

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 635**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2016 PCT/EP2016/058809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170013**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2016 E 16720752 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3285787**

54 Título: **Tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura**

30 Prioridad:

20.04.2015 EP 15164343

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

28.10.2020

73 Titular/es:

**FIXED PHAGE LIMITED (100.0%)
c/o Barwell 97 West Regent Street
Glasgow Scotland G2 2BA, GB**

72 Inventor/es:

MATTEY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 790 635 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

Tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura, la producción general de cultivo de camarones, gambas y peces. En particular, la invención se refiere a composiciones y métodos para usar en la reducción o prevención de infecciones y/o para tratar infecciones existentes en tal acuicultura.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Los bacteriófagos son la forma más numerosa de la vida en la Tierra. Se pueden encontrar en todos los entornos donde crecen bacterias. Los bacteriófagos se detectan en el agua subterránea y superficial, el suelo, los alimentos (p. ej., Chucrut, vino), las aguas residuales y los lodos. También se han aislado de humanos y animales, por ejemplo de heces, orina, saliva, rumen. y suero. Los bacteriófagos pueden penetrar diferentes órganos y tejidos, incluido el sistema nervioso central, y son parte de la flora intestinal junto con sus huéspedes bacterianos. Son responsables del 10-80% de la mortalidad bacteriana total en los ecosistemas acuáticos y son un factor importante que limita las poblaciones bacterianas.

15

20

[0003] Se conocen aplicaciones terapéuticas de bacteriófago. El documento WO 03/093462 describe métodos para la inmovilización de virus, en particular bacteriófagos, mientras retiene su actividad biológica para su uso como agentes antibacterianos. Dado que el ambiente natural de los bacteriófagos es acuoso, se ha asumido ampliamente que la estabilidad frente a la deshidratación como se describe en el documento WO 03/093462 tiende hacia la estabilidad natural en medios acuosos.

25

[0004] Los océanos y las aguas continentales se pescan en gran medida hasta su límite y el suministro de peces capturados en la naturaleza alcanzó su punto máximo en la década de 1990. Con el estancamiento del suministro mundial de peces silvestres y el aumento de la población humana, una nueva investigación muestra que la producción de peces y mariscos de cultivo tendrá que aumentar en un 133 por ciento entre 2010 y 2050 para satisfacer la demanda de pescado proyectada en todo el mundo.

30

[0005] Casi un tercio de los mariscos del mundo son producidos por la acuicultura industrial y la producción ha aumentado en un 6% anual de 8,7 millones de toneladas de pescado en 1990 a 50 millones de toneladas en 2011 y se prevé que alcance los 80 millones de toneladas en 2030. Sin embargo, los centros de cultivo de pescado a menudo sufren grandes pérdidas financieras debido al desarrollo de infecciones causadas por patógenos microbianos, incluidas bacterias resistentes a múltiples fármacos que se transmiten fácilmente a través del agua y, por lo tanto, pueden infectar una gran variedad de especies de peces.

35

[0006] A pesar de las especies patógenas se han descrito en la mayoría de los grupos taxonómicos bacterianos, sólo un número relativamente pequeño es responsable de importantes pérdidas económicas. La vibriosis y la fotobacteriosis son principalmente enfermedades de peces marinos y estuarinos, tanto en sistemas de producción naturales como comerciales en todo el mundo, que ocurren con poca frecuencia en peces de agua dulce. Ambas enfermedades pueden causar una mortalidad significativa en los peces, alcanzando valores de hasta el 100% en las instalaciones infectadas. La vibriosis y la fotobacteriosis son causadas por bacterias de la familia Vibrionaceae. La vibriosis es causada por especies de *Vibrio*, a saber, *Vibrio anguillarum*.

40

45

[0007] Otras especies de *Vibrio*, tales como *V. alginolitycus*, *V. carchariae*, *V. salmonicida*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, también causan infecciones importantes en varias especies de peces. La fotobacteriosis es causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que es una bacteria altamente patógena que no parece tener especificidad de huésped, infectando una amplia gama de especies de peces. Otras bacterias, como *Aeromonas salmonicida*, agente causante de la furunculosis, bacterias similares a *Rickettsia*, *Cytophaga marina*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Pseudomonas plecoglossicida* también son grupos importantes de patógenos de peces.

50

55

[0008] Las enfermedades como el SMT (Síndrome de Mortalidad Temprana) de los camarones son causadas por infecciones bacterianas en las que la bacteria (*Vibrio parahaemolyticus*) está infectada por un bacteriófago lisogénico que lleva un gen de toxina. En la infección por bacteriófagos, la bacteria incorpora el bacteriófago en su genoma y expresa la toxina que conduce a SMT en los camarones.

