(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 790 391**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/07	(2006.01)
A61K 39/09	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)
A23K 10/18	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A23K 50/00	(2006.01)
A23K 50/75	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2013** **PCT/FR2013/051202**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013** **WO13178947**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2013** **E 13730003 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 2900077**

(54) Título: **Composición bacteriana destinada al tratamiento de la colibacilosis en las granjas, en particular las granjas avícolas, así como agua de bebida que contiene una composición bacteriana de este tipo**

(30) Prioridad:

30.05.2012 FR 1254976

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2020

(73) Titular/es:

NOLIVADE (100.0%)
Parc Tertiaire 1 rue Charles Nicolle
53810 Change, FR

(72) Inventor/es:

DE BRUEKER, MARC y
THEBAULT, STÉPHANE

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 790 391 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición bacteriana destinada al tratamiento de la colibacilosis en las granjas, en particular las granjas avícolas, así como agua de bebida que contiene una composición bacteriana de este tipo

La presente invención tiene por objeto una composición bacteriana destinada al tratamiento de la colibacilosis en las granjas de animales, en particular las granjas avícolas.

Las aves de corral constituyen la segunda carne más consumida en el mundo con de más 91 millones de toneladas en 2009.

La producción en Francia asciende a aproximadamente 1.650.000 Tec (tonelada equivalente de canal) de la que el 50% es de pollo, lo cual es considerable.

La infección por la bacteria *Escherichia coli* que representa una proporción muy grande de las infecciones bacterianas en las aves de corral constituye una auténtica plaga para los avicultores y puede conllevar pérdidas económicas muy importantes.

En las aves, la bacteria *Escherichia coli* corresponde generalmente a un agente contaminante oportunista que crea infecciones en presencia de diversos factores contaminantes: modo de explotación intensiva, condiciones de explotación (insuficiencia a nivel de la gestión de la calidad del agua, de la ventilación, del calentamiento,...), presencia de virus o de diversas bacterias patógenas,...

Estos factores contaminantes conllevan un debilitamiento y una inmunodepresión de los animales de manera que se permiten las infecciones por *E. coli* con todas las consecuencias nefastas que resultan de ello.

Para luchar contra esta plaga, los avicultores se esfuerzan por tomar un máximo de medidas preventivas sistemáticas para garantizar en sus granjas condiciones de higiene estrictas de manera que se impida lo máximo posible el desarrollo de organismos patógenos; para ello, realizan en particular operaciones de limpieza y de desinfección regulares de sus instalaciones, concretamente durante los periodos de vacío sanitario.

Otro imperativo esencial para combatir el desarrollo de organismos patógenos consiste en hacer lo necesario para que el agua de bebida de las aves de corral tenga siempre una calidad inmejorable incluso, y sobre todo, en los abrevaderos.

En paralelo a estos tratamientos preventivos, el único tratamiento curativo propuesto actualmente a los avicultores para tratar una colibacilosis ya manifiesta es la terapia con antibióticos que presenta numerosos inconvenientes.

En primer lugar, un tratamiento de este tipo es cada vez más difícil de recetar debido al sacrificio precoz de los animales, plazos de espera importantes,...

No obstante, el principal inconveniente de un tratamiento con antibióticos en la medicina veterinaria está asociado a los fenómenos crecientes de resistencia a los antibióticos; por consiguiente, para no favorecer la aparición de organismos multirresistentes a los antibióticos, las autoridades sanitarias están actualmente muy atentas en cuanto al uso de los antibióticos en granjas y, por este motivo, el uso de determinados antibióticos podría llegar a limitarse o incluso prohibirse a plazo más o menos largo.

Por tanto, sería deseable poder proponer a los avicultores un medio de tratamiento de la colibacilosis ya manifiesta que pueda constituir una alternativa a la terapia con antibióticos.

La invención tiene como objetivo proponer una composición de manera que se satisfaga esta demanda.

En el contexto anteriormente mencionado, se ha constatado según la invención que los granjeros y en particular los avicultores usan diferentes composiciones bacterianas que contienen, en particular, bacterias del género *Bacillus*, para limpiar o desinfectar sus instalaciones, concretamente durante los periodos de vacío sanitario.

También se ha establecido que las bacterias pueden actuar como agentes probióticos ocupando espacio en el tubo digestivo de los animales de manera que se impide el desarrollo en el mismo de bacterias patógenas tales como *E. coli*.

Ahora bien, se ha concebido que determinadas cepas de bacterias, concretamente de bacterias del género *Bacillus*, también podrían tener, además de sus propiedades probióticas, propiedades curativas para el tratamiento de la colibacilosis ya extendida, y se han realizado investigaciones empíricas para intentar aislar tales cepas.

Concretamente, a partir del estado de la técnica se conocen

- la solicitud WO1992012639 que describe el uso de lactobacilos para proteger el tracto intestinal de los animales, y en particular de las gallinas, frente a las bacterias patógenas,

- el artículo de Maneewan *et al*. Intern. J. Appl. Res. Vet. 2011, Med, vol. 9, n.º 4, páginas 382 a 387, que describe

dos cepas de bacterias del género *Bacillus* usadas en el contexto del tratamiento de la diarrea de los cerdos recién nacidos,

- la solicitud US20020146399 que describe el uso de diferentes bacterias en combinación con ácido sórbico como agente probiótico para animales,

- el artículo de Kyriakis *et al*, Reasearch in Veterinary Sciences, British Veterinary Association, Londres GB, 1999, vol. 67, n.º 3, páginas 223 a 228, que describe un agente probiótico que comprende esporas viables de *Bacillus licheniformis* y que se usa en el contexto de la diarrea de lechones provocada por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas,

- o incluso la solicitud KR20110125810A que describe una composición probiótica procedente de la corteza interna secada de los brotes de *Cinnamomum verum*, que comprende al menos un bacilo, un pediococo o un lactobacilo, para mejorar la salud de los animales y, en particular, la lucha contra las bacterias patógenas intestinales.

