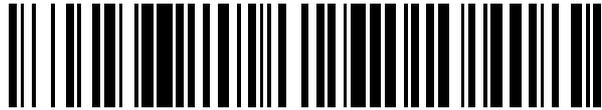


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 019**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/CA2013/000660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13819873 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2875121**

54 Título: **Cepa de E. coli F18 no patógena y uso de la misma**

30 Prioridad:

20.07.2012 US 201261674179 P

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

10.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FAIRBROTHER, JOHN MORRIS;
NADEAU, ÉRIC y
DESAUTELS, CLARISSE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 019 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

Cepa de *E. coli* F18 no patógena y uso de la misma

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente de EE. UU. provisional 61/674,179, presentada el 20 de julio de 2012.

Campo técnico

Esta solicitud se refiere a una cepa de *E. coli* F18 no patógena y a su uso.

Antecedentes

10 La enfermedad de los edemas y la diarrea son típicamente enfermedades comunes entre los animales de cría. Por ejemplo, la enfermedad de los edemas en lechones destetados es producida típicamente por cepas de *Escherichia coli* codificadas por toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) que codifican la toxina Shiga tipo 2e (Stx2e) (MacLeod et al., 1991, Vet Pathol 28:66-73), mientras que la diarrea secretora en lechones recién nacidos y destetados es producida típicamente por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC, por sus siglas en inglés) que codifican enterotoxinas termoestables (STa, STb, EAST1) y/o termolábiles (TL) (Gyles and Fairbrother, 15 2010, *Escherichia coli*. En: Pathogenesis of bacterial infections in animals, ed. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, 4ª ed., pp. 267-308. Blackwell Publishing, Ames, IA; Nagy et al., 1997, Microb Pathog 22:1-11). Algunas cepas patógenas expresan tanto los genes Stx2e como los genes de enterotoxina y por lo tanto pueden ocasionar síntomas de la enfermedad de los edemas y los de la diarrea en el mismo animal (STEC/ETEC) (Barth et al., 2007, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 120:307-316).

20 Una deficiencia asociada a muchas composiciones y a muchos métodos, terapéuticos o profilácticos, convencionales, para infecciones bacterianas intestinales asociadas a síntomas de la enfermedad de los edemas y/o la enfermedad diarreica es su baja fiabilidad o eficacia. Hay por lo tanto necesidad de composiciones y métodos, terapéuticos o profilácticos, mejorados, para la enfermedad de los edemas y/o la enfermedad diarreica.

Resumen

25 En un aspecto se proporciona una cepa de *Escherichia coli* aislada depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC, por sus siglas en inglés) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

30 En otro aspecto se proporciona un método para prevenir una infección intestinal por *Escherichia coli* (*E. coli*) F18 patógena en un animal, que comprende el suministro entérico al animal de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

35 En otro aspecto se proporciona un método para prevenir la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *Escherichia coli* (*E. coli*) F18 patógena en un animal, que comprende el suministro entérico al animal de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

En una realización, la cepa *E. coli* viva está en forma liofilizada. En otra realización no limitante, la cepa de *E. coli* viva está asociada a un portador aceptable del alimento, por ejemplo, la cepa de *E. coli* viva puede diluirse, incorporarse a, o suspenderse en, el portador aceptable del alimento. En otra realización no limitante, la cepa de *E. coli* viva está en forma congelada.

40 Estos y otros aspectos y características de la presente invención llegarán a ser evidentes ahora para los expertos en la materia con la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

45 Se proporciona en la presente memoria a continuación una descripción detallada de las realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Figura 1: Es un gráfico no limitante que ilustra la excreción fecal de la cepa F18 no patógena después de la administración de la cepa F18 no patógena, viva, según dosis variables, mostradas como el logaritmo inverso del promedio de las unidades logarítmicas de formación de colonias (UFC).

50 Figura 2: Es un gráfico no limitante que ilustra la excreción fecal de una cepa de exposición patógena F18-STEC: comparación entre animales que han sido tratados con la composición combinada y animales de control.

Figura 3: Es un gráfico no limitante que ilustra la colonización por la cepa de exposición patógena F18-STE C en diferentes segmentos intestinales: comparación entre animales que han sido tratados con la composición combinada y animales de control.

5 Figura 4: Es un gráfico no limitante que ilustra la detección inmunológica de IgM frente a fimbria F18 en muestras serológicas: comparación entre animales que han sido tratados con la composición combinada y animales de control.

Descripción detallada de las realizaciones

10 En general, las cepas STEC porcinas y muchas cepas ETEC porcinas expresan el determinante de F18. El determinante de F18 es una fimbria que facilita la colonización bacteriana de la superficie mucosal del intestino (Fairbrother et al. 2006, Postweaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. En: Diseases of swine, ed. Straw B, Zimmermann JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, 9^a ed., pp. 649-662. Blackwell Publishing, Ames, IA). Se cree que la fimbria F18 media la adhesión de una célula bacteriana que expresa F18 a un receptor de enterocitos, el receptor ECF18R, que se expone por los enterocitos del intestino delgado en su membrana citoplasmática apical (Vögeli et al. 1996, Anim Genet 27:321-328; Waddell et al. 1996, Infect Immun 64:1714-1719).

15 Algunas cepas de STEC y STEC/ETEC porcinas pueden expresar otras fimbrias citoadhesivas o adhesinas no fimbriales además de la fimbria F18, en particular fimbria F4 o F5 o la "adhesina implicada en la adherencia difusa" (AIDA, por sus siglas en inglés) (Barth et al., 2007, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 120:307-316; DebRoy et al. 2009, J Vet Diagn Invest 21:359-364; Fairbrother et al., *supra*; Niewerth et al.: 2001, Clin Diagn Lab Immunol 8:143-149). Si bien la adhesina AIDA se encuentra con frecuencia en ambos patógenos, las fimbrias F4 o F5 son raras en esas cepas.

20 En la granja, la diarrea posdestete (DPD) y la enfermedad de los edemas (EE) en cerdos tienen lugar en general en las primeras 2 semanas posdestete y se asocian a infección por cepas de *E. coli* enterotoxigénicas F4 o F18 (ETEC) para la DPD y por cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga F18 patógenas (STE C) para la EE. Para las dos cepas, las fimbrias (es decir, F4 o F18) permiten la adhesión de las bacterias a sus receptores específicos, situados en las vellosidades del intestino delgado, seguido por división de las bacterias y colonización del intestino.

25 En la DPD, los receptores F4 se expresan en aproximadamente el 30 % al 40 % de los cerdos y se detectan receptores F18 en aproximadamente el 70 % al 80 % de los cerdos. Las cepas patógenas producen una combinación de varias toxinas tales como LT, STa y STb. Los cerdos infectados con ETEC-F4 muestran en general una morbilidad muy alta, retraso en el crecimiento, diarrea acuosa y proyectil que con frecuencia conducen a la muerte del animal infectado.

30 En la EE, los receptores F18 se detectan en aproximadamente el 70 % al 80 % de los cerdos. La toxina asociada a STE C es Stx2e, una vasotoxina que actúa en las células endoteliales vasculares dando como resultado edema y posteriores signos neurológicos incluyendo ataxia, posición de decúbito, y eventualmente, en cuanto a la DPD, con frecuencia conduce a la muerte del animal infectado.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "*E. coli* F18" o "cepa F18" se refiere a una cepa de *E. coli* que expresa el determinante F18 (fimbria).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "*E. coli* F4" o "cepa F4" se refiere a una cepa de *E. coli* que expresa el determinante F4 (fimbria).

40 El experto reconocerá que la cepa F18 no patógena descrita en la presente memoria puede ser manipulada para obtener su cepa mutante o variante, una cepa que presente todas las características identificativas de la cepa descrita en la presente memoria, sin excesivo esfuerzo. Los métodos para crear mutantes o variantes son comunes y se conocen en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE. UU. número 7,371,558 describe un resumen de algunos métodos para crear su "mutante o variante". También están bien documentados en la técnica métodos específicos para crear mutantes usando radiación o agentes químicos. Véase, por ejemplo, Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., o Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227 (1992). También puede identificarse su cepa mutante o variante con un genoma o una parte significativa del mismo que se hibrida en condiciones de alta exigencia al genoma de la cepa descrita en la presente memoria. El experto podrá reconocer cuánto de significativa debe ser una parte de un genoma para considerar si una determinada cepa es "su mutante o variante".

