

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 517**

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: **24.04.2009 E 09735856 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2293687**

54 Título: **Composición alimenticia funcional**

30 Prioridad:

24.04.2008 NO 20081977

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

19.02.2016

73 Titular/es:

EWOS INNOVATION AS (50.0%)

4335 Dirdal, NO y

CHEMOFORMA LTD (50.0%)

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ VECINO, JOSÉ LUIS y

WADSWORTH, SIMON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 560 517 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

Composición alimenticia funcional.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a una composición alimenticia que se puede administrar para prevenir o reducir los síntomas de enfermedades infecciosas en animales, al uso de la composición alimenticia y a un método para alimentar peces tal como se define en el preámbulo de las reivindicaciones independientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 *Piscirickettsia salmonis* es una pequeña bacteria, intracelular que provoca una septicemia fatal en los salmónidos. Desde su aislamiento inicial en la década de 1980, *P. salmonis* ha sido la principal causa de mortalidad de los salmónidos en la industria acuícola en Chile. Debido a que *P. salmonis* es intracelular, la eficacia de un tratamiento del salmón infectado con antibióticos es reducida. El desarrollo de vacunas también ha resultado difícil debido a la naturaleza intracelular de la bacteria. Las vacunas actuales contra *P. salmonis* son, por tanto, en gran medida ineficaces, 6 meses después de la transferencia desde el agua dulce al agua de mar y la industria sigue dependiendo en gran medida de los antibióticos cuando se trata esta enfermedad. El uso de agentes antimicrobianos, tales como ácido oxolínico, ha sido amplio durante una serie de años en Chile, alcanzando más de 20 130 t (compuesto activo) por año. Más del 80 % de este volumen se utiliza para controlar *P. salmonis*, aunque no es antimicrobiano, ha demostrado ser consistentemente eficaz.

25 Por otra parte, los tratamientos con antibióticos, tales como con oxitetraciclina y ácido oxolínico, pueden reducir significativamente las funciones del sistema inmune específico y no específico de los peces, tales como el salmón del Atlántico. Esta inmunosupresión aumenta el riesgo de una reinfección con organismos patógenos como *P. salmonis*, lo que conduce a una rápida recolonización de *P. salmonis* y a una necesidad reiterada de administración de antibióticos. Este extenso uso repetido de antibióticos reduce aún más la inmunidad de los peces y afecta a la flora microbiana natural de los organismos, tal como la microflora intestinal. Una baja eficacia de la alimentación y poco crecimiento son algunos de los efectos negativos descritos de tratamientos con antibióticos en este contexto y, 30 por lo tanto, no son solo un problema económico, sino también una cuestión del bienestar general de los peces. El aumento de la conciencia pública y del consumidor sobre el bienestar de los peces, aumenta la necesidad de tratamientos alternativos eficaces y la prevención de brotes de enfermedades en la producción acuícola.

35 El uso continuado de antibióticos también ha aumentado la preocupación por los residuos y la seguridad alimentaria. Actualmente, para todos los lotes de salmón producidos en Chile, tanto para los mercados de EE.UU. como japoneses, es un requisito la prueba de residuos de antibióticos. Estas iniciativas han dado lugar a un período de espera más largo de más de 2 meses antes de la recogida en las poblaciones de salmón del Atlántico. Por tanto, este período representa un riesgo significativo y puede conducir a grandes pérdidas de peces valiosos en caso de infecciones graves de todo tipo. Por otra parte, cualquier infección y las pérdidas en esta población antes de la recogida, pueden dar lugar a una sanción económica significativa ya que no se pueden utilizar antibióticos para 40 controlar la enfermedad.

45 Los inmunoestimulantes que aumentan la respuesta inmune de los peces tienen una importante aplicación en la acuicultura, especialmente cuando se implementan como parte de un programa de control sanitario integrado. Los peptidoglicanos (PGs) son componentes estructurales de las paredes celulares bacterianas y pueden formar hasta el 90 % del peso seco de las bacterias gram-positivas. Los PGs son responsables de la resistencia de las células, de la forma y de contrarrestar la presión osmótica del citoplasma. Se forman a partir de dos aminoazúcares alternos que producen una fuerte estructura de tipo reticular. Debido a su presencia en muchas bacterias patógenas, los PGs producen una respuesta fuerte cuando se exponen al sistema inmune del hospedador. Los PGs han mostrado que 50 mejoran la protección contra agentes patógenos en un rango de especies acuícolas jóvenes así como adultas, que incluyen salmónidos, jurel, tilapia, platija y gamba. Sin embargo, se ha mostrado que la administración de peptidoglicano puede dar como resultado efectos secundarios negativos si no se administra en una dosis óptima, tales como una reducción de la supervivencia, por ser demasiado alta o demasiado baja y especialmente si se administra al organismo durante períodos largos. Desde un punto de vista de la acuicultura, sería beneficioso si este fuerte inmunoestimulante se pudiera administrar durante un período más largo de lo que es recomendable basándose en experiencias y conocimientos experimentales actuales. Matsuo K. & Miyazono I. ("The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile Rainbow-trout. Nippon Suisan Gakkaishi 89 (8): 1377-1379, agosto de 1993) se refirieron a que la administración oral de PG durante más de 28 60 días puede conducir a la disminución de la resistencia a las enfermedades.

