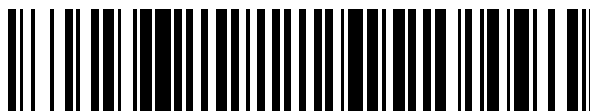


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 010**

51 Int. Cl.:

**C09B 61/00** (2006.01)

**G01N 33/12** (2006.01)

**A22B 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2010 PCT/GB2010/000412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10103261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10722729 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2406325**

54 Título: **Marcadores fecales**

30 Prioridad:

**09.03.2009 GB 0904024**

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

**20.02.2019**

73 Titular/es:

**ABERYSTWYTH UNIVERSITY (100.0%)  
Old College King Street Aberystwyth  
SY23 2AX, GB**

72 Inventor/es:

**LEE, MICHAEL;  
THEODOROU, MICHAEL;  
OUGHAM, HELEN y  
THOMAS, HOWARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 701 010 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

Marcadores fecales

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para detectar contaminación fecal en cadáveres de animales, en la carne obtenida a partir de estos y en los productos producidos u obtenidos a partir de animales, en particular, a marcadores fecales para su uso en los métodos y composiciones de este tipo.

10 La limpieza en el matadero es de suma importancia y se llevan a cabo numerosas prácticas en las granjas para garantizar que los animales llegan al matadero con una materia fecal limitada pegada a la piel. Las estrategias de este tipo incluyen: cambiar a dietas basadas en cereales y heno antes del sacrificio para motivar heces "secas"; limpiar a los animales antes de desplazarlos; reducir el estrés de los animales durante el transporte y en el matadero para reducir la propagación de patógenos. Sin embargo, incluso con estas estrategias implementadas, una fuente importante de contaminación en el matadero es la presencia de pequeñas trazas de heces asociadas aún con la piel que entra en contacto con la canal. En la actualidad, los cadáveres se comprueban a "ojo" y se lavan con pulverizadores químicos o se diseccionan para eliminar las áreas contaminadas. Con esto, se corre el riesgo de dejar pequeñas áreas de contaminación fecal que podrían albergar patógenos letales tales como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter*. Los problemas predominan en el procesamiento de varios animales, incluidos, por ejemplo, el ganado y las aves de corral. En el caso de las aves de corral, y en particular en los pollos, la presencia de contaminación fecal en los huevos es también una preocupación.

20 Un método conocido, denominado Verifeye (RTM), utiliza niveles naturales de clorofila para visualizar contaminantes fecales. Sin embargo, esta tecnología no se ha aceptado universalmente debido a la variación de clorofila en diferentes dietas. Por ejemplo, la diferencia en la cantidad de fluorescencia entre animales que pastan en pastos frescos y animales en un sistema de alimentación con cebada sería enorme, lo que significa que no es posible atribuir de manera precisa fluorescencia real a descomposición fecal. Un método de este tipo se describe en la solicitud de patente internacional número PCT/US99/03961, publicada con el número WO99/45138. Otro método se sugiere en M. S. Kim *et al*, Journal of Food Protection, 66(7), 2003, 1198-1207. De este modo, existe una necesidad de métodos mejorados para detectar contaminantes fecales en la carne. En particular, se necesitan métodos que se puedan utilizar para detectar contaminantes fecales durante el procesamiento de cadáveres de animales de una variedad de animales y sistemas de producción.

Compendio de la invención

30 La presente invención se define con referencia a las reivindicaciones anejas.

Se describe un método para analizar un cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o un producto producido u obtenido a partir de un animal para la presencia o ausencia de materia fecal, el método comprende:

35 analizar el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal para la presencia o ausencia de un marcador detectable, la presencia del marcador detectable es indicativa de la presencia de materia fecal y la ausencia del marcador detectable es indicativa de la ausencia de materia fecal;

donde el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ha obtenido a partir de un animal alimentado con una composición que comprende un suplemento del marcador detectable y/o un precursor de este.

40 Esto proporciona un método fiable y reproducible para detectar la presencia o ausencia de materia fecal en el cadáver de un animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal. A diferencia de los métodos conocidos, es improbable que se produzcan falsos negativos que pueden haber aparecido en métodos conocidos debido a la variación marcadores detectables, por ejemplo, clorofila, en diferentes dietas, o en efecto falsos positivos que pueden aparecer debido a la presencia de niveles bajos de productos de degradación del metabolismo de la hemoglobina que no están relacionados con la contaminación fecal. Un único compuesto, o un grupo de compuestos, puede ser preciso como marcador específico de contaminación fecal.

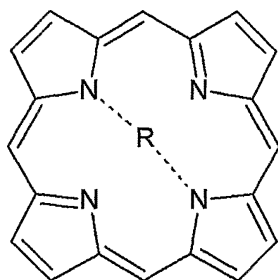
Preferiblemente, el producto se selecciona entre carne, huevos o leche producidos u obtenidos a partir del animal.

Como resultado de la limpieza mejorada de los productos obtenidos mediante los métodos, el nivel de organismos de la descomposición se reduce enormemente y, de este modo, se puede aumentar la vida útil en depósito de dichos productos.

50 Se ha descrito una composición para alimentar a un animal y para su uso en un método relacionado, la composición comprende un suplemento de un marcador detectable y/o un precursor de este.

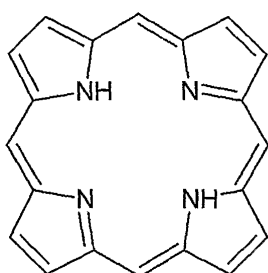
Preferiblemente, el marcador detectable comprende un marcador fluorescente.

- 5 Preferiblemente, el marcador detectable comprende un anillo de porfirina o un derivado, análogo u homólogo de esta, o su sal. Como tal, se prefiere que el marcador fluorescente comprenda la estructura mostrada en la Fórmula I o un derivado, análogo u homólogo de este, o su sal, donde R está ausente o es un ión metálico. Preferiblemente, R es un ión metálico divalente, por ejemplo, un metal alcalinotérreo, tal como Mg, o un metal de transición, tal como Fe, Cu, Zn, Pd, Co, Ni y Mn. Preferiblemente, R se selecciona entre magnesio, hierro, zinc o cobre, por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ . Más preferiblemente, R se selecciona de entre magnesio, hierro, zinc, y más preferiblemente magnesio o zinc, de manera más preferida, magnesio.

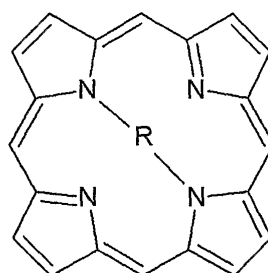


Fórmula I

- 10 Se apreciará que, a lo largo de esta especificación, el uso de una línea de puntos representa un enlace opcional. Como tal, en relación a la Fórmula I, la estructura se puede proporcionar con o sin R. Dicho de otra manera, la estructura de la Fórmula I podría ser cualquiera de las estructuras expuestas a continuación y designadas como Fórmula IA e IB.

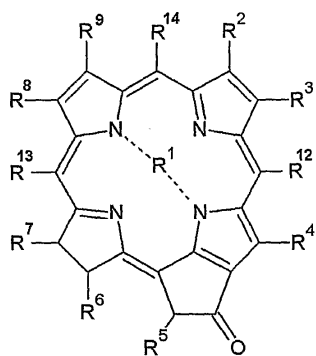


Fórmula IA

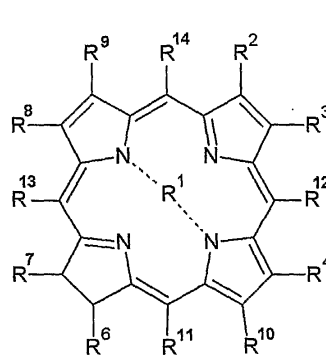


Fórmula IB

- 15 Preferiblemente, el marcador detectable comprende la estructura mostrada en la Fórmula IIA o IIB o un derivado, análogo u homólogo de este, o su sal.



Fórmula IIA



Fórmula IIB

- 20 Preferiblemente,  $R^1$  está ausente o es un ión metálico, preferiblemente un ión metálico divalente, por ejemplo, un metal alcalinotérreo, tal como Mg, o un metal de transición, tal como Fe, Cu, Zn, Pd, Co, Ni y Mn. Preferiblemente, R se selecciona de entre magnesio, hierro o cobre, por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , más preferiblemente, R se selecciona entre magnesio, hierro o zinc, más preferiblemente magnesio o zinc, de manera más preferida magnesio;



aproximadamente 20 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 átomos de carbono, de manera más preferida aproximadamente 20 átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S, (b) un alqueno, preferiblemente que contiene de 2 a aproximadamente 50 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 átomos de carbono, de manera más preferida aproximadamente 20 átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S, y (c) hidrógeno, y donde R<sup>16</sup> es un alquilo, preferiblemente que contiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, por ejemplo, un metilo, etilo o propilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S o un alqueno, preferiblemente que contiene de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, por ejemplo, un etenilo o propenilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S. En realizaciones particulares, R<sup>15</sup> es -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>, donde n es un entero de 1 a aproximadamente 10, preferiblemente de 1 a aproximadamente 6, preferiblemente de 1 a aproximadamente 4, preferiblemente 3. En realizaciones particulares, R<sup>6</sup> se selecciona entre hidrógeno y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OCH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>, donde n es un entero de 1 a aproximadamente 10, preferiblemente de 1 a aproximadamente 6, preferiblemente de 1 a aproximadamente 4, preferiblemente 3; y

R<sup>9</sup> se selecciona entre (i) un alqueno preferiblemente que contiene de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, por ejemplo, un etenilo o propenilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S, (ii) un aldehído, preferiblemente que contiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, por ejemplo, -CHO o -R<sup>17</sup>CHO, donde R<sup>17</sup> es un alquilo, preferiblemente que contiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, por ejemplo, un metilo, etilo o propilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S, (iii) hidrógeno, y (iv) un éster, por ejemplo, -C(O)OR<sup>15</sup> o -R<sup>16</sup>C(O)OR<sup>15</sup>, y R<sup>15</sup> se selecciona entre (a) un alquilo, preferiblemente que contiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, por ejemplo, un metilo, etilo o propilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S, y (b) hidrógeno, y donde R<sup>16</sup> es un alquilo, preferiblemente que contiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, por ejemplo, un metilo, etilo o propilo, que puede ser lineal o ramificado y puede contener uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, NH o S

En realizaciones particulares preferidas, el marcador detectable comprende la estructura mostrada en la Fórmula IIA, y

R<sup>1</sup> está ausente o se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>;

R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> o CHO;

R<sup>3</sup> es CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o CHCH<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>5</sup> es H o C(O)OCH<sub>3</sub>;

R<sup>6</sup> es CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OCH<sub>2</sub>CH

C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>;

R<sup>7</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>8</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>9</sup> es CHCH<sub>2</sub> o CHO;

R<sup>12</sup> es H;

R<sup>13</sup> es H; y

R<sup>14</sup> es H.

En otras realizaciones particulares preferidas, el marcador detectable comprende la estructura mostrada en la Fórmula IIB, y

5 R<sup>1</sup> está ausente o se selecciona entre Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>;

R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> o CHO;

R<sup>3</sup> es CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o CHCH<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>6</sup> es CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OCH<sub>2</sub>CH

10 C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>;

R<sup>7</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>8</sup> es CH<sub>3</sub>;

R<sup>9</sup> es CHCH<sub>2</sub> o CHO;

R<sup>10</sup> es COOH;

15 R<sup>11</sup> es CH<sub>2</sub>COOH;

R<sup>12</sup> es H;

R<sup>13</sup> es H; y

R<sup>14</sup> es H.

20 En realizaciones preferidas, dos de los adyacentes R<sup>2</sup> a R<sup>14</sup> están unidos para formar una o más estructuras de anillo de 5 o 6 miembros, opcionalmente, sustituidas. Por ejemplo, en relación con la Fórmula IIA, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>12</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>13</sup>, R<sup>13</sup> y R<sup>8</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>14</sup>, y/o R<sup>14</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar una o más estructuras de anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituidas. Por ejemplo, en relación con la Fórmula IIB, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>12</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>4</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>10</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>6</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>13</sup>, R<sup>13</sup> y R<sup>8</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>14</sup>, y/o R<sup>14</sup> y R<sup>2</sup> pueden unirse para formar una o más estructuras de anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituidas.

25 La naturaleza de la estructura de anillo dependerá de la naturaleza de los grupos que forman la estructura de anillo.

Preferiblemente, el marcador detectable comprende la estructura mostrada en la Fórmula IIB, donde R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> se unen para formar una estructura de anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituida. La naturaleza de la estructura de anillo dependerá de la naturaleza de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>. Sin embargo, se apreciará que un ejemplo de este tipo de la Fórmula IIB, donde R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> se unen para formar una estructura de anillo es la estructura mostrada en la

30 Fórmula IIA.

Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona entre clorofila o un derivado, análogo u homólogo de esta, o su sal. Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona entre clorofila a, b, c1, c2 o un derivado, análogo u homólogo de esta, o su sal. A este respecto, se pretende que se incluyan los derivados feofitina, clorofilina, clorofilida, feofórbido y pirofeofórbido de clorofila a y b.

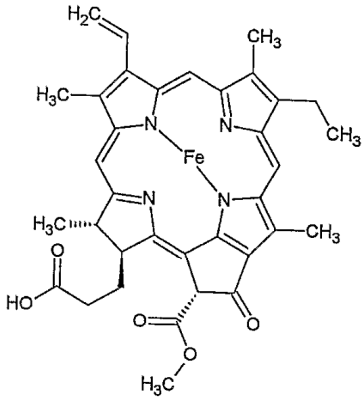
35 Preferiblemente, el marcador detectable se obtiene a partir de espirulina. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser clorofila a obtenida a partir de espirulina o un derivado, análogo u homólogo de esta, o su sal.

Preferiblemente, el marcador detectable comprende extracto de clorofila concentrado de alfalfa o hierba. Preferiblemente, el marcador detectable comprende feofórbido y feofitina.

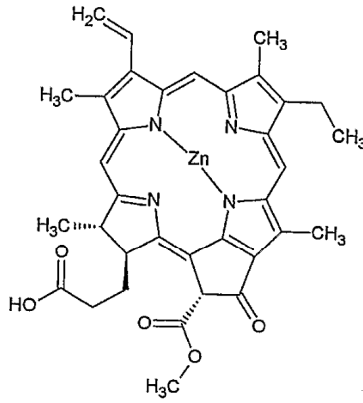
40 Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona entre (i) una clorofilina, o un derivado, análogo u homólogo de esta, o su sal, o (ii) feofórbido o un derivado, análogo u homólogo de este, o sus sales. Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona entre clorofilina de hierro, clorofilina de zinc o clorofilina de magnesio o un derivado, análogo u homólogo de estas, o sus sales.

45 Según lo anterior, el marcador detectable se puede, por ejemplo, y sin limitación, seleccionar de las estructuras mostradas a continuación o derivados, análogos u homólogos de estas, o sus sales. En aras de la concisión, las estructuras mostradas a continuación en relación con los derivados clorofilina, clorofilida, feofórbido, pirofeofórbido y

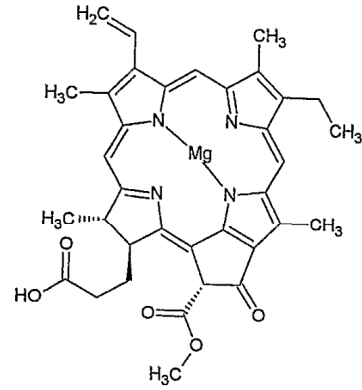
feofitina de la clorofila se representan como derivados de la clorofila a. Sin embargo, se apreciará que los derivados de la clorofila b, cl, c2 y d serán incluidos.



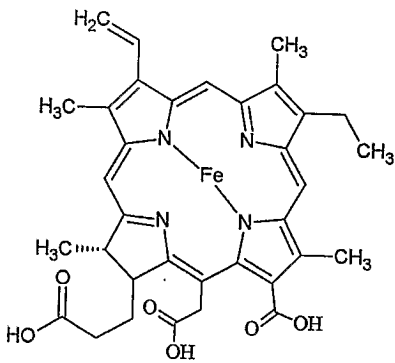
Fórmula III  
(clorofilida de hierro)



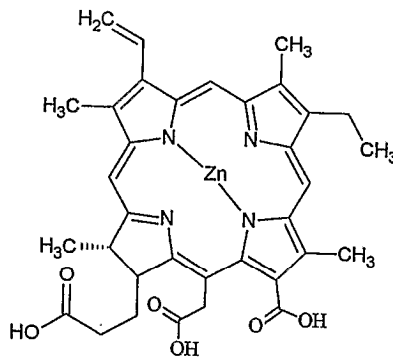
Fórmula IV  
(clorofilida de zinc)



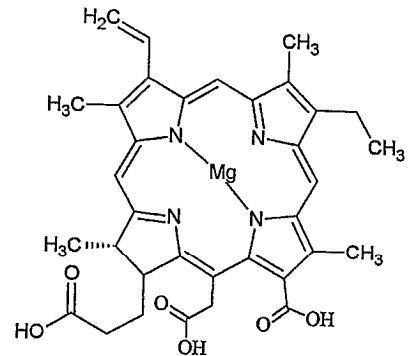
Fórmula V  
(clorofilida de magnesio)



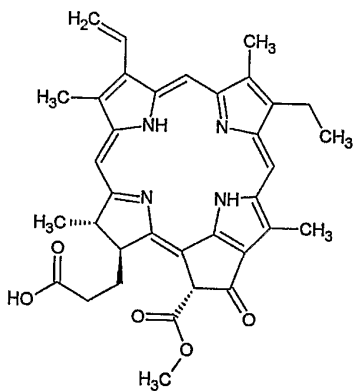
Fórmula VI  
(clorofilina de hierro)



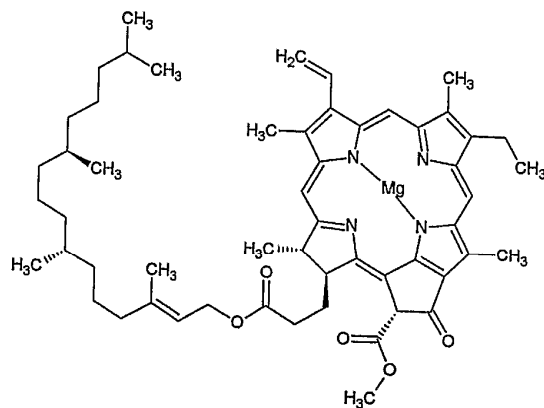
Fórmula VII  
(clorofilina de zinc)



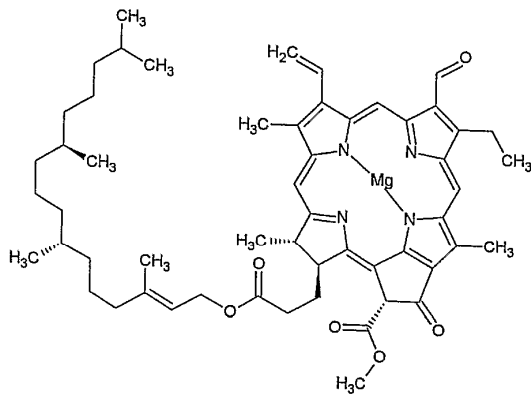
Fórmula VIII  
(clorofilina de magnesio)



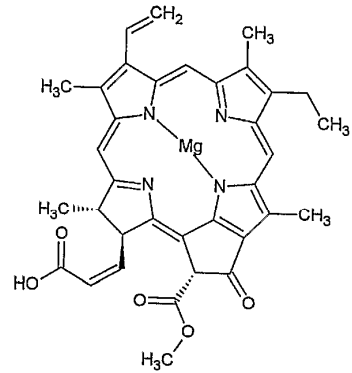
Fórmula IX  
(feofóbido)



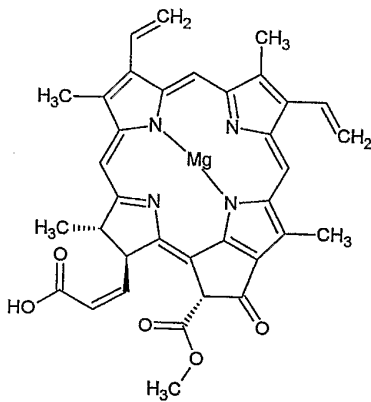
Fórmula X  
(clorofila a)



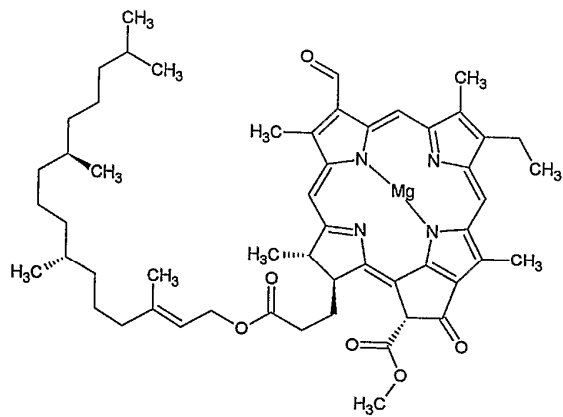
Fórmula XI  
(clorofila b)



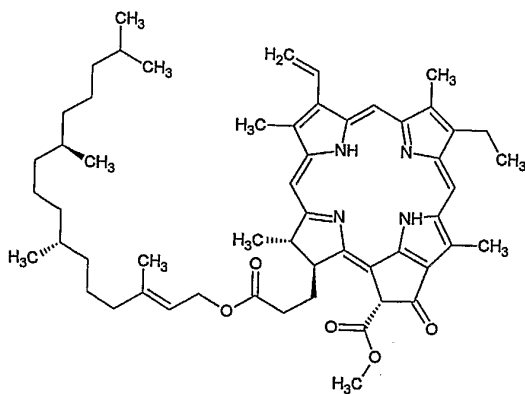
Fórmula XII  
(clorofila c1)



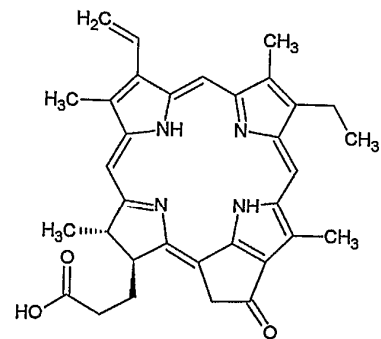
Fórmula XIII  
(clorofila c2)



Fórmula XIV  
(clorofila d)



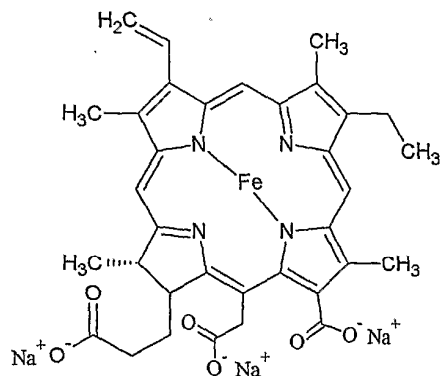
Fórmula XV  
(feofitina)



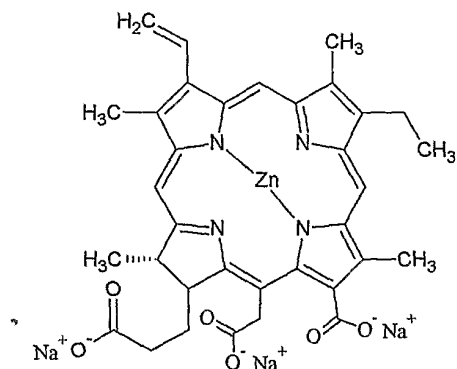
Fórmula XVI  
(pirofeofórbido)



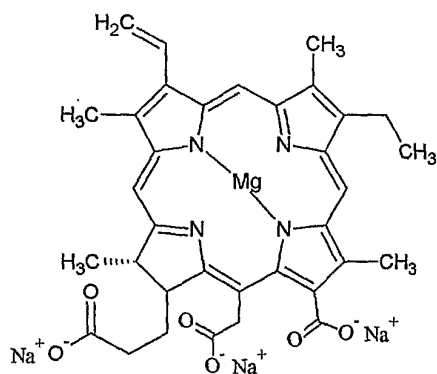
Como se señaló anteriormente, en realizaciones preferidas, el marcador detectable comprende una sal de las estructuras mencionadas anteriormente. Preferiblemente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitativos en los que el marcador detectable comprende una sal son los siguientes:



Fórmula XVII



Fórmula XVIII



Fórmula XIX

- 5 Preferiblemente, el cadáver del animal, la carne obtenida a partir de este o producto se analiza en una o más etapas de producción. Por ejemplo, el análisis se podría realizar inmediatamente después de la disección y seguido de cada etapa de procesamiento posterior. Además, un análisis se puede realizar antes del envasado. Otro análisis se puede hacer antes de enviar los productos envasados.
- 10 Preferiblemente, el animal se selecciona entre bovinos, aves de corral, porcinos, ovinos o caprinos. Sin embargo, se apreciará que el cadáver del animal, la carne obtenida a partir de este o producto podría obtenerse a partir de cualquier animal cuya contaminación fecal durante el procesamiento sea un problema.
- Preferiblemente, la presencia o ausencia del marcador detectable se determina por medio de espectroscopia de fluorescencia.
- 15 Preferiblemente, el marcador detectable muestra fluorescencia a una longitud de onda de entre aproximadamente 660 nm a aproximadamente 700 nm, preferiblemente entre aproximadamente 670 nm y aproximadamente 690, preferiblemente a aproximadamente 685 nm.
- Preferiblemente, el marcador detectable muestra fluorescencia a una longitud de onda de aproximadamente 660 nm, por ejemplo, 662 nm.
- 20 Preferiblemente, la superficie del cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ilumina con UV o luz visible que tiene una longitud de onda eficaz para provocar la fluorescencia del marcador detectable. Preferiblemente, la superficie del cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o producto producido u el obtenido a partir del animal se ilumina con una luz que tiene una longitud de

onda de entre aproximadamente 300 nm a aproximadamente 660 nm, preferiblemente entre aproximadamente 380 nm a aproximadamente 440 nm o entre aproximadamente 510 nm a aproximadamente 600 nm, preferiblemente de aproximadamente 400 nm.

5 Por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos a continuación, la superficie del cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se iluminó a una longitud de onda de aproximadamente 400 nm y la fluorescencia se detectó a aproximadamente 685 nm.

En algunos ejemplos, el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se iluminó a una longitud de onda de aproximadamente 380 nm o aproximadamente 430 nm.

10 En algunas realizaciones, la detección del marcador detectable se puede realizar según métodos conocidos descritos en la solicitud de patente internacional PCT/US99/03961, publicada con el número WO99/45138. Tal como se describe en este documento, la ingesta y las heces de animales herbívoros muestran fluorescencia a longitudes de onda entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 680 nm cuando se iluminan con UV apropiada o luz de excitación visible, tal como luz que tiene unas longitudes de onda de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 600 nm, particularmente entre aproximadamente 400 nm a aproximadamente 440 nm o 510 nm a 600 nm.

15 Preferiblemente, el derivado de clorofila, homólogo o análogo de esta, o su sal se selecciona entre un derivado, homólogo o análogo sintéticos de esta o su sal, o un derivado, homólogo o análogo de esta que existe de manera natural, o su sal.

20 En realizaciones preferidas, el marcador detectable es sustancialmente estable durante la digestión en el tracto digestivo del animal. Dicho de otra manera, se prefiere que el marcador detectable no se degrade durante la digestión, o que solo se degrade de forma limitada, de tal manera que el nivel de fluorescencia en las heces no se afecte sustancialmente.

25 Se apreciará que, en los métodos y composiciones, el marcador detectable puede comprender una combinación de uno o más marcadores detectables, por ejemplo, una combinación de uno o más marcadores detectables descritos anteriormente. Adicionalmente, se apreciará que una combinación de clorofila y uno o más de los derivados, homólogos o análogos, o sales de esta descritos anteriormente se pueden utilizar en los métodos y composiciones.

En realizaciones preferidas, el marcador detectable es clorofilina de magnesio.

30 Como se señaló anteriormente, en algunas realizaciones, la composición comprende un precursor para el marcador detectable. Por ejemplo, la composición puede comprender un precursor para una clorofilina. A este respecto, se prevé que una vez que se alimente a un animal con una composición de este tipo, el precursor se modificará en el tracto digestivo del animal, por ejemplo, por medio de degradación digestiva, de tal manera que el marcador detectable se detectará en las heces del animal.

35 Preferiblemente, se ha alimentado al animal con la composición durante al menos 3 días antes del sacrificio. Preferiblemente, se ha alimentado al animal con la composición durante al menos aproximadamente 4 días, preferiblemente al menos aproximadamente 5 días, preferiblemente al menos aproximadamente una semana antes del sacrificio.

40 Preferiblemente, antes del sacrificio, se ha alimentado al animal con una cantidad eficaz del marcador detectable. Por ejemplo, se prefiere que se haya alimentado al animal con una dosis diaria de al menos aproximadamente 1 g del marcador detectable por kg de materia seca ingerida, preferiblemente al menos aproximadamente 2 g por kg de materia seca ingerida, preferiblemente al menos aproximadamente 3 g por kg de materia seca ingerida, preferiblemente al menos aproximadamente 4 g por kg de materia seca ingerida, preferiblemente al menos aproximadamente 5 g por kg de materia seca ingerida, preferiblemente al menos aproximadamente 10 g por kg de materia seca ingerida.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del marcador detectable que es suficiente para activar el marcador detectable para que sea detectado de manera fiable en las heces de un animal.

45 Preferiblemente, la composición es un alimento para animales o un suplemento para animales. Como tal, se proporciona un alimento para animales o un suplemento para animales que comprende un marcador detectable o un precursor de este tal como se describió anteriormente para su uso en los métodos. En algunas realizaciones, el alimento para animales o suplemento para animales se encuentra en forma de un alimento para animales o un suplemento para animales líquido. En otras realizaciones, el alimento para animales o suplemento para animales se encuentra en forma de un alimento para animales o un suplemento para animales seco, por ejemplo, en forma de gránulos.

Los métodos para producir alimentos para animales y suplementos para animales son conocidos por un experto en la técnica. De esta manera, se pueden utilizar métodos rutinarios para producir un alimento para animales o suplemento para animales.

Según un aspecto, se proporciona un método para analizar un cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o un producto producido u obtenido a partir de un animal para la presencia o ausencia de materia fecal, el método comprende:

5 analizar el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal para la presencia o ausencia de clorofilina de magnesio, la presencia de la clorofilina de magnesio es indicativa de la presencia de materia fecal y la ausencia de la clorofilina de magnesio es indicativa de la ausencia de materia fecal;

10 donde el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ha obtenido a partir de un animal alimentado con una composición que comprende un suplemento de clorofilina de magnesio y/o un precursor de esta.

Realizaciones de ejemplo de la presente invención se describirán ahora con referencia a las figuras que acompañan.

Dentro de esta especificación, las realizaciones se han descrito de una manera que permita escribir una especificación clara y concisa, pero no se pretende y se apreciará que las realizaciones se pueden combinar o separar de varias maneras sin alejarse de la invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las ingestas de materia seca, clorofila, metabolitos de clorofila y los marcadores de clorofilina en los cinco tratamientos descritos en el Ejemplo 2;

la Figura 2 muestra el ACP (análisis de componentes principales) de la fluorescencia de las heces a partir cuatro marcadores diferentes dados a ovejas;

20 la Figura 3 muestra el posicionamiento de materia fecal en una muestra de carne tal como se describe más adelante en el Ejemplo 3;

las Figuras 4A y 4B muestran los resultados obtenidos a partir de inspección de la muestra de carne en luz visible (Figura 4A) y por medio de análisis de imágenes espectrales (Figura 4B);

25 las Figuras 5A y 5B muestran los resultados obtenidos a partir de inspección de la muestra de carne en luz visible (Figura 5A) y por medio de análisis de imágenes espectrales (Figura 5B) una vez que la materia fecal ha sido cepillada de la muestra de carne;

las Figuras 6A y 6B muestran los resultados obtenidos a partir de inspección de la muestra de carne en luz visible (Figura 6A) y por medio de análisis de imágenes espectrales (Figura 6B) una vez que la muestra de carne se ha enjuagado con agua;

30 la Figura 7 muestra los espectros de emisión de cuatro marcadores (clorofilina de Mg, clorofilina de Fe, clorofilina de Zn y extracto de clorofila) por medio de una excitación  $\lambda = 380$  nm; y

la Figura 8 muestra los espectros de emisión de cuatro marcadores (clorofilina de Mg, clorofilina de Fe, clorofilina de Zn y extracto de clorofila) por medio de una excitación  $\lambda = 430$  nm.

Descripción detallada de la invención

35 La invención se refiere a métodos para analizar un cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o un producto producido u obtenido a partir de un animal para la presencia o ausencia de materia fecal y composiciones para su uso en métodos de este tipo.

A continuación, se exponen ejemplos de la invención.

40 Dentro de esta especificación, las expresiones "comprende" y "que comprende" se interpretan como "incluye, entre otras cosas" Estas expresiones no deben interpretarse como "consiste solo en".

Dentro de esta especificación, el término "aproximadamente" significa más o menos un 20%, más preferiblemente más o menos un 10%, incluso más preferiblemente más o menos un 5%, de manera más preferida más o menos un 2%.

45 Dentro de esta especificación, el término "animal" incluye, por ejemplo, ganado no doméstico tal como bovinos, aves de corral, porcinos, ovinos o caprinos. Los ejemplos específicos incluyen pollos, pavos, reses, cerdos, ovejas y etcétera.

50 Dentro de esta especificación, el término "derivados" se refiere a moléculas derivadas de los compuestos descritos anteriormente. Los derivados de este tipo pueden ser, por ejemplo, productos de la digestión de los compuestos descritos anteriormente o derivados alterados sintéticamente de los compuestos descritos anteriormente. A este respecto, se apreciará que se alimenta a un animal con uno de los compuestos descritos anteriormente, entonces un

derivado (p. ej., un producto de la digestión del compuesto) se puede detectar en los métodos descritos anteriormente. En este sentido, será el derivado del compuesto o el compuesto más su derivado que estará comprendido por el marcador detectable. Se apreciará que, en algunas realizaciones, el término "derivados" abarca metabolitos de los compuestos descritos anteriormente.

- 5 Dentro de esta especificación, el término "homólogos" se refiere a moléculas que tienen similitudes estructurales sustanciales con los compuestos descritos anteriormente.

Dentro de esta especificación, el término "análogos" se refiere a moléculas que tienen similitudes biológicas sustanciales con los compuestos descritos anteriormente.

- 10 Dentro de esta especificación, el término "suplemento" significa una cantidad de marcador detectable o de un precursor de este mayor que la encontrada normalmente en la dieta basal del animal al que se aplican los métodos y composiciones de la invención. Por ejemplo, en el caso de un animal alimentado con una dieta basal que comprende hierba, entonces esta dieta basal proporcionará una ingesta de clorofila debido al contenido de clorofila en la hierba. En este caso, se puede decir que una composición comprende un suplemento de un marcador detectable, por ejemplo, clorofila, si el nivel de marcador detectable en la composición es mayor que el que se encuentra normalmente en la dieta basal con hierba del animal. Se apreciará que un suplemento que existe de manera natural de un marcador detectable se puede incluir en el significado del término "suplemento" mientras proporcione un nivel mayor (o "suplementado") de marcador detectable cuando se compara con la dieta basal del animal.

- 15 Dentro de esta especificación, el término "alqueno" significa un radical orgánico formado a partir de un hidrocarburo alifático insaturado. El alqueno puede tener uno, dos o tres dobles enlaces, preferiblemente un doble enlace en una cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos alquenos son etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-butenilo, 2-metil-1-propenilo, o 3-metil-2-butenilo.

Dentro de esta especificación, el término "alquilo" significa un radical orgánico formado a partir de un hidrocarburo alifático saturado. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo o hexilo.

- 20 Dentro de esta especificación, el término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que retiene una actividad deseada del compuesto original y no imparte efectos toxicológicos indeseados. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se comentan en Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19.

### Ejemplos

- 30 Se utilizaron estudios de la digestión del tracto completo *in vivo* para identificar los mejores productos de degradación de la clorofila para su uso como marcadores de contaminación fecal en un intervalo de dietas al alterar su concentración de clorofila y productos de degradación de clorofila como consecuencia de diferencias de conservación (p. ej., heno frente a ensilaje). Se evaluó también la degradación de los compuestos de clorofilina en estas dietas. La clorofilina es un derivado semisintético de la clorofila. Se utiliza en la industria alimentaria como colorante alimentario, para reducir el olor de una colostomía o ileostomía y también como ayuda para reducir el olor fecal debido a incontinencia. Se prevé que los marcadores de clorofilina y clorofila natural se puedan utilizar como aditivo alimentario antes del sacrificio y en dietas de animales alimentados predominantemente con dietas basadas en granos para una evaluación fácil de la contaminación fecal del cadáver. Una vez que los compuestos del marcador candidato se identificaron, se evaluó su eficacia por medio de espectroscopia y análisis de imágenes multiespectrales de carne contaminada.

#### Ejemplo 1

- Se analizó un número de productos de descomposición de clorofila para su uso como marcadores de contaminación fecal en un intervalo de dietas. Se alimentaron ocho ovejas cheviot con: (i) pasto fresco y trébol, (ii) ensilaje, (iii) heno o (iv) concentrado y paja de cebada. Se administró cada dieta a dos ovejas durante un periodo de dos semanas antes de cambiar la dieta a un diseño de cuadrado latino 4x4 duplicado. Las muestras de alimento se recogieron durante un periodo de alimentación completo y se incrementaron mientras se tomaron las muestras de heces al final del periodo. Se midieron las muestras para clorofila y sus derivados por medio de HPLC. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia directamente en las heces. Las muestras se colocaron dentro de cubetas de muestra, que expusieron una superficie circular plana con un diámetro de 5 cm para las mediciones. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia con excitación a 382 nm y 430 nm, por medio de un sistema de mesas ópticas, adecuado para disoluciones y muestras sólidas. La luz de excitación se generó con una fuente luminosa de xenón de 300w (Oriol 6258, Oriol Corporation, Stratford, CT, EE. UU.) y se pasó a través de un filtro de interferencia de banda ancha (Oriol 59920) y (Oriol 59295). La luz se dirigió sobre las muestras en un ángulo de aproximadamente 45°. Se recolectaron los espectros por un espectrógrafo de imágenes (Acton SP-150, Acton Research Corporation, Acton, MA, EE. UU.) conectado a un dispositivo de carga acoplada sensible (cámara CCD) (Roper Scientific NTE/CCD-1340/400-EMB, Roper Scientific, Trenton, NJ, EE. UU.). Los filtros de corte a 400 nm (para la excitación de 382 nm) (Melles Griot 03FCG049) y 475nm (para la excitación de 430nm) (Melles Griot 03FCG068) se situaron en frente de la rendija del espectrógrafo para reprimir la luz de excitación reflejada de las

muestras. El tiempo de exposición fue de 10 segundos y 5 segundos para excitación a 382 nm y 430 nm, respectivamente. La temperatura de las muestras fue de 4°C. Todas las muestras se midieron dos veces y se utilizó una media en el análisis. El campo de iluminación no fue perfectamente homogéneo, por lo que las muestras se rotaron 90° entre cada medición para nivelar la heterogeneidad de la muestra. Para garantizar una iluminación estable, se midió la intensidad de emisión a 440 nm a una excitación de 382 nm de un estándar de fluorescencia estable de plástico lavable (Ciba, Basilea, Suiza) antes y después de las mediciones. Se recolectaron imágenes de fluorescencia con el mismo sistema, ligeramente modificado. Se montó una lente fotográfica Nikon de 102 mm en el espectrógrafo de imágenes, se eliminó la rendija del espectrógrafo y se cambió la rejilla con un espejo. Se crearon imágenes espectrales al colocar un filtro de interferencia de banda ancha de 40 nm en frente de la lente. Se iluminaron las muestras por 400 nm (filtro de banda ancha de 10 nm, Melles Griot 03FIV026), se capturaron la luz y las imágenes a 685 nm (ancho de banda de 10nm). El tiempo de exposición para cada imagen fue de 60 segundos.

Los animales que recibieron las dietas de pasto fresco y trébol tuvieron una concentración mayor de compuestos fluorescentes en sus heces y la subsecuente fluorescencia que los animales con dietas con ensilajes conservados y las basadas en concentrados. Consecuentemente, la precisión de la detección de imágenes espectrales de contaminación fecal dependió de la dieta del animal. Esta es la razón por la que técnicas anteriores tales como "Verifeye (RTM)" no se habían aceptado universalmente.

#### Ejemplo 2

Diez ovejas macho (cheviots) se asignaron al azar a uno de cinco tratamientos: Control (C, sin marcador); clorofilina de zinc (Zn, 2g/d); clorofilina de hierro (Fe, 2g/d); clorofilina de magnesio (Mg, 2g/d) o clorofila a de espirulina (Sp, 2g/d). El experimento consistió en dos cuadrados latinos 5x5. Cada periodo consistió en dos semanas. La primera semana, no tuvo suplementación de marcador y actuó como el periodo de adaptación y lavado, todos los animales recibieron concentrado a voluntad (Wynnstay, Lamb master) y paja de cebada. La segunda semana, los animales recibieron 2g/d de marcador mezclado con un puñado de concentrado húmedo que se le dio a los animales antes de alimentarlos para garantizar que se consumiera el marcador. La suplementación con marcador se basó en la ingesta de clorofila por día a partir de dieta de ensilaje (Lee et al. J Anim Sci, 84: 3061-3070; 2006). Durante la semana de dosificación, se alimentó a voluntad a los animales con paja de cebada y concentrado al 30% por encima del mantenimiento ( $MJ/d = 1,15\{0,25*(W/1,08)0,75\}$  donde W es peso vivo en kg). La recolección fecal ocurrió durante 1 día después de cada periodo de 2 semanas. Se retiró a los animales de los puestos a un área de recolección con un piso de cemento limpio y se les dejó durante 2 horas, después de ese tiempo se recolectaron heces limpias (sin contaminación de los alimentos o de los lechos). Se pesó a los animales al principio y al final de cada periodo experimental, con ingestas diarias controladas durante la administración del marcador. Las muestras fecales (alrededor de 100 g) para cada animal se dividieron en dos y se congelaron a -80°C. La mitad se preparó para análisis de imágenes espectrales y la otra mitad para análisis de metabolitos de clorofila.

Las ingestas de materia seca, clorofila, metabolitos de clorofila y los marcadores de clorofilina en los cinco tratamientos se muestran en la Figura 1. La adición de los marcadores no afectó a la ingesta de materia seca. La ingesta de clorofila fue significativamente ( $P<0,001$ ) mayor en el tratamiento con Sp (clorofila a de espirulina) pero fue similar en todos los otros tratamientos junto con el metabolito de feoforbido. La Figura 2 muestra claramente que el patrón espectral de las heces es diferente a través de los marcadores y muestra el potencial de cada marcador para marcar fluorescentemente las heces.

#### Ejemplo 3

Se tomó una muestra de carne y se contaminó en ubicaciones separadas en la carne con heces tomadas de cada uno de los tratamientos realizados en el Ejemplo 2 (tal como se muestra en la Figura 3).

Tal como se muestra en la Figura 4A, se detectaron las cinco muestras fecales en la carne en luz visible. Además, cuando se vieron mediante análisis de imágenes espectrales, las cinco muestras fecales fueron detectables (excitación a 400 nm, capturadas a  $685\pm 5nm$ ) (Figura 4B).

Sin embargo, cuando las heces se retiraron de la muestra de carne (pero no se enjuagaron), las muestras fecales fueron apenas detectables en la carne en luz visible (Figura 5A) y mientras las heces tomadas de los animales alimentados con tratamiento suplementado con clorofilina fueron detectables mediante análisis de imágenes espectrales (excitación a 400 nm, capturadas a  $685\pm 5nm$ ) (Figure 5B).

Cuando la muestra de carne se enjuagó con agua, ninguna de las muestras fecales fue detectable en la carne en luz visible (Figura 6A) ni fueron detectables las heces tomadas de un animal alimentado con la dieta de control mediante análisis de imágenes espectrales (excitación a 400 nm, capturadas a  $685\pm 5nm$ ). Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 6B, las heces tomadas de animales alimentados con el tratamiento suplementado con clorofilina fueron detectables por medio de análisis de imágenes espectrales.

Tal como se ha evidenciado anteriormente, cuando se utiliza un suplemento de marcadores de clorofilina, los marcadores se pueden encontrar en las heces de oveja. Los marcadores de clorofilina de Fe, Zn y Mg produjeron fluorescencia en heces y serían adecuados como marcadores. La espirulina a través de su contenido de clorofila a produjo también fluorescencia en las heces. Esto sugiere que una forma pura de clorofila a puede utilizarse también

como marcador en dietas alimentadas a animales antes del sacrificio. Los niveles más altos de fluorescencia se vieron en la clorofilina de Mg.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para analizar un cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o un producto producido u obtenido a partir de un animal para la presencia o ausencia de materia fecal, el método comprende:
- 5 analizar el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal para la presencia o ausencia de un marcador detectable, la presencia del marcador detectable es indicativa de la presencia de materia fecal y la ausencia del marcador detectable es indicativa de la ausencia de materia fecal;
- donde el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ha obtenido a partir de un animal alimentado con una composición que comprende un suplemento del marcador detectable.
- 10 donde el marcador detectable es un marcador fluorescente y comprende una o más clorofilinas o sus sales y donde la presencia o ausencia del marcador detectable se determina por medio de espectroscopia de fluorescencia.
2. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el marcador detectable se selecciona entre uno o más de clorofilina de hierro, clorofilina de zinc y clorofilina de magnesio o una de sus sales.
3. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se analiza en una o más etapas de producción.
- 15 4. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el animal se selecciona entre bovinos, aves de corral, porcinos, ovinos o caprinos.
5. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el marcador detectable muestra fluorescencia a una longitud de onda de entre 660 nm y 700 nm, donde opcionalmente la superficie del cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ilumina con UV o luz visible que tiene una longitud de onda eficaz para provocar la fluorescencia del marcador detectable, donde opcionalmente la superficie del cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de entre 300 nm a 600 nm, y/o donde el cadáver de animal, la carne obtenida a partir de este, o el producto producido u obtenido a partir del animal se ilumina a una longitud de onda de 400 nm y la fluorescencia se detecta a 685 nm.
- 20 6. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde se ha alimentado al animal con la composición durante al menos 3 días antes del sacrificio, donde opcionalmente se ha alimentado al animal con una dosis diaria de al menos 2 g de marcador detectable por kg de ingesta de materia seca.
- 25 7. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el marcador detectable es sustancialmente estable durante la digestión en el tracto digestivo del animal.
- 30 8. Un método según cualquier reivindicación precedente, donde el producto producido u obtenido a partir del animal se selecciona entre huevos y leche.

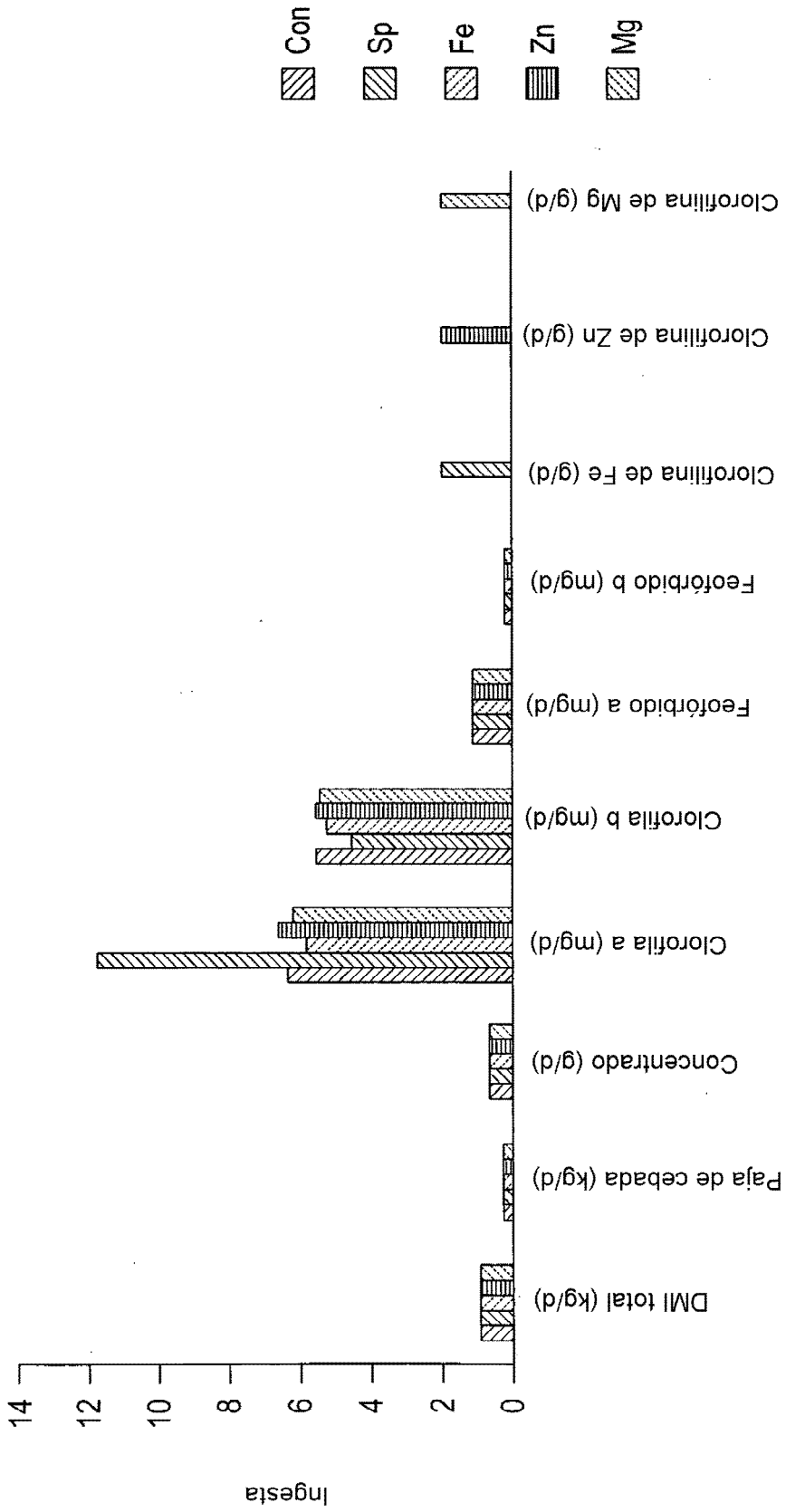


Fig.1



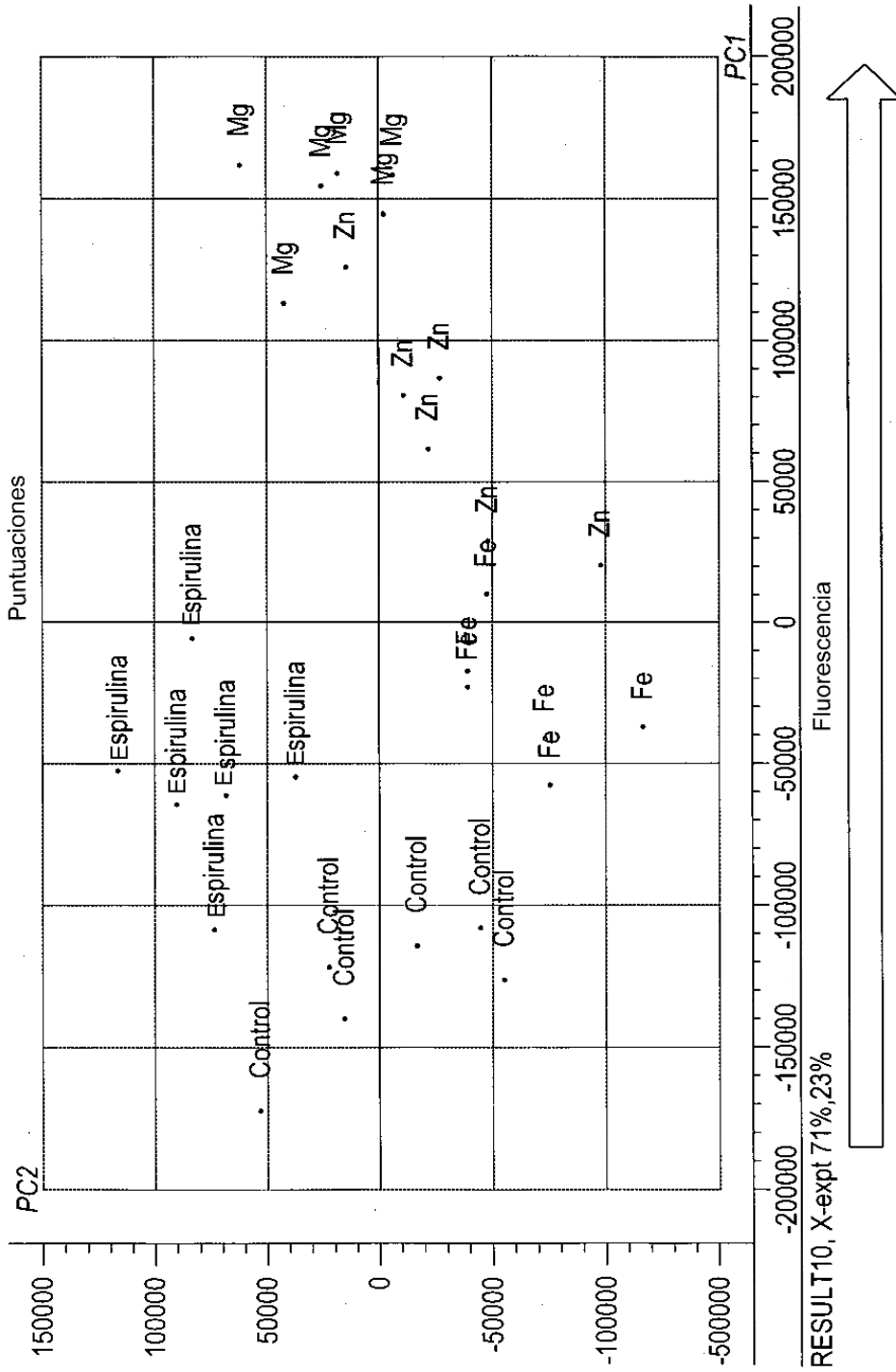
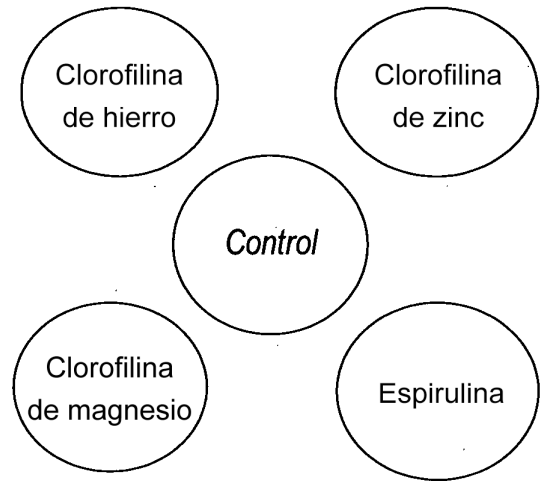


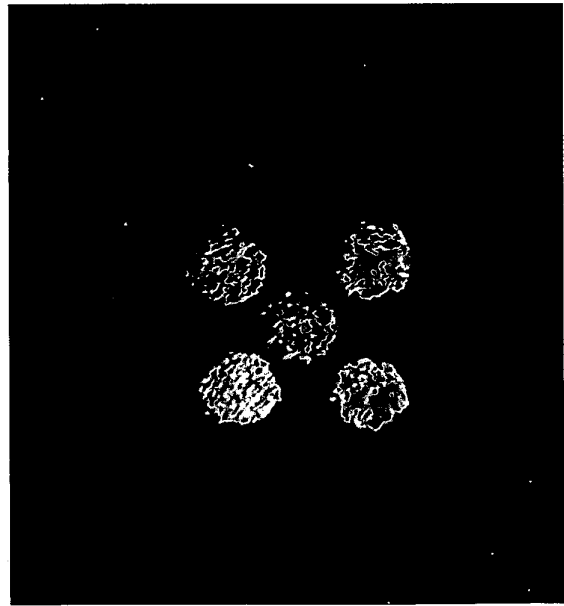
Fig.2



*Fig.3*



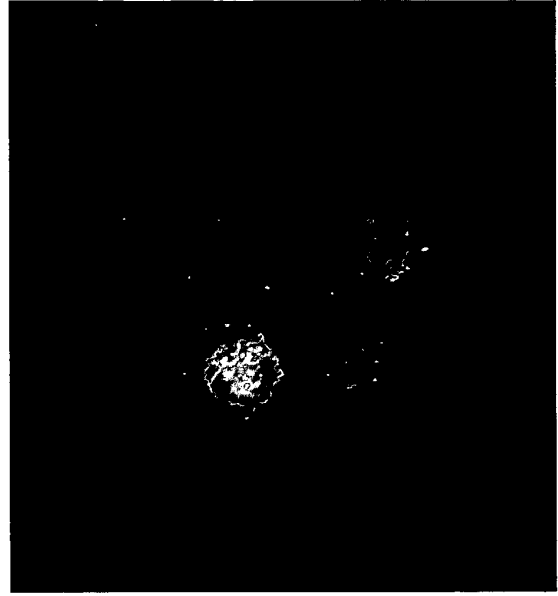
*Fig.4A*



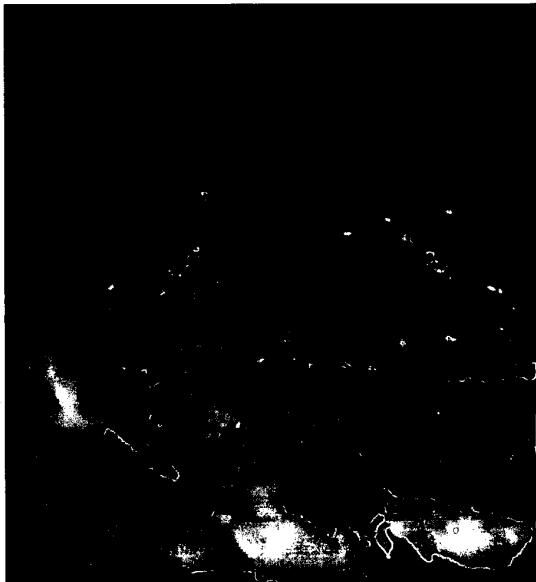
*Fig.4B*



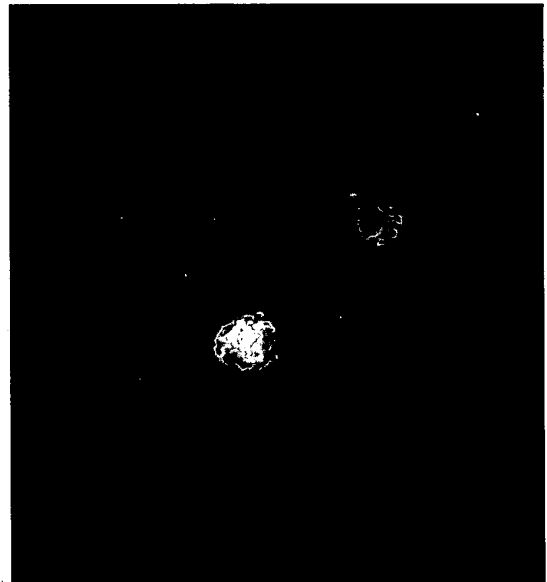
*Fig. 5A*



*Fig. 5B*



*Fig. 6A*



*Fig. 6B*

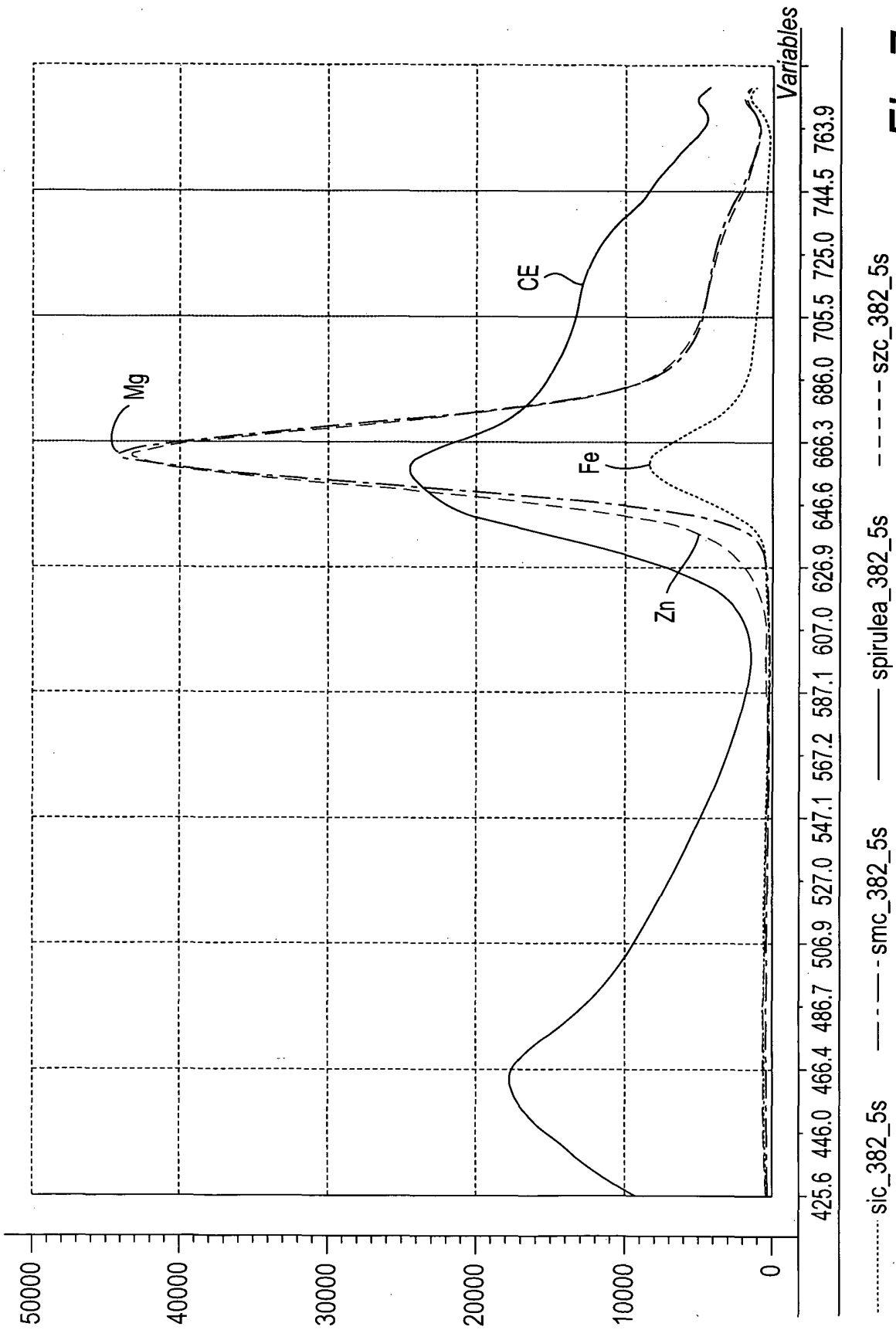


Fig.7

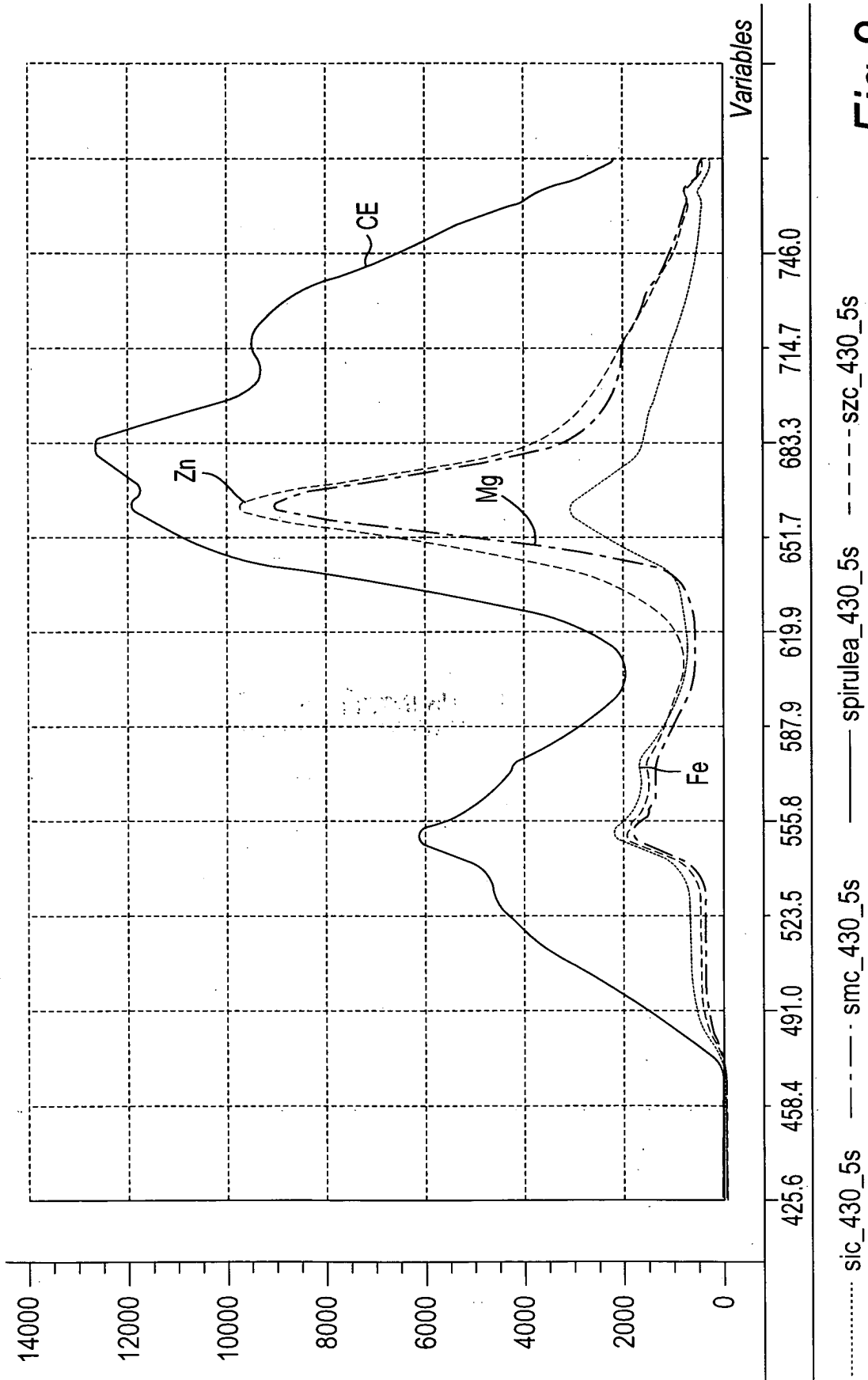


Fig.8