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que provocará la respuesta biológica deseada de un tejido, sistema o animal. Dicha cantidad eficaz de la cepa de *E. coli* F18 viva descrita en la presente memoria puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, la cantidad que sea suficiente para prevenir infección bacteriana intestinal, minimizando la excreción bacteriana, previniendo una enfermedad producida por infección bacteriana intestinal y similares. La cantidad eficaz que se tiene que usar puede variar según una serie de factores. Por ejemplo, el número de factores puede seleccionarse del tipo de animal, el peso inicial del animal, la fase de crecimiento del animal, el entorno, el portador aceptable del alimento asociado a la cepa viva, es decir, instalaciones para animales, tipo y gestión de producción, estado higiénico de las instalaciones, estrés de los

animales después del destete o la incubación, alimentación y suplementos usados, salud del animal y enfermedades o tratamiento concomitantes y similares. Por ejemplo, la cantidad eficaz puede ser, pero sin limitarse a, cualquier cantidad seleccionada del intervalo de aproximadamente 5×10^6 a aproximadamente 3×10^{10} UFC. El experto en la materia podrá determinar una cantidad eficaz adecuada sin un excesivo esfuerzo.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "animal" se refiere a cualquier animal joven o adulto adecuado para usarse según la presente invención. En una realización no limitante, el término "animal" se refiere a un animal porcino. En una realización no limitante, el término "animal" se refiere a un cerdo. En una realización no limitante, el cerdo es un cerdo predestetado. En otra realización no limitante, el cerdo es un cerdo posdestetado. El experto en la materia podrá determinar un animal adecuado sin un excesivo esfuerzo.
- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "suministro entérico" se refiere a un modo de administración que permite que la cepa alcance eventualmente el tubo digestivo y más preferiblemente los intestinos. En una realización no limitante, el suministro entérico se realiza por administración oral de la cepa. En otra realización no limitante, el suministro entérico se realiza por administración rectal, por ejemplo, mediante un supositorio. El experto en la materia podrá determinar un modo de administración adecuado sin un excesivo esfuerzo.
- 15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "portador aceptable del alimento" se refiere a cualquier portador, diluyente o excipiente que sea compatible con la cepa descrita en la presente memoria y que pueda darse a un animal sin efectos adversos. Los portadores aceptables de alimentación, adecuados, conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, agua, disolución salina, glucosa, dextrosa, disoluciones tamponadas y similares. Dicho portador es ventajosamente no tóxico para la cepa y no perjudicial para el animal. También puede ser biodegradable. El portador puede ser un portador aceptable del alimento sólido o líquido. Un portador aceptable del alimento sólido, adecuado, es un portador ingerible no tóxico. Por ejemplo, este portador aceptable del alimento, sólido, puede ser un pienso sólido común tal como el componente de una dieta animal típica que consista en: productos cereales, tales como harina de cebada, harina de maíz o harina de trigo, productos de frutos secos y semillas, tales como torta de frutos secos molidos pelados o torta de semilla de algodón o torta de semilla de algodón extraída, junto con cantidades minoritarias de, por ejemplo, harina de plumas, harina de algas, comida de huesos, harina de huesos, caliza, sal, urea y vitaminas o puede ser un diluyente o portador sólido inerte sin valor nutricional, por ejemplo, caolín, talco, carbonato de calcio, tierra de batán, arcilla atapulgita, conchas de ostras molidas o piedra caliza molida o puede ser almidón o lactosa. En otra aplicación específica, el portador aceptable del alimento, sólido, puede ser maíz molido, soja triturada, suero, grasa animal y similares. Un portador aceptable del alimento líquido, adecuado, es por ejemplo, agua y preferiblemente agua potable; leche tal como leche entera o desnatada o un medio de cultivo tal como un caldo de triptona de soja (CTS). El experto en la materia podrá determinar un portador aceptable del alimento adecuado sin un excesivo esfuerzo.
- 20
- 25
- 30

Ejemplos

Ejemplo 1

- 35 a) Cepa de *E. coli* F18 no patógena

La cepa de *E. coli* depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01 se aisló de las heces de un cerdo en 1996 en el laboratorio de referencia de la OIE para *Escherichia coli* (Ecl) en la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV), Universidad de Montréal (UdeM), Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá por el Dr. J. M. Fairbrother.

- 40 Se realizó una identificación de la cepa usando el sistema API. El código API 20E para cultivo de referencia es 5004552. El establecimiento de serotipo de la cepa reveló un serotipo de O141:K94:H-.

- Se realizó un establecimiento de virotipo de la cepa por hibridación de colonias y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los resultados del establecimiento de virotipo mostraron que la cepa era positiva para F18 y AIDA mientras que era negativa para las siguientes toxinas: STa, STb, LT, EAST1, Stx1, Stx2, CNF, F4, F5, F6, F17, F41, P, AFA, Eae, Paa, Tsh, genes de aerobactina. Esta cepa es así una cepa de *E. coli* no patógena.
- 45

- La cepa es resistente a los siguientes antimicrobianos: amoxicilina, ampicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, neomicina, penicilina, espectinomina, estreptomina, sulfacoropiridazina, sulfadimetoxina, sulfatiazol, tiamulina, tilmicosina, tetraciclina (cloro y oxi) y tilosina, si bien es sensible a los siguientes antimicrobianos: apramicina, ceftiofur, colistina, danofloxacina, enrofloxacina y gentamicina.
- 50

- b) Cepa de *E. coli* F4 no patógena

- También puede usarse una cepa de *E. coli* F4 no patógena junto con la cepa F18 no patógena descrita en la presente memoria. En una realización no limitante, la cepa de *E. coli* F4 no patógena es cualquier cepa no patógena que exprese el determinante F4. En una realización no limitante, la cepa de *E. coli* F4 no patógena es una cepa recombinante, por ejemplo, la cepa pMK005 (Kehoe et al., J Bacteriol., septiembre de 1983; 155(3):1071-7). En una realización no limitante, la cepa de *E. coli* F4 no patógena es una cepa natural, por ejemplo, la cepa depositada en la
- 55

Autoridad Internacional Depositaria de Canadá el 21 de enero de 2005 y número de registro atribuido IDAC 210105-01, como se describe en la patente de EE. UU. 7,981,411.

Ejemplo 2

- 5 En un amplio aspecto, el fin de este estudio fue evaluar el impacto de diferentes dosis orales de la cepa F18 no patógena descrita en la presente memoria sobre su excreción fecal y sobre respuestas humorales sistémicas anti-F18.

La siguiente tabla 1 resume en general el plan de estudio:

Día	Suceso
0	Llegada de los cerdos a la unidad experimental y distribución en 3 grupos
0-5	Periodo de aclimatación
2 y 5 a 19	Muestreo fecal para PCR
5	Vacunación
5 a 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 19	Muestreo fecal para recuento viable de cepas de la vacuna (basado en colonias hemolíticas)
5, 10, 12, 15 y 19	Muestra de sangre
8	Primera necropsia
19	Necropsia final y fin del experimento

I - Diseño del estudio

a) Animales

- 10 Se tomaron muestras de sangre de 50 lechones lactantes para análisis de detección del estado del receptor F18 y se marcaron las orejas de los lechones. Se adquirieron cerdos destetados seleccionados (machos y hembras), con edades comprendidas entre 17 y 20 días, de una granja local situada en Montérégie, Québec, Canadá. Se transportaron los animales a las instalaciones de aislamiento. La granja seleccionada no mostró síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) ni episodios de enfermedad posdestete recientes (menos de 6 meses). Los cerdos eran cerdos sanos y pesaron entre 4 y 6 kg. Se usó un total de veintiún (21) cerdos, positivos para el estado del receptor F18, separados de manera aleatoria usando números de etiquetas para las orejas en tres (3) grupos de 7 animales (tres dosis diferentes de composición F18). El día 2 posdestete, se tomó una muestra fecal para determinar la colonización existente con cepas positivas a F4 y cepas positivas a F18 usando PCR. No se encontró ningún animal que fuera positivo a las bacterias positivas a F4 o positivas a F18 el día 2 posdestete.