Zhou et al. (Effects of dietary supplementation of A3 α -peptidoglycan on innate immune responses and defense Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 2006. *Aquaculture* 251, págs. 172-181) describen el efecto de un suplemento alimenticio de A3 α -peptidoglicano sobre la respuesta inmune de la pulga japonesa, también la dosis considerada y la duración de la administración.

El documento EP1082908A1 describe un aditivo alimentario para crustáceos y peces que comprende un lipopolisacárido de bajo peso molecular obtenido a partir de bacterias gram-negativas que es capaz de activar la inmunidad y evitar infecciones en los animales.

5 La mayoría de las células producen nucleótidos para uso en la replicación celular. En condiciones normales en cualquier organismo vivo, la síntesis constante de nucleótidos está bien equilibrada con las exigencias naturales, necesarias para la proliferación celular.

10 Burrells et al. (Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. Effects on resistance to disease in salmonids. 2001. Aquaculture 199, págs. 159-169) y Li et al. (Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. 2006. Aquaculture 251, págs. 141-152) describen los efectos de incluir nucleótidos exógenos en las dietas de acuicultura sobre la resistencia de los peces frente a infecciones.

15 El documento WO 2007/095313 A2 describe un suplemento alimenticio que comprende nucleótidos que tienen estabilidad en el agua y una eficacia dietética mejoradas debido a la microencapsulación. Las microcápsulas también pueden comprender un inmunoestimulante tal como un peptidoglicano.

20 El documento WO 2008/051091 A1 (publicado el 2 de mayo, 2008), un derecho previo según el Art. 54(3) en relación con la novedad, describe un alimento que comprende mana-oligosacáridos, combinados opcionalmente con nucleótidos y un inmunoestimulante como peptidoglicano, para compensar los efectos negativos de la harina de soja en las dietas.

25 El problema que tiene que resolver la presente invención es desarrollar y proporcionar una dieta sana, funcional, eficaz y un régimen de alimentación sin los efectos secundarios negativos mencionados anteriormente y que mejore la supervivencia de los peces durante los períodos en los que los peces se exponen o han sido expuestos a infecciones tales como *P. salmonis*. Esta dieta se traduciría en importantes beneficios económicos tanto para los productores de pescado como de alimentos. Por otra parte, contribuirá a mejorar de este modo el bienestar de los peces y podrá reducir la necesidad y la cantidad de una administración de antibióticos con todas las desventajas conocidas.

30 COMPENDIO DE LA INVENCION

35 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición alimenticia para peces que comprende ingredientes alimenticios convencionales, caracterizada porque la composición comprende además peptidoglicano y nucleótidos, en donde dicho peptidoglicano en la composición alimenticia está en el intervalo de 0,001-0,01 %, más preferiblemente de 0,001-0,005 % y lo más preferiblemente de 0,001 % en peso.

40 Preferiblemente, los nucleótidos están en el intervalo de 0,05 %-1 % en peso, más preferiblemente de 0,1-0,5 % en peso y lo más preferiblemente de 0,2 % en peso.

45 Preferiblemente, la relación en peso de nucleótidos a peptidoglicano es superior a 4, más preferiblemente superior a 20, y más preferiblemente superior a 40 y la cantidad de peptidoglicano está en el intervalo de 0,001-0,01 % del peso de la composición alimenticia.

50 Los nucleótidos se eligen a partir de monofosfato de adenosina, monofosfato de citidina, monofosfato de guanosina, monofosfato de uridina, monofosfato de timidina.

55 Preferiblemente, la composición alimenticia para peces anterior es una composición alimenticia funcional para evitar o reducir los síntomas relacionados con una enfermedad infecciosa en un animal.

60 Preferiblemente, la composición alimenticia para peces es para incrementar la supervivencia y/o el crecimiento en peces expuestos a una infección.

65 Preferiblemente, la infección está causada por bacterias tales como *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp, estomatitis infecciosa, infecciones estreptocócicas, infecciones de *Vibrio*; enfermedad del páncreas, NSAV, inflamación de las branquias (GI), inflamación del músculo cardíaco y esquelético (HSMI), virus de la anemia infecciosa de los salmónidos (ISA), saprolegniosis e infestación de piojos marinos.

60 Preferiblemente, el pez es un salmónido, preferentemente un salmón del Atlántico.

65 Preferiblemente, la composición alimenticia para peces es para una recuperación eficaz después de una infección y/o un tratamiento con antibióticos debido a una infección y/o para reducir el riesgo de una reinfección.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención comprende el uso de una composición tal y como se ha indicado anteriormente, para alimentar peces que son susceptibles de una infección, en donde la composición se administra

al pez en el periodo anterior a la exposición a una infección, en donde la composición se proporciona durante un período de 1-12 semanas antes de la infección.

5 Preferiblemente, la composición se proporciona durante un período de 2-6 semanas antes de la infección, y lo más preferiblemente de 4 semanas antes de la infección.

Preferiblemente, el pez es un salmónido, preferentemente un salmón del Atlántico.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las realizaciones de la invención se describirán ahora a modo de ejemplos, haciendo referencia a los siguientes diagramas, en los que:

15 La Figura 1 muestra la mortalidad acumulada (media \pm EEM (en inglés SEM, "standard error mean") en el experimento 1 durante el período posterior a la exposición de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) alimentado con diferentes dietas en la fase previa a la exposición.

20 La Figura 2 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (porcentaje relativo de supervivencia, media \pm error estándar de la media) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) durante el período posterior a la exposición (experimento 1) después de haber sido alimentado con diferentes dietas en la fase previa a la exposición.

25 La Figura 3 muestra la mortalidad acumulada (%) (media \pm SDEV) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en el experimento 2, expresada como series de tiempos. Los peces fueron alimentados con diferentes dietas antes de la exposición a *Piscirickettsia salmonis*.

30 La Figura 4 muestra la mortalidad acumulada (%) (media \pm EEM) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en el experimento 2, expresada como la mortalidad final después de la fase posterior a la exposición. Los peces fueron alimentados con diferentes dietas antes de la exposición a *Piscirickettsia salmonis*.

30 SECCIÓN EXPERIMENTAL

Experimento 1

35 Un total de 640 salmones del Atlántico *Salmo salar* (160 peces por grupo), sexo mixto, peso inicial de 80 g, adaptados al agua de mar, fueron alimentados durante un período de 4 semanas a 2 % del peso corporal por día. En la práctica, los peces tienen libre acceso a la alimentación. Los peces se mantuvieron en 6 tanques. Los peces se marcaron con PIT (del inglés "Passive Integrated Transponder") para identificar los diferentes grupos, antes del inicio del período de alimentación. Los peces se mantuvieron en agua de mar a temperatura ambiente (16°C). La mortalidad se evaluó a diario.

40 Hubo 4 tratamientos dietéticos diferentes en el período previo a la exposición (Tabla 3) que incluían 5 dietas diferentes (Tabla 1). Tres grupos de peces fueron alimentados con una dieta que comprendía nucleótidos durante 3 semanas, seguida de tres dietas diferentes que comprendían peptidoglicano en diferentes concentraciones y nucleótidos durante una semana. El grupo de control recibió una dieta comercial durante todo el período previo a la
45 exposición de 4 semanas. Todas las dietas comprendían ingredientes alimenticios convencionales y solo diferían en la cantidad de peptidoglicano y nucleótidos añadidos (Tabla 2).

Exposición a *Piscirickettsia salmonis* y alimentación posterior a la exposición

50 Veinticuatro horas después de la alimentación final en el período previo a la exposición, los peces se mezclaron equitativamente en 6 tanques con 25 peces de cada grupo por tanque (un total de 100 peces por tanque). Los peces se expusieron a 0,2 ml de una dosis letal (DL₅₀) de *Piscirickettsia salmonis* mediante inyección intraperitoneal. Después de la exposición, los peces fueron alimentados con la misma dieta de control sin ningún tipo de nucleótido o peptidoglicano añadido durante 30 días (después de la exposición), cuando terminó el experimento y se
55 determinaron las mortalidades finales.

Tabla 1: Dietas del ensayo empleadas en el experimento 1. PG = peptidoglicano.

Nº de Dieta	Nombre de la dieta
1.	Dieta de control (Comercial)
2.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos y 0,005 % de PG; (50 g de PG tonelada ⁻¹)
3.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos y 0,01 % de PG; (100 g de PG tonelada ⁻¹)
4.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos y 0,05 % de PG; (500 g de PG tonelada ⁻¹)
5.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos

Table 2: Ingredientes alimenticios principales y análisis químico de la composición de las dietas del ensayo en el experimento 1.

Ingrediente (% en peso)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
Harina de pescado	51	51	51	51	51
Aceite de pescado	18	18	18	18	18
Gluten de trigo	7	7	7	7	7
Composición alimenticia funcional	8	8	8	8	8
Premezcla de vitaminas*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Premezcla mineral**	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Peptidoglicano	-	0,005	0,01	0,05	-
Nucleótidos	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Composición (%)					
Proteína	47,9	47,9	47,9	47,9	47,9
Lípido	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
Ceniza	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Masa seca	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7

*EWOS Vitamin premix ®
**EWOS Mineral premix ®.

5

Tabla 3. Regímenes alimenticios de la dieta del ensayo en el experimento 1 antes de la exposición a *Piscirickettsia salmonis* (pre-exposición) y después de la exposición a *P. salmonis* (post-exposición).

Tratamiento	Pre-exposición				Post-exposición 30 días
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	
1 (control)	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1	
2	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 2	Dieta 1
3	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 3	
4	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 4	

10 Determinación de DL50

La dosis correcta para determinar el nivel de mortalidad del 50 % de la población (DL₅₀) se determinó antes de la exposición principal. Un total de 220 peces (*Salmo salar*) de la misma población de peces que los utilizados en el experimento de alimentación, se distribuyeron en tanques de 4 x 700 L. Los peces tenían un peso promedio de 120 a 150 g (55 peces por tanque). A los tanques se suministró agua de mar a temperatura ambiente. Una vez que los peces se ajustaron a las condiciones del tanque, fueron inyectados (0,2 ml por pez, inyección intraperitoneal, medial ventral) con 4 diluciones de un título conocido de *P. salmonis* PSLT8 (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10.000). Los datos de la temperatura del agua y la mortalidad de los peces inyectados se registraron durante un periodo de 30 días. La estimación de la DL₅₀ se realizó paralelamente al periodo de alimentación de las diferentes dietas.