60

[0009] A pesar de que la vacunación es el método ideal para prevenir muchos tipos diferentes de enfermedades infecciosas que no siempre es aplicable en las especies de peces.

[0010] La quimioterapia es un método alternativo rápido y efectivo para tratar o prevenir infecciones bacterianas, pero el uso frecuente de antibióticos ha dado como resultado una resistencia creciente a los medicamentos en bacterias patógenas en las áreas de acuicultura, agricultura y medicina, y dado que pocos medicamentos quimioterapéuticos

65

tienen licencia para su uso en la pesca, se requieren tratamientos alternativos.

[0011] Nakai et al. Diseases of Aquatic Organisms, vol. 37, pp. 33-41, (23 de junio de 1999) describe el efecto del tratamiento de la infección por *Lactococcus garvieae* en la cola amarilla mediante el uso de bacteriófagos a los que *L. garvieae* es susceptible. Nakai y col. informan que cada uno de los tres aislamientos de bacteriófagos que probaron para determinar la estabilidad en agua de mar natural (sin esterilizar) persistió durante 3 días, pero pereció en 1 semana. Nakai y col. también describe el uso de alimentos para peces impregnados con $10^{7.9}$ PFU g^{-1} de bacteriófago. Dar este alimento a los peces que posteriormente fueron desafiados con $10^{8.5}$ UFC de *L. garvieae* por intubación anal disminuyó la tasa de mortalidad de los peces desafiados.

[0012] El documento WO 2006/047872 describe composiciones antibacterianas que comprenden bacteriófagos que se adsorben en una matriz. La composición se puede agregar a un alimento para uso acuático.

[0013] Los bacteriófagos se han propuesto para varios tratamientos de la infección bacteriana. Sin embargo, se sabe que los bacteriófagos sobreviven solo durante períodos relativamente cortos en su entorno natural, es decir, en el agua. Las tasas promedio de descomposición de los virus en muestras de agua de mar natural se pueden calcular, en base a datos bien conocidos, por ejemplo, en CH Suttle (Microb. Ecol. (1994) 28: 237-243, aproximadamente $0,48 \text{ día}^{-1}$). La supervivencia muy reducida de bacteriófagos en ambientes acuáticos naturales es debido a una combinación de causas, de manera significativa la depredación y la luz solar.

[0014] Por lo tanto, existe una necesidad de un medio alternativo para tratar o reducir infecciones bacterianas de los crustáceos de cría, especialmente de camarones y gambas y peces.

Objeto de la invención

[0015] Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones y usos de dichas composiciones y métodos que usan esas composiciones que ofrecen una alternativa de tratamiento de infecciones bacterianas en los crustáceos criados comercialmente, por ejemplo, gambas y camarones, y/o pescado. Un objetivo adicional de realizaciones particulares es proporcionar la mejora de tales composiciones, usos y métodos.

Sumario de la invención

[0016] Una composición que comprende un bacteriófago unido covalentemente a una partícula es para uso en el tratamiento de la infección bacteriana en peces o crustáceos en donde la partícula comprende carbohidratos o proteínas a las que están unidos covalentemente los bacteriófagos. Se usan preferiblemente partículas comestibles. La presente invención se basa en la mejora de la estabilidad y la viabilidad del bacteriófago en ambientes acuáticos, lo que hace posible el tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura.

[0017] Se proporciona alimento para crustáceos o peces, que comprende bacteriófagos unidos covalentemente a una partícula para tratar la infección bacteriana en peces o crustáceos.

[0018] Un método de fabricación de piensos de pescado o de crustáceos comprende bacteriófagos unidos covalentemente a partículas de mezcla en componentes de la alimentación, para producir piensos que comprenden dichas partículas.

[0019] Las bacterias infectadas con un bacteriófago lisogénico se proporcionan y se pueden utilizar en el tratamiento de las enfermedades de los peces o crustáceos.

Detalles de la invención

[0020] Una composición de la invención en consecuencia comprende bacteriófago unido covalentemente a una partícula para su uso en el tratamiento de infección bacteriana en pescado o crustáceos en donde la partícula comprende carbohidrato o proteína a la que se une covalentemente el bacteriófago.

[0021] Después de la administración a los peces o crustáceos, por ejemplo a través de alimentación que contiene las partículas, se tratan las infecciones bacterianas.