b) Alojamiento y alimentación

- 25 Se mantuvieron los grupos de tratamiento en espacios separados. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua y fueron alimentados dos veces al día durante el estudio. La dieta de los animales estaba constituida por una soja triturada de alto contenido en proteína como se describe en la patente de EE. UU. 6,355,859. No se administró medicación o vacunación concurrente durante el estudio.

c) Preparación y administración de la cepa

- 30 Se prepararon dos curvas de crecimiento de la misma manera para evaluar el tiempo requerido por la cepa F18 no patógena para lograr su rendimiento óptimo. Se usó siembra de trabajo (ST) para preparar la curva de crecimiento y el cultivo que se usó para preparar la composición de F18. Se usó un mililitro del ST para inocular 500 ml de caldo tríptico de soja sin materiales de origen animal. Se incubó el cultivo aproximadamente 6,5 horas a 37 °C con agitación (19 rad/s (180 rpm)). Se realizó un recuento viable para evaluar el rendimiento del cultivo de cepa F18 y se usó una reacción PCR para demostrar que se usaba la cepa apropiada durante el análisis. Basándose en los resultados, se ajustó el cultivo para satisfacer las dosis que se tenían que ensayar usando TSB estéril sin materiales de origen animal: Grupo 1, 5×10^8 UFC/dosis; grupo 2, 1×10^9 UFC/dosis y grupo 3, 5×10^9 UFC/dosis.

Se prepararon nueve (9) dosis de composición de cepa F18 no patógena para cada formulación, 2 más que el número de lechones que se tenía que tratar para compensar las pérdidas de composición. Se administraron seis (6) mL de composición de F18 por vía oral a cada lechón. Se administró la composición de F18 el día 5 posdestete usando un tubo esofágico.

5 II - Observaciones y evaluación

a) Salud general

Se observaron los lechones dos veces al día en cuanto a su salud general: comportamiento, deshidratación, apetito y estado físico general. También se evaluaron la movilidad y el aspecto del pelo.

b) Diarrea

10 Se valoró la consistencia fecal a diario como sigue: 0, normal; 1, pastosa; 2, presencia de líquido pero más partículas sólidas que líquidas; 3, presencia de más líquido que partículas sólidas y 4, totalmente líquida.

a) Excreción de la cepa F18 no patógena administrada

15 El día 2 y los días 5 a 19 posdestete, se analizaron las heces por PCR (múltiplex: LT, STa, STb y F4; F18, Stx2e y AIDA) siguiendo enriquecimiento en caldo Luria-Bertoni (LB) para evaluar la presencia de la cepa F18 no patógena administrada en cada grupo. Se consideró positiva una muestra positiva para F18 para la cepa F18 no patógena administrada. Los días 5 a 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 19 posdestete, se realizó un recuento viable sobre muestras de heces usando agar de soja tríptico II (TSA II) - sangre ovina al 5 % para evaluar el nivel de la cepa F18 no patógena administrada excretada después de la administración. Sólo se contaron colonias hemolíticas con morfología típica de *E. coli*.

20 d) Evaluación de inmunización

Se recogieron muestras de sangre los días 5, 10, 12, 15 y 19 posdestete para evaluar por ELISA la respuesta inmunitaria óptima de acuerdo con la dosis de la cepa F18 no patógena administrada.

III - Necropsia

a) Necropsia

25 Se realizó una primera necropsia 3 días posvacunación, el día 8 posdestete en 2 animales elegidos de manera aleatoria y se evaluaron deformidades graves. La segunda necropsia se realizó al final del estudio, por tanto el día 19 posdestete, que era 14 días posvacunación en todos los animales restantes.

b) Consistencia del contenido intestinal

30 Se valoró la consistencia del contenido intestinal en el yeyuno, íleon, ciego, colon y recto de la siguiente manera: 0, normal; 1, pastosa; 2, presencia de líquido pero más partículas sólidas que líquidas; 3, presencia de más líquido que partículas sólidas o totalmente líquida.

c) Colonización del íleon por la cepa de la vacuna

35 Se muestreó una porción de 2 centímetros del íleon a 10 cm proximal de la válvula ileocecal. Se llevó a cabo la enumeración de bacterias vivas usando TSA II - sangre ovina al 5 %, donde se contaron sólo colonias hemolíticas con morfología típica de *E. coli*.

IV - Resultados

40 No se observó mortalidad tanto en los animales tratados como en los de control durante todo el estudio. Todos los cerdos seleccionados fueron positivos al receptor F18 según el método PCR-RFLP. En general, los lechones estaban en buen estado de salud a lo largo de todo el estudio. Pocos animales mostraron una movilidad reducida que aparecía antes de la administración de la cepa F18 no patógena o debido a lesiones por tanto no relacionadas con la administración de F18 no patógena.

Durante este estudio, se consideró una puntuación de 2 o más como diarrea. De los 21 animales, 5 mostraron diarrea leve y transitoria después de la administración de F18. Un animal (cerdo 5 del grupo 3) presentó diarrea (puntuación de 3) durante 2 días consecutivos (tablas 2a, 2b y 2c).

45 Se ensayaron a diario muestras fecales por PCR para detectar la presencia de la cepa administrada de F18; 3 animales en el grupo 2 (1×10^9 UFC/dosis) fueron positivos a la cepa administrada de F18, como muy tarde, el día 11 posvacunación, donde el grupo 3 (5×10^9 UFC/dosis) presentó 1 lechón positivo el día 10, 1 el día 8 y 3 el día 7 posvacunación. Para el grupo 1 (5×10^8 UFC/dosis) 1 lechón fue positivo a la cepa administrada de F18 no patógena el día 8 posvacunación, 1 lechón el día 7 y 2 el día 6 posvacunación (tablas 2a, 2b y 2c).

Tabla 2a Valoraciones, duración y gravedad de la diarrea para el grupo al que se administraron 5 x 10⁸ UFC/dosis

ID	Valoración de la diarrea ^{*1} el día ^{*2}																			Duración ^{*3}		Gravedad ^{*4}
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Máx = 14	Máx = 56
9	0	0	NR	NR	NR	1	0	0	2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	1	2
18	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3
23	0	0	NR	NR	NR	0	0	1	0	0	0	0	0	NR	0	0	0	0	0	0	0	2
27	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
30	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	0	0
33	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
50	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MD ^{*5}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Tabla 2b Valoraciones, duración y gravedad de la diarrea para el grupo al que se administraron 1 x 10⁹ UFC/dosis

ID	Valoración de la diarrea ^{*1} el día ^{*2}																			Duración ^{*3}		Gravedad ^{*4}
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Máx = 14	Máx = 56
6	0	0	NR	NR	NR	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	5
26	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
34	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	0	0
37	0	0	NR	NR	NR	0	1	3	1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	1	5
42	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	0	NR	NR	NR	2	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	6
MD ^{*5}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tabla 2c Valoraciones, duración y gravedad de la diarrea para el grupo al que se administraron 5×10^9 ufc/dosis

ID	Valoración de la diarrea*1 el día*2																			Duración*3		Gravedad*4	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Máx = 14	Máx = 56	
4	0	0	NR	NR	NR	0	0	V	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2	0	1	9	
5	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	1	0	1	3	3	0	2	1	1	1	1	3	3	14	
13	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	3	
17	0	0	NR	NR	NR	0	1	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	0	0	1	
21	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
46	0	0	NR	NR	NR	0	0	0	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	0	0	0	
49	0	0	NR	NR	NR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
MD*5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

*1 Se valoró la consistencia fecal como sigue: 0, normal; 1, pastosa; 2, presencia de líquido pero más partículas sólidas que líquido; 3, presencia de más líquido que partículas sólidas y 4, totalmente líquida;

*2 Día 5: Administración de cepa administrada F18;

*3 Duración de la diarrea (número de días con valoraciones de 2 o más durante el periodo posvacunación; días 6 a 19);

*4 Gravedad de la diarrea (valoraciones acumulativas de la diarrea durante el periodo posvacunación; días 6 a 19);

*5 Mediana de la valoración de la diarrea.

La línea vertical en negrita señala el último día que fue detectada F18 (la cepa de la vacuna) por PCR.

NR: No Realizado

V: Vacío

F: Fallecido (sometido a necropsia)

También se evaluó la excreción fecal de la cepa administrada F18 no patógena por enumeración bacteriana de muestras fecales el día 5 a 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 19. La figura 1 muestra la excreción de la cepa posadministración. El nivel de bacterias excretadas con la dosis menor (5×10^8 UFC) es inferior al de las otras dos, observándose la excreción mayor con animales del grupo 2, a los que se había administrado una dosis de 1×10^9 UFC.

5 No se observaron deformidades graves para órganos internos. Se evaluaron las consistencias del contenido intestinal en cuanto a acumulación de fluido.

10 En este estudio, se consideró una valoración de 2 o más como acumulación de fluidos en un segmento intestinal el día de la necropsia. Las tablas 3a, 3b y 3c muestran que un animal en el grupo 1 presentó dos segmentos consecutivos con acumulación de fluidos (valoración de 2). Los otros animales no mostraron acumulación de fluidos.

No se observó ningún caso no deseable relacionado con la administración de la cepa F18 no patógena durante el estudio, que indica que las dosis ensayadas eran seguras en general.

15 Basándose en la evaluación de la excreción de las cepas, tanto PCR como la enumeración de bacterias sugirió que la 1×10^9 UFC/dosis es una dosis adecuada para obtener una excreción fecal prolongada de esta cepa. Los dos ensayos demostraron que la administración de la cepa F18 no patógena a 1×10^9 UFC/dosis fue excretada en un periodo mayor que las otras dosis ensayadas.

Tabla 3a Valoraciones de la consistencia del contenido intestinal y extensión y gravedad de la acumulación de fluido en los intestinos para un grupo al que se administraron 5×10^8 UFC/dosis

ID	Día de la necropsia	Valoración del fluido del contenido intestinal ^{*1}					Extensión ^{*2} (Máx = 5)	Gravedad ^{*3} (Máx = 15)
		Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto		
9	8	0	V	1	2	2	2	5
18	19	0	0	0	0	0	0	0
23	19	0	0	0	0	0	0	0
27	19	0	0	0	0	0	0	0
30	8	0	V	0	0	0	0	0
33	19	0	0	0	0	0	0	0
50	19	0	0	0	0	0	0	0
MD ^{*4} día 8		0	V	0,5	1	1	1,5	3,5
MD ^{*4} día 19		0	0	0	0	0	0	0

20 Tabla 3b Valoraciones de la consistencia del contenido intestinal y extensión y gravedad de la acumulación de fluido en los intestinos para un grupo al que se administraron 1×10^9 UFC/dosis

ID	Día de la necropsia	Valoración del fluido del contenido intestinal ^{*1}					Extensión ^{*2} (Máx = 5)	Gravedad ^{*3} (Máx = 15)
		Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto		
6	19	0	0	0	1	0	0	1

ES 2 663 019 T3

ID	Día de la necropsia	Valoración del fluido del contenido intestinal ^{*1}					Extensión ^{*2} (Máx = 5)	Gravedad ^{*3} (Máx = 15)
		Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto		
26	19	0	0	0	0	0	0	0
29	19	0	0	0	1	0	0	1
34	8	0	0	0	0	0	0	0
37	8	0	0	0	0	0	0	0
42	19	0	V	0	0	0	0	0
45	19	0	V	0	0	0	0	0
MD ^{*4} día 8		0	0	0	0	0	0	0
MD ^{*4} día 19		0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3c Valoraciones de la consistencia del contenido intestinal y extensión y gravedad de la acumulación de fluido en los intestinos para un grupo al que se administraron 5×10^9 UFC/dosis

ID	Día de la necropsia	Valoración del fluido del contenido intestinal ^{*1}					Extensión ^{*2} (Máx = 5)	Gravedad ^{*3} (Máx = 15)
		Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto		
4	19	1	0	0	0	0	0	1
5	19	0	1	0	1	1	0	3
13	19	0	V	1	1	0	0	2
17	8	0	0	0	0	0	0	0
21	19	1	V	1	0	0	0	2
46	8	0	0	0	0	0	0	0
49	19	0	0	0	0	0	0	0
MD ^{*4} día 8		0	0	0	0	0	0	0
MD ^{*4} día 19		0	0	0	0	0	0	2

^{*1} Se valoró la consistencia del contenido intestinal en el yeyuno, íleon, ciego, colon y recto de la siguiente manera: 0, normal; 1, pastosa; 2, presencia de líquido pero más partículas sólidas que líquidas; 3, presencia de más líquido que partículas sólidas o totalmente líquida.

ID	Día de la necropsia	Valoración del fluido del contenido intestinal ^{*1}					Extensión ^{*2} (Máx = 5)	Gravedad ^{*3} (Máx = 15)
		Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto		
^{*2} Extensión de la acumulación de fluido en los intestinos (número de segmentos intestinales con valoraciones de 2 o más) ^{*3} Gravedad de la diarrea (valoraciones del contenido intestinal en cuanto a consistencia acumulativa para los segmentos intestinales) ^{*4} Mediana de la valoración de la consistencia del contenido intestinal NR: No realizado								

Ejemplo 3

En un amplio aspecto, el fin de este estudio fue evaluar la eficacia de la composición combinada, incluyendo las cepas de *E. coli* F4 y F18 no patógenas descritas en la presente memoria.

5 La siguiente tabla 4 resume en general el plan de estudio:

Día	Suceso
0	Llegada de los cerdos a la unidad experimental y distribución en 2 grupos
0 a 5	Periodo de aclimatación
1, 12, 14, 16, 18 y 19	Muestreo fecal para PCR
4, 12, 17 y 19	Muestra de sangre
5	Administración oral de dosis o placebo
12, 13 y 14	Exposición
12, 14, 16, 18 y 19	Muestreo fecal para recuento viable de cepa de exposición
19	Necropsia final y fin del experimento

I - Diseño del estudio

a) Animales

10 Se tomaron muestras de sangre de 50 lechones lactantes para análisis de detección del receptor F18 y se marcaron las orejas de los lechones. Se adquirieron cerdos destetados seleccionados (machos y hembras), con edades comprendidas entre 17 y 21 días, de una granja comercial situada en la zona de Montérégie, Québec, Canadá. Se transportaron los animales a las instalaciones de aislamiento. La granja no mostró síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) ni episodios de enfermedad posdestete recientes (menos de 6 meses). Los cerdos eran cerdos sanos y pesaron entre 4 y 6 kg.

15 Se usó un total de veinte (20) cerdos, separados de manera aleatoria usando números de etiquetas en las orejas. Se usó software aleatorizado para distribuir de manera aleatoria los 20 animales en dos (2) grupos de 10 animales (grupo de control y administrado). El día 1 posdestete, se tomó una muestra fecal para determinar la colonización existente con cepas positivas a F4-ETEC y cepas positivas a F18-ETEC/STEC patógenas originadas en la granja usando análisis PCR. Los genes marcados son STa, STb, LT, F4, Stx2 y F18. No se encontró ningún animal que fuera positivo a las bacterias de F4-ETEC o F18-ETEC/STEC el día 1 posdestete.

20

b) Alojamiento y alimentación

Se mantuvieron los grupos tratado y de control en espacios separados. Los animales tuvieron acceso ad libitum al agua y pienso durante el estudio. La dieta de los animales estaba constituida por una soja triturada de alto contenido en proteína como se describe en la patente de EE. UU. 6,355,859. No se administró medicación o vacunación concurrente durante el estudio.

5 c) Preparación y administración de la cepa

Se diluyó la composición combinada rehidratada para obtener un mínimo de 5×10^8 UFC/cepa por 6 ml de dosis. El placebo estaba constituido por 6 ml de agua estéril. La composición y el placebo combinados se administraron por vía oral usando una jeringa con tubo de goma.

c) Preparación y administración de la cepa de exposición (F18-STEC EcL14724)

10 Se depositó esta cepa de exposición en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 9 de julio de 2013 y número de registro atribuido 090713-01.

15 Se preparó el cultivo para obtener una dosis de infección de 1×10^{11} UFC por lechón. Después de la administración de 10 ml de carbonato de calcio 1,2 % (CaCO_3), se administraron por vía oral cinco (5) mL de la cepa de exposición a cada lechón usando un tubo esofágico. Se administró la cepa de exposición durante tres (3) días consecutivos, es decir, el día 12, 13 y 14 posdestete a una concentración de 1×10^{11} UFC/dosis cada día.

e) Observaciones y evaluación

20 Se observaron los lechones dos veces al día en cuanto su salud general: comportamiento, apetito, estado físico general, movilidad y aspecto del pelo. Se observaron la deshidratación y la temperatura corporal una vez al día. Se evaluó la excreción de la cepa de exposición por PCR y recuento bacteriano viable (UFC). Se analizaron las muestras de sangre usando enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) específico. Los resultados se presentaron como porcentaje de positividad (% PP) frente al control positivo.

II - Necropsia

25 La colonización del íleon y el ciego por la cepa de exposición se determinó de la siguiente manera. Se muestreó una porción de 2 centímetros del íleon a 10 cm proximal de la válvula ileocecal así como una porción del ciego. Se llevó a cabo la enumeración de bacterias vivas usando TSA II - sangre ovina al 5 %, donde se contaron sólo colonias hemolíticas con morfología típica de *E. coli* después de 12 a 18 horas de incubación a 37 °C.

III - Resultados

a) Información general

30 De los 50 lechones ensayados, 30 fueron susceptibles a adhesión de cepa F18 y 20 animales fueron seleccionados de manera aleatoria para las pruebas. En general, los lechones estaban en buen estado de salud antes de la exposición.

La siguiente tabla 5 muestra los resultados PCR de la cepa de exposición excretada de heces de animales tratados y de control:

	Los cerdos (%) que excretan la cepa de exposición el día posterior a la de última exposición (día posdestete)			
	0 (14)	2 (16)	4 (18)	5 (19)
Placebo	100 %	100 %	67 %	56 %
Composición combinada	100 %	60 %	0 %	0 %

35 Como se demuestra en la tabla 5, la administración de la composición combinada redujo la excreción de las cepas de exposición comparado con cerdos que recibieron un placebo. Más de la mitad de los animales de placebo (56 %) excretó además la cepa de exposición 5 días después de la última exposición (fin del estudio) si bien no se detectó la cepa de exposición en animales tratados con la composición combinada tan pronto como 4 días después de la última exposición.

40 La figura 2 muestra recuento bacteriano viable (UFC)/g de la cepa de exposición excretada de heces de animales tratados y de control. Se observa un pico en la concentración de la cepa de exposición excretada el día 14

posdestete (día 0 posexposición) tanto para animales tratados como de control. En los animales tratados, la concentración de la cepa de exposición en las heces empezó a disminuir el día 2 posterior a la última exposición (día 16 posdestete) y se observaron más reducciones comparado con los de placebo los días 4 y 5 posteriores a la última exposición. Estos resultados son conformes con los resultados de PCR. Más precisamente, la administración de la composición combinada redujo el nivel de excreción de la cepa de exposición por aproximadamente 2 log a los 5 días posteriores a la última exposición (fin del estudio).

b) Colonización del íleon y el ciego por la cepa de exposición

Se observaron diferencias para colonización intestinal entre los animales tratados y de placebo para los dos segmentos de tejido intestinal (íleon y ciego). La figura 3 demuestra que la administración de la composición combinada redujo significativamente la colonización del intestino por la cepa de exposición. Más precisamente, la administración de la composición combinada redujo la colonización de la cepa de exposición del íleon y el ciego por aproximadamente 2 log los 5 días posteriores a la última exposición (fin del estudio).

c) Evaluación de la respuesta inmunitaria

Se evaluó la presencia de IgM sistémico frente a fimbria F18 en muestras de suero usando ELISA específico. Los animales tratados con composición combinada mostraron una respuesta inmunitaria específica tan pronto como a los 7 días posadministración (figura 4).

Basándose en la reducción resultante de la colonización de cepa de exposición, la reducción de excreción y estimulación de anticuerpos anti-F18 específicos, este estudio sugiere que el suministro entérico de una composición incluyendo la cepa F18 no patógena descrita en la presente memoria puede prevenir la infección bacteriana intestinal por *E. coli* F18.

Ejemplo 4

En un amplio aspecto, el fin de este estudio fue evaluar la eficacia de la cepa de *E. coli* F18 no patógena descrita en la presente memoria.

I - Diseño del estudio

a) Animales

Previamente a la entrada de los animales en las instalaciones, se muestrearon diez lechones lactantes de 10 camadas, para un total de 100 lechones, en la sala de parto para aislamiento de ADN y selección para el estado del receptor F18 (RF18+) mediante un método RFLP-PCR. Treinta (30) lechones RF18+ fueron distribuidos de manera aleatoria entre grupos por bloqueo por camada (relación 1:1), con generación de tamaño de bloque de n = 6. Se asignaron los lechones a uno de los siguientes grupos: T1 al que se administró cepa ensayada F18 no patógena (n=15) y T2 al que se administró un placebo (n=15).

Se combinaron los animales del grupo tratado (T1) en una jaula de un espacio experimental y se combinaron los animales del grupo de placebo (T2) en una jaula de otro espacio experimental hasta la fase de exposición. El día de la exposición, que es a los 11 días después de administración de la cepa F18 no patógena o placebo, se transfirieron los animales de T1 (n = 15) y T2 (n = 15), previamente a la exposición, a 2 jaulas separadas situadas en un espacio de exposición. Los 15 cerdos de un grupo de tratamiento particular se combinaron en la respectiva jaula. Durante todo el estudio, los animales tuvieron acceso ad libitum al agua, excepto durante la privación de agua previamente a la vacunación. Se alimentaron los animales dos veces al día con soja triturada de alto contenido en proteína no medicada (patente de EE. UU. 6,355,859).

El día 1 posdestete, se tomó una muestra fecal para determinar la colonización existente con cepa positiva a F4-ETEC y cepas positivas a F18-ETEC/STEC, patógenas, originadas en la granja usando análisis PCR. Los genes marcados son STa, STb, LT, F4, Stx2 y F18. No se encontró ningún animal que fuera positivo a las bacterias de F4-ETEC o F18-ETEC/STEC el día 1 posdestete. Se apartaron del estudio tres (3) animales del grupo T1 por razones de bienestar animal. Se consideró que estos acontecimientos adversos no estaban relacionados con la administración de la cepa F18 no patógena.

La siguiente tabla 6 resume en general los animales usados:

Especie:	Cerdos domésticos (Pen Ar Lan Naïma). Esta raza porcina es una raza híbrida comercializada en América, Europa y Asia.
Número y sexo:	30 animales; 30 % machos castrados y 70 % hembras.
Proveedor:	Granja comercial, Montérégie, Québec, Canadá

Edad cuando se ensaya:	El artículo del ensayo se destinó a administración de cepa para ensayo de lechones de aproximadamente 17 días.
Intervalo de peso a la iniciación del estudio:	3,120 kg - 7,295 kg
Aclimatación:	1 día
Medicación:	No se administró medicación o vacunación concurrente en 3 días previamente a, y durante, el estudio para cualquiera de los animales de estudio.

La siguiente tabla 7 resume en general el diseño de estudio:

Día de actividad	T1	T2
Día - 2	Llegada de cerdos RF18+ a las instalaciones de aislamiento y asignación aleatoria de los cerdos, control de la salud general y peso	
Día 0 (edad aprox. 17 días)	Administración de F18 no patógena	Placebo
Días 1 - 11	Control diario de la salud	
Día 11-12-13	Exposición a F8-STEC	
Día 11 a 18	Observaciones de la salud	
Día 18	Necropsia y microbiología	

II - Procedimiento y evaluación

5 Los animales del grupo T1 y el grupo T2 no podían combinarse debido a la naturaleza del producto ensayado (es decir, una vacuna viva) que requería animales tratados que se tenían que alojar por separado de controles con placebo. Las disoluciones de cepa de F18 no patógena y de placebo fueron preparadas por personas no implicadas en la fase de animal. Se asignó de manera aleatoria un código "A" y "B" a la cepa F18 no patógena y disoluciones de placebo. Los espacios se asignaron de manera aleatoria a tratamiento y se identificaron como espacios 1 y 2. Cada espacio tuvo todos los animales del grupo T1 o todos los animales del grupo T2 combinados en una sola jaula. El personal implicado en la fase animal y que hacía análisis de laboratorio fue ciego para tratamiento y asignaciones de espacio. Para la fase de necropsia, la secuencia de los animales que fueron objeto de necropsia se asignó de manera aleatoria y se volvieron a identificar los animales como A a AD. La persona que realizaba la necropsia fue ciega para identificación y tratamiento de los cerdos. Se mantuvieron los códigos de aleatorización en un sobre sellado por el bioestadístico al cargo.

a) Preparación y administración de la cepa F18 no patógena

Se cultivó la cepa F18 no patógena en un fermentador, después se congelaron las bacterias y se almacenaron a -78 °C en viales de vidrio de 10 mL que contenían 200 dosis nominales. Se diluyeron las bacterias congeladas con agua a temperatura ambiente previamente a su uso.

20 Se administró la dosis una vez el día uno posdestete (día 0) a aproximadamente 3×10^8 UFC por dosis de 2 mL. La dosis se administró por vía oral usando una jeringa montada con tubo de goma. Los animales de control recibieron la misma cantidad de disolución de placebo (agua).

b) Cepa de exposición (cepa F18-STEC EcL14724)

25 La cepa de exposición usada en este ensayo se volvió a aislar de un lechón (#381) previamente expuesto a la cepa EcL 14724 (positivo a Stx2, F18ab, AIDA y Paa). Se administró por vía oral la cepa de exposición una vez los 3 días consecutivos 11, 12 y 13 del estudio a aproximadamente 1×10^{10} UFC por cerdo. Cada dosis de exposición se administró usando una cápsula de gelatina como reemplazo por intubación esofágica. Se administró por vía oral

carbadox (un antibiótico que estimula la liberación de la shiga toxina) en una cápsula de gelatina inmediatamente después de administración de la cepa de exposición para provocar la liberación de la Shiga toxina.

c) Evaluación de la salud general

5 Se observaron los cerdos una vez al día previamente al periodo de exposición en cuanto a la salud general. Después de la primera exposición, se controlaron los animales dos veces al día en cuanto a salud general, incluyendo depresión, deshidratación, apetito y cualquier signo clínico asociado a enfermedad de los edemas: ataxia, edema facial o de las extremidades, muerte súbita.

d) Evaluación de la excreción de la cepa de exposición

10 La excreción fecal de la cepa de exposición se cuantificó usando un método PCR del número más probable (MPN-PCR) fijando como objetivo el gen que codifica la proteína principal FedA de la fimbria F18.

a) Necropsia

Se realizaron necropsias a los 7 días posteriores a la primera exposición. La colonización del ciego mediante la cepa de exposición se cuantificó usando un método PCR del número más probable fijando como objetivo el gen que codifica la proteína principal FedA de la fimbria F18 usando una porción de aproximadamente 2 cm² del tejido.

15 III - Resultados

20 El análisis PCR demostró la eficacia de la administración de la cepa F18 no patógena para prevenir la excreción de la cepa patógena shigatoxigénica F18 de exposición. Se observó una reducción de aproximadamente 2,5 log de excreción fecal para los animales tratados comparado con los animales de placebo los 4 días posteriores a la última exposición (tabla 8). Los 4 días posteriores a la última exposición, un 93 % de los animales de placebo excretó más de 1 x 10⁵ UFC de la cepa de exposición por gramo de muestra fecal si bien sólo un 42 % de los animales tratados lo hizo (tabla 9).

La siguiente tabla 8 muestra excreción de la cepa de exposición el día 4 posterior a la última exposición:

	Mediana de la excreción (UFC de la cepa de exposición/g de muestra fecal)
Animales de placebo	7,8 x 10 ⁶
Animales tratados	5,2 x 10 ⁴

25 La siguiente tabla 9 muestra la proporción de cerdos que excretan la cepa de exposición en diferente carga bacteriana el día 4 posterior a la última exposición:

	UFC de la cepa de exposición/g de muestras fecales			
	<1 x 10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	>1 x 10 ⁵
Animales de placebo	0 %	7 %	33 %	60 %
Animales tratados	25 %	33 %	17 %	25 %

30 Se observó una reducción de aproximadamente 1 log de la cepa de exposición detectada en el ciego para los animales tratados (se les administró la cepa F18 no patógena) comparado con los animales de placebo los 5 días posteriores a la última exposición (tabla 10). Los 5 días posteriores a la última exposición, más de un 53 % de los animales de placebo excretó más de 1 x 10⁵ UFC de la cepa de exposición por gramo de tejido del ciego si bien sólo un 8 % de los animales tratados lo hizo (tabla 11). Más del 80 % de los animales de placebo se colonizó en el ciego por más de 1 x 10⁴ UFC de la cepa de exposición por gramo de ciego comparado con un 50 % de los animales tratados a los 5 días posteriores a la última exposición (tabla 11).

35 La siguiente tabla 10 muestra la colonización del ciego por la cepa de exposición el día 5 posterior a la última exposición:

	Mediana de la colonización del ciego (UFC de la cepa de exposición/g de tejido del ciego)
Animales de placebo	3,4 x 10 ⁵
Animales tratados	1,5 x 10 ⁴

La siguiente tabla 11 muestra la proporción de cerdos cuyo ciego se colonizó por la cepa de exposición a diferente carga bacteriana el día 5 posterior a la última exposición:

	UFC de la cepa de exposición/g de muestras de ciego				
	<1 x 10 ²	10 ²	10 ³	10 ⁴	>1 x 10 ⁵
Animales de placebo	7 %	7 %	7 %	27 %	53 %
Animales tratados	8 %	17 %	25 %	42 %	8 %

- 5 Basándose en la reducción resultante de la colonización de cepa de exposición y la reducción de excreción, este estudio sugiere que el suministro entérico de una composición incluyendo la cepa F18 no patógena puede prevenir la infección bacteriana intestinal que produce edema por *E. coli* F18.

Las siguientes cláusulas proporcionan una descripción adicional de ejemplos de realizaciones según la presente invención:

- 10 Cláusulas:

Cláusula 1: Cepa de *E. coli* aislada depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

Cláusula 2: La cepa *E. coli* aislada de la cláusula 1, en forma liofilizada.

Cláusula 3: La cepa *E. coli* aislada de la cláusula 1, en forma congelada.

- 15 Cláusula 4: La cepa *E. coli* aislada de la cláusula 1, en donde la cepa está junto con un portador aceptable del alimento.

Cláusula 5: Una composición que comprende la cepa *E. coli* aislada de una cualquiera de las cláusulas 1 a 3 y un portador aceptable del alimento.

- 20 Cláusula 6: La composición de la cláusula 5, que comprende además una *E. coli* no patógena, viva, aislada, que expresa la fimbria F4.

Cláusula 7: La composición de la cláusula 6, en la que dicha *E. coli* no patógena que expresa la fimbria F4 es la cepa depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá el 21 de enero de 2005 y número de registro atribuido IDAC 210105-01.

- 25 Cláusula 8: Un método para prevenir una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en un animal, que comprende el suministro entérico al animal de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

Cláusula 9: El método de la cláusula 8, en el que dicho suministro entérico se obtiene por administración oral de la cepa *E. coli* viva.

Cláusula 10: El método de la cláusula 8 o 9, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma liofilizada.

- 30 Cláusula 11: El método de la cláusula 8 o 9, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma congelada.

Cláusula 12: El método de la cláusula 8 o 9, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está junto con un portador aceptable del alimento.

Cláusula 13: El método según una cualquiera de las cláusulas 8 a 12, en el que dicha cantidad eficaz es al menos 5 x 10⁷ UFC.

Cláusula 14: Un método según una cualquiera de las cláusulas 8 a 12, en el que dicho animal es un cerdo.

Cláusula 15: Un método para prevenir la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *E. coli* F18 patógena en un animal, que comprende el suministro entérico al animal de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.

Cláusula 16: El método de la cláusula 15, en el que dicho suministro entérico se obtiene por administración oral de la cepa de *E. coli* viva.

Cláusula 17: El método de la cláusula 15 o 16, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma liofilizada.

Cláusula 18: El método de la cláusula 15 o 16, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma congelada.

Cláusula 19: El método de la cláusula 15 o 16, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está junto con un portador aceptable del alimento.

Cláusula 20: El método según una cualquiera de las cláusulas 15 a 19, en el que dicha cantidad eficaz es al menos 5×10^7 UFC.

Cláusula 21: Un método según una cualquiera de las cláusulas 15 a 20, en el que dicho animal es un cerdo.

Cláusula 22: Uso, para prevenir una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en un animal, de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01, siendo adaptada la cepa para suministro entérico en el animal.

Cláusula 23: Uso, en la fabricación de una composición para uso en la prevención de una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en un animal, de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01, siendo adaptada la composición para suministro entérico en el animal.

Cláusula 24: Uso, para prevenir la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *E. coli* F18 patógena en un animal, de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01, siendo adaptada la cepa para suministro entérico en un animal.

Cláusula 25: Uso, en la fabricación de una composición para uso en la prevención de la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *E. coli* F18 patógena en un animal, de una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01, siendo adaptada la composición para suministro entérico en un animal.

Cláusula 26: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 a 25, en el que dicha cepa de *E. coli* viva se adapta para administración oral.

Cláusula 27: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 a 26, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma liofilizada.

Cláusula 28: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 a 26, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está en forma congelada.

Cláusula 29: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 a 26, en el que dicha cepa de *E. coli* viva está junto con un portador aceptable del alimento.

Cláusula 30: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 al 29, en el que dicha cantidad eficaz es al menos aproximadamente 5×10^7 UFC.

Cláusula 31: El uso según una cualquiera de las cláusulas 22 a 30, en el que dicho animal es un cerdo.

Cláusula 32: La cepa de *E. coli* aislada según una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, para uso en la prevención de una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en un animal, siendo adaptada la cepa para suministro entérico en el animal.

Cláusula 33: La cepa de *E. coli* aislada según una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, para uso en la fabricación de una composición para uso en la prevención de una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en un animal, siendo adaptada la composición para suministro entérico en el animal.

Cláusula 34: La cepa de *E. coli* aislada según una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, para uso en la prevención de la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *E. coli* F18 patógena en un animal, siendo adaptada la cepa para suministro entérico en el animal.

Cláusula 35: La cepa de *E. coli* aislada según una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, para uso en la fabricación de una composición para uso en la prevención de la enfermedad de los edemas o diarrea producida por una infección por *E. coli* F18 patógena en un animal, siendo adaptada la composición para suministro entérico en el animal.

5 Obsérvese que los títulos o subtítulos pueden estar por todo el presente documento para facilidad de lectura, que no debería limitar de ningún modo el alcance de la invención. Además, se proponen algunas teorías y se describen en la presente memoria; sin embargo, de ningún modo, sean ciertas o no, deben limitar el alcance de la invención siempre que la invención se ponga en práctica según la presente descripción sin tener en cuenta ninguna teoría o esquema de acción particular.

10 Los expertos en la materia entenderán que en toda la presente memoria descriptiva, el término "un" usado antes de un término incluye realizaciones que contienen uno o más de aquello a lo que se refiera el término. Los expertos en la materia también entenderán que, en toda la presente memoria descriptiva, el término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" es inclusivo o está abierto y no excluye elementos o etapas del método no citadas, adicionales.

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, gobernará el presente documento, incluyendo las definiciones.

Aunque en los estudios descritos en la presente memoria se han usado cerdos destetados, el experto entenderá fácilmente que los cerdos que son tratados pueden ser alternativamente cerdos predestetados.

20 Como se usa en la presente memoria, "alrededor de" o "aproximadamente" significará en general dentro del 20 por ciento, preferiblemente dentro del 10 por ciento y más preferiblemente dentro del 5 por ciento de un valor o intervalo determinado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria son en general aproximadas; que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" pueden ser deducidos si no se indican expresamente.

El alcance de las reivindicaciones no debería estar limitado por las realizaciones preferidas explicadas en los ejemplos, sino que se debería proporcionar la interpretación más amplia consistente con la descripción en conjunto.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *E. coli* aislada depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01.
- 5 2. La cepa de *E. coli* aislada según la reivindicación 1, en forma liofilizada.
3. La cepa *E. coli* aislada según la reivindicación 1, en forma congelada.
4. La cepa de *E. coli* aislada según la reivindicación 1, en la que la cepa está junto con un portador aceptable del alimento.
- 10 5. Una composición que comprende una cepa de *E. coli* aislada depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01 y un portador aceptable del alimento.
6. La composición según la reivindicación 5, que comprende además una *E. coli* no patógena, viva, aislada, que expresa la fimbria F4.
- 15 7. La composición según la reivindicación 6, en la que dicha *E. coli* no patógena que expresa la fimbria F4 es la cepa depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá el 21 de enero de 2005 y número de registro atribuido IDAC 210105-01.
8. Una cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva depositada en la Autoridad Internacional Depositaria de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 y número de registro atribuido 200613-01, para uso, mediante suministro entérico a un animal en la prevención de una infección intestinal por *E. coli* F18 patógena en el animal.
- 20 9. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva, para uso según la reivindicación 8, en la que la cepa de *E. coli* viva es para suministro entérico por administración oral.
10. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva para uso según la reivindicación 8 o 9, en la que la cepa de *E. coli* viva está en forma liofilizada.
- 25 11. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva, para uso según la reivindicación 8 o 9, en la que la cepa de *E. coli* viva está en forma congelada.
12. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva para uso según la reivindicación 8 o 9, en la que la cepa de *E. coli* viva está junto con un portador aceptable del alimento.
13. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que la cantidad eficaz es de al menos 5×10^7 UFC.
- 30 14. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que el animal es un cerdo.
15. La cantidad eficaz de una cepa de *E. coli* viva según la reivindicación 8, para uso en la prevención de la enfermedad de los edemas o diarrea producida por la infección por *E. coli* F18 patógena.

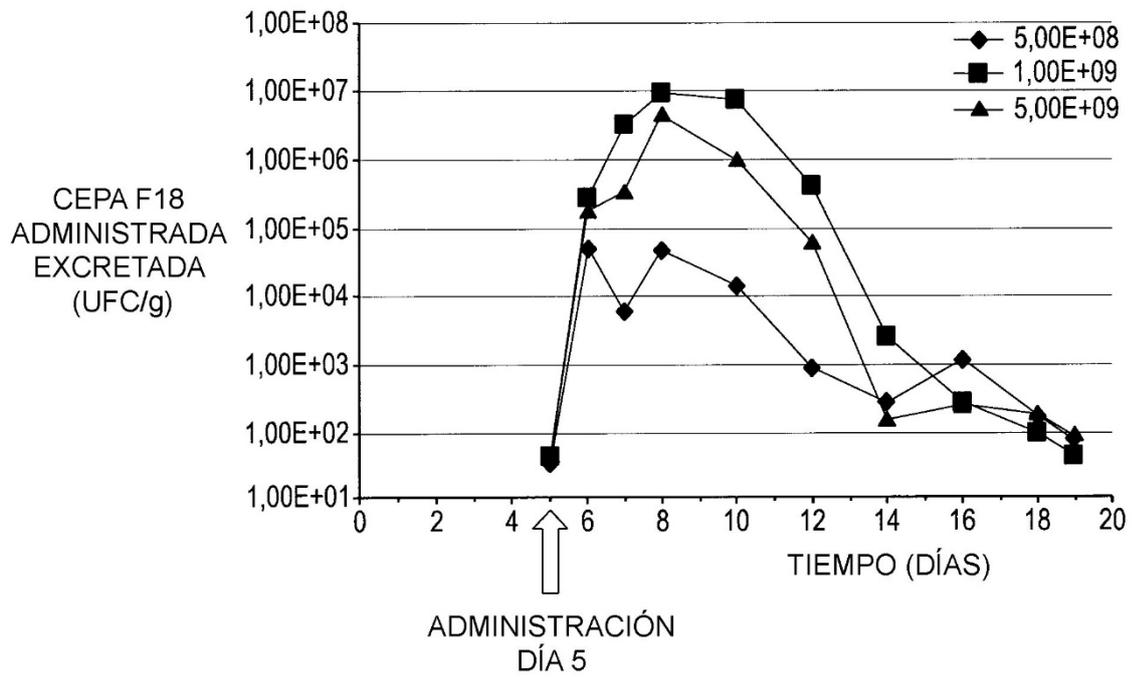


FIG. 1

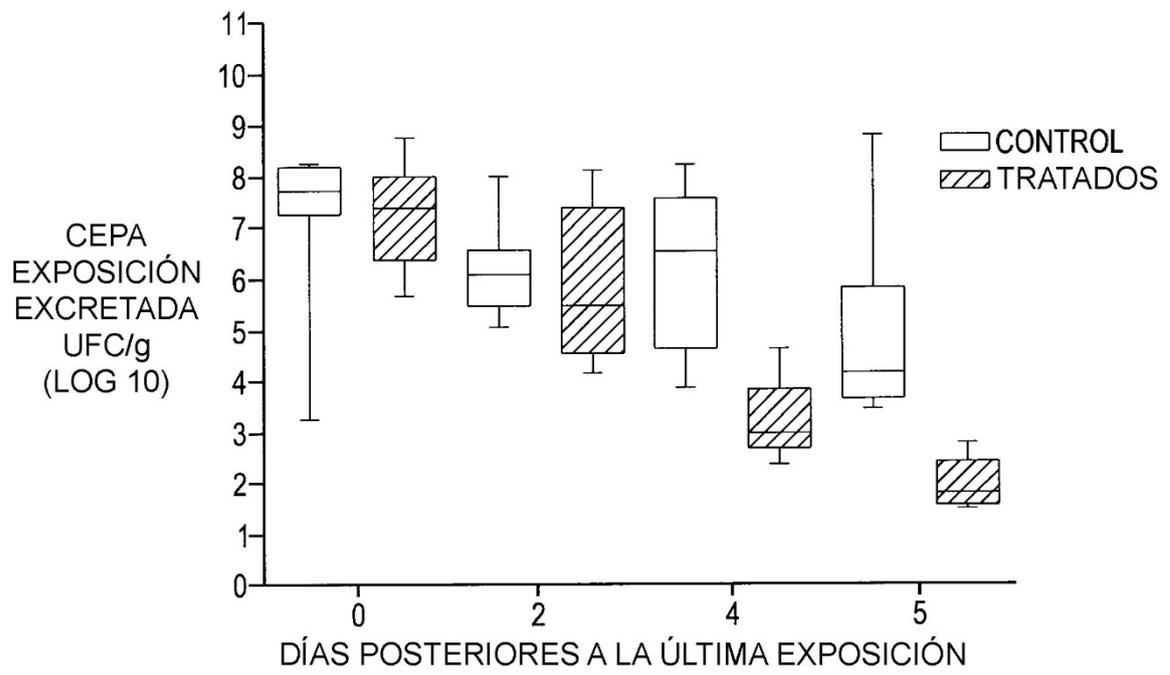


FIG. 2

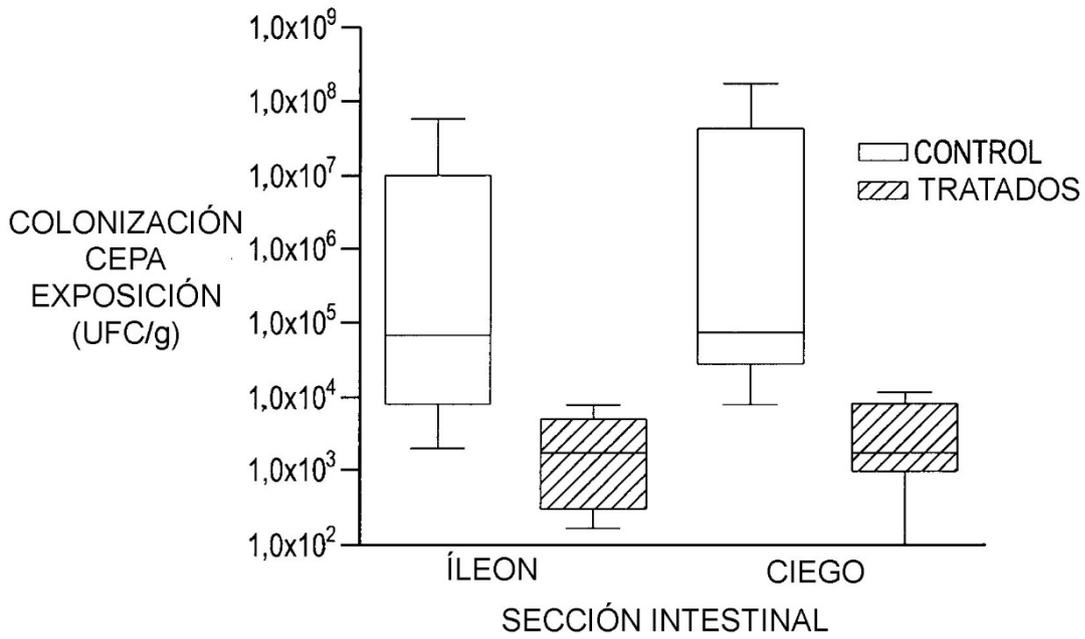


FIG. 3

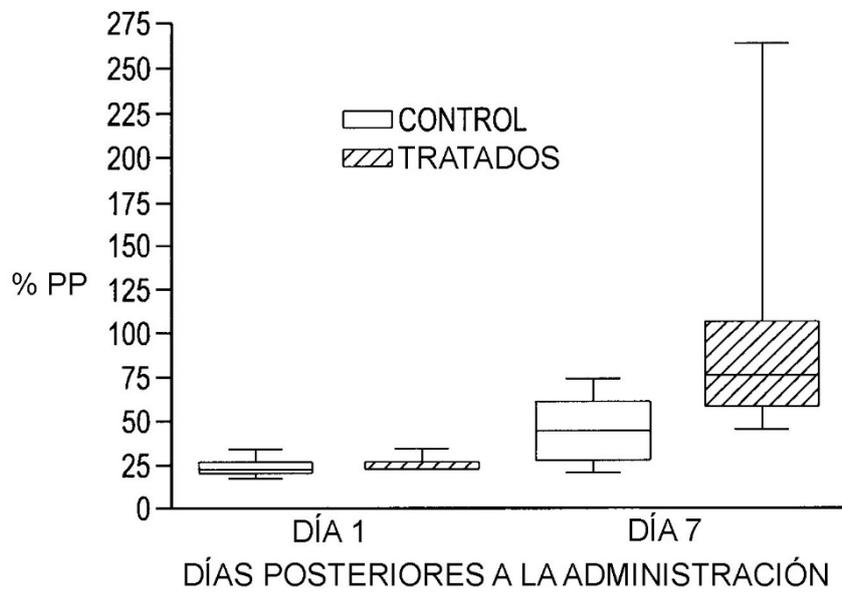


FIG. 4