20 Estadísticas

Las mortalidades se expresaron como mortalidad acumulada (%). Los datos se determinaron empleando un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, además de una prueba de Rango logarítmico y Wilcoxon (Minitab 13.32, State College, PA, EE.UU.). El porcentaje de supervivencia relativa (PSR) se calculó como:

25

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{Mortalidad en el grupo del ensayo}}{\text{Mortalidad en el grupo de control}}\right) \times 100$$

Resultados y discusión

30 Los peces alimentados con nucleótidos y peptidoglicano (PG) tuvieron un porcentaje de supervivencia relativa (PSR) significativamente mayor, al final del estudio, 30 días después de la exposición (Tabla 4, Figura 2) (prueba de rango logarítmico: $p < 0,001$; prueba de Wilcoxon: $p < 0,001$) en comparación con los peces que recibieron la dieta de control. La probabilidad de supervivencia en el grupo de control estaba por debajo del 49 %, en comparación con el 69 %, 72 % y 75 % en los tratamientos que recibieron nucleótidos y PG al 0,05 %, nucleótidos y PG al 0,01 % y

nucleótidos y PG al 0,005 %, respectivamente (Figura 2). No hubo diferencias significativas en la mortalidad entre los tratamientos que recibieron dietas que comprendían una combinación de nucleótidos y de peptidoglicano, aunque se observó una tendencia clara hacia mortalidades más bajas con dosis más bajas (Figura 1). Había una desviación baja en las mortalidades entre los tanques y no se observó ninguna diferencia significativa del efecto del tanque (prueba de rango logarítmico: $p = 0,906$; prueba de Wilcoxon: $p = 0,952$).

Tabla 4: Porcentaje de supervivencia relativa (PSR) y porcentaje de mortalidad al final de la fase posterior a la exposición (media \pm error estándar de la media) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) que fue alimentado con diferentes dietas antes de la exposición a *P. salmonis*. * indica diferencias significativas ($p < 0,001$ en comparación con el control).

Tratamiento 1	PSR (%)	Mortalidad (%)
1 (control)	-	51 \pm 1,23
2	51	25 \pm 1,33*
3	46	28 \pm 1,79*
4	40	31 \pm 2,40*

Experimento 2

Un total de 900 salmones del Atlántico *Salmo salar* (150 peces por tratamiento, 6 tratamientos), con un peso inicial de 80 g, adaptados al agua de mar, se marcaron con PIT para identificar los diferentes grupos, antes del inicio del período de alimentación. Los peces se mantuvieron en agua de mar a temperatura ambiente (13°C). Los peces fueron alimentados durante un período de 8 semanas a 2 % de peso corporal por día, con seis dietas diferentes en diferentes combinaciones: una dieta de control sin ingredientes adicionales, una dieta que comprendía nucleótidos, una dieta que comprendía peptidoglicano y dietas que comprendían combinaciones de nucleótidos y peptidoglicano (Tabla 5). Aparte de la adición de nucleótidos y/o peptidoglicano, todas las dietas contenían ingredientes alimenticios convencionales (Tabla 6). En la práctica, los peces tienen libre acceso a la alimentación.

Tabla 5: Dietas del ensayo empleadas en el experimento 2. PG = peptidoglicano.

Nº de Dieta	Nombre de la dieta
1.	Dieta de control (Comercial)
2.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos
3.	Dieta con 0,005 % de PG; (50 g de PG tonelada ⁻¹)
4.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos + 0,005 % de PG (50 g de PG tonelada ⁻¹)
5.	Dieta con 0,2 % de nucleótidos + 0,001 % de PG (10 g de PG tonelada ⁻¹)

Tabla 6: Ingredientes alimenticios principales y análisis químico de la composición de las dietas del ensayo en el experimento 2.

Ingrediente (% en peso)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
Harina de pescado	51	51	51	51	51
Aceite de pescado	18	18	18	18	18
Gluten de trigo	7	7	7	7	7
Harina de gluten de maíz	8	8	8	8	8
Premezcla de vitaminas*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Premezcla mineral**	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Peptidoglicano	-	-	0,005	0,005	0,001
Nucleótido	-	0,2	-	0,2	0,2
Composición (%)					
Proteína	47,6	47,6	47,6	47,6	47,6
Lípido	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
Ceniza	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Masa seca	92,7	92,5	92,7	92,5	92,7

*EWOS Vitamin premix ®

**EWOS Mineral premix ®.

Los peces fueron alimentados con las dietas diferentes durante la fase de pre-exposición de 4 semanas (Tabla 7): el Tratamiento 1 recibió una dieta de control sin ningún ingrediente adicional durante las 4 semanas del período de pre-exposición. El Tratamiento 2 recibió una dieta con nucleótidos añadidos durante 4 semanas. En el tratamiento 3 los peces fueron alimentados con la dieta de control durante 3 semanas, seguido de una dieta que comprendía 0,005 % de PG durante 1 semana. En el tratamiento 4 y 5, los peces fueron alimentados con la dieta que comprendía nucleótidos durante 3 semanas, seguida de dietas que comprendían diferentes combinaciones de nucleótidos y peptidoglicano (0,005 % de PG en el tratamiento 4 y 0,001 % de PG en el tratamiento 5) durante 1 semana. En el tratamiento 6 los peces fueron alimentados con una dieta que comprendía una combinación de nucleótidos y peptidoglicano durante 4 semanas. Después del período de pre-exposición, los peces fueron expuestos a *P. salmonis* tal y como se describe con detalle a continuación.

Durante el periodo de post-exposición, todos los tratamientos recibieron alimentos de la dieta de control durante 4 semanas hasta que se terminó el experimento.

Tabla 7. Regímenes alimenticios en el experimento 2 antes de que los peces fueran expuestos a *Piscirickettsia salmonis* (pre-exposición) y después de la exposición a *P. salmonis* (post-exposición). Los controles positivos y negativos son dietas comerciales convencionales con nucleótidos añadidos (Dieta 2) y sin nucleótidos añadidos (Dieta 1).

Tratamiento	Pre-exposición				Post-exposición			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
1	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1			
2	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 1			
3	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 1	Dieta 3	Dieta 1			
4	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 4	Dieta 1			
5	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 2	Dieta 5	Dieta 1			
6	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 5	Dieta 1			

Exposición a *Piscirickettsia salmonis*

Después de cuatro semanas con alimentación de dietas del ensayo (período de pre-exposición), los peces se distribuyeron equitativamente en 6 tanques con 25 peces por grupo por tanque (150 peces en total por tanque). Los peces se expusieron a 0,2 ml de una dosis de *Piscirickettsia salmonis* prevista para matar el 50 % de la población (DL₅₀), mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Los peces fueron alimentados con dietas de control durante todo el período de exposición. Los peces muertos fueron retirados diariamente y se registraron.

Determinación de la DL₅₀:

La estimación de la DL₅₀ se realizó tal y como se ha descrito para el experimento 1, paralelamente al período de alimentación de las diferentes dietas. El peso promedio de los peces para la determinación de la DL₅₀ era de 80 g (55 peces por tanque).

Estadísticas

Las determinaciones estadísticas se llevaron a cabo como se ha descrito en el experimento 1.

Resultados y discusión

La dosis de DL₅₀ se administró para alcanzar un nivel de mortalidad en la población de control de aproximadamente el 50 %. La mortalidad control final alcanzó el 53 % (Tabla 8, Figura 4). No parece haber ningún efecto basado en el tanque que sea significativo en el estudio de exposición actual (p = 0,967).

A los 14 días, la mortalidad después de la exposición había sobrepasado el 10 % en el tratamiento de control (Figura 3). En los grupos alimentados con peptidoglicano, las mortalidades alcanzaron el 10 %, 21 días después de la exposición. Una adición de nucleótidos solos también retrasó, así como redujo, la mortalidad global (Figura 4), sin embargo no era tan eficaz como era el caso para la combinación de peptidoglicano y nucleótidos. Los peces que recibieron la dieta que solo comprendía como aditivo nucleótidos, mostraron un porcentaje de supervivencia relativa (PSR) del 45 % (Tabla 8) y una probabilidad de supervivencia significativamente mayor (p <0,001, rango logarítmico-Wilcoxon) en comparación con el control que recibió la dieta de control sin ningún aditivo.

Todos los tratamientos que recibieron peptidoglicano tenían probabilidades de supervivencia significativamente más elevadas (p > 0,001, rango logarítmico-Wilcoxon) con valores de PSR en el intervalo del 66 % al 78 %, en comparación con los tratamientos que recibieron la dieta de control (Tabla 8, Figura 3).

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad y de supervivencia relativa (PSR) del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) alimentado con diferentes dietas antes de la exposición a *Piscirickettsia salmonis*. EEM = Error estándar de la media.

Tratamiento	Mortalidad promedio (%)	EEM	PSR
1 (control)	53,33	1,33	-
2	29,33	1,69	45
3	18,00	1,71	66
4	16,67	1,23	69
5	16,67	1,91	69
6	12,00	1,03	78

5 Los grupos de peptidoglicano tenían todas probabilidades de supervivencia significativamente diferentes del tratamiento que recibía como aditivo solo nucleótidos ($p < 0,05$, Rango logarítmico-Wilcoxon).

10 Los peces alimentados con dietas que comprendían una combinación de nucleótidos y peptidoglicano (tratamiento 4, 5 y 6) en la fase de pre-exposición, tenían probabilidades de supervivencia superiores del 3-12 %, en comparación con los peces alimentados con una dieta que comprendía solamente peptidoglicano (tratamiento 3) sin adición de nucleótidos.

15 No había diferencias en la supervivencia de los peces alimentados con una dieta con nucleótidos durante 3 semanas seguida por una dieta que comprendía nucleótidos, en combinación con diferentes cantidades de peptidoglicano (0,001 % de PG o 0,005 % de PG). Sin embargo, la mejor supervivencia después de la exposición se logró sorprendentemente cuando los peces fueron alimentados con una combinación de peptidoglicano con una concentración baja (0,001 % de PG) en combinación con nucleótidos durante todo el período de pre-exposición de 4 semanas (tratamiento 6).

20 Conclusiones del experimento 1 y 2:

25 La alimentación con una combinación de nucleótidos y de peptidoglicano en el experimento 1 aumentó significativamente la resistencia a *Piscirickettsia salmonis*, en comparación con el control negativo (dieta comercial). No había ninguna diferencia significativa en la supervivencia entre los grupos del ensayo (peptidoglicano + nucleótidos), aunque había una tendencia hacia un aumento de la supervivencia con dosis más baja en el experimento 1.

30 Zhou et al. (2006; "Effects of dietary supplementation of A3 α -peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)", Aquaculture 251, 172-181) encontraron que una dieta de 4 g kg⁻¹ era la dosis óptima de peptidoglicano en la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), después de la exposición a *Vibrio anguillarum*. Se describió que las dosis tanto más bajas como más altas que 4g kg⁻¹ aumentaban la mortalidad. Se observaron efectos similares del rango de dosis con langostinos tigre negro (*Penaeus monodon*), en donde se logró una mejor supervivencia con una dosis óptima más baja (Boonyaratpalin S. et al. (1995) "Effects of peptidoglycan prepared from *Brevibacterium lactofermentum* on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*". En: Disease in Asian Aquaculture II. M. Shariff, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe (compiladores), p. 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas).

40 Sorprendentemente, pudimos mostrar que una concentración de la dieta de 0,5 g-0,01 g de PG kg⁻¹ en combinación con nucleótidos era eficaz para mejorar significativamente la supervivencia de los peces infectados en el experimento 1 y 2. Por otra parte, el peptidoglicano era eficaz en una concentración tan baja como una alimentación de 0,05 g kg⁻¹ para la mejora de la supervivencia, después de la exposición en el experimento 2, sin una adición de nucleótidos.

45 La administración oral de peptidoglicano en combinación con nucleótidos durante el período de pre-exposición en el experimento 2, proporcionó una protección significativa de la supervivencia de los peces al final del período de post-exposición de hasta un 78 % de PSR (probabilidad de supervivencia $p < 0,001$, Rango logarítmico-Wilcoxon).

50 Los mejores resultados fueron obtenidos cuando el peptidoglicano se administró a los peces a una concentración baja (0,001 % de PG; dosis final de 6 mg kg⁻¹ de peso corporal) en combinación con nucleótidos durante toda la fase de pre-exposición.

55 Los resultados de los experimentos sugieren que niveles adecuados de nucleótidos administrados junto con el estimulante del sistema inmune son probablemente beneficiosos para los peces en los períodos de exposición o de estrés por infecciones. Estos efectos pueden deberse a que los nucleótidos se convierten en limitantes cuando las poblaciones de células se incrementan rápidamente, por ejemplo, durante los períodos de estimulación del sistema inmune.

- 5 Los efectos negativos sobre la inmunidad debido a la sobreexposición a peptidoglicano se han descrito en publicaciones (Matsuo y Miyazono, (1993) informaron de que la administración oral de PG en una dieta de 0,2 y 2 mg/kg, aumenta la resistencia a las enfermedades de la trucha arco iris frente a una infección con *V. anguillarum*, pero una administración durante más de 28 días puede conducir a una disminución de la resistencia a enfermedades.
- 10 Los resultados de los experimentos sugieren que los nucleótidos pueden compensar estos efectos negativos relacionados con una sobreexposición y/o una administración a largo plazo debida a peptidoglicano.
- 10 La presente invención representa por tanto una mejora importante para el control sanitario de los peces.
- Se apreciará que las características de la invención descritas anteriormente, se pueden modificar sin apartarse del alcance de la invención.
- 15 Definiciones de términos:
- El término *peptidoglicano* comprende todos los compuestos comúnmente descritos y todavía no descritos que pertenecen al grupo de sustancias de peptidoglicanos.
- 20 *Nucleótidos* comprende cualquier éster fosfórico conocido de un nucleósido tal como AMP, GMP, UMP, CMP, UMP. *Ingredientes alimenticios convencionales* son ingredientes alimenticios que se utilizan comúnmente en composiciones alimenticias para una especie animal específica, tales como lípidos, proteínas, vitaminas, carbohidratos, minerales, etc.
- 25 Una *alimentación funcional* que puede ser similar en apariencia, o que puede ser un alimento convencional que se consume como parte de una dieta habitual, y que se ha demostrado que tiene beneficios fisiológicos y/o que reduce el riesgo de ciertas enfermedades además de las funciones nutricionales básicas, es decir, que comprende compuestos bioactivos tales como nucleótidos y peptidoglicano.
- 30 Los *salmónidos* son peces que pertenecen a la familia Salmonidae. Ejemplos representativos son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*), salmón Coho (*Onchorynchus kisutch*).
- 35 La expresión *enfermedad infecciosa* incluye enfermedades infecciosas conocidas comúnmente en los animales, causadas, p. ej., por bacterias tales como *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp, estomatitis infecciosa, infecciones estreptocócicas, infecciones de *Vibrio*; enfermedad del páncreas, NSAV, inflamación de las branquias (GI), inflamación del músculo cardíaco y esquelético (HSMI), virus de la anemia infecciosa de los salmónidos (ISA), saprolegniosis e infestación de piojos marinos.
- 40 El término *recuperación* significa que la salud de un animal se restaura después de haber estado afectado por una enfermedad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición alimenticia para peces que comprende ingredientes alimenticios convencionales, caracterizada porque dicha composición alimenticia comprende peptidoglicano y nucleótidos, en donde dicho peptidoglicano está en el intervalo de 0,001-0,01 %, más preferiblemente de 0,001-0,005 % y lo más preferiblemente de 0,005 % en peso.
- 10 2. Composición alimenticia según la reivindicación 1, caracterizada porque los nucleótidos están en el intervalo de 0,05 %-1 % en peso, preferiblemente de 0,1-0,5 % en peso y lo más preferiblemente de 0,2 % en peso.
3. Composición alimenticia según la reivindicación 1, caracterizada porque la relación en peso de nucleótidos frente a peptidoglicano es superior a 4, más preferiblemente superior a 20 y lo más preferiblemente superior a 40, y la cantidad de peptidoglicano está en el intervalo de 0,001-0,01 % del peso de la composición alimenticia.
- 15 4. Composición alimenticia según la reivindicación 1, en donde la cantidad de nucleótidos es de aproximadamente 0,2 % y la cantidad de peptidoglicano es de aproximadamente 0,005 % del peso total de la composición alimenticia.
- 20 5. Composición alimenticia que comprende ingredientes alimenticios convencionales, nucleótidos y peptidoglicano para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces, y/o para uso en la reducción de los síntomas de una enfermedad infecciosa, en donde el peptidoglicano está en el intervalo de 0,001-0,01 %.
- 25 6. Composición alimenticia según la reivindicación 5, en donde dicho peptidoglicano está en el intervalo de 0,001-0,005 % y preferiblemente de 0,005 % en peso.
7. Composición alimenticia según la reivindicación 5, en donde dicha composición se proporciona a los peces en el periodo previo a la exposición a una infección, durante la infección o después de que se haya infectado el pez.
- 30 8. Composición alimenticia según la reivindicación 5, en donde la relación en peso de nucleótidos frente a peptidoglicano es superior a 4, más preferiblemente superior a 20 y lo más preferiblemente superior a 40.
9. Composición alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, como una composición alimenticia funcional para evitar o reducir los síntomas relacionados con una enfermedad infecciosa en un pez.
- 35 10. Composición alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para incrementar la supervivencia y/o el crecimiento en peces expuestos a una infección.
- 40 11. Composición alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la infección está causada por bacterias tales como *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp, estomatitis infecciosa, infecciones estreptocócicas, infecciones de *Vibrio*; enfermedad del páncreas, NSAV, inflamación de las branquias (GI), inflamación del músculo cardíaco y esquelético (HSMI), virus de la anemia infecciosa de los salmónidos (ISA), saprolegniosis e infestación de piojos marinos.
- 45 12. Composición alimenticia según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde el pez es un salmónido, preferentemente un salmón del Atlántico.
- 50 13. Composición alimenticia según la reivindicación 5, para una recuperación eficaz después de una infección y/o un tratamiento con antibióticos debido a una infección y/o para reducir el riesgo de una reinfección.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en la alimentación de peces que son susceptibles a una infección en donde la composición se proporciona a los peces en el periodo previo a la exposición a una infección, en donde la composición se administra durante un periodo de 1-12 semanas antes de la infección.
- 55 15. Composición para uso según la reivindicación 14, en donde la composición se administra durante un periodo de 2-6 semanas antes de la infección, y lo más preferiblemente de 4 semanas antes de la infección.
16. Composición para uso según la reivindicación 14, en donde el pez es un salmónido, preferentemente un salmón del Atlántico.

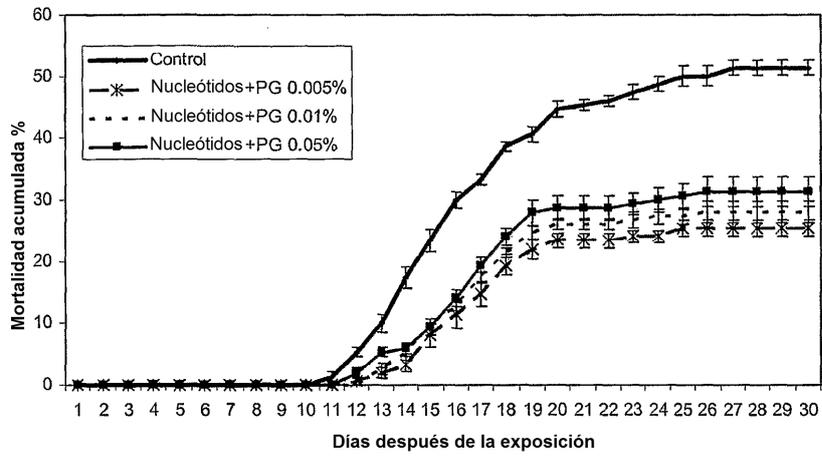


Figura 1

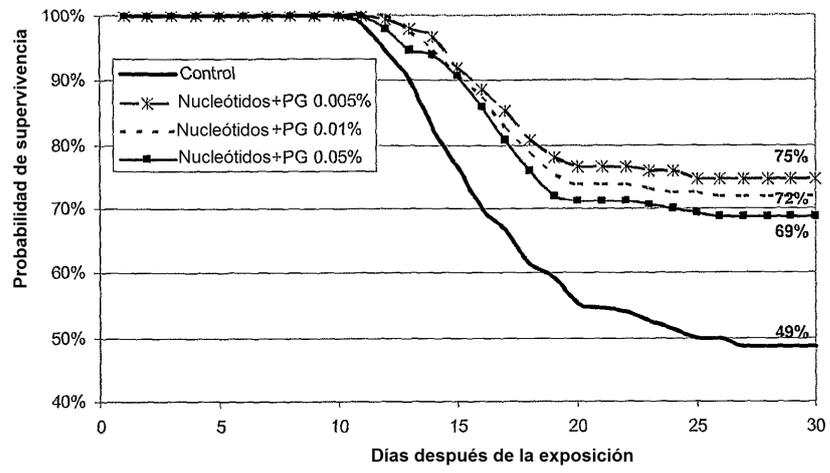


Figura 2

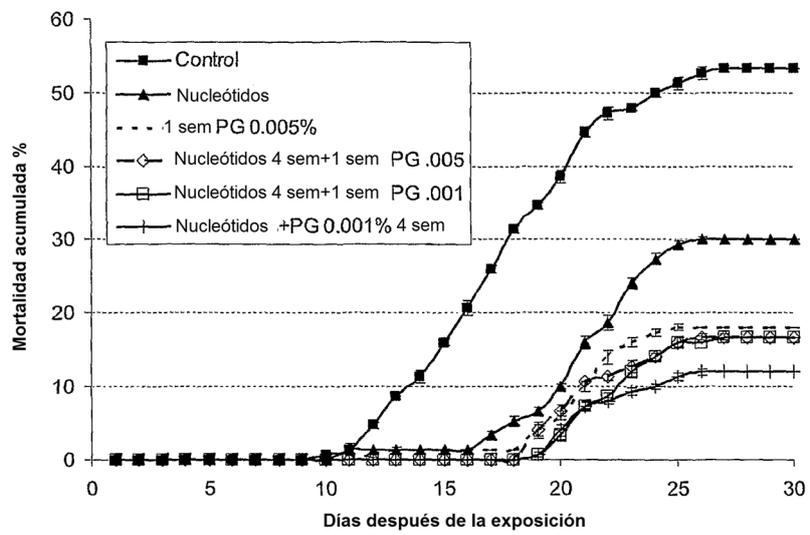


Figura 3

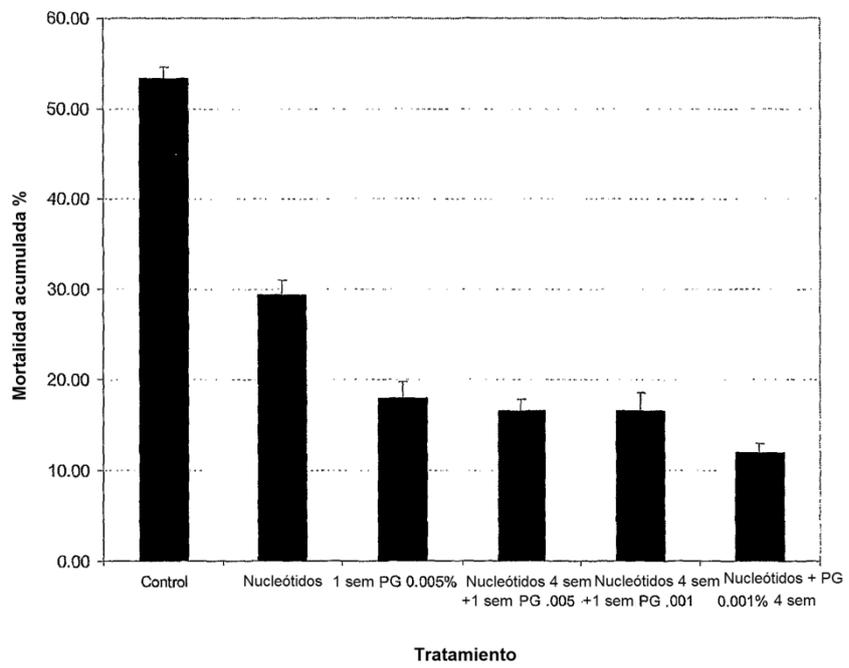


Figura 4