[0022] La partícula puede ser una partícula de soporte, hecha por ejemplo de material comestible o un material inerte, en cuyo caso el soporte de partículas es típicamente aproximadamente esférico. Puede tener un diámetro promedio de hasta 1 mm, hasta 100 micrones, hasta 50 micrones, hasta 10 micrones, desde 1 nm, desde 10 nm, desde 100 nm, desde 0,5 micrones o cualquier combinación de estos. En los ejemplos específicos a continuación, se usaron partículas en el intervalo de 1 a 200 micras. Las partículas en general pueden ser aproximadamente redondas o esféricas; son preferiblemente lisas. Las partículas o fragmentos de material comestible también pueden tener formas y tamaños irregulares.

[0023] El tamaño de partícula se mide adecuadamente usando métodos y aparatos reconocidos como estándar en la

técnica. El dimensionamiento de partículas en dispersiones se puede lograr usando una variedad de técnicas, que incluyen difracción láser, dispersión dinámica de luz (DLS), centrifugación de disco y microscopía de luz. Todas estas técnicas tienen sus ventajas y limitaciones. La difracción láser se basa en una presentación bien controlada de la muestra a la región de medición y se limita a muestras con un intervalo estrecho de concentraciones de partículas. A menudo se requiere dilución y esto puede afectar el tamaño de partícula, particularmente en compuestos con alta solubilidad. Malvern Instruments (Reino Unido) elabora ejemplos de equipos de dimensionamiento utilizando métodos de difracción láser. Para partículas muy irregulares, el diámetro se refiere al diámetro más grande en cualquier dimensión, incluso si la partícula es relativamente no esférica.

[0024] En realizaciones de la invención, bacteriófagos unidos covalentemente a una pluralidad de partículas se proporcionan. Estos están preferiblemente en forma relativamente homogénea, en donde una gran proporción, preferiblemente sustancialmente la totalidad, de la pluralidad de partículas tiene diámetros en el intervalo establecido, más preferiblemente 80% o más, 90% o más o 95% o más de las partículas con fagos unidos covalentemente tienen diámetros en el intervalo establecido (siendo cualquier intervalo como se establece anteriormente o en otro lugar del presente documento).

[0025] Las partículas para su uso en la invención a la que el bacteriófago se inmoviliza por unión covalente son generalmente comestibles o sustancialmente inertes para el animal a tratar.

[0026] La inmovilización o unión del bacteriófago al sustrato de partículas se puede lograr de varias maneras. Preferiblemente, los bacteriófagos se inmovilizan mediante enlaces covalentes formados entre la proteína de la cubierta del bacteriófago y el sustrato portador.

[0027] Además, el bacteriófago se inmoviliza preferiblemente al sustrato a través de sus grupos de cabeza o nucleocápside por activación de la partícula de sustrato antes de la adición y unión de bacteriófago.

[0028] El término "activado/activador/activación" se entiende que significa la activación del sustrato tal como eléctricamente, por ejemplo mediante descarga en corona, o por reacción de dicho sustrato con diversos grupos químicos (dejando una química superficial capaz de unir los virus, tales como grupos de cabeza de bacteriófago o cápsida).

[0029] La activación de dicho sustrato se puede lograr, por ejemplo, por hidrólisis preliminar con un ácido, preferiblemente HCl seguido de una etapa de lavado con agua y un álcali para neutralizar el ácido. Preferiblemente, dicho álcali es bicarbonato de sodio. La unión de bacteriófagos a través de sus grupos principales es ventajosa. En el caso de bacteriófagos complejos, por ejemplo, la unión a través de grupos de cabeza deja los grupos de cola, que son necesarios para el reconocimiento específico de bacterias, libres de infectar, es decir, unirse y penetrar en una célula bacteriana huésped. Se puede inmovilizar una pluralidad de diversos bacteriófagos específicos de la cepa en un sustrato en cualquier momento.

[0030] El acoplamiento del fago a un sustrato es el resultado de la formación de enlaces covalentes entre la proteína de la cubierta viral y el sustrato, como a través de un grupo amino en un péptido, por ejemplo, un enlace peptídico. Los "agentes de acoplamiento" que ayudan a este proceso varían y dependen del sustrato utilizado. Por ejemplo, para el acoplamiento a nylon u otros polímeros con grupos de superficie amino o carboxi, se pueden usar los agentes de acoplamiento carbodiimida o glutaraldehído.

[0031] Otros detalles de los métodos y métodos preferidos para la unión covalente de bacteriófago a partículas o gránulos o componentes de la alimentación, conservando la infectividad del fago, se describen en más detalle en el documento WO 2003/093462 y WO 2007/072049.

[0032] Otra opción es utilizar partículas que comprenden uno o más restos de focalización, por ejemplo, una proteína o ligando, para dirigir las partículas a los objetivos deseados dentro de pescado o de crustáceos.

[0033] Por ejemplo, las partículas pueden comprender una o más lectinas para dirigirse a ellas por ejemplo, para branquias de los peces para el tratamiento por ejemplo de la infección por Yersinia.

[0034] Adecuadamente, la presente invención administra bacteriófagos a través de alimentación y la partícula está hecha de material comestible. Por lo tanto, se incorpora convenientemente en alimentos para peces/crustáceos. El bacteriófago se puede unir a partículas de carbohidratos (por ejemplo, celulosa) o proteínas (incluidas las proteínas de pescado o proteínas animales) y esto se puede lograr utilizando, por ejemplo, métodos de aplicación de descarga eléctrica en perlas de nylon.

[0035] El alimento que comprende las partículas puede comprender carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas o una mezcla de uno o más de todos.

[0036] La invención es de uso en el tratamiento de las enfermedades de peces y crustáceos causadas por las siguientes bacterias:

Bacterias	Anfitriones marinos	Enfermedades
Especies Vibrio: <i>V. harveyi</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. penaeicida</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. carchariae</i> <i>V. salmonicida</i> <i>V. damsela</i> <i>V. ordalii</i> <i>V. owensii</i>	Crustáceos Pescado	Vibriosis hepatopancreatitis necrotizante (SMT) Varias otras infecciones
Especies de Aeromonas: <i>A. salmonicida</i> <i>A. hydrophilla</i> <i>A. punctata</i>	Pez	Furunculosis
<i>Yersinia ruckeri</i>	Pez	Enfermedad de boca roja entérica
<i>Moritella viscosa</i>	Pez	Enfermedad de la úlcera de invierno
<i>Rickettsia salmonis</i> <i>Piscirickettsia salmonis</i>	Salmón	Síndrome de rickettsia de salmón (SRS)
<i>Lactococcus garvieae</i>	Pez	Lesiones del endotelio vascular.
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Pez ayu	Ascitis hemorrágica
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Pez	Enfermedad bacteriana del agua fría (BCWD)
<i>Photobacterium damsela</i>	Pez	Fotobacteriosis

[0037] En una aplicación preferida de la invención los bacteriófagos son para uso en el tratamiento de infección bacteriana en crustáceos; más específicamente, para tratar la infección por especies de bacterias *Vibrio*.

[0038] El *V. parahaemolyticus* es un habitante común de ambientes costeros y estuarinos en todo el mundo. Por lo tanto, a menudo se encuentran asociados naturalmente con los sistemas de acuicultura de camarones. Ciertas condiciones ambientales pueden ser más favorables para el establecimiento, la supervivencia y el crecimiento del organismo, como la temperatura, la salinidad, el zooplancton, el anegamiento de las mareas y el oxígeno disuelto.

[0039] El *V. parahaemolyticus* está estrechamente relacionado con las bacterias luminosas patógenas del camarón como *V. harveyi*, *V. campbelli* y *V. owensii*. Estos, junto con otros *Vibrio* spp estrechamente relacionados, forman un "clado de *V. harveyi*". Las bacterias dentro de este clado tienen un alto grado de similitud a nivel fenotípico y genotípico. Ciertas cepas de *V. parahaemolyticus* pueden causar gastroenteritis en humanos y las cepas clínicas se caracterizan por la capacidad de producir una hemolisina directa termoestable (TDH) o una hemolisina relacionada con TDH (TRH). Los genes que codifican estas hemolisinas (genes de *tdh* y *trh*) se utilizan generalmente como marcadores para las cepas patógenas humanas de *V. parahaemolyticus*. Las cepas patógenas humanas que poseen estos marcadores representan el 1-2 por ciento de las cepas ambientales de *V. parahaemolyticus*. Todas las cepas (tanto clínicas como ambientales) producen una hemolisina termolábil (TLH) codificada por el gen *tlh* y esto generalmente se usa como marcador de *V. parahaemolyticus* en las pruebas de diagnóstico (48). Los genes *tdh* y *trh* que codifican los factores de virulencia están presentes en las "islas de patogenicidad", que son unidades genéticas discretas presentes solo en cepas virulentas; que tienen un contenido de Guanina + Citosina (G + C) que es diferente del resto del ADN cromosómico y generalmente se adquiere por transferencia horizontal de genes.

[0040] Mediante el uso de la invención con bacteriófagos específicos para especies de *Vibrio*, ahora pueden tratarse estas infecciones de, por ejemplo, camarones y gambas.

[0041] En otra aplicación preferida de la invención, los bacteriófagos son para el tratamiento de infección bacteriana en el pescado, especialmente para el tratamiento de la infección por especies de bacterias *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Moritella*, *Rickettsia*, *Piscirickettsia*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Photobacterium*. Se describen bacteriófagos útiles, por ejemplo, en el documento US 2013/0323209.

[0042] La invención proporciona alimento para peces y crustáceos, especialmente camarones y gambas. Por lo tanto, un aspecto de estas realizaciones de la invención proporciona alimento para crustáceos o peces, que comprende bacteriófagos unidos covalentemente a partículas para tratar la infección bacteriana en peces o crustáceos.

[0043] Se prefiere que toda la alimentación sea comestible, por lo que se prefiere que la partícula esté hecha de material comestible, por ejemplo, hidratos de carbono o proteína como se describe en otra parte en este documento.

Mezclados con las partículas hay otros componentes alimenticios que típicamente incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas o una mezcla de uno o más de todos.

5 [0044] Por lo tanto, otro aspecto de estas realizaciones de la invención proporciona alimento para crustáceos o peces a los que se une covalentemente el bacteriófago, para tratar la infección bacteriana en peces o crustáceos. Típicamente, la alimentación contiene componentes alimenticios comestibles a los que los bacteriófagos están unidos covalentemente. Según las realizaciones anteriores, el bacteriófago puede unirse covalentemente a carbohidratos o proteínas de la alimentación.

10 [0045] En realizaciones particulares de la invención, ilustradas en los ejemplos siguientes, gránulos de pienso se proporcionan a los que se une covalentemente el bacteriófago, en general, a la superficie exterior de la misma por métodos en los cuales gránulos se activan y tienen fagos adjuntos. Los tamaños de gránulos adecuados y preferidos son como se describen en otra parte de este documento.

15 [0046] Gránulos específicos de la invención, con bacteriófago unido covalentemente son para el tratamiento de la infección por especies de bacterias *Vibrio* en los crustáceos.

20 [0047] Otros gránulos específicos de la invención, con bacteriófago unido covalentemente, son para el tratamiento de la infección por especies de bacterias *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Moritella*, *Rickettsia*, *Piscirickettsia*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Photobacterium* en el pescado.

25 [0048] Los bacteriófagos para la invención incluyen bacteriófagos en general sin limitación, siempre que el bacteriófago se pueda obtener y sus bacterias huésped o diana se puedan cultivar e infectar en cultivo. El bacteriófago puede ser bacteriófago ARNss, ARNds, ADNss o ADNds, con disposición circular o lineal del material genético. El bacteriófago adecuado incluye Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Lipothrixviridae, Rudiviridae, Ampullaviridae, Bacilloviridae, Bicaudaviridae, Clavaviridae, Corticoviridae, Cystoviridae, Fusseseloviridae, Globuloviridae, Guttavirus, Inoviridae, Leviviridae, Microviridae, Plasmaviridae y Tectiviridae. Los fagos adecuados para su uso en las realizaciones mencionadas anteriormente infectan y son líticas para las familias y especies bacterianas mencionadas.

30 [0049] Los ejemplos de cómo aislar el fago deseado están muy extendidos en la literatura, incluso a modo de ilustración: Gill JJ y Hyman P, " Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy", Curr Pharm Biotechnol., 2010, enero; 11 (1): pp2-14, y la minirevista "Bacteriophage Therapy" mencionada anteriormente por Sulakvelidze et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, marzo de 2001, pp 649-659.

35 [0050] La invención se extiende la viabilidad de los dos bacteriófagos líticos y lisogénicos en su ambiente natural, mar, agua dulce u otros ambientes acuosos, por la inmovilización covalente. La viabilidad y la estabilidad sorprendentemente aumentadas se han ilustrado en los ejemplos a continuación y ahora hacen posible los tratamientos bacterianos establecidos en este documento.

40 [0051] La inmovilización se ha encontrado en los ejemplos expuestos a continuación con más detalle para dificultar la depredación. La depredación puede ocurrir a través de la digestión enzimática con enzimas extracelulares o intracelulares de bacterias u hongos, por la ingestión de protozoos y la posterior digestión o por los procesos digestivos de otros organismos eucariotas.

45 [0052] En general, las ventajas de la invención se derivan de la extensión inesperada de la viabilidad del fago en aguas salinas, aguas frescas y otros entornos predominantemente acuosos; resistencia inesperada a la degradación por componentes del medio ambiente natural; resistencia inesperada a la depredación: lograda mediante el uso de bacteriófagos unidos covalentemente a partículas en la alimentación como se describe aquí.

50 [0053] Un método de la invención comprende la combinación de componentes de gránulos con partículas a las que el bacteriófago se une covalentemente, para formar alimento que comprende las partículas. Ese alimento se utiliza para entregar el bacteriófago a los peces/crustáceos diana.

55 [0054] En un método particular de hacer alimentación de pescado o de crustáceos, las etapas comprenden el mezclado de bacteriófagos covalentemente unidos a partículas en componentes de la alimentación, para producir que comprende alimentación de dichas partículas.

[0055] El método puede comprender:

- 60 (a) combinar componentes de la alimentación para formar una mezcla,
 (b) tratar la mezcla para (i) aumentar su contenido de humedad, o (ii) calentar y cocinar la mezcla, o (iii) ambos (i) y (ii), y
 (c) añadir posteriormente las partículas a la mezcla tratada y, opcionalmente, formar gránulos de alimentación.

65 [0056] El calor puede usarse para lograr al menos la esterilización parcial de los gránulos. Un método de la invención

comprende:

- 5 (b) tratar térmicamente la mezcla,
 (c) enfriar la mezcla tratada y
 (d) añadir posteriormente las partículas a la mezcla tratada y enfriada.

[0057] Este orden de los pasos evita la aplicación de calor y por lo tanto daños en el componente de bacteriófago de la alimentación.

10 [0058] En ciertos métodos, las partículas se añaden a gránulos formados. Esto se puede lograr pulverizando gránulos con una solución o suspensión de las partículas. Los gránulos pulverizados se pueden secar para adherir las partículas a los mismos.

15 [0059] En un ejemplo del método, la preparación de los gránulos comprende:

- 20 1) mezclar los componentes de gránulos,
 2) pulverizar componentes mezclados para reducir el tamaño de partículas,
 3) el acondicionamiento de la mezcla, mediante la exposición de los componentes pulverizados al agua y/o vapor,
 4) formar gránulos a partir de la mezcla acondicionada,
 5) enfriar los gránulos,
 6) secar los gránulos,
 7) agregar bacteriófagos en las partículas a los gránulos, y
 8) transferir los gránulos a un recipiente, típicamente una bolsa.

25 [0060] Típicamente, los componentes de gránulos comprenden una mezcla de uno o más o todas las proteínas, grasas, carbohidratos, minerales, vitaminas y agua (por ejemplo, carne o harina de pescado, harina de trigo, salvado de arroz, arroz pollard, guisantes, maíz, soja harina, mezcla de molino, aceite de pescado, premezcla de vitaminas y minerales, etc.). Se usan mezclas similares tanto para crustáceos como para peces, aunque también se usan mezclas específicas a medida.

30 [0061] La etapa de acondicionamiento puede utilizarse para aumentar el contenido de agua y/o cocinar parcial o completamente componentes de gránulos. Generalmente se usa vapor, que cocina eficazmente los componentes y aumenta el contenido de humedad al mismo tiempo. Dependiendo del calor del vapor y la duración del paso, también puede ocurrir algún grado de esterilización en este momento.

35 [0062] Los gránulos se forman generalmente haciendo pasar el material acondicionado a través de un molino de granulación. El tamaño del gránulo varía y el paso de pulverización puede ser de mayor duración o más vigoroso si los gránulos finales deben ser de tamaños más pequeños. Dependiendo del tamaño de los peces/crustáceos, los diámetros de los gránulos están típicamente en el intervalo de 0,1 a 30 mm, más generalmente 0,5 mm o más, también más generalmente hasta 25 mm, hasta 20 mm, hasta 15 mm, hasta 10 mm o hasta 8 mm. Los tamaños de gránulos de menos de 2 mm normalmente requieren una pulverización bastante extensa. Los gránulos de camarones se encuentran más comúnmente en el intervalo de aproximadamente 5 mm u 8 mm, y pueden ser más pequeños, por ejemplo, de hasta 2 mm o 3 mm. Los gránulos de pescado son más grandes y más comúnmente de diámetro 3 mm hacia arriba.

40 [0063] Los componentes de gránulos usualmente incluyen almidón. Sin embargo, en agua los gránulos se desintegran debido a la hinchazón del almidón. Se ha demostrado que el acondicionamiento a temperaturas más bajas reduce la expansión del almidón y proporciona una forma de mantener la integridad del gránulo mientras está húmedo. Un paso opcional es agregar un segundo paso de calentamiento después del paso de granulación.

45 [0064] El calentamiento después de la molienda, donde convencionalmente puede ocurrir el proceso de enfriamiento, tiene dos efectos principales:

- 50 1) El almidón se convierte en forma digerible,
 2) El gluten de trigo que une el gránulo se vuelve sustancialmente insoluble (se ha demostrado que otros glútenes no tienen éxito).

55 [0065] La utilización de esta etapa de acondicionamiento post-molienda mejora drásticamente la estabilidad de la pastilla en agua. El costo de formulación se ahorra porque se necesita agregar menos aglutinante y esto ayuda enormemente a la digestibilidad para la vida marina.

60 [0066] La flotabilidad de los gránulos puede alterarse dependiendo de si las formas de vida marina diana son consumidores superiores o inferiores. Los gránulos huecos permiten tiempos de flotación significativamente más largos.

65

[0067] También proporcionados por la invención son procedimientos de fabricación de alimentación de pescado o de crustáceos que comprenden covalentemente fijación de bacteriófago a gránulos de pienso.

[0068] Según formas de realización en los ejemplos a continuación, que contienen mayores detalles, un método de este tipo comprende el método de formación de componentes de la alimentación en gránulos, y el tratamiento de los gránulos para adjuntar covalentemente bacteriófago a los mismos. El tratamiento con gránulos se describe adecuadamente en otra parte del presente documento, para la activación de gránulos y luego la unión covalente del fago. De base eléctrica son especialmente adecuados. En un ejemplo, la descarga de corona se ha utilizado con éxito. Los gránulos activados se pueden combinar con fagos, por ejemplo, poniendo los gránulos en contacto con una solución o suspensión de fagos.

[0069] En un aspecto separado de la invención, es posible aprovechar factores celulares que impiden la superinfección de bacterias ya infectadas con un bacteriófago lisogénico por un segundo bacteriófago del mismo tipo. Por consiguiente, la invención proporciona bacterias infectadas con un bacteriófago lisogénico para su uso en el tratamiento de enfermedades de peces o crustáceos. Un método para prevenir enfermedades en peces o crustáceos consiste en infectar a los mismos con esta bacteria.

[0070] En uso, peces o crustáceos están por lo tanto deliberadamente infectados con esta bacteria, se sabe que son relativamente frecuentes, pero relativamente inoocuos (como el bacteriófago con el que está infectado es lisogénico y no causa la enfermedad). Sin embargo, este paso previene la enfermedad causada por bacterias que posteriormente se infectan con bacteriófagos portadores de un gen de toxina. La presencia de la primera infección bacteriófaga significa que se reduce la sobreinfección por bacteriófagos más patógenos.

[0071] Las bacterias son por ejemplo bacterias *Vibrio* para su uso en el tratamiento de la enfermedad de los crustáceos.

[0072] Las bacterias son, por ejemplo, especies de bacterias *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Moritella*, *Rickettsia*, *Piscirickettsia*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Photobacterium* para su uso en el tratamiento de enfermedades de los peces.

[0073] Los alimentos para crustáceos o peces, que comprenden estas bacterias, forman realizaciones adicionales de la invención.

Ejemplos

[0074] La invención se ilustra ahora en las siguientes realizaciones específicas con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- Fig. 1 muestra la supervivencia de bacteriófago ϕ lin 24 en varios ambientes acuosos,
- Fig. 2 muestra bacteriófagos inmovilizados son más resistentes a la exposición de UV,
- Fig. 3 muestra la estabilidad de almacenamiento del fago único de *Peptobacterium* inmovilizado en celulosa,
- Fig. 4 muestra la estabilidad de almacenamiento del fago único de *Peptobacterium* inmovilizado en perlas de copolímero,
- Fig. 5 muestra la supervivencia del bacteriófago libre e inmovilizado cuando está expuesto a condiciones de estrés (húmedo, seco, UV y alta temperatura),
- Fig. 6 muestra la supervivencia del bacteriófago libre e inmovilizado en presencia del agente antimicótico Neozil de la planta de papa,
- Fig. 7 muestra la supervivencia del bacteriófago libre e inmovilizado en tiras de celulosa en el suelo,
- Fig. 8 muestra la supervivencia de bacteriófago libre y inmovilizado sobre tiras de nylon en el suelo,
- Fig. 9 muestra la supervivencia del polvo de celulosa tratado con fago de *Peptobacterium* después de la incubación,
- Fig. 10 muestra la actividad infecciosa del polvo de celulosa tratado con fago de *Peptobacterium* después de la incubación en suelo no estéril.
- Fig. 11 muestra la actividad antibacteriana que se muestra cuando se inmovilizan múltiples tipos de bacteriófagos en nylon en presencia de bacterias huésped susceptibles y no susceptibles,
- Fig. 12 muestra la actividad infecciosa del bacteriófago de *Salmonella* inmovilizado en láminas de alginato,
- Fig. 13 muestra zonas de limpieza alrededor de los gránulos de la invención, y
- Fig. 14 muestra la supervivencia de los camarones desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* después de ser alimentados con gránulos con bacteriófagos covalentemente adjuntos al mismo o gránulos de control.

Ejemplo 1

[0075] Hemos probado bacteriófago unido covalentemente a partículas tanto de plástico (nylon) como de hidratos de carbono (celulosa) para demostrar la viabilidad de usar composiciones de la invención en aplicaciones de acuicultura.

[0076] Se determinó en primer lugar si los bacteriófagos inmovilizados sobre el polvo de celulosa sobreviven más tiempo que bacteriófagos libres tanto en agua de mar como agua dulce. La Figura 1 muestra la supervivencia de

bacteriófagos inmovilizados y no inmovilizados ϕ lin 24 en agua de mar. El bacteriófago ϕ lin 24 inmovilizado en polvo de celulosa sobrevivió significativamente más tiempo que los bacteriófagos no inmovilizados en agua de mar ($P \leq 0,001$).

5 Procedimientos

Medios y métodos

10 **[0077]** Tabla 1 - Todos los medios se hicieron y los métodos se realizaron de acuerdo con el procedimiento de operación estándar apropiado (SOP).

Tabla 1

Medio/Método	SOP
Agar nutriente	Agar 50
Caldo de nutrientes	Caldo 51
Inmovilización de fagos	Inmovilización
Cultivo de bacterias	Cultivo

20 SOP "Agar 50"

[0078]

- 25 • Pese la cantidad deseada de polvo
- Agregue el polvo a la botella vacía del tamaño adecuado
- 30 • Agregue agua destilada al volumen deseado
- Tape sin apretar y selle con cinta de autoclave sobre la tapa.
- Autoclave a 121°C durante 15 minutos de acuerdo con el manual
- 35 • Deje que los medios se enfríen

Preparación de placas de agar nutritivo

[0079]

- 40 • Coloque los medios fijados en el microondas.
- autoclave durante 5 minutos
- 45 • compruebe que el medio se haya derretido por completo. Si no es microondas, por 1 minuto más.
- Coloque la botella de medio en baño de agua (50°C) y deje enfriar.
- vierta el medio en placas de Petri con aproximadamente 15 ml de medio por placa.
- 50 • deje secar

"Caldo 51" SOP

55 **[0080]**

- Pese la cantidad deseada de polvo
- Coloque el agua destilada al volumen deseado en un vaso de precipitados con un agitador magnético
- 60 • Agregue polvo al agua y permita que se disuelva
- Agregue la cantidad deseada a una botella limpia
- 65 • Tape sin apretar y selle con cinta de autoclave sobre la tapa.

Autoclave del medio

[0081]

- 5 • Coloque la botella de medio en autoclave
- Encienda el autoclave a 121°C durante 15 minutos de acuerdo con el manual
- Deje que el medio se enfríe
- 10 • Una vez que se enfríe, etiquétalo adecuadamente
- Déjelo en el estante hasta su uso posterior.

15 "Inmovilización" SOP

Bacteriófagos aplicables

[0082]

- 20 • ϕ K
- ϕ Gamma
- 25 • ϕ PLS27 HER200
- ϕ 7 LINDBERG HER4
- ϕ 24 LINDBERG HER4
- 30 • ϕ FC3-9 HER 111
- ϕ K13 HER173
- 35 • ϕ 68 HER49
- ϕ MINCE
- ϕ 235
- 40 • ϕ CLYDE
- ϕ 11575
- 45 • ϕ 1173
- ϕ T4 10360
- ϕ T7 10380
- 50 • ϕ Psp1

Materiales necesarios

[0083]

- 55 • Cultivo de bacteriófagos
- Quemador Bunsen
- 60 • Pipeta para medir 0-100 μ l
- Puntas biseladas estériles de 0-200 μ l
- 65 • Esparcidor de plástico estéril

ES 2 790 635 T3

- Recipiente de plástico universal de 30 ml
- Controlador de pipeta

5 • Pipetas stripette estériles de 10 ml

Uso de la máquina de descarga de corona (cama plana)

[0084]

10

- Asegúrese de que la máquina corona esté APAGADA antes de limpiar/esterilizar.
- Enganche la cubierta transparente para mantenerla abierta.
- Limpie la mesa de corona con alcohol al 70% para esterilizar. El electