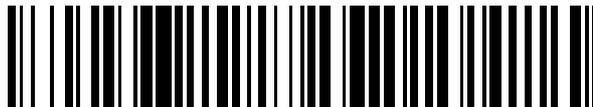


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 429**

51 Int. Cl.:

A23K 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2012 PCT/IB2012/054070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13027146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12770231 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2747578**

54 Título: **Método para obtener una cepa de bacteriófago, cepas específicas de bacteriófago y uso de las mismas**

30 Prioridad:

25.08.2011 PL 39608011

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

25.04.2019

73 Titular/es:

**PROTEON PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
ul. Tylna 3A
90-364 Łódź, PL**

72 Inventor/es:

**DASTYCH, JAROSLAW;
DZIADEK, JAROSLAW;
GÓRECKA, ELZBIETA;
RUMIJOWSKA-GALEWICZ, ANNA;
WOJTASIK, ARKADIUSZ y
WÓJCIK, EWELINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 710 429 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

Método para obtener una cepa de bacteriófago, cepas específicas de bacteriófago y uso de las mismas

5 La presente invención se refiere a un método para preparar una cepa de bacteriófago específica para una cepa de bacteria seleccionada, a cepas de bacteriófago obtenidas de este modo y a la aplicación de bacteriófagos para producir una preparación para prevenir y combatir infecciones de animales de granja, especialmente de aves de corral, por cepas bacterianas sensibles a estos bacteriófagos.

10 El objetivo de la invención es proporcionar una tecnología de producción para una preparación antimicrobiana adecuada para su uso como aditivo alimentario para aves de corral y cerdos que, al mismo tiempo, sería específica para cepas patógenas de *Salmonella spp* que provocan la aparición de la salmonelosis, especialmente en seres humanos. La preparación cumplirá los estrictos requisitos de seguridad para aditivos alimentarios. La prohibición del uso de antibióticos en los piensos para animales, válida en los países de la Unión Europea desde el 1 de enero de
15 2006, ha provocado una gran demanda de aditivos alimentarios que no contengan antibióticos pero que tengan un efecto antimicrobiano.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación que pueda reemplazar a los antibióticos usados en la actualidad.

20 Inesperadamente, dicha preparación se obtuvo con éxito en la presente invención.

El método para preparar una cepa de bacteriófago específica para una cepa seleccionada de bacterias, divulgado en la presente solicitud, se caracteriza por que:

25 a) se obtiene una colección de cepas de bacteriófago que contiene una cepa de bacteriófago específica para una cepa de bacterias seleccionada,
b) se lleva a cabo el cultivo de una cepa de bacterias seleccionada en un medio de cultivo estéril,
c) se aplican muestras del cultivo en una placa de medida multipocillo especial, añadiéndose posteriormente una
30 suspensión de las cepas de bacteriófago de ensayo a diversas concentraciones y se incuban a 37°C durante al menos 4 horas,
d) se añade resazurina al cultivo y se continúa con la incubación en la oscuridad a 37°C durante al menos 3 horas,
e) se controla el color de la fluorescencia del cultivo, así como que la cepa de bacteriófago contenida en el cultivo que conserva el color azul o que no muestra un aumento significativo en la fluorescencia en comparación con la
35 muestra de control, se identifica como una cepa de bacteriófago específica para una cepa de bacterias seleccionada. Como muestra de control se usa una muestra estéril que se había tratado con la misma incubación,
f) se propaga la cepa de bacteriófago identificada específica para una cepa de bacteria seleccionada.

40 De manera favorable, la cepa bacteriana seleccionada es una cepa de *S. enterica*, serovar Enteritidis.

El método divulgado es adecuado para una selección fácil y rápida de grandes colecciones de bacteriófagos y permite determinar fácilmente el título (fuerza lítica) de los fagos ensayados, que es esencial en aplicaciones industriales.

45 Por lo tanto, la primera materia de la invención es una cepa de bacteriófago para su uso en prevenir o combatir infecciones de las aves de corral, por cepas patógenas de *Salmonella sp.*, en donde dicha cepa de bacteriófago se administra con el alimento o la bebida a animales vulnerables en intervalos de uno a siete días y la cepa de bacteriófago es una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en PCM F/00069, PCM F/00070 y PCM F/00071.

50 La siguiente materia de la invención es una cepa de bacteriófago adecuada para la prevención o erradicación de la infección por cepas patógenas de *Salmonella sp.*, seleccionada entre el grupo que consiste en: PCM F/00069, PCM F/00070 y PCM F/00071, en donde dicha cepa de bacteriófago conserva su título en su orden de magnitud durante tres meses de almacenamiento a -20°C o 4°C. Por lo tanto, se usa la cepa de bacteriófago seleccionada entre el grupo que consiste en las cepas divulgadas en la presente solicitud, depositadas el 7 de junio de 2011 en la Colección Placa de Microorganismos, con los siguientes números de depósito: PCM F/00069 (cepa 8 sent 1748), PCM F/00070 (cepa
55 8 sent 65) y PCM F/00071 (cepa 3 sent 1).

La preparación divulgada en esta solicitud se basa en componentes naturales del ecosistema y no tiene una influencia desfavorable en organismos distintos de dichas bacterias patógenas específicas. Aunque los sustitutos comercialmente disponibles de los antibióticos están basados en sustancias que, como con los ácidos orgánicos, no modulan de manera específica la flora bacteriana, impidiendo hasta cierto punto el crecimiento de microorganismos no deseados, la preparación divulgada en la presente solicitud asegura que solo se reduzcan de manera selectiva cepas patógenas de *Salmonella spp*. De manera inesperada, también parece ser que la preparación no se mantiene en el cuerpo humano o animal, en caso de no haber *Salmonella spp* presente. En una realización particular, la preparación es adecuada para su uso en la producción animal, especialmente, para combatir la infección por
60 *Salmonella* en aves de corral.
65

Las cepas de bacteriófago divulgadas en la presente solicitud se identificaron mediante un proceso divulgado en la presente solicitud. Inesperadamente, muestran una gran especificidad que implica la lisis de al menos cuatro serotipos de *Salmonella* y se mantienen estables en condiciones de almacenamiento refrigerado durante al menos 3 meses. Además, pueden propagarse con éxito a escala industrial sin pérdida de actividad y no son específicas para las bacterias probióticas de *Lactobacillus*.

A fin de clarificar la invención, esta se ha ilustrado en las figuras adjuntas que presentan:

Figura 1: los perfiles de restricción para bacteriófagos seleccionados;

Figura 2: las gráficas de los parámetros monitorizados en los experimentos efectuados;

Figura 3: Imagen de muestra de placas de ELISA inmediatamente después de añadir la mezcla de reacción y después de tres horas de incubación. La densidad óptica DO_{600} de la suspensión usada de la cepa *S. enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076 que supone 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0, respectivamente, corresponde a la densidad de las células – 8×10^5 , $1,05 \times 10^6$, $7,0 \times 10^6$, $3,5 \times 10^7$, $1,4 \times 10^8$ y $3,8 \times 10^8$;

Figura 4: los resultados de la estabilidad térmica de bacteriófagos seleccionados, llevada a cabo a los tres meses en tres condiciones de temperatura diferentes;

Figura 5: resultados de las pruebas de citotoxicidad de las preparaciones de bacteriófago con el método de rojo neutro. Se añadió una preparación que contenía una mezcla estéril de bacteriófagos durante 24 h a cultivos de fibroblastos 3T3 de ratón y se evaluó la viabilidad celular con el uso de la prueba de captación de rojo neutro;

Figura 6: detección de bacilos de *Salmonella* en el experimento que se llevó a cabo;

Figura 7: El nivel de UFC de *Salmonella* en los órganos internos e intestinos de pollos de 21 días.

La descripción se ha complementado con los siguientes ejemplos, que sirven para ilustrar mejor la naturaleza de la invención. Sin embargo, estos ejemplos no han de identificarse con el alcance completo de la invención.

Ejemplo 1. Aislamiento y descripción de bacteriófagos

Establecimiento de un banco de cepas (serovar) de Salmonella más frecuentemente aisladas de seres humanos y animales de granja

El conjunto de 108 cepas de *Salmonella spp*, que consiste en las serovar más frecuentemente aisladas, se recogió según las necesidades del proyecto (Tabla 1). Estas cepas se aplican para determinar la especificidad de los bacteriófagos purificados. La colección está formada tanto por cepas de referencia disponibles en repositorios públicos como por aislados obtenidos mediante la colaboración de la compañía VETLAB (Brudzew, Polonia) y la Inspección Sanitaria Estatal.

Tabla 1. Lista de serovar de *Salmonella enterica* y sus orígenes.

N.º	Serovar	Número de cepas	Fuente
1	Berta	1	VetLab
2	Brandemburgo	1	Inspección Sanitaria Estatal
3	Coeln	1	VetLab
4	Colindale	1	VetLab
5	Derby	1	VetLab
6	Enteritidis	1	ATCC
		1	Inspección Sanitaria Estatal
		58	VetLab
7	Gallimarum Pullorum	1	VetLab
8	Hadar	2	VetLab
		1	Inspección Sanitaria Estatal
9	Heidelberg	1	VetLab
10	Infantis	6	VetLab
		1	Inspección Sanitaria Estatal
11	Mbandaka	1	VetLab

12	Moscú	1	VetLab
13	Newport	5	VetLab
14	Paratyphi	1	ATCC
15	Senftenberg	1	VetLab
16	Typhi	1	ATCC
17	Typhimurium	1	ATCC
		1	Inspección Sanitaria Estatal
		10	VetLab
18	Virchow	9	VetLab

Aislamiento de bacteriófagos de muestras ambientales que muestran actividad frente a serovar seleccionadas de cepas de Salmonella spp de referencia

- 5 Se aislaron bacteriófagos de muestras proporcionadas por las plantas de tratamiento de aguas residuales de Lodz, Polonia y Tuszyn, Polonia. Los estudios confirmaron que las muestras recogidas de la etapa de separación de arenas (cámara de arena), que es uno de los procesos de tratamiento de aguas residuales, son la fuente más rica de virus. Además, también se obtuvieron bacteriófagos de heces, proporcionadas por un granjero privado y la compañía VETLAB, que se especializa en el análisis de contaminación bacteriana en granjas. El aislamiento de fagos se llevó a cabo con el uso de cepas de referencia de *Salmonella enterica*, incluyendo las serovar Typhimurium, Enteritidis y 10 Typhi, así como varias cepas ambientales. Se describen con detalle varios fagos seleccionados (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de bacteriófagos obtenidos y sus cepas hospedadoras.

N.º	Bacteriófago	Fuente	Cepa hospedadora
1	1st1	Planta de tratamiento de aguas residuales	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium LT2
2	1sent3	Planta de tratamiento de aguas residuales	
3	1sent4	Planta de tratamiento de aguas residuales	
4	3sent1	Planta de tratamiento de aguas residuales	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis ATCC 13076
5	4sent1	Granja privada	
6	6sent1	Granja privada	
7	5sent1	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis 65/S/10
8	8sent65	VetLab	
9	8sent1748	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis 1748
10	2styp4	VetLab	
11	2styp5	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Typhi ATCC 13311
12	6styp1	Granja privada	

- 15 Todos los fagos previstos para investigaciones posteriores se purificaron con el uso del método de selección a fin de obtener una sola placa en las placas de LB (Luria-Bertani). Este procedimiento requirió aplicar al menos cinco veces el proceso de selección.

- 20 Inicialmente, se definió la especificidad de los virus aislados mediante el uso del método de placa determinando la capacidad lítica de los bacteriófagos aislados frente a 17 cepas de *S. enterica* seleccionadas, incluyendo 7 serovar diversas, 9 cepas de serovar Enteritidis aisladas de seres humanos y animales de granja, así como las cepas hospedadoras de bacteriófagos analizadas (Tabla 3). A fin de confirmar los resultados, se repitió tres veces la determinación de la especificidad de los bacteriófagos aislados.

Tabla 3. Especificidad de bacteriófagos seleccionados en relación con cepas de referencia y ambientales seleccionadas.

Bacteriófago \ Serovar de <i>S. enterica</i>	1st1	1sent3	1sent4	3sent1	4sent1	5sent1	6sent1	8sent65	8sent1748	2styp4	2styp5	6styp1
Typhimurium LT2	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Typhimurium 1751	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Typhi ATCC 13311	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Paratyphi A ATCC 19150	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Infantis 789	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Brandenburg 584	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Hadar 817	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Enteritidis D ATCC 13076	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Enteritidis 1748	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Enteritidis 65/S/10	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Enteritidis 249	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1014/S/09 K-1	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1192/S/09 K-8	+	-	+	+	-	+	nd	+	-	-	-	nd
Enteritidis 1250/S/09	+	-	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1446/S/09 K-31	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1535/S/09	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 2050/S/09 K-4	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd

nd – no determinado

5 Los fagos resultantes, propagados en la cepa hospedadora, se concentraron mediante PEG8000. Dichas muestras preparadas se sometieron al proceso de aislamiento de ADN genómico de los bacteriófagos estudiados. Este procedimiento emplea esferas de zirconio de 0,1 mm de diámetro. También emplea extracción con disolventes orgánicos y sistemas comerciales para el aislamiento de ADN genómico. El ADN resultante se emplea en (1) análisis de restricción (tres experimentos independientes que usan la enzima *EcoRI*) generando varios perfiles de restricción para diferentes bacteriófagos, que representa una caracterización génica inicial de los fagos (Fig. 1).

10 Se obtiene una caracterización genética más detallada mediante la secuenciación de genomas de bacteriófagos de la colección de los presentes inventores, llevada a cabo con el uso de técnicas de secuenciación de última generación, subcontratada con la compañía MacroGen. El análisis de los resultados de dicha secuenciación se lleva a cabo por el presente equipo de investigadores. Se determinó que las secuencias obtenidas hasta ahora del ADN genómico muestran una alta homología respecto del bacteriófago de la familia bien explorada, T5 y son bacteriófagos líticos.

Ejemplo 2. Fabricación de la preparación

20 *Determinación y optimización de las condiciones del proceso de propagación en un cultivo de Salmonella spp. a escala de laboratorio*

25 La optimización se llevó a cabo empleando la cepa *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076. Los parámetros tomados en consideración fueron los siguientes: volumen del inóculo de un cultivo bacteriano y bacteriófagos, tiempo del proceso de cultivo puro e incubación del cultivo infectado, temperatura del cultivo, nivel de aireación, pH del medio y condiciones necesarias para la inducción del ciclo lítico.

Se determinó que el volumen de inóculo de cultivo bacteriano óptimo era de 2×10^9 UFC para 0,5 l de medio de cultivo. Se llevó a cabo el proceso de cultivo optimizado hasta que la densidad óptica alcanzó el nivel de $DO_{600} = 0,5$, que se logró tras 3 horas de incubación. La temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$ parecía ser óptima para el crecimiento bacteriano. Se logró el nivel de aireación adecuado agitando a 220 rpm en el agitador New Brunswick. Se observó un crecimiento óptimo del cultivo en medio LB a pH 7,0. El proceso de optimización demostró que la adición de suspensión de bacteriófago al 10% que mostraba un título de 10^9 (50 ml por cada 500 ml de cultivo) es la cantidad de inóculo más favorable. Asimismo, el análisis mostró que la proporción óptima inicial de partículas de bacteriófagos y de células bacterianas es de 25:1. Además, los estudios de optimización revelaron que los bacteriófagos aislados muestran una naturaleza lítica y por consiguiente, no es necesaria la inducción del ciclo lítico.

El proceso de recuperación de bacteriófagos del cultivo se llevó a cabo mediante ultracentrifugación en una ultracentrifugadora Beckman L-80. Los cultivos bacterianos infectados con bacteriófagos tras un proceso de incubación adecuado (véase lo anterior) se centrifugaron inicialmente durante 30 minutos (3700 g). Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a tubos de ultracentrifugación de tipo Beckman y se ultracentrifugaron durante 2 horas (200 000 g). Este procedimiento permitió la purificación y la concentración simultánea de la preparación de fagos.

Optimización del cultivo de la cepa de referencia de Salmonella spp a escala de 10 litros

En la etapa siguiente de la optimización, se desarrolló un método de propagación de bacteriófagos en un biorreactor de 10 litros (8 litros de volumen de trabajo). Para este fin, se prepararon 8 litros de medio LB y se autoclavaron (durante 20 min $120\text{ }^\circ\text{C}$) en el biorreactor. Antes de la inoculación con 200 ml de la cepa *Salmonella* Enteritidis 65, se aireó el medio hasta el 90% - 100% y se calentó hasta $37\text{ }^\circ\text{C}$. El inóculo fue un cultivo bacteriano de 16 horas que mostraba una densidad óptica de aproximadamente $DO_{600} = 5,0$ ($4,5\text{-}5 \times 10^9$ UFC/ml). Tras la inoculación del medio, se tomó una muestra para medir la densidad óptica (DO_{600}) de cultivo inicial de *Salmonella* Enteritidis 65. Se monitorizaron los parámetros cruciales del cultivo y el título final de los bacteriófagos propagados (Tablas 4 y 5). El cultivo se llevó a cabo en un biorreactor con aireación constante a 1,3 lpm (volumen de aire suministrado al medio durante 1 minuto) y agitando a 50 rpm. Tras 40 minutos del proceso, se tomaron muestras cada 30 minutos para la determinación de la densidad óptica del cultivo (DO_{600}). Cuando se logró el valor de densidad óptica (DO_{600}) de 0,48-0,55, se añadió una suspensión de bacteriófago 3sent1 de título adecuado en el cultivo, en los volúmenes siguientes:

- 800 ml en el caso del experimento 1,
- 700 ml en el caso del experimento 2, así como
- 200 ml en el caso de los experimentos 3 y 4.

A partir de este instante, el cultivo se llevó a cabo durante 4 horas con aireación y agitación constante (véase lo anterior). Se monitorizaron los cambios de la densidad óptica y la cinética de propagación de fagos tomando muestras cada hora. Durante el proceso, se monitorizaron los parámetros de cultivo, incluyendo el pH, pO_2 (nivel de aireación indicado en %), la temperatura del medio y el nivel correcto de agitación. Cada parámetro monitorizado se registró mediante el uso un programa informático diseñado para documentar el transcurso del proceso de cultivo (Figura 2), salvo el experimento 1, debido a problemas químicos experimentados durante la inicialización del programa informático. Durante los experimentos efectuados, se observaron una reducción progresiva del nivel de oxígeno disuelto en el medio (aumento de consumo de oxígeno por células bacterianas debido a su crecimiento en el cultivo), así como pequeñas fluctuaciones de pH dentro del intervalo de 7,2-6,7.

Independientemente del volumen de suspensión de fago (de 200 a 800 ml con un título de $1,3\text{-}2,3 \times 10^9$ UFP/ml), se logró un título elevado de bacteriófago propagado de aproximadamente 10^9 UFP/ml.

Tabla 4. Parámetros de propagación de los fagos 3sent1 en 10 litros de cultivo de la cepa de *Salmonella* Enteritidis 65

	Volúmenes aplicados [ml]			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Inóculo bacteriano	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
Suspensión de fago	800 ml	700 ml	200 ml	200 ml
	DO_{600}			
Comienzo del proceso	0,097	0,089	0,070	0,070
Antes de la adición de suspensión de fago	0,488	0,501	0,501	0,535
1 h de propagación de fago	0,589	0,720	0,856	0,477
2 h de propagación de fago	0,150	0,286	0,632	0,198

	Volúmenes aplicados [ml]			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
3 h de propagación de fago	0,110	0,210	0,372	0,160
4 h de propagación de fago	0,068	0,182	0,320	0,166

Tabla 5. Número de partículas de fago 3sent1 propagadas.

	Densidad de la suspensión de fagos [UFP/ml]			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Suspensión de fago inicial	2,32x10 ⁹ UFP/ml	1,17x10 ⁹ UFP/ml	1,33x10 ⁹ UFP/ml	1,44x10 ⁹ UFP/ml
1 h de propagación de fagos	6,20x10 ⁹ UFP/ml	1,05x10 ⁹ UFP/ml	1,42x10 ⁹ UFP/ml	4,94x10 ⁹ UFP/ml
2 h de propagación de fagos	5,54x10 ⁹ UFP/ml	4,32x10 ⁹ UFP/ml	5,98x10 ⁹ UFP/ml	3,90x10 ⁹ UFP/ml
3 h de propagación de fagos	6,26x10 ⁹ UFP/ml	3,84x10 ⁹ UFP/ml	5,72x10 ⁹ UFP/ml	5,80x10 ⁹ UFP/ml
4 h de propagación de fagos	7,94x10 ⁹ UFP/ml	4,16x10 ⁹ UFP/ml	4,26x10 ⁹ UFP/ml	3,16x10 ⁹ UFP/ml

5 Tras 4 horas de proceso de propagación de bacteriófago, se centrifugó todo el contenido del biorreactor durante 30 minutos a 4 °C a una velocidad de 4500 rpm/min. Ya que los parámetros técnicos aplicados no son lo suficientemente eficaces para la separación precisa de la biomasa del medio, se microfiltraron dos veces las partículas de fago contenidas en el sobrenadante mediante el uso de un sistema de filtración de flujo cruzado con casetes de membrana para la separación del resto de la biomasa y la esterilización de la preparación de fago obtenida.

10 **CONCLUSIONES:** Los procesos biotecnológicos realizados permitieron a los presentes inventores describir restricciones iniciales para el método de propagación de partículas de fago usando cultivo de la cepa de *Salmonella spp* a escala de biorreactor de 10 litros.

- 15 • Volumen de medio – 8 litros;
- Volumen de inóculo de *Salmonella* Enteritidis 65 (DO₆₀₀ = 5; 4,5-5 x 10⁹ UFP/ml) – 200 ml;
- Volumen de suspensión de fago (título de 10⁹ UFP/ml) – 200 ml;
- Tiempo del proceso de propagación de partículas de fago – 3 horas;
- Parámetros de centrifugación – 30 minutos a 4 °C a una velocidad de 4500 rpm/min;
- 20 • Microfiltración en dos tiempos (membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm);
- Procedimiento de titulación de la preparación de fagos obtenida;

Desarrollo de la producción de la preparación y la tecnología de purificación

Etapas del proceso de fabricación de la preparación de bacteriófago

25

1. Cultivo en biorreactor.

30 Proceso de propagación de partículas de bacteriófago en la primera etapa de la línea de producción. Esto se realiza inoculando un cultivo bacteriano de *Salmonella* en un biorreactor (condiciones descritas anteriormente) con suspensión de partículas de bacteriófago. Durante el proceso de cultivo, las partículas de fago se propagan en células bacterianas, lo que provoca la lisis celular. Cada uno de los tres bacteriófagos ha de propagarse en un cultivo separado. Hasta ahora en la presente investigación, se ha empleado un biorreactor clásico de 10 litros (8 litros de volumen de trabajo). A fin de llevar a cabo este tipo de cultivo, se usan componentes previamente preparados, incluyendo (1) inóculo bacteriano y (2) suspensión de bacteriófago que se añade tras lograr una densidad óptica (DO₆₀₀) adecuada del cultivo bacteriano. Tras la adición de la suspensión de fago, se lleva a cabo el cultivo de 3 a 4 horas y el proceso permite obtener un elevado título de un bacteriófago propagado al nivel de aproximadamente 10⁹ UFP/ml. Una vez se ha terminado el procedimiento de propagación, se transfiere el cultivo de un modo estéril a la siguiente etapa del procedimiento de producción mediante una bomba peristáltica. En el futuro, se planea la aplicación en la línea de producción de biorreactores de 100 litros o en bolsas de biorreactor avanzadas de un solo uso (hasta 40 15 litros), que anteriormente reemplazaron con éxito a los biorreactores clásicos.

2. Retirada de la biomasa.

45 Ya que no es posible la lisis total del cultivo bacteriano durante el proceso de incubación de biorreactor, es necesaria una etapa de separación posterior de la biomasa del líquido de cultivo que contiene fago. Por lo tanto, en la primera etapa, el cultivo se transfiere a una centrifugadora y después, se lleva a cabo un proceso de microfiltración dos veces usando un sistema de filtración de flujo cruzado que contiene una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm. Este procedimiento permite obtener una suspensión estéril de bacteriófago con una reducción muy pequeña en el título de partículas de fago. Una vez que se ha finalizado el proceso de filtración, la suspensión se transfiere de manera estéril a la etapa siguiente del proceso de producción mediante una bomba peristáltica. En el futuro, se planea la expansión de esta etapa de la línea de producción adquiriendo sistemas de filtración adicionales. Esto podría permitir el

50

tratamiento del material biológico obtenido de un solo cultivo de biorreactor sin necesidad de limpiar y esterilizar el equipo de filtración durante esta etapa.

3. Concentración de producto (opcional).

Dependiendo de la demanda de producto, puede concentrarse la suspensión de bacteriófago 10 veces, lo que permite aumentar el número de partículas de fago en un volumen dado. Por lo tanto, se emplea un sistema de filtración cruzada con membrana de ultrafiltración con un corte de 30 o 50 kD (dependiendo del fago). Este proceso permite una concentración de las partículas de fago de 7,5 veces.

4. Eliminación de la contaminación de endotoxina potencial.

A fin de eliminar las endotoxinas restantes tras la lisis de células bacterianas inducida por los bacteriófagos durante el proceso biotecnológico, se planea la aplicación de columnas de adsorción especiales. Estas columnas contendrán una resina adecuada para eliminar endotoxinas con un tamaño y una capacidad que depende del volumen de la preparación que contiene fago.

5. Preparación del producto en fase líquida.

En esta etapa, se prepara una mezcla de diferentes suspensiones de bacteriófago, obtenidas en los procedimientos descritos anteriormente. La mezcla ha de contener todos los bacteriófagos con un valor de título muy similar. La mezcla debe contener todos los bacteriófagos con un valor de título muy similar. Los bacteriófagos seleccionados para la preparación muestran una capacidad de lisis de un espectro más amplio de cepas bacterianas de *Salmonella spp* de la colección poseída. Posteriormente, la preparación se separa en porciones en condiciones estrictamente estériles. Además, durante este proceso, se somete nuevamente la suspensión final a esterilización mediante microfiltros de un solo uso (0,22 µm).

6. Microencapsulación (opcional)

Dependiendo de si el producto se necesita en forma líquida o sólida, se planea la implementación de la tecnología de microencapsulación a fin de atrapar las partículas de bacteriófago en cápsulas de alginato. El fin de esta etapa es generar cápsulas fácilmente absorbibles que pasen de manera segura a través del sistema digestivo y para liberar gradualmente las partículas de bacteriófago atrapadas en el lugar diana sin irritar al organismo completo.

Ejemplo 3. Investigación de la eficacia y seguridad de la preparación

Investigación *in vitro*

Desarrollo y optimización del método colorimétrico altamente eficiente y automatizado para medir la actividad de la preparación de bacteriófago

Se usó el reactivo disponible comercialmente, alamarBlue® para desarrollar el ensayo útil para medir la actividad lítica de bacteriófago. El alamarBlue® es un colorante indicador que permite una cuantificación rápida y precisa de la proliferación y la citotoxicidad, basada en la reacción cromática. Un reactivo fácil de usar aprovecha el fenómeno de una reacción de reducción-oxidación (REDOX) y durante el proceso, la resazurina cambia su color de azul (no fluorescente) a rojo (fluorescente) como resultado de la oxidación, que es una consecuencia de la actividad metabólica de la célula. El cambio de color es visible a simple vista. También puede medirse espectrofotométrica o fluorométrica. Debido a su falta de toxicidad celular, alamarBlue® es especialmente valioso para observar la diferenciación de células bacterianas en cultivos microbianos. Esta prueba se ajustó para su aplicación en una placa de ELISA de 96 pocillos y se elaboraron dos técnicas de medición. La primera estaba prevista para evaluar la actividad lítica de los bacteriófagos. Durante la prueba, se usó la denominada mezcla de trabajo fresca (preparada justo antes de la aplicación en la placa de ELISA), que consistía en alamarBlue® y solución estéril al 20% de Tween™80 (3 partes de alamarBlue® y 1 parte de solución estéril al 20% de Tween™) y se añadió a los pocillos que contenían la suspensión estudiada de la cepa de *Salmonella* con una densidad adecuada, así como a los pocillos rellenos tanto con suspensiones de células de *Salmonella* con una densidad adecuada como con la suspensión de bacteriófago estudiada con el título deseado. El procedimiento permite la determinación visual de la actividad lítica de las partículas de fago en relación con las cepas de *Salmonella* investigadas. El color azul de la mezcla de reacción de alamarBlue® + solución estéril al 20% de Tween™80 (3 partes de alamarBlue® y 1 parte de solución estéril al 20% de Tween™80) indica ausencia de crecimiento de la cepa de *Salmonella* y un alto efecto lítico de la concentración de bacteriófago adecuada. El cambio de color de la mezcla de reacción de alamarBlue® + solución estéril al 20% de Tween™80 (3 partes de alamarBlue® y 1 parte de solución estéril al 20% de Tween™80) de azul a rojo, provocado por la oxidación asociada con la actividad metabólica, indica el crecimiento de las células de *Salmonella* y la ausencia de o un bajo efecto lítico de la concentración de bacteriófago adecuada en relación con la cepa de *Salmonella* investigada.

A continuación se presenta un protocolo experimental detallado que permite la evaluación cuantitativa de la actividad lítica de los bacteriófagos, así como un dibujo que presenta los resultados de un experimento seleccionado llevado a

cabo para el bacteriófago 3sent1 en relación con la cepa de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076 (Figura 3).

- 5 1. Se añaden 100 µl de suspensión de cultivo de *Salmonella spp* con una densidad óptica (DO₆₀₀) adecuada en relación con el número adecuado de unidades formadoras de colonias (UFC/1 ml)¹ en cada pocillo de la primera fila en columnas de 1 a 12. En detalle: suspensión con la densidad óptica de 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0 en los pocillos de la placa: 1 y 7, 2 y 8, 3 y 9, 4 y 10, 5 y 11, así como 6 y 12, respectivamente.
- 10 2. Se añaden 100 µl de suspensión de fago a una concentración de 6,5 x 10⁹ UFP (unidades formadoras de placas) en cada pocillo de la primera fila en las columnas 1 a 6. La proporción de volumen de la suspensión bacteriana a la de fago es de 1:1.
- 15 3. De manera similar, se añaden 75 µl de suspensión de cultivo de *Salmonella spp* con una densidad óptica adecuada y 125 µl de suspensión de fago en los pocillos de la segunda fila. La proporción de volumen de la suspensión bacteriana a la de fago es de 1:1,5.
- 20 4. De manera similar, se añaden 50 µl de suspensión de cultivo de *Salmonella spp* con una densidad óptica adecuada y 150 µl de suspensión de fago en los pocillos de la tercera fila. La proporción de volumen de suspensión bacteriana a la de fago es de 1:3.
- 25 5. Preparación de los controles; se añade medio LB estéril en lugar de la suspensión de fago en cada pocillo de las filas primera, segunda y tercera de las columnas 7 a 12 (control de crecimiento de cepas de *Salmonella* de densidades concretas). Adicionalmente, se añade suspensión de fago en cada pocillo de las filas 6.^a, 7.^a y 8.^a en la columna 3 (control de la contaminación del medio aplicado para diluir el cultivo en el conjunto investigado y de control).
6. Se cubre la placa de Elisa con tapas estériles y se incuba durante 4 h a 37 °C. Tras la etapa de incubación, se añaden 50 µl de mezcla de reacción de alamarBlue® + solución estéril al 20% de Tween™80² en cada pocillo de la placa. Debido a la susceptibilidad de la mezcla de reacción a la luz, se protege la placa con papel de aluminio. Se continúa la incubación durante las 3 h siguientes a 37 °C. Se lleva a cabo una observación visual cada 30 minutos.

¹La relación entre la densidad óptica DO500 y el valor de UFC ha de determinarse experimentalmente en varias estrategias experimentales.

30 ²La mezcla ha de prepararse directamente antes de la aplicación en pocillos en la placa de ELISA (3 partes de alamarBlue® y 1 parte de solución estéril al 20% de Tween™80).

Puede aplicarse el protocolo modificado como una herramienta útil para la estimación del efecto protector de los bacteriófagos contra el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis. El cambio de color de la mezcla de reacción de mezcla reacción de alamarBlue® de azul a rojo, que está provocado por la oxidación asociada con la actividad metabólica, indica el crecimiento de las células de *Salmonella*. El color azul de la mezcla de reacción de alamarBlue® + solución estéril al 20% de Tween™80 indica un efecto protector de la suspensión de fagos, que previene el crecimiento de células de *Salmonella*. El protocolo detallado:

- 40 1. Se añaden 20 ml de medio LB a matraces cónicos de fondo plano de 100 ml y se autoclavan.
2. Se inoculan 20 ml de medio líquido LB con la cepa S. Enteritidis y se incuba el cultivo durante una noche a 37 °C con agitación (rpm = 150). La suspensión ha de almacenarse en el refrigerador a 4 °C durante no más de 1 semana y se trata como inóculo para los cultivos actuales.
- 45 3. Se inoculan 20 ml de medio LB estéril (en matraces Erlenmeyer de 100 ml) con 20 µl de cepa de S. Enteritidis y se incuba el cultivo durante 1 h a 37 °C con agitación (rpm = 150).
4. Se preparan diluciones adecuadas de la suspensión en LB. Las diluciones han de contener 2000, 200 y 20 células bacterianas en 1 ml. Se usan para experimentos con suspensión de fagos que muestran efecto protector.
5. Se mezclan 100 µl de la dilución adecuada de células bacterianas de S. Enteritidis con 100 µl de suspensión de bacteriófago y se añaden las mezclas en los pocillos secuenciales de una placa de titulación de 96 pocillos.
- 50 6. Preparación de los controles; diluciones adecuadas de suspensión de S. Enteritidis que servirá como control de crecimiento bacteriano, así como la suspensión de bacteriófago y un medio LB transparente como los controles de la contaminación microbiana.
7. Se cubre la placa de titulación con una placa y se incuba durante 4 h a 37 °C.
8. Se cubre la placa con una tapa y se protege con papel de aluminio contra la luz y después se continúa la incubación durante las 4 h posteriores a 37 °C. Se lleva a cabo la lectura, tras 4 horas del proceso de incubación.

Investigación de la estabilidad térmica de los bacteriófagos

60 Se llevó a cabo el análisis de la estabilidad térmica del almacenamiento de bacteriófagos durante 3 meses a tres temperaturas diferentes: -20 °C, + 4 °C y a temperatura ambiente. La estabilidad se midió determinando el título de fago mediante recuento de placas al comienzo del experimento, tras un mes y tras tres meses de almacenamiento en las temperaturas mencionadas anteriormente. Los bacteriófagos se suspendieron en medio LB tras la propagación y purificación de las células bacterianas. Los resultados indican que algunos de los bacteriófagos de la colección existente, a saber, 3sent1, 8sent65 y 8sent1748 (Fig. 4) conservan su título en el orden de magnitud en tres meses de almacenamiento a -20 °C o 4 °C, al contrario que otros fagos: 1st1 o 2styp5 (Fig. 4), lo que es importante en vista de la durabilidad.

*Investigación de la seguridad de la preparación de bacteriófago*Determinación del nivel de endotoxina

5 La determinación de la concentración de endotoxina (LPS), el principal componente de la pared celular de bacterias gramnegativas se llevó a cabo usando la prueba de LAL (*lisado de amebocito limulus*). Las pruebas de LAL se encuentran disponibles en forma de kits listos para usar para la medición colorimétrica del nivel y la actividad de LPS:

- 10 1. Kit producido por Genscrot (kit de ensayo de endotoxina ToxinSensor LAL).
2. Kit producido por LONZA (ensayo de LAL cromogénico QCL-1000 Endpoint).

15 En estas pruebas, el reactivo de LAL interactúa con la endotoxina en las muestras analizadas, dando como resultado la producción de un producto de reacción que es capaz de reaccionar con sustrato cromogénico, siendo posible de este modo la medición espectrofotométrica. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de endotoxina.

20 Se tomaron muestras que contenían fago de diferentes etapas del proceso tecnológico (evaluación de la eficacia de ultracentrifugación – muestras A1-A2 y concentración de partículas de fago usando diferentes cortes de membrana: 100 kDa – muestras B1-B5 y 50 kDa – muestras C1-C7) y se analizó el nivel de endotoxina. Los resultados obtenidos indican la presencia de alta cantidad de LPS en muestras tomadas tras la etapa de concentración de partículas de fago (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la concentración de LPS en muestras analizadas.

N.º de muestra	Descripción	Concentración de LPS UE/ml
A1	Muestra que contiene sedimentos (fagos) tras la ultracentrifugación, suspendida en tampón SM	>10 ⁶
A2	Muestra que contiene sobrenadante tras la ultracentrifugación	106 345
B1	Muestra inicial – medio que contiene fagos tras la separación de las células bacterianas y la esterilización	>10 ⁶
B2	Preparación concentrada 10 veces (fase retenida)	156 389
B3	Permeato – líquido filtrado a través de una membrana de concentración	4 888
B4	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como permeato	55
B5	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como fase retenida	0,5
C1	Muestra inicial – medio que contiene fagos tras la separación de las células bacterianas y la esterilización	211 327
C2	Permeato – líquido filtrado a través de una membrana de concentración	25
C3	Preparación concentrada 10 veces (fase retenida)	1,36 x 10 ¹⁰
C4	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como fase retenida (primera muestra, 100 ml)	1,69 x 10 ⁹
C5	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como fase retenida (segunda muestra, 200 ml)	1,32 x 10 ⁹
C6	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como fase retenida (tercera muestra, 200 ml)	1,05 x 10 ⁸
C7	Suero salino usado para enjuagar la membrana al final del proceso de filtración, recogido como fase retenida (cuarta muestra, 500 ml)	1 549

25 *Análisis de citotoxicidad*

30 Se llevó a cabo una investigación mediante un ensayo de captación de rojo neutro. La prueba se llevó a cabo con placas de 96 pocillos usando la línea celular 3T3. Las células 3T3 son fibroblastos procedentes de ratón no transformados usados convencionalmente para ensayos de toxicidad *in vitro*. El análisis se llevó a cabo en la preparación que contenía una mezcla de tres fagos diferentes en 4 diluciones seriadas. Las mediciones se llevaron a cabo en duplicados y en 5 repeticiones independientes. Los valores de absorbancia obtenidos se usaron para calcular el % de viabilidad de las células, comparando la absorbancia de la muestra analizada con la absorbancia de la muestra de control (es decir, células incubadas en medio de cultivo) (Figura 5).

35 Pruebas de citotoxicidad usando la línea celular 3T3:

1. Se ponen 10 000 fibroblastos 3T3 suspendidos en medio de cultivo estándar a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incuban durante 24 horas en la incubadora (37 °C; CO₂ al 5%).

2. Se retira el medio de cultivo y se añade la preparación de bacteriófago diluida en medio de cultivo. Se continúa la incubación durante las 24 horas siguientes (37 °C; CO₂ al 5%).

3. Tras la incubación, se retira el medio que contiene la preparación de fago, se lava la monocapa de fibroblastos con PBS y se incuba con solución de rojo neutro en PBS durante 3 horas (37 °C; CO₂ al 5%).

5 4. Se retira la solución de rojo neutro, se lava con PBS y se induce la lisis celular. Se mide la cantidad de colorante rojo absorbida mediante un método colorimétrico.

10 Los resultados obtenidos indican ausencia de actividad citotóxica de la preparación de bacteriófago, incluso a elevadas concentraciones. Por consiguiente, no se espera la aparición de citotoxicidad aguda tras el uso de esta preparación *in vivo* a una concentración de fago de hasta 10⁸ partículas.

Investigación *in vivo*

15 *Determinación de la eficacia y seguridad del prototipo de preparación de fago aplicada contra la salmonelosis en pollos de engorde*

Se llevó a cabo el estudio en cooperación con la Universidad de Warmia y Mazury, así como de VETLAB.

20 **Objetivo:** Evaluar la posibilidad del uso de bacteriófagos en la protección contra infecciones por salmonelosis en pollos de engorde.

25 Se usó la cepa de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis 65/S/10 proporcionada por VETLAB para infectar a pollos de engorde, mientras que para preparar el agente de bacteriófago, se usaron tres bacteriófagos diferentes: 3sent1, 8sent65 y 8sent1748, aislados de dos cepas de *Salmonella enterica* (Tabla 3) y que mostraban un amplio espectro de especificidad contra diferentes serovar de *Salmonella*, así como contra las cepas de Enteritidis investigadas. Basándose en las especificidades de los bacteriófagos usados, puede deducirse la especificidad de la preparación completa (Tabla 7). La preparación de bacteriófago se preparó del siguiente modo: se sometió a cada uno de los tres bacteriófagos al procedimiento de propagación optimizado y posteriormente, se mezclaron las suspensiones de fago obtenidas, de tal forma que sus valores de título en el producto final eran similares. Se prepararon dos mezclas con diferentes concentraciones de fago: concentración elevada de 2,0 x 10⁸ UFP/ml y baja concentración, que contenía 30 2,0 x 10⁶ UFP/ml. Posteriormente, se separaron en porciones las mezclas y se esterilizaron usando microfiltración. El análisis de la contaminación microbiana no mostró presencia de bacterias en la preparación de bacteriófago usada.

Tabla 7. Especificidad asumida de la preparación basándose en la especificidad de los fagos incluidos.

Serovar	Cepa	3sent1	8sent748	8sent65	PREPARACIÓN
Typhimurium	LT2	+	+	+	+
	1751	-	+	-	
Typhi	ATCC 13311	+	+	+	+
Paratyphi	A ATCC 19150	-	+	-	
Infantis	789	-	-	-	
Brandenburg	584	+	+	+	+
Hadar	871	+	+	+	+
Enteritidis	D ATCC 13076	+	+	+	+
	1748	+	+	+	+
	65/S/10	+	+	+	+
	249	+	+	+	+
	1014/S/09 K-1	+	+	+	+
	1192/S/09 K-8	+	+	-	
	1250/S/09	+	+	+	+
	1446/S/09 K31	+	+	+	+
	1535/S/09	+	+	+	+
	2050/S/09 K-4	+	+	+	+
Granja "K" K-4	+	+	+	+	
Granja "K" K-3	+	+	+	+	

ES 2 710 429 T3

Granja "K" K-6	+	+	+	+
Granja "K" K-9	+	-	-	
Granja "K" K-10	+	+	-	
Granja "K" K-11	+	-	-	
Granja "K" K-12	+	-	-	
Granja "K" K-14	+	+	+	+
Granja "K" K-18	-	-	-	
Pac K-ground	-	+	+	
Pac K-floor	+	+	+	+
W/K-6	+	+	+	+
W/K-7	+	+	-	
W/K-9	+	+	+	+
64/S/10	+	+	+	+
65/S/10	+	+	+	+
517/8/09	+	+	+	+
571/S/09	+	+	+	+
833/S/09	+	+	+	+
838/S/09	+	-	+	
838/S/09 B	+	+	+	+
847/S/09	+	+	+	+
848/S/09	+	-	-	
865/S/09	+	+	+	+
866/S/09	+	+	+	+
945/S/09	+	+	+	+
975/S/09	+	+	+	+
1013/S/09 K-4	+	+	+	+
1021/S/09	+	+	+	+
1022/S/09 K-9	+	+	+	+
1044/S/09 K-2	+	-	+	
1047/S/09 K-1	+	+	+	+
1048/S/09 K-8	+	+	+	+
1061/S/09 K-5	-	-	-	
1067/S/09 K-2	+	-	-	
1067/S/09 K-3	+	+	+	+
1085/S/09 MEK	+	+	+	+
1106/S/09 K-1	+	+	+	+
1143/S/09	+	+	+	+
1171/S/09	+	+	+	+
230+/S/09 MEK	+	+	+	+
1231/S/09	+	+	+	+
1250/S/09	+	+	+	+

1257/S/09 K-7	+	+	+	+
1422/S/09 MEK	+	+	+	+
1445/S/09 K- 46	+	-	+	
1465/S/09 MEK	+	+	+	+
1535/S/09	+	+	+	+
1542/S/09 NWJ	+	+	+	+
1545/S/09 MEK	+	-	+	
1572/S/09 NWJ	+	+	+	+
1573/S/09 NWJ	+	+	+	+
1714/09	+	+	+	+
1748	+	+	+	+
2149/09	+	+	+	+
2619/S/10	+	+	+	+

Procedimiento experimental

5 Se usaron para la investigación ciento cincuenta pollos de engorde Ross 308, se dividieron aleatoriamente en 5 grupos aislados iguales (habitaciones separadas- cajas). Se alimentó a los pollos con alimento estándar completo, producido por Agrocentrum Kolno, Polonia y se mantuvieron en condiciones que cumplieran con las recomendaciones del fabricante de materiales biológicos. Se infectó a los pollos de cuatro días de edad de las cajas 1, 2 y 3 con bacilos de *Salmonella* Enteritidis con una dosis de 1×10^5 UFC por animal (Tabla 8). No se infectó a los pollos de las cajas 4 y 5 con bacilos de *Salmonella*. Se administró la preparación de bacteriófago a los pollos colocados en las cajas 1 (baja concentración de $2,0 \times 10^6$ UFP/ml, macada como F_N), 2 y 5 (alta concentración de $2,0 \times 10^8$ UFP/ml, marcada como F_W). La preparación se administró a los pollos una vez al día durante los primeros 14 días de sus vidas. El agente de bacteriófago no se administró a los pollos de las cajas 4 y 5. El tiempo de crianza fue de 21 días y durante este periodo, solo murieron cinco pájaros de diferentes cajas (Tabla 8). Ya que la tasa de mortalidad detectada era mínima y no dependía de un grupo de pollos determinado, la tasa de mortalidad no podía considerarse el resultado de la administración de la preparación de bacteriófago.

Tabla 8. Esquema de administración de bacterias y bacteriófagos, así como viabilidad de las aves.

Caja	Infección por <i>Salmonella</i>	Administración de bacteriófago	Viabilidad de las aves
1	1×10^5 UFP/ave	$2,0 \times 10^6$ UFP/ml	30/30
2	1×10^5 UFP/ave	$2,0 \times 10^8$ UFP/ml	29/30
3	1×10^5 UFP/ave		28/30
4			30/30
5		$2,0 \times 10^8$ UFP/ml	28/30

Detección de bacilos de *Salmonella*

20 Se recogieron muestras para la detección de bacilos de *Salmonella* de acuerdo con el esquema descrito a continuación (Figura 6):

- Investigación de las heces durante los 21 días del experimento,
- Investigación del lecho – se recogieron frotis de las patas en los días 3.º, 15.º y 21.º de la vida del ave,
- Investigación de hígado, bazo e intestino de pollos de engorde de 21 días de edad,
- Investigación de las cajas vacías antes de introducir los pollitos – se recogieron frotis de las paredes, comederos, bebederos y el suelo (control),
- Investigación de los pollitos de un día – órganos internos, intestinos y meconio (control).

30 La detección de la presencia de bacilos de *Salmonella* en las muestras analizadas se llevó a cabo por un laboratorio acreditado -VETLAB (Brudzew, Polonia). En 2008, este laboratorio recibió la autorización del Oficial Veterinario en

Jefe (n.º GIWhig-5120-23/08) para llevar a cabo la detección de bacilos de *Salmonella* mediante un método cuantitativo bacteriológico.

5 No se detectaron bacilos de *Salmonella* en las muestras analizadas de los órganos internos e intestinos de los pollitos de un día, el meconio, así como de frotis de las cajas antes de introducir los pollitos. La ausencia de bacilos de *Salmonella* o del diferente nivel de detección en el caso de análisis de heces de 21 días de experimento, así como el análisis de frotis individuales en los días 3.º, 15.º y 21.º de vida (Tabla 9) y el análisis de los órganos internos de los pollos de engorde de 21 días de edad (Figura 7) dependía de la caja que se estuviese investigando. Es decir, como se preveía, no se detectaron bacilos de *Salmonella* en pollos de las cajas 4 y 5. En el caso de los pájaros de la caja 10 3, que fueron infectados con bacilos de *Salmonella* y no se trataron con la preparación de bacteriófagos, los bacilos se detectaron comenzando en el sexto día de vida, mientras que en el caso de los pollos de las cajas 1 y 2, que fueron infectados con bacilos de *Salmonella* y tratados con el agente de fago, la inhibición de la propagación de las bacterias se observó claramente hasta que se detuvo la administración de la preparación de fago. Lo que es más importante, el número de bacilos detectado en los órganos internos y los intestinos de los pájaros de 21 días de edad fue muy baja en relación con los pollos que no fueron tratados con la preparación de fago. Por lo tanto, los bacteriófagos impiden la propagación de las bacterias y por consiguiente, la aparición de bacterias en las heces de aves infectadas durante el experimento. Por consiguiente, puede observarse que los bacteriófagos reducen en 200 veces el nivel de infección incluso una semana tras interrumpir el tratamiento con fago.

20 **Tabla 9.** Nivel de aparición de bacilos de *Salmonella* en las heces durante el experimento.

Día	Infección	Aparición de bacilos de <i>Salmonella</i>					Adición de fago
		Caja 1 FN+/S+	Caja 2 FW+/S+	Caja 3 F-/S+	Caja 4 F-/S-	Caja 5 FW+/S-	
1		-	-	-	-	-	Sí
2		-	-	-	-	-	Sí
3	$2,5 \times 10^3$	-	-	-	-	-	Sí
4		-	-	-	-	-	Sí
5		-	-	-	-	-	Sí
6		-	-	$1,0 \times 10^1$	-	-	Sí
7		-	-	+	-	-	Sí
8		-	-	$5,3 \times 10^3$	-	-	Sí
9		-	-	+	-	-	Sí
10		-	-	$1,0 \times 10^4$	-	-	Sí
11		-	-	+	-	-	Sí
12		-	$3,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^4$	-	-	Sí
13		-	-	+	-	-	Sí
14		-	$2,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	-	-	Sí
15		$4,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	-	-	No
16		+	+	+	-	-	No
17		$2,1 \times 10^2$	+	$3,0 \times 10^4$	-	-	No
21		$5,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	-	-	No

“-” significa que no se detectaron bacilos de *Salmonella*

“+” significa que se detectaron bacilos de *Salmonella*, pero que era difícil determinar su título

Detección de la aparición de bacteriófagos.

25 Las muestras analizadas respecto de la presencia de bacteriófago se recogieron durante los 21 días del experimento y de los frotis de todas las cajas antes de la introducción de pollitos, antes de la infección y también un día y una semana después de detener el tratamiento con fago. No se detectaron bacteriófagos en los órganos internos. Se observó que la ausencia de bacteriófagos o el diferente nivel de su detección en las heces de aves (Tabla 10) y los análisis de frotis de las patas (Tabla 11) dependen de la caja de pollo concreta que se esté analizando. Es decir, se detectaron bacteriófagos en las heces de los pollos de las cajas 1, 2 y 5, a los que se administró el agente de fago. Sin embargo, su número se redujo tras interrumpir el tratamiento y especialmente, en el caso de los pájaros de las 30 cajas 2 y 5, donde se usó una elevada concentración de fago, los fagos ya no fueron detectables. Cabe destacar que se detectó un número de bacteriófagos mucho menor en las heces de la caja 5, en comparación con las heces de la caja 2, lo que puede ser el resultado de la imposibilidad de propagación del fago debido a la ausencia de bacilos de *Salmonella*.

35

Tabla 10. Nivel de título de bacteriófago en heces de aves de corral.

Día	Título de bacteriófago				
	Caja 1 FN+/S+	Caja 2 FW+/S+	Caja 3 F-/S+	Caja 4 F-/S-	Caja 5 F+/S-
1	0	0	0	0	0
3	0	$1,8 \times 10^7$	0	0	$5,6 \times 10^2$
10	$8,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^4$	0	0	$5,0 \times 10^3$
15	$1,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^1$	0	0	$8,2 \times 10^2$
17	$1,7 \times 10^4$	0	0	0	0
21	$5,0 \times 10^1$	0	0	0	0

Tabla 11. Nivel de título de bacteriófago en frotis individuales analizados.

Día	Título de bacteriófago				
	Caja 1 FN+/S+	Caja 2 FW+/S+	Caja 3 F-/S+	Caja 4 F-/S-	Caja 5 F+/S-
Un día después de interrumpir el tratamiento con fago (15)	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	0	0	$2,4 \times 10^3$
Una semana tras interrumpir el tratamiento con fago (21)	$6,5 \times 10^5$	0	0	0	0

5 *Conclusiones de la investigación acerca del efecto de la preparación de bacteriófago en pollos de engorde*

Basándose en las pruebas efectuadas, se puede llegar a la conclusión de que la preparación es segura y eficaz.

1. La preparación es segura para aves de corral.
2. Los bacteriófagos pasan a través del tracto intestinal y alcanzan las heces y el lecho.
3. Los bacteriófagos no entran en los órganos internos de las aves.
4. Los bacteriófagos desaparecen tras interrumpir la administración de la preparación.
5. Los bacteriófagos impiden la aparición de bacterias en heces de las aves infectadas de manera experimental.
6. Los bacteriófagos reducen 200 veces el nivel de infección una semana después de haber interrumpido el tratamiento con fago.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de bacteriófago para su uso en prevenir o combatir infecciones de aves de corral, con cepas patógenas de *Salmonella sp*, en donde dicha cepa de bacteriófago se administra con el alimento o el agua a los animales vulnerables a intervalos de uno a siete días y la cepa de bacteriófago es una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en: PCM F/00069, PCM F/00070 y PCM F/00071.
- 10 2. Una cepa de bacteriófago adecuada para la prevención o erradicación de la infección por cepas patógenas de *Salmonella sp* seleccionada entre el grupo que consiste en: PCM F/00069, PCM F/00070 y PCM F/00071, en donde dicha cepa de bacteriófago conserva su título en el orden de magnitud a los tres meses de almacenamiento a -20 °C o 4 °C.

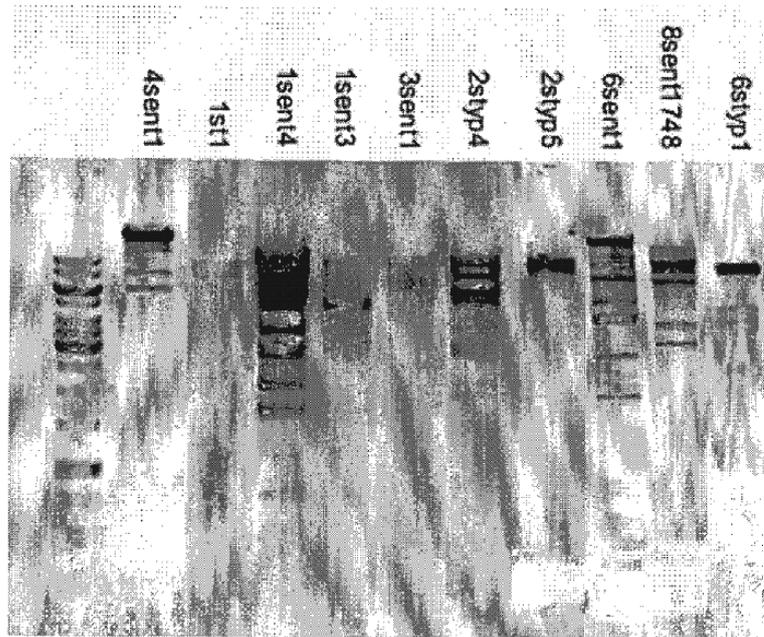


Fig. 1

***S. enteritidis* ATCC 13076**

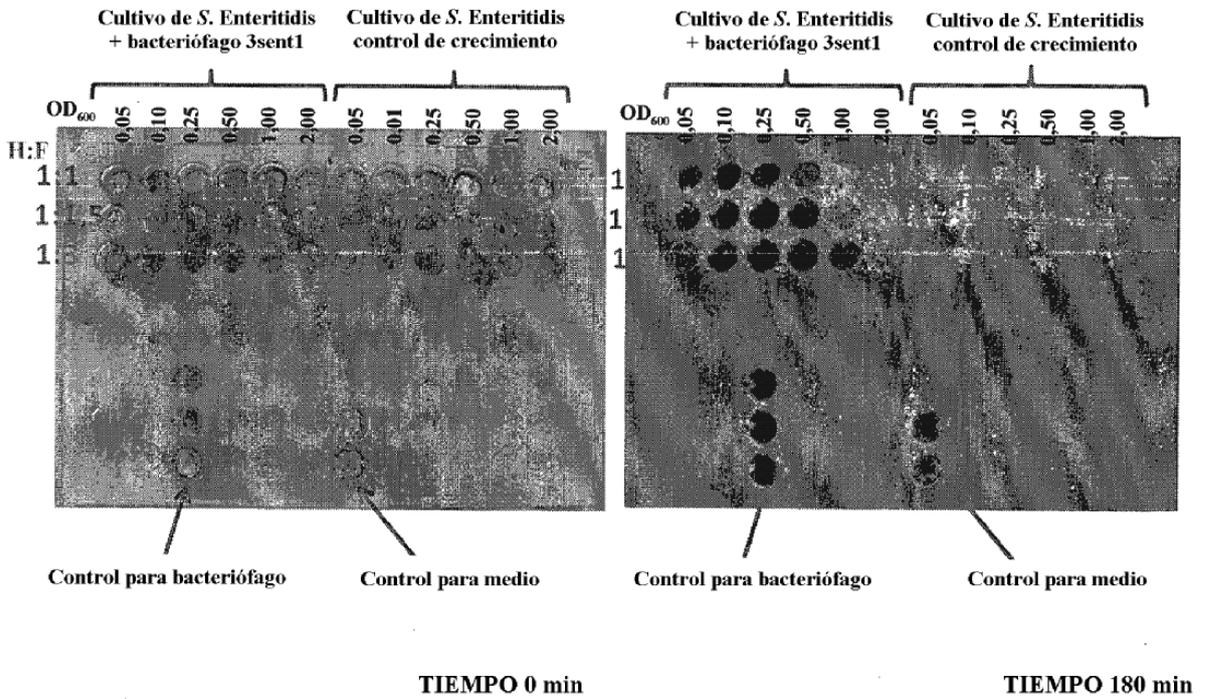


Fig. 3

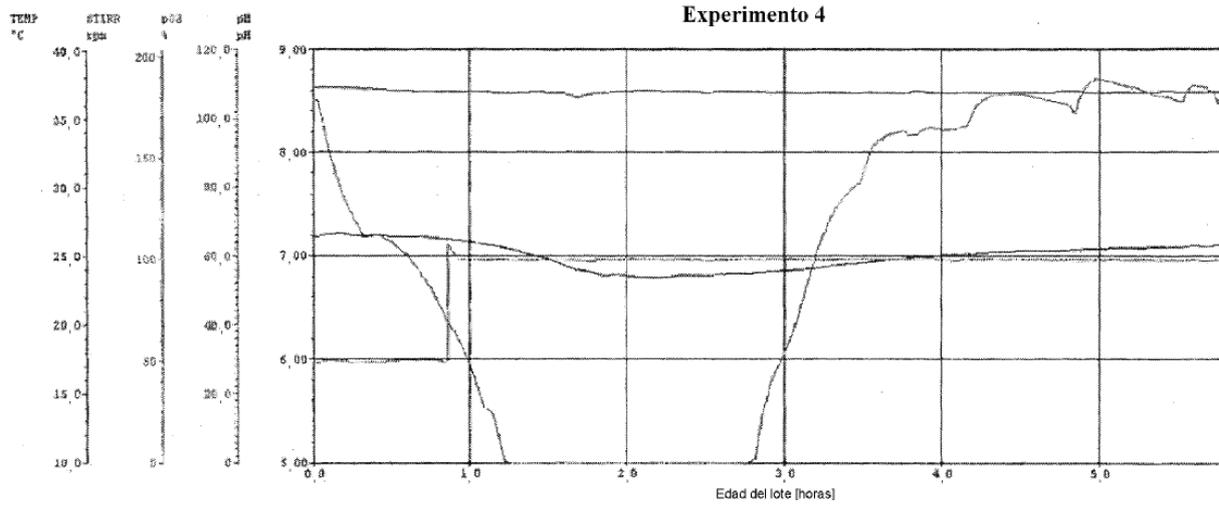
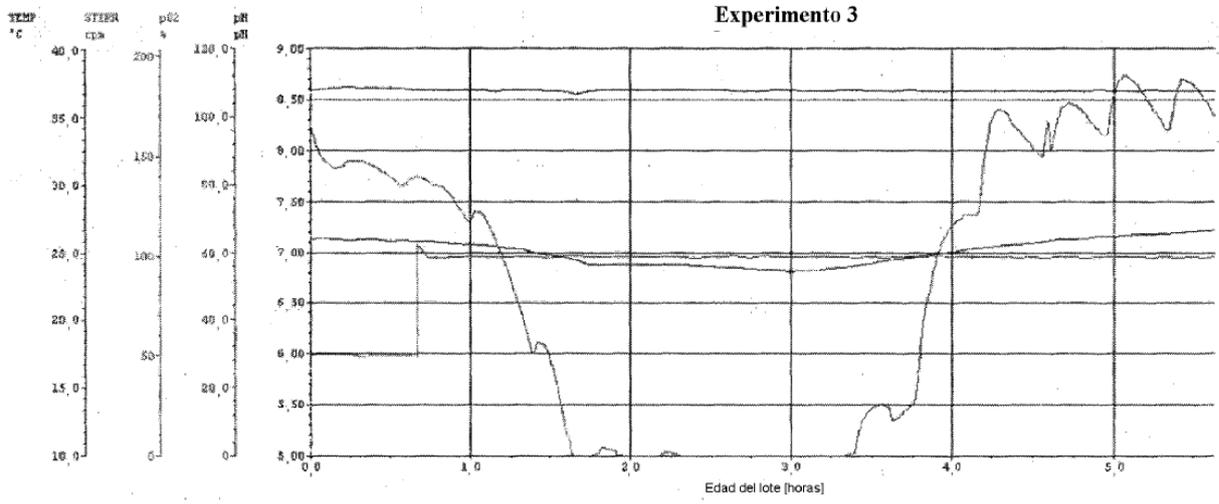
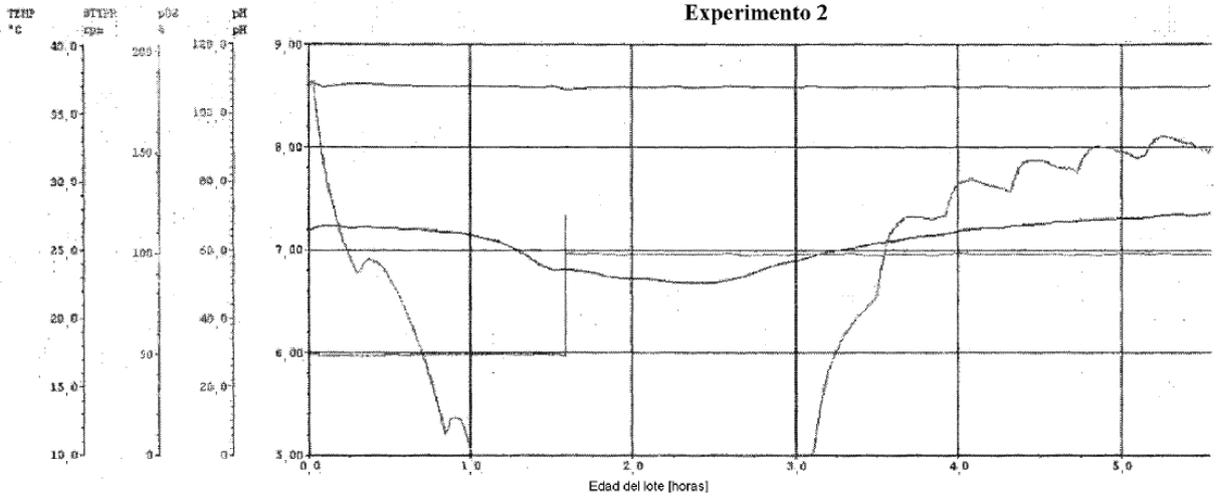


Fig. 2

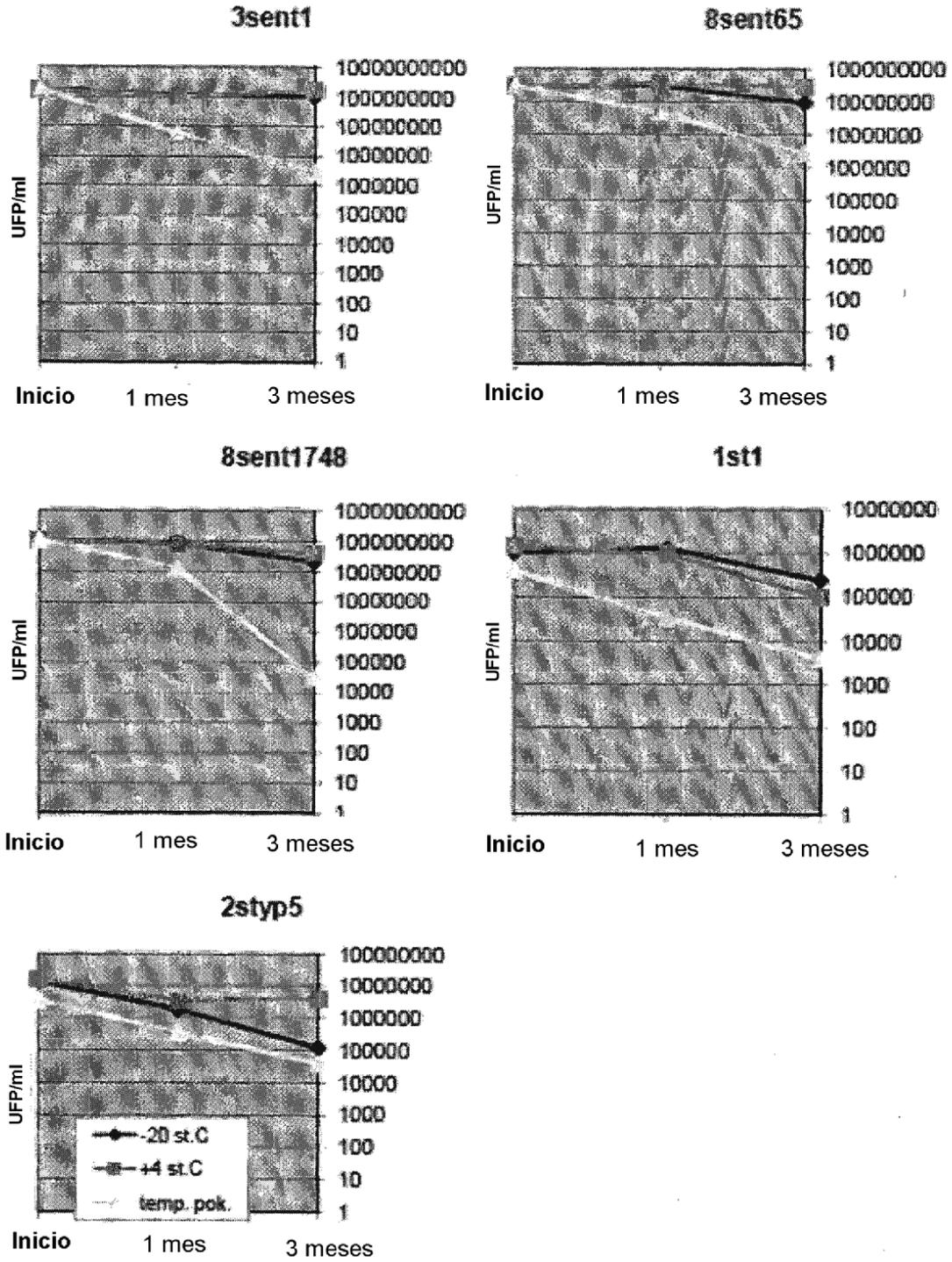


Fig. 4

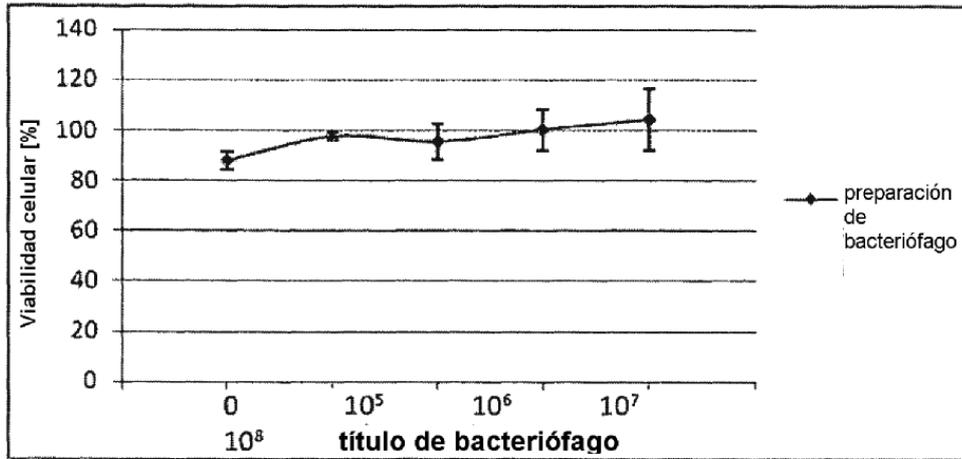


Fig. 5

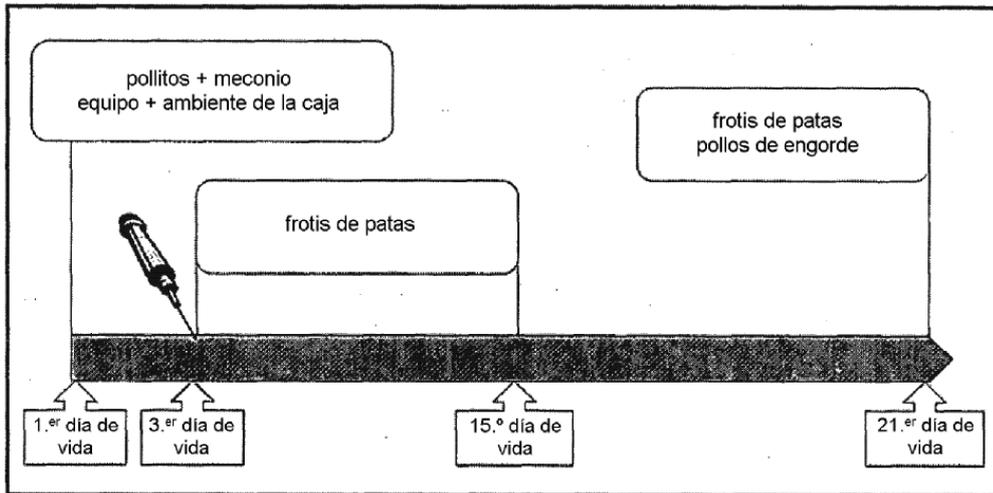


Fig. 6

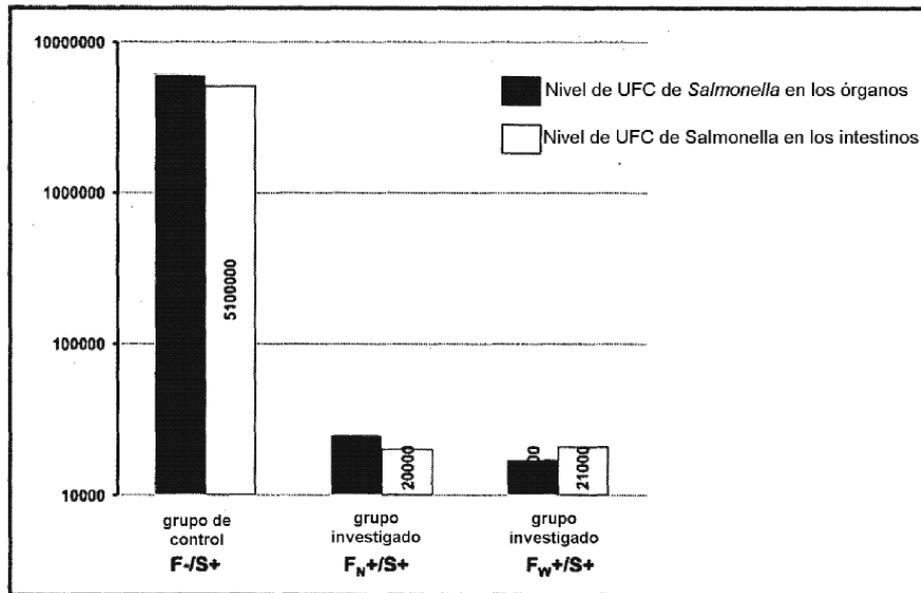


Fig 7