| Grupo 4 | 5,00 | 5,13 | 7,07 | 9,20 | 10,60 |
| Grupo 5 | 4,97 | 5,59 | 7,04 | 9,27 | 10,47 |
| Grupo 6 | 4,91 | 5,47 | 7,20 | 9,41 | 10,46 |
| Grupo 7 | 5,03 | 5,80 | 8,03 | 10,20 | 11,23 |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4; grupo 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4.

15 El modelo lineal con medidas repetidas, usando el día como un factor intra-sujeto y el grupo como un factor entre sujeto, no mostró efecto del tratamiento sobre el crecimiento de cerdos ($p = 0,90$). El análisis *post hoc* comprobó diferencias entre cada grupo tratado (grupos 2 a 7) y el grupo control (grupo 1) cada día (tabla 6). El peso era significativamente mayor para el grupo 7, comparado con el grupo control, el día 9 solo ($p = 0,045$). Otras diferencias de peso no eran significativas.

20 Sin embargo, los grupo 3 y 7, tratados con las cepas JFF4 y recombinante, respectivamente, tenían un mayor peso los días 4 y 9, pero los pesos eran posteriormente más similares entre grupos (tabla 6). Durante el primer periodo del ensayo (días 0 a 4), los grupo 3 y 7 tenían un porcentaje de ganancia de peso del 18 y el 15%, respectivamente, comparado con el 11% para ambos grupos control (grupos 1 y 2; figura 2). La baja ganancia de peso observada para el grupo 4 durante este primer periodo se atribuyó a 3 cerdos que habían perdido peso.

25 Durante el segundo periodo (días 4 a 9), los grupos 2, 4, 6 y 7 tuvieron un mayor porcentaje de ganancia de peso que el del grupo sin tratar (grupo 1). El porcentaje de ganancia de peso era más homogéneo durante el tercer periodo (días 9 a 14) y fue mayor para los grupos 2 y 3 que para el grupo 1, durante el último periodo.

30 Ejemplo III: Pollos de engorde

Efectos de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺ vivas, en forma oral, en el crecimiento de pollos de engorde

35 1. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas usadas se describen en el ejemplo I.

40 2. Experimentos

2.1 Animales

45 Sesenta y tres (63) pollos de engorde Cobbs machos de 1 día de edad, originarios de una granja de pollos convencional, limpia. Después de la eclosión, los pollos se transfirieron al animalario.

2.2 Ensayos

2.2.1 Grupos de ensayo

Tras la eclosión, los pollos se transfirieron al animalario, estancias de contención, Laboratorio de Higiene Veterinaria y Alimentaria, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Los análisis de laboratorio se produjeron en el Laboratorio ECL, FMV, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá.

5

| GRUPO NO. (N) | DESCRIPCIÓN |
|---------------|---|
| 1 (10) | pollos sin tratar |
| 2 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4-negativa P82-862 |
| 3 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JFF4 (coliPROtec) |
| 4 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JG1329 |
| 5 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ M226 |
| 6 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ P03-7586(175) |
| 7(10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante no patógena F4 ⁺ pMK005 |

2.2.2 Plan de ensayo

| DÍA No. | DESCRIPCIÓN |
|--------------------------|--|
| 0 | Llegada de los pollos de 1 día de edad al animalario; identificación, pesado y agrupamiento de pollos; muestreo de heces para evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR) |
| 1 y 4 | Aproximadamente 1E9 UFC de bacterias <i>Escherichia coli</i> en caldo de tripsona (TSB) por pollo dadas por vía oral usando una aguja esofágica. El grupo control recibió TSB solo |
| 0, 4, 9, 14, 18, 23 y 28 | Pesado de los animales; evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR) |
| 2, 9, 17 y 24 | Evaluación del consumo de pienso en 24 horas |
| 28 | Eutanasia de los animales |

2.2.3 Parámetros evaluados

El peso corporal medio (PCM), la ganancia de peso diaria media (GPD), la ingesta de pienso (IP), y la relación de conversión de pienso (RCP) se evaluaron todos en los presentes ensayos.

15 Durante el ensayo, los pollos tuvieron acceso *ad libitum* a pienso y agua. Se observaron dos veces al día para la salud general y presencia de diarrea. Del día 0 al día 24, los pollos recibieron un pienso comercial estándar para pollos (sin antibióticos). Del día 24 al día 28, recibieron un pienso comercial de desarrollo estándar (sin antibióticos).

3. Resultados

20

3.1 Estado de *Escherichia coli* F4⁺ y ETEC patogénico de pollos

Ninguna muestra fecal fue positiva para F4, STa, STb o LT el día 0, antes del tratamiento. La excreción fecal de *Escherichia coli* F4⁺ se detectó en grupos tratados (grupos 3 a 7) los días 2 y 4, pero no posteriormente.

25

3.2 Salud general y evaluación de diarrea

Los animales tuvieron buena salud durante el ensayo y no se observó diarrea. Tres (3) animales del grupo 7 se sacrificaron el día 23 o 25 debido a su estado de salud general deteriorado. No se observó ningún signo clínico gastrointestinal en estos pollos. Los informes de necropsia en estos pollos del departamento de patología (Facultad de medicina veterinaria, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá) revelaron que estos pollos murieron del síndrome de ascitis, una enfermedad no infecciosa frecuente, generalmente asociada con insuficiencia cardíaca en pollos de engorde.

30

3.3 Evaluación del rendimiento de crecimiento

35

Tabla 7: Peso de los pollos después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Peso corporal medio (g) | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|-------|--------|--------|--------|---------|-----------------------|
| | 0 | 4 | 9 | 14 | 18 | 23 | 28 |
| 1* ¹ | 42,11 | 93,22 | 170,89 | 411,00 | 655,56 | 1018,67 | 1386,22 |
| 2 | 43,89 | 94,33 | 174,56 | 395,11 | 644,44 | 968,56 | 1341,11 |
| 3 | 42,11 | 89,67 | 181,78 | 421,56 | 685,78 | 1003,22 | 1305,89 |
| 4 | 40,89 | 88,00 | 178,22 | 405,56 | 645,78 | 1019,44 | 1326,56 |
| 5 | 40,44 | 96,78 | 191,44 | 433,33 | 696,00 | 1036,89 | 1322,67 |
| 6 | 39,56 | 91,33 | 188,56 | 430,33 | 679,00 | 1043,44 | 1372,33 |
| 7 | 40,78 | 95,67 | 185,33 | 435,56 | 669,22 | 1043,57 | 1492,83* ² |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4

*2: Se excluyeron tres animales sacrificados.

5 Tabla 8: Ganancia de peso corporal diaria después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Ganancia de peso diaria media (g) | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|------|------|-------|-------|--------------------|
| | 0-4 | 4-9 | 9-14 | 14-18 | 18-23 | 23-28 |
| 1* ¹ | 12,8 | 15,5 | 48,0 | 61,1 | 72,6 | 73,5 |
| 2 | 12,6 | 16,0 | 44,1 | 62,3 | 64,8 | 74,5 |
| 3 | 11,9 | 18,4 | 48,0 | 66,1 | 63,5 | 60,5 |
| 4 | 11,8 | 18,0 | 45,5 | 60,1 | 74,7 | 61,4 |
| 5 | 14,1 | 18,9 | 48,4 | 65,7 | 68,2 | 57,2 |
| 6 | 12,9 | 19,4 | 48,4 | 62,2 | 72,9 | 65,8 |
| 7 | 13,7 | 17,9 | 50,0 | 58,4 | 73,4 | 76,7* ² |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4

*2: Se excluyeron tres animales sacrificados.

10 **Cepa JFF4:** El PCM del grupo 3, tratado con la cepa JFF4, era mayor que para el grupo sin tratar (grupo 1) y el grupo tratado con la cepa F4-negativa (grupo 2) los días 9, 14, 18 (tabla 7). La GPD del grupo tratado con la cepa JFF4 era mayor que para ambos grupos control (grupos 1 y 2) durante los días después del segundo tratamiento (periodo entre los días 4 y 9) y durante el cuarto periodo (días 14 a 18; tabla 8).

15 **Otras cepas F4⁺:** El PCM de los grupo 5, 6 y 7 era mayor que el de ambos grupos controles (grupos 1 y 2) los días 6, 14, 18 y 23. Por contraste, era mayor solo el día 9 para el grupo 4 (tabla 7).

La GPD de todos los grupos tratados con cepas F4⁺ era mayor que la de ambos grupos control durante los días después de los tratamientos (días 4 a 9) y durante el cuarto periodo (días 14 a 18) para el grupo 5 (tabla 8).

20 **Cepa F4-negativa:**

El PCM y GPD eran similares o menores para el grupo tratado con la cepa F4-negativa que para el grupo sin tratar.

25 Un modelo lineal con medidas repetidas, usando el día como un factor intra-sujeto y el grupo como un factor entre sujeto, no mostró efecto del tratamiento sobre el crecimiento de pollos ($p = 0,97$). El análisis *post hoc* se hizo para comprobar diferencias entre cada grupo tratado (grupos 2 a 7) y el grupo sin tratar (grupo 1) cada día. El peso no era significativamente diferente entre cada grupo tratado y el grupo sin tratar cada día. Las diferencias observadas en el análisis descriptivo no eran significativas probablemente debido a una mayor variabilidad de la esperada para el peso de los pollos en cada grupo, en particular para el grupo sin tratar.

3.4 Ingesta de pienso (IP)

35 Tabla 9: Ingesta de pienso (periodo de 24 horas) de pollos después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Ingesta de pienso (g) de grupos (por animal) durante periodos de 24 horas | | | |
|-----------------|---|------------|--------------|----------------------------|
| | Día 2 | Día 9 | Día 17 | Día 24 |
| 1* ¹ | 144 (16,0) | 576 (64,0) | 1043 (115,9) | 1316 (146,2) |
| 2 | 146 (16,2) | 522 (58,0) | 951 (105,7) | 1180 (131,1) |
| 3 | 128 (14,2) | 570 (63,3) | 915 (101,7) | 1305 (145,0) |
| 4 | 136 (15,1) | 498 (55,3) | 880 (97,8) | 1389 (154,3) |
| 5 | 169 (18,8) | 526 (58,4) | 976 (108,4) | 1274 (141,6) |
| 6 | 145 (16,1) | 632 (70,2) | 923 (102,6) | 1535 (170,6) |
| 7 | 144 (16,0) | 695 (77,2) | 1013 (112,6) | 1006* ² (143,7) |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4

*2: Dos animales sacrificados (n = 7 en lugar de 9).

40 **Cepa JFF4:** La IP del grupo 3 (JFF4) era menor que la de tanto el grupo sin tratar (grupo 1) como el grupo tratado con la cepa F4-negativa (grupo 2) los días 2 y 17 (tabla 9).

Otras cepas F4⁺: La IP era menor que la de ambos grupos control (grupos 1 y 2) solo para el grupo 4 (días 2, 9, 17) y para el grupo 6 (día 17).

45 **Cepa F4-negativa:** La IP del grupo tratado con una cepa F4-negativa era menor que la del grupo sin tratar (grupo 1) los días 9, 17 y 24.

Un modelo lineal no mostró efecto del tratamiento en el consumo de pienso de pollos ($p = 0,77$).

3.5 Relación de conversión de pienso (RCP)

Tabla 10: Relación de conversión de pienso de pollos después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Relación de conversión de pienso* ¹ de grupos | | | |
|-----------------|--|-------|--------|--------------------|
| | Día 2 | Día 9 | Día 17 | Día 24 |
| 1* ² | 1,25 | 2,01 | 1,90 | 2,01 |
| 2 | 1,29 | 1,93 | 1,70 | 2,02 |
| 3 | 1,20 | 1,91 | 1,54 | 2,28 |
| 4 | 1,28 | 1,74 | 1,68 | 2,07 |
| 5 | 1,33 | 1,74 | 1,65 | 2,08 |
| 6 | 1,24 | 2,07 | 1,65 | 2,34 |
| 7 | 1,17 | 2,27 | 1,93 | 1,96* ³ |

*1: Día 2; GPD total del grupo entre los días 0 y 4/IP el día 2, Día 9; GPD total del grupo entre los días 4 y 14/IP el día 9, Día 17; GPD total del grupo entre los días 14 y 23/IP el día 17, Día 24; GPD total del grupo entre los días 18 y 28/IP el día 24

*2: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4

*3: Dos animales sacrificados ($n = 7$ en lugar de 9).

Cepa JFF4: La RCP del grupo 3 (JFF4), era menor que la de tanto el grupo sin tratar (grupo 1) como el grupo tratado con la cepa F4-negativa (grupo 2) los días 2, y 17 (tabla 10), similarmente a la IP (tabla 9). Este relación era menor que la del grupo sin tratar solo el día 9.

Otras cepas F4⁺: La RCP era menor que la de ambos grupos control (grupo 1 y 2) para el grupo 7 (día 2), grupos 3 y 4 (días 9 y 17) y grupos 3 y 6 (día 17; tabla 4)

Cepa F4-negativa: La RCP del grupo tratado con una cepa F4-negativa era menor que la del grupo sin tratar (grupo 1), el día 17 solo.

Un modelo lineal no mostró efecto del tratamiento en la relación de conversión de pienso de pollos ($p = 0,68$).

4. Análisis y conclusión

Los resultados demuestran que las cepas de *E. coli* no patógenas F4⁺, incluyendo la cepa JFF4, aumentan el rendimiento de crecimiento de pollos. El rendimiento de crecimiento estaba positivamente afectado, especialmente para los días inmediatamente después del segundo tratamiento, siendo la GPD mayor para todos los grupos tratados que para el grupo sin tratar, durante los días 4 a 9. Dos cepas F4⁺, incluyendo la cepa JFF4, también tenían una GPD mayor que ambos grupos control durante los días 14 a 18. La mejora en el rendimiento de crecimiento durante los días inmediatamente después de los tratamientos (días 4 a 9) produjo un peso mayor de los grupos tratados con cepas F4⁺ que para ambos grupos control hasta el día 18 o, para algunos grupos, el día 23.

La GPD mayor observada durante el corto periodo tras el tratamiento afectó positivamente al PCM de los grupos tratados hasta los días 18 o 23, dependiendo de la cepa. El mayor peso de los grupos tratados no se asoció con mayor ingesta de pienso. Además, la IP era algunas veces menor para los grupos tratados que para el grupo sin tratar, disminuyendo de esta manera la relación de conversión de pienso.

Este efecto sobre el rendimiento de crecimiento se asocia con el determinante F4 o con cepas que expresan el determinante F4 ya que el grupo tratado con la cepa de *Escherichia coli* F4-negativa no mostró este efecto y tenía similar rendimiento de crecimiento que el grupo sin tratar.

Ejemplo IV: Ratones destetados

Efectos de cepas de *Escherichia coli* no patógenas F4⁺ vivas, en forma oral, en el crecimiento de ratones destetados

1. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas usadas se describen en el ejemplo I.

2. Experimentos

2.1 Animales

Setenta (70) ratones destetados de 21 días de edad sanos. Tras el destete, los ratones se transfirieron al animalario.

2.2 Ensayos

2.2.1 Grupos de ensayo

En el destete, los ratones se transfirieron al animalario, estancias de contención, Laboratorio de Higiene Veterinaria y Alimentaria, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Los análisis de laboratorio se produjeron en el Laboratorio EcL, FMV, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá.

| GRUPO NO. (N) | DESCRIPCIÓN |
|---------------|---|
| 1 (10) | ratones sin tratar |
| 2 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4-negativa P82-862 |
| 3 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JFF4 (coliPROtec) |
| 4 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ JG1329 |
| 5 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ M226 |
| 6 (10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena F4 ⁺ P03-7586(175) |
| 7(10) | tratados con la cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante no patógena F4 ⁺ pMK005 |

2.2.2 Plan de ensayo

| DÍA No. | DESCRIPCIÓN |
|--------------------------|---|
| 0 | Llegada de los ratones destetados de 21 días de edad al animalario; identificación, pesado y agrupamiento de ratones; para cada grupo tratado, 5 machos y 5 hembras se agruparon en 2 jaulas. Muestreo de heces para evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR) |
| 1 y 4 | Aproximadamente 1E9 UFC de bacterias <i>Escherichia coli</i> en caldo de tripsona (TSB) por ratón dadas por vía oral usando una aguja esofágica. El grupo control recibió TSB solo |
| 0, 4, 9, 14, 18, 23 y 28 | Pesado de los animales; evaluación del consumo de pienso para el periodo desde el día del peso anterior hasta el día del pesado. Se muestrearon las heces para la evaluación de la excreción de <i>Escherichia coli</i> positiva para F4, LT STa y/o STb (PCR) |
| 28 | Eutanasia de los animales |

15 Variables evaluadas: ganancia de peso corporal medio (PCM), ingesta de pienso (IP), y relación de conversión de pienso (RCP).

Durante el ensayo, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a pienso y agua. Se observaron dos veces al día para la salud general y presencia de diarrea.

3. Resultados

3.1 Estado de *Escherichia coli* F4⁺ y ETEC patogénico de los ratones

25 Ninguna muestra fecal fue positiva para F4, STa, STb o LT el día 0. Se identificó F4 en las heces de los grupos 3, 4, 5 y 7 el día después del primer y/o hasta 10 días después del segundo tratamiento con las cepas F4⁺. No se detectó STa, STb o LT en ningún momento durante el experimento.

3.2 Salud general y evaluación de diarrea

30 Todos animales tuvieron buena salud durante el ensayo y no se observó diarrea.

3.3 Evaluación del rendimiento de crecimiento

35 Tabla 11: Peso corporal medio de los ratones después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Peso corporal medio (g) | | | | | | |
|-------|-------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | Día 0 | Día 4 | Día 9 | Día 14 | Día 18 | Día 23 | Día 28 |
| 1* | 16,71 | 21,01 | 23,67 | 24,95 | 26,15 | 27,35 | 28,24 |
| 2 | 17,20 | 21,67 | 24,40 | 25,72 | 26,81 | 28,32 | 29,38 |
| 3 | 17,33 | 21,93 | 24,42 | 25,85 | 27,10 | 27,88 | 28,94 |
| 4 | 17,54 | 21,39 | 24,37 | 26,12 | 26,87 | 28,09 | 29,48 |
| 5 | 18,05 | 21,68 | 24,40 | 25,70 | 27,42 | 28,85 | 29,90 |
| 6 | 17,77 | 21,52 | 24,37 | 25,83 | 26,92 | 27,89 | 29,13 |
| 7 | 17,79 | 20,88 | 23,44 | 24,03 | 26,15 | 27,41 | 28,29 |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4-positiva los días 1 y 4

No se observó diferencia en el peso corporal entre los grupos. Un modelo lineal con medidas repetidas, usando el día como un factor intra-sujeto y el grupo como un factor entre sujeto, no mostró efecto del tratamiento sobre el crecimiento de ratones ($p = 0,99$). El análisis *post hoc* se hizo para comprobar diferencias entre cada grupo tratado (grupos 2 a 7) y el grupo sin tratar (grupo 1) cada día. El peso no era significativamente diferente entre cada grupo tratado y el grupo sin tratar cada día.

Los porcentajes de ganancia de peso de todos los grupos fueron similares durante el periodo del ensayo de 28 días. Por otra parte, los grupos 1, 2 y 3 tuvieron un aumento ligeramente mayor, el día 4 solo (figura 3).

3.4 Ingesta de pienso (IP)

Tabla 12: Ingesta de pienso de ratones después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Ingesta de pienso (g) de grupos para cada periodo de ensayo | | | | | |
|-------|---|-------|--------|---------|---------|---------|
| | 0 a 4 | 4 a 9 | 9 a 14 | 14 a 18 | 18 a 23 | 23 a 28 |
| 1* | 148,1 | 198,1 | 243,2 | 176,2 | 209,2 | 208,6 |
| 2 | 149,4 | 192,6 | 201,6 | 165,4 | 192,2 | 191,6 |
| 3 | 154,1 | 183,6 | 208,6 | 176,1 | 195,6 | 195,1 |
| 4 | 138,4 | 168,7 | 194,6 | 160,0 | 174,2 | 182,4 |
| 5 | 157,4 | 183,6 | 224,8 | 182,0 | 207,8 | 205,5 |
| 6 | 161,6 | 186,7 | 219,4 | 180,0 | 187,6 | 215,0 |
| 7 | 153,0 | 175,0 | 198,8 | 179,4 | 190,0 | 190,9 |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4⁺ los días 1 y 4.

Cepa JFF4: La IP del grupo 3 (JFF4), era menor que la de tanto el grupo sin tratar (grupo 1) como el grupo tratado con la cepa F4-negativa (grupo 2) entre los días 4 a 9, pronto tras el tratamiento. Sin embargo, era menor que la del grupo sin tratar pero similar a la del grupo tratado con la cepa F4-negativa durante la mayoría de los siguientes periodos, excepto los días 14 a 18 (tabla 12).

Otras cepas F4⁺: La IP de todas las otras cepas F4⁺ era menor que la de ambos grupo control (grupo 1 y 2) durante el periodo de días 4 a 9, pronto después del tratamiento (tabla 12). Posteriormente, la IP varió, dependiendo de la cepa (tabla 12).

Cepa F4-negativa: La IP del grupo tratado con una cepa F4-negativa (grupo 2) era similar a la observada para el grupo sin tratar (grupo 1) hasta el día 9, y posteriormente fue menor que la última. Por tanto, la reducción de la IP para el grupo 2 se observó más tarde después del tratamiento que para los grupos tratados con cepas F4⁺.

El modelo lineal mostró un efecto significativo del tratamiento en la ingesta de pienso ($p < 0,0001$). La prueba de Dunnett *post hoc* mostró que el consumo de pienso era significativamente mayor para el grupo control (grupo 1) que para los grupos 2, 3, 4 y 7, tratados con las cepas 862, JFF4, JG1329 y pmK005, respectivamente (tabla 12). Para estos grupos, los ratones comieron menos pienso para alcanzar el mismo peso.

3.5 Relación de conversión de pienso (RCP)

Tabla 13: Ingesta de pienso de ratones después del tratamiento con cepas de *Escherichia coli* F4⁺

| Grupo | Relación de conversión de pienso de grupos | |
|-------|--|------------|
| | Días 0-14 | Días 14-28 |
| 1* | 7,30 | 18,39 |
| 2 | 6,50 | 14,96 |
| 3 | 6,41 | 18,34 |
| 4 | 6,62 | 17,11 |
| 5 | 7,40 | 14,17 |
| 6 | 7,04 | 17,65 |
| 7 | 8,44 | 13,15 |

*1: Tratamiento: Grupo 1; control, Grupo 2; cepa de *Escherichia coli* F4-negativa los días 1 y 4, grupos 3 a 7, cepas F4⁺ los días 1 y 4.

Aunque la diferencia no era significativa, la RCP del grupo tratado con JFF4 era menor que la de cualquier otro grupo de tratamiento para los días 0 a 14. Posteriormente, la RCP fue más variable entre grupos. El modelo lineal no mostró efecto significativo del tratamiento en la RCP.

4. Análisis y conclusión

El efecto de cepas de *Escherichia coli* F4⁺ en el crecimiento parece ser menos importante que el observado para cerdos y pollos. No obstante, se observó un efecto en la IP y la RCP, particularmente durante la fase de crecimiento de los ratones (primeros 14 días). Puesto que los ratones CD-1 no estaban genéticamente seleccionados para rendimiento de crecimiento, como era el caso para los pollos y cerdos usados en los presentes estudios, es posible que los ratones alcanzaran rápidamente la máxima ganancia de peso y por tanto hubiera poco alcance para que las cepas F4⁺ influyeran la ganancia de peso, afectando de esta manera solo a la ingesta de pienso.

Bernardeau et al. describieron que el efecto promotor del crecimiento de *Lactobacilli* no se observaba en ratones sobrealimentados con dietas convencionales enriquecidas mientras que el impacto de la administración de probióticos estaba aumentado en ratones alimentados con una dieta subestándar (tal como una basada en cebada).

Referencias

Arnold S., Gassner B., Giger T. y Zwahlen R. Banning antimicrobial growth promoters in feedstuffs does not result in increased therapeutic use of antibiotics in medicated feed in pig farming. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2004; 13: 323-331.

Wegener HC, Aarestrup FM, Bogo Jensen L, Hammerum AM y Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5 (3): 329-335.

Schwarz S, Kehrenberg C y Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 17: 431-437.

Bernardeau M, Vernoux JP y Gueguen M. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International Journal of Food Microbiology* 2002; 77(1-2): 19-27.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cantidad eficaz de una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva para fomentar el crecimiento en un animal o para homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales y en donde dicha cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ viva se usa por vía oral.
2. Uso según la reivindicación 1 para fomentar el crecimiento en un animal.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 para homogenizar el crecimiento entre un rebaño de animales.
4. El uso según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde dicha cantidad eficaz de cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ se asocia con un soporte de pienso aceptable.
- 15 5. El uso según la reivindicación 4, en donde el animal se alimenta con la cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ en asociación con un soporte de pienso aceptable sólido o líquido.
6. El uso según la reivindicación 5, en donde el soporte de pienso aceptable sólido es pienso sólido común.
- 20 7. El uso según la reivindicación 5, en donde el soporte de pienso aceptable líquido es agua.
8. El uso según la reivindicación 5, en donde el soporte de pienso aceptable líquido es leche.
- 25 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la cantidad eficaz es al menos aproximadamente 5^{E7} UFC de cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ por animal.
- 30 10. El uso según la reivindicación 9, en donde la cantidad eficaz varía desde aproximadamente 5^{E7} hasta aproximadamente 5^{E9} UFC de cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ por animal.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ consiste en la cepa de *Escherichia coli* depositada en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) el 21 de enero, 2005 con el número de acceso IDAC 210105-01, mutantes o variantes de la misma.
- 35 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el animal o animales se selecciona(n) del grupo que consiste en un animal tras el destete o un animal tras la eclosión.
13. El uso según la reivindicación 12, en donde el animal tras el destete tiene una edad desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 28 días.
- 40 14. El uso según la reivindicación 12, en donde el animal tras la eclosión tiene una edad desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 días.
15. El uso según la reivindicación 12 o 13, en donde el animal tras el destete es un cerdo.
- 45 16. El uso según la reivindicación 12 o 13, en donde el animal tras el destete es un ratón.
17. El uso según la reivindicación 12 o 14, en donde el animal tras a eclosión es un ave de corral.
18. El uso según la reivindicación 17, en donde el ave de corral es un pollo.
- 50 19. Una cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ depositada en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) el 21 de enero, 2005 con el número de acceso IDAC 210105-01.
20. Una composición que comprende la cepa de *Escherichia coli* no patógena F4⁺ de la reivindicación 19.

FIGURA 1

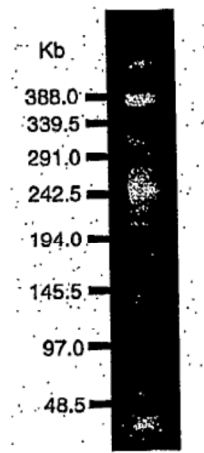


FIGURA 2

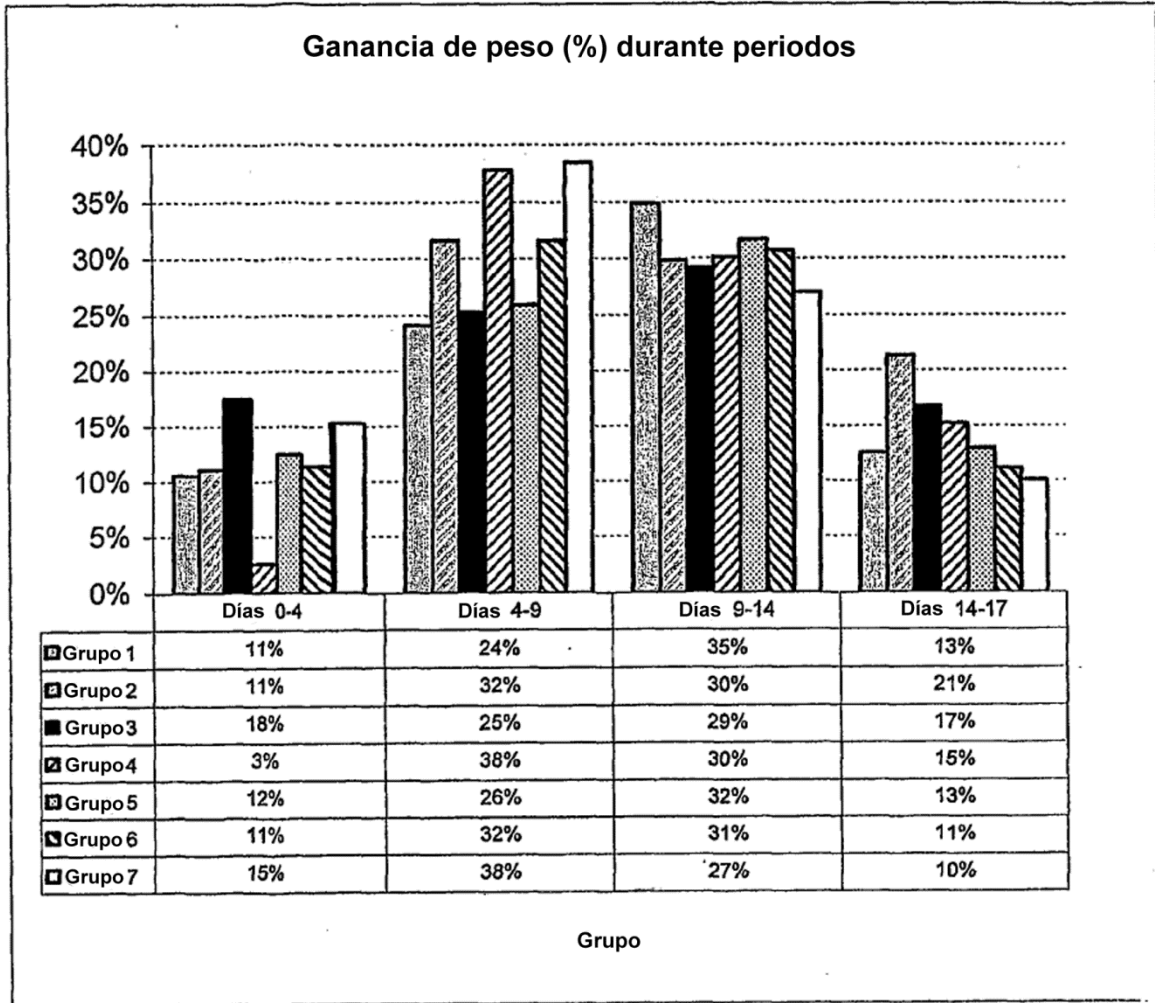


FIGURA 3