De este modo ha podido establecerse, según la invención, que de manera muy sorprendente cepas particulares de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus licheniformis* pueden actuar de manera sinérgica con determinadas cepas de bacterias lácticas para inhibir el desarrollo de los colibacilos en la aves de corral.

Puede describirse, por ejemplo, una composición bacteriana destinada al tratamiento de la colibacilosis en las granjas de animales, en particular las granjas avícolas, caracterizada porque contiene por un lado al menos 10^5 ufc/ml de al menos una de las cuatro cepas siguientes de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus licheniformis*: NOL 01, NOL 02, NOL 03 y NOL 04 y, por otro lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos una bacteria láctica elegida de las siguientes bacterias lácticas: *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1 cepa NOL 11 y *Pediococcus pentosaceus* 2 cepa NOL 12.

Además, la invención se refiere a una composición bacteriana para su uso en el contexto del tratamiento de la colibacilosis en las granjas de animales, en particular las granjas avícolas, caracterizada porque contiene

- por un lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos una de las siguientes cepas de *Bacillus subtilis*: NOL01 y NOL03,

- y, por otro lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos la bacteria láctica *Lactococcus lactis* spp. *lactis*,

en la que dichas cepas NOL01, NOL03 y NOL11 son las siguientes:

- la cepa NOL 01 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4606,
- la cepa NOL 03 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4607, y
- la cepa NOL 11 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4609.

Ventajosamente, la invención se refiere a la composición anteriormente mencionada para su uso descrito anteriormente, caracterizada porque contiene entre 10^5 y 10^9 ufc/ml de bacilos y entre 10^9 y 10^{10} ufc/ml de bacterias lácticas.

De manera ventajosa, la invención se refiere a la composición anteriormente mencionada para su uso descrito anteriormente, en la que dichos bacilos y dichas bacterias lácticas, están en forma esporulada y/o vegetativa.

De manera ventajosa, la invención se refiere a la composición anteriormente mencionada para su uso descrito anteriormente, caracterizada porque comprende una cualquiera de las siguientes composiciones:

- la cepa NOL 01 y la cepa NOL 11, y

- la cepa NOL 03 y la cepa NOL 11.

La invención también se refiere a un agua de bebida para animales de granja, en particular para aves de corral, caracterizada porque contiene la composición bacteriana anteriormente mencionada.

Además, la invención se refiere a una composición bacteriana caracterizada porque contiene

- por un lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos una de las siguientes cepas de *Bacillus subtilis*: NOL01 y NOL03,

- y, por otro lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos la bacteria láctica *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1 cepa NOL11,

en la que dichas cepas NOL01, NOL03 y NOL11 son las siguientes:

- la cepa NOL 01 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4606,
- la cepa NOL 03 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4607, y

○ la cepa NOL 11 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I-4609.

De manera ventajosa, la composición anteriormente mencionada caracterizada porque contiene entre 10^5 y 10^9 ufc/ml de bacilos y entre 10^9 y 10^{10} ufc/ml de bacterias lácticas.

De manera ventajosa, la composición anteriormente mencionada es tal que la que dichos bacilos y dichas bacterias lácticas están en forma esporulada y/o vegetativa.

De manera ventajosa, la composición anteriormente mencionada está caracterizada porque comprende una cualquiera de las siguientes composiciones:

- la cepa NOL 01 y la cepa NOL 11, y

- la cepa NOL 03 y la cepa NOL 11.

La composición según la invención puede contener ventajosamente entre 10^5 y 10^9 ufc/ml de bacilos y entre 10^9 y 10^{10} ufc/ml de bacterias lácticas.

Esta composición está destinada a añadirse al agua de bebida de los animales de granja, en particular de las aves de corral.

Por tanto, la invención también se refiere a un agua de bebida para animales de granja, en particular para aves de corral, caracterizada porque contiene la composición bacteriana anteriormente mencionada.

A modo de ejemplo, esta agua de bebida puede contener esta composición bacteriana en una cantidad de 10 a 100 ml en 1000 l.

La composición que constituye el objeto de la invención puede proponerse en forma de dosis que contienen bacterias en forma esporulada y/o vegetativa y que se presentan en cualquier forma, concretamente dosis congeladas y/o que se han sometido a un tratamiento de liofilización o de atomización.

En efecto, ha podido establecerse que, en una composición que se presenta con bacilos en forma esporulada, una proporción importante de esporas pueden devolverse al estado vegetativo y, por tanto, volver a ser activas en el tubo digestivo de la aves de corral.

Las cepas bacterianas que pueden estar contenidas en la composición que constituye el objeto de la invención se identificaron mediante su morfología así como mediante sus características biológicas y bioquímicas.

Los resultados de esta identificación se mencionan a continuación.

1/ Cepa: NOL 01

Género y especie: *Bacillus subtilis* o *licheniformis*

Morfología: bacilo gram-positivo largo en cadena

Características: Medio de cultivo: básico (PCA) o agar sangre

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre agar sangre y PCA:

Colonias jóvenes y aisladas: abombadas, brillantes

Prueba de la oxidasa positiva

Prueba de la catalasa positiva

Perfil de API 50CHB:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	+	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	+	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	+	30	D-Melibiosa	+
6	D-Xilosa	+	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	+
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-

10	D-Galaciosa	-	35	D-Rafinosa	+
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	+
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	+
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	-
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatosa	-
18	D-Manitol	+	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	+	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	-	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	+	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	+	49	5-Cetogluconato de potasio	-
25	Esculina-citrato de hierro	+			

2/ Cepa: NOL 02

Género y especie: *Bacillus subtilis*

Morfología: bacilo gram-positivo aislado o de dos en dos. Presencia de esporas.

Características: Medio de cultivo: básico (PCA) o agar sangre

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre agar PCA:

grandes, planas, redondas, secas, ancladas en el agar

Aspecto de las colonias sobre agar sangre:

no hemolíticas, contorno harinoso

Prueba de la oxidasa positiva

Prueba de la catalasa positiva

Perfil de API 50CHB:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	+	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	+	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	+	30	D-Melibiosa	+
6	D-xilosa	-	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	+
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-
10	D-Galaciosa	-	35	D-Rafinosa	+
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	+
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	+
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	-
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatosa	-
18	D-Manitol	+	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	+	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	-	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	-	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	+	49	5-Cetogluconato de potasio	-

25	Esculina-citrato de hierro	+			

3/ Cepa: NOL 03

Género y especie: *Bacillus subtilis*

Morfología: bacilo gram-positivo aislado o de dos en dos. Presencia de esporas en el gram.

Características: Medio de cultivo: básico (PCA) o agar sangre

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre agar PCA:

pequeñas, planas, borde irregular, centro más oscuro

Aspecto de las colonias sobre agar sangre:

no hemolíticas, centro ligeramente hundido, borde definido

Prueba de la oxidasa positiva

Prueba de la catalasa positiva

Perfil de API 50CHB:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	+	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	+	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	-	30	D-Melibiosa	+
6	D-xilosa	-	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	+
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-
10	D-Galaciosa	-	35	D-Rafinosa	+
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	+
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	+
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	-
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatosa	-
18	D-Manitol	+	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	+	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	-	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	+	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	+	49	5-Cetogluconato de potasio	-
25	Esculina-citrato de hierro	+			

4/ Cepa: NOL 04

Género y especie: *Bacillus subtilis*

Morfología: bacilo gram-positivo aislado o de dos en dos

Características: Medio de cultivo: básico (PCA) o agar sangre

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre agar PCA:

pequeñas, planas, borde irregular, centro más oscuro

Aspecto de las colonias sobre agar sangre:

hemolíticas, borde irregular

Prueba de la oxidasa positiva

Prueba de la catalasa positiva

Perfil de API 50CHB:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	+	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	+	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	+/-	30	D-Melibiosa	-
6	D-xilosa	-	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	+/-
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-
10	D-Galaciosa	-	35	D-Rafinosa	+/-
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	+/-
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	+/-
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	-
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatosa	-
18	D-Manitol	+	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	+	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	+/-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	-	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	+/-	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	+/-	49	5-Cetogluconato de potasio	-
25	Esculina-citrato de hierro	+			

5/ Cepa: NOL 11

Género y especie: *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1

Morfología: coco gram-positivo agrupado en grupos de 2 en cadenas

Características: Medio de cultivo: MRS

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre MRS: pequeñas, marrones

Agar sangre: pequeñas, grises

Prueba de la oxidasa negativa

Prueba de la catalasa negativa

Perfil de API 50CHL:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	-	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	-	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	+	30	D-Melibiosa	-
6	D-xilosa	-	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	-
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-
10	D-Galaciosa	+	35	D-Rafinosa	-

11	D-Glucosa	+	36	Almidón	+
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	-
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	-
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatosa	-
18	D-Manitol	+	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	-	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	+	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	-	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	-	49	5-Cetogluconato de potasio	-
25	Esculina-citrato de hierro	+			

6/ Cepa: NOL 12

Género y especie: *Pediococcus pentosaceus* 2

Morfología: coco gram-positivo agrupado en parejas o en tétradas

Características: Medio de cultivo: MRS

Temperatura: 30-37ºC

Aspecto de las colonias sobre MRS: blancas, lechosas

Agar sangre: pequeñas, grises

Prueba de la oxidasa negativa

Prueba de la catalasa negativa

Perfil de API 50CHL:

	Prueba	Resultado		Prueba	Resultado
1	Glicerol	-	26	Salicina	+
2	Eritritol	-	27	D-Celobiosa	+
3	D-Arabinosa	-	28	D-Maltosa	+
4	L-Arabinosa	+	29	D-Lactosa	-
5	D-Ribosa	+	30	D-Melibiosa	+
6	D-xilosa	+	31	D-Sacarosa	+
7	L-Xilosa	-	32	D-Trehalosa	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulina	-
9	Metil-βD-xilopiranósido	-	34	D-Melecitosa	-
10	D-Galaciosa	+	35	D-Rafinosa	+
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	-
12	D-Fructosa	+	37	Glucógeno	-
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	Gentiobiosa	+
15	L-Ramnosa	-	40	D-Turanosa	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatosa	+
18	D-Manitol	-	43	D-Fucosa	-
19	D-Sorbitol	-	44	L-Fucosa	-
20	Metil-αD-manopiranósido	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil-αD-glucopiranósido	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetilglucosamina	+	47	Gluconato de potasio	-
23	Amigdalina	+	48	2-Cetogluconato de potasio	-
24	Arbutina	+	49	5-Cetogluconato de potasio	-
25	Esculina-citrato de hierro	+			

Debe observarse que la identificación bioquímica de los bacilos a partir del perfil de API 50CHB no es fiable.

Por consiguiente, la identificación de estas bacterias se completó mediante la caracterización de su genoma

(identificación mediante secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S).

En el caso particular de la cepa NOL 01, este análisis no permitió distinguir las especies *subtilis* o *licheniformis*.

No obstante, el aspecto de las colonias hace pensar más en *Bacillus licheniformis*.

Cinco de las seis cepas bacterianas que pueden estar contenidas en la composición según la invención han sido adicionalmente objeto de depósitos ante el Instituto Pasteur según el tratado de Budapest con los siguientes números:

NOL 01 CNCM I - 4606

NOL 03 CNCM I - 4607

NOL 04 CNCM I - 4608

NOL 11 CNCM I - 4609

NOL 12 CNCM I - 4610

La eficacia de la composición que constituye el objeto de la invención para el tratamiento de la colibacilosis, así como el efecto de sinergia de cepas particulares de bacilos y de bacterias lácticas, se confirmaron mediante pruebas *in vitro* a partir de placas de Petri sembradas con *E. coli* y también mediante pruebas *in vivo* realizadas en granjas avícolas.

Ejemplo 1: ensayos *in vitro*.

Demostración de la sinergia de un bacilo y de una bacteria láctica con respecto al crecimiento de una *E. coli*.

Se pusieron en práctica las siguientes etapas de manera sucesiva:

Día 1: trasplante de las cepas de bacilos y de bacterias lácticas sobre un agar sangre. Incubación de las placas durante 20-24 h a 37ºC.

Día 2: preparación de las placas de Petri de ∅ 90 mm.

- hacer fluir 17 ml de agar PCA en sobrefusión en una placa de Petri y dejar enfriar

- retirar el agar PCA sobre una anchura de 4 mm (con la ayuda de la punta de una pipeta Pasteur) y una longitud de ½ surco central. Sustituirlo por agar MRS en sobrefusión y dejar enfriar.

Primera siembra de las placas de Petri:

- sembrar una bacteria láctica sobre el ½ surco central de agar MRS

- sembrar un bacilo sobre la prolongación del ½ surco de la bacteria láctica

- incubar durante 20-24 h a 37ºC.

Trasplantar las cepas de *E. coli* sobre un agar Drigalski e incubar durante 20-24 h a 37ºC.

Día 3: preparación la suspensión de *E. coli*:

- a partir de las colonias de *E. coli* sobre el agar Drigalski, realizar una suspensión de Mac Farland 0,5 en agua fisiológica

- diluir 230 µl de esta suspensión en 4,2 ml de agua fisiológica.

Segunda siembra de las placas de Petri:

- con la ayuda de un hisopo y a partir de la dilución de *E. coli*, recubrir las placas a ambos lados de los surcos del bacilo y de la bacteria láctica

- incubar durante 48 h a 37ºC.

Día 5: medición (en mm) de la anchura de las zonas de inhibición del crecimiento de *E. coli*:

- ZI láctica = zona de inhibición total creada por la bacteria láctica (principalmente provocada por su actividad acidificante que modifica el medio y no por la propia bacteria)

- ZI de bacilo = zona de inhibición total creada por el bacilo

- ZI de sinergia = zona de inhibición total creada por la asociación del bacilo y de la bacteria láctica

En la figura 1 se representa esquemáticamente una placa de Petri 1 preparada de la manera anteriormente mencionada.

La referencia 2 corresponde a la banda de agar MRS sobre la que se siembra un surco 3 de una bacteria láctica.

La referencia 4 corresponde a un surco de bacilo sembrado sobre el agar PCA en la prolongación del surco de la bacteria láctica.

La parte en sombreado con la referencia 5 corresponde a la zona de crecimiento de *E. coli*, mientras que las zonas blancas a ambos lados de los surcos 3, 4 corresponden a las zonas de inhibición total de este crecimiento.

Los puntos de medición respectivos de la anchura de las zonas de inhibición del crecimiento de *E. coli*: ZI láctica, ZI de sinergia y ZI de bacilo, se representan mediante flechas dobles.

Esta figura muestra claramente el efecto de sinergia entre un bacilo y una bacteria láctica.

En la siguiente tabla puede visualizarse la inhibición del crecimiento de dos cepas A y B de *E. coli* debido a la sinergia entre las diferentes cepas de bacilos y de bacterias lácticas.

INOCULACIÓN			ZONA DE INHIBICIÓN (mm)		
bacilos	lácticas	E. coli	*láctica (acidez)*	bacilo	SINERGIA
NOL 01	NOL 11	A	*1*	0	3
		B	*1*	0	4
NOL 01	NOL 12	A	*13*	2	3
		B	*14*	0	3
NOL 02	NOL 11	A	*1*	2	0
		B	*1*	2	0
NOL 02	NOL 12	A	*10*	3	0
		B	*12*	3	0
NOL 03	NOL 11	A	*1*	0	5
		B	*2*	0	6
NOL 03	NOL 12	A	*12*	0	5
		B	*15*	0	5
NOL 04	NOL 12	A	*10*	0	3
		B	*14*	0	5

Estos resultados muestran que las zonas de inhibición total de los bacilos sobre el crecimiento de *E. coli* son débiles y diferentes según las cepas.

En sinergia con una bacteria láctica, estas zonas de inhibición total aumentan de manera neta en el caso de los bacilos NOL 01, NOL 03 y NOL 04, que son muy poco activos de manera individual.

Esta sinergia entre un bacilo y una bacteria láctica es particularmente pronunciada en el caso del bacilo NOL 03.

A diferencia de las otras tres cepas, el bacilo NOL 02 pierde su actividad inhibidora con respecto al crecimiento de *E. coli*.

Ejemplos 2: ensayos *in vivo*

En el contexto de estos ensayos, se prepararon previamente matraces que contenían las siguientes preparaciones:

Preparación 1 = matraz de 20 ml

mezcla de 4 bacilos NOL 01, NOL 02, NOL 03, NOL 04 (en forma vegetativa)

concentración de 10^5 a 10^8 ufc/ml

conservación entre -80ºC y -21ºC

Preparación 2 = matraz de 20 ml

mezcla de 2 bacterias lácticas (lactococos + pediococos)

concentración de 10^9 a 10^{10} ufc/ml

conservación entre -80ºC y -21ºC

Preparación 3 = matraz de 20 ml

1 bacilo (NOL 04) (en forma vegetativa)

concentración de 10^5 a 10^8 ufc/ml (formas viables)

conservación entre -80ºC y -21ºC

A continuación se sometieron a prueba en la práctica las siguientes mezclas:

dosis de mezcla 1: 1 matraz de preparación 1 + 1 matraz de preparación 2

dosis de mezcla 2: 1 matraz de preparación 1 + 1 matraz de preparación 2

Ejemplo 2.1: ensayo con tratamiento mediante la mezcla 1 sobre gallinas ponedoras:

Granja: edificio de 56.000 gallinas

Examen de laboratorio a las 28 semanas: LA17656

Bacteriología: aislamiento de una *E. coli* de serotipo O78K80

Tratamientos: 5 dosis al día durante 4 días en agua de bebida en la batería n.º 5

5 dosis al día durante 4 días en nebulización en el conjunto del edificio

(5 dosis para 12.000 gallinas (batería n.º 5) → 25 toneladas, es decir, 2 dosis por 10 toneladas)

La evolución de la mortalidad se representa en la siguiente tabla así como en la figura 2.1.

Edad (días)	Mortalidad	Tratamiento (dosis)
190	62	
191	57	
192	68	
193	72	
194	81	
195	75	
196	80	5
197	66	5
198	37	5
199	21	5
200	13	
201	10	
202	12	
203	13	
204	8	
205	11	

Ejemplo 2.2: ensayo con tratamiento mediante la mezcla 1 sobre pollos de engorde convencionales:

Granja: edificio de 22.500 pollos

Examen de laboratorio a los 3 días: LA17656

Autopsia: onfalitis

Bacteriología: aislamiento de una *E. coli* de serotipo O78K80

Tratamientos del día 1 al día 2: enrofloxacino → fracaso del tratamiento explicado por el resultado del examen realizado en D3 (la *E. coli* O78K80 es resistente a enrofloxacino)

Tras el examen: 2 dosis de mezcla 1 al día durante 3 días en agua de bebida (2 dosis para 22.500 pollos a 100 g → 2,2 toneladas, es decir, 1 dosis por tonelada).

La evolución de la mortalidad del día 1 al día 5 se representa en la siguiente tabla así como en la figura 2.2

Edad (días)	Mortalidad	Tratamiento (dosis)
1	0	
2	50	

3	195	2
4	93	2
5	30	2

Ejemplo 2.3: ensayo con tratamiento mediante la mezcla 2 sobre pavos de engorde convencionales:

Granja: edificio de 9.000 pavos

Examen de laboratorio a los 56 días: LA19492

Autopsia: lesiones de colibacilosis respiratoria

Bacteriología: aislamiento de una *E. coli* de serotipo (O78K80; O2; O1) negativo

Tratamiento: 4 dosis de mezcla 2 al día durante 4 días en agua de bebida (4 dosis para 9.000 pavos a 3,9 kg → 35 toneladas, es decir, 1 dosis por 10 toneladas).

La evolución de la mortalidad entre los días 51 y 59 se representa en la siguiente tabla así como en la figura 2.3

Edad (días)	Mortalidad	Tratamiento (dosis)
51	3	
52	4	
53	5	
54	6	
55	8	
56	8	4
57	4	4
58	1	4
59	1	4

Ejemplo 2.4: ensayo con tratamiento mediante la mezcla 1 sobre pollos de engorde convencionales:

Granja: edificio de 20.000 pollos

Examen de laboratorio a los 32 días: LA18574

Autopsia: pericarditis/artritis/necrosis de la cabeza del fémur

Bacteriología: aislamiento de una *E. coli* de serotipo (O78K80; O2; O1) negativo

Tratamiento: 4 dosis de mezcla 1 al día durante 4 días (4 dosis para 20.000 pollos a 1,4 kg → 28 toneladas, es decir, 1,5 dosis por 10 tonelada).

La evolución de la mortalidad entre los días 30 y 39 se representa en la siguiente tabla así como en la figura 2.4.

Mortalidad según norma de bienestar: 1% + 0,06% x N (N = número de días de cría)

3,4% (con N = 40 días de cría)

Es decir, una mortalidad total de 680 muertes (20.000 pollos x 3,4%).

Es decir, una mortalidad diaria media de 17 muertes (680 muertes/40 días).

Edad (días)	Mortalidad		Tratamiento (dosis)
	Norma (media)	real	
30	17	31	
31	17	47	
32	17	61	
33	17	101	4
34	17	74	4
35	17	43	4
36	17	27	4
37	17	29	
38	17	43	
38	17	45	

Estos resultados demuestran claramente la eficacia de la composición que constituye el objeto de la invención para el tratamiento de la colibacilosis.

REIVINDICACIONES

1. Composición bacteriana para su uso en el contexto del tratamiento de la colibacilosis en las granjas de animales, en particular las granjas avícolas, caracterizada porque contiene

   - por un lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos una de las siguientes cepas de *Bacillus subtilis*: NOL01 y NOL03,

   - y, por otro lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos la bacteria láctica *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1 cepa NOL11,

   en la que dichas cepas NOL01, NOL03 y NOL11 son las siguientes:

   ○ la cepa NOL 01 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4606,

   ○ la cepa NOL 03 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4607, y

   ○ la cepa NOL 11 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4609.

2. Composición bacteriana para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque contiene entre 10^5 y 10^9 ufc/ml de bacilos y entre 10^9 y 10^{10} ufc/ml de bacterias lácticas.

3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dichos bacilos y dichas bacterias lácticas están en forma esporulada y/o vegetativa.

4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque comprende una cualquiera de las siguientes composiciones:

   - la cepa NOL 01 y la cepa NOL 11, y

   - la cepa NOL 03 y la cepa NOL 11.

5. Agua de bebida para animales de granja, en particular para aves de corral, caracterizada porque contiene la composición bacteriana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Composición bacteriana caracterizada porque contiene

   - por un lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos una de las siguientes cepas de *Bacillus subtilis*: NOL01 y NOL03,

   - y, por otro lado, al menos 10^5 ufc/ml de al menos la bacteria láctica *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1 cepa NOL11,

   en la que dichas cepas NOL01, NOL03 y NOL11 son las siguientes:

   ○ la cepa NOL 01 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4606,

   ○ la cepa NOL 03 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4607, y

   ○ la cepa NOL 11 es la cepa depositada en el Instituto Pasteur con el número CNCM I - 4609.

7. Composición bacteriana según la reivindicación 6, caracterizada porque contiene entre 10^5 y 10^9 ufc/ml de bacilos y entre 10^9 y 10^{10} ufc/ml de bacterias lácticas.

8. Composición según la reivindicación 6 ó 7, en la que dichos bacilos y dichas bacterias lácticas están en forma esporulada y/o vegetativa.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizada porque comprende una cualquiera de las siguientes composiciones:

   - la cepa NOL 01 y la cepa NOL 11, y

   - la cepa NOL 03 y la cepa NOL 11.

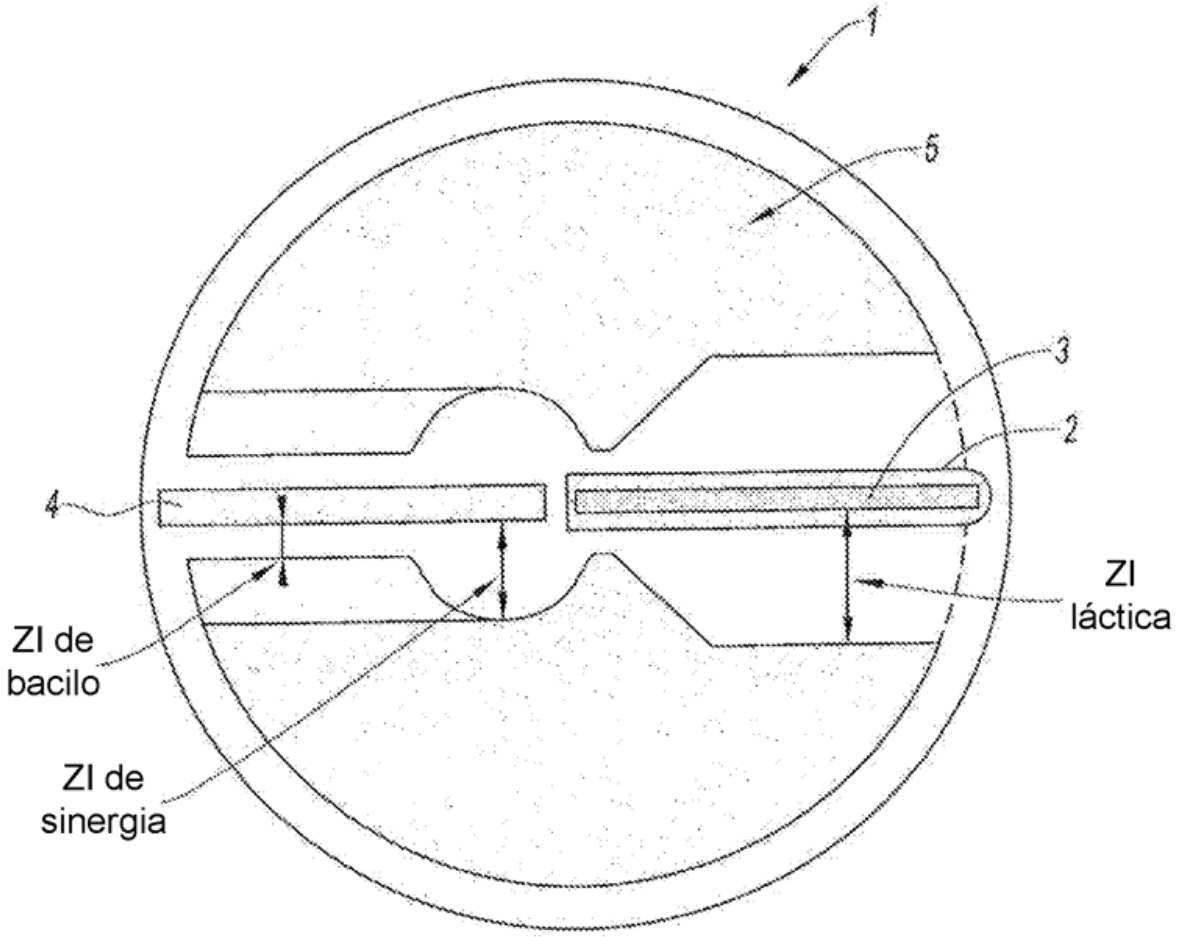

Fig. 1

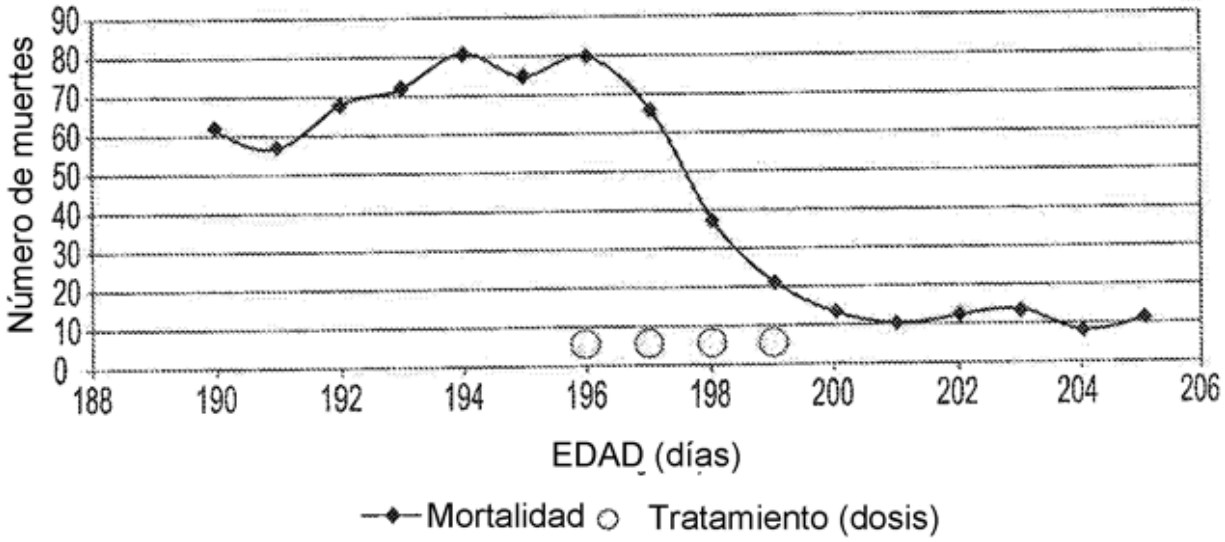
Número de muertes
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
188
190
192
194
196
198
200
202
204
206
EDAD (días)
Mortalidad
Tratamiento (dosis)

Fig. 21

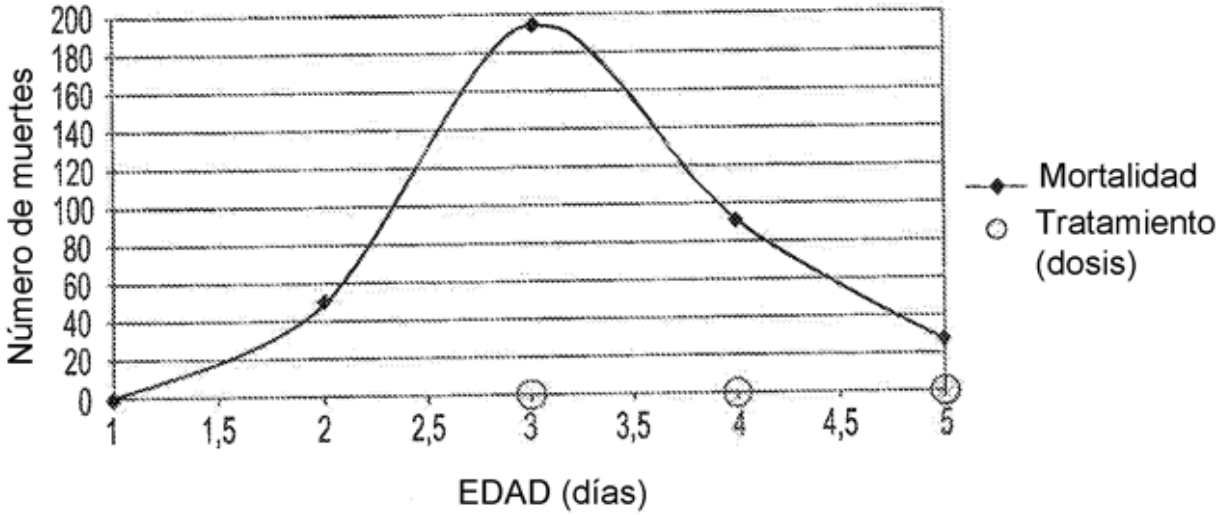
Número de muertes
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
5
EDAD (días)
Mortalidad
Tratamiento (dosis)

Fig. 22

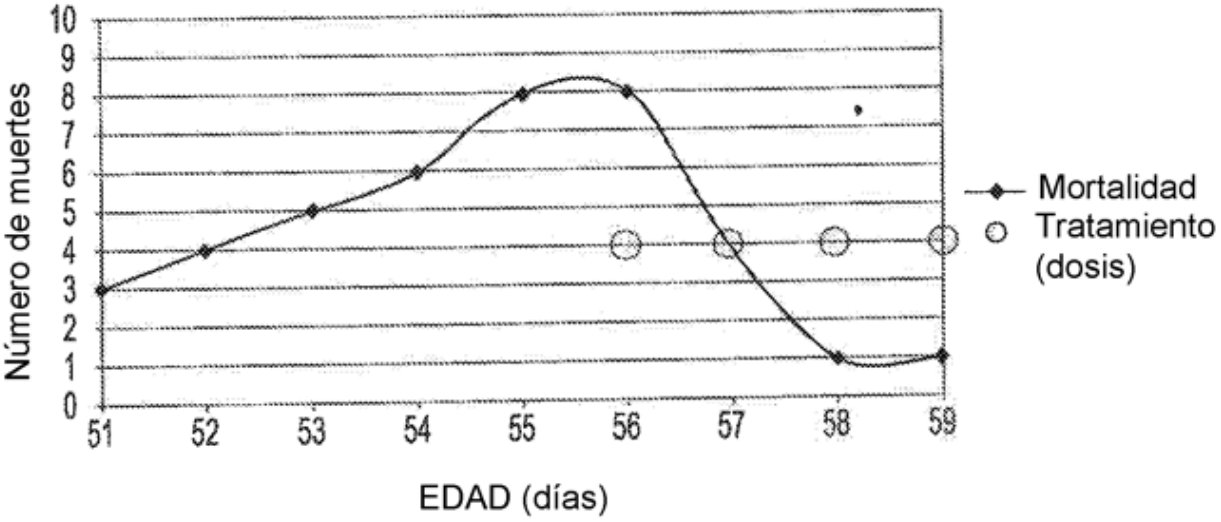
Número de muertes
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
51
52
53
54
55
56
57
58
59
EDAD (días)
Mortalidad
Tratamiento (dosis)

Fig. 23

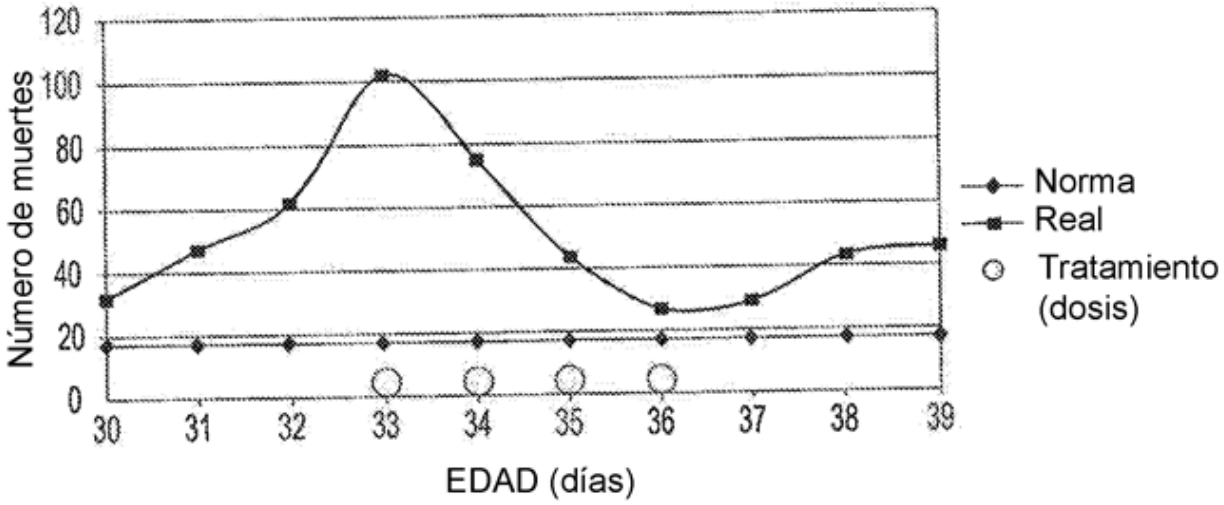
Número de muertes
120
100
80
60
40
20
0
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
EDAD (días)
Norma
Real
Tratamiento (dosis)

Fig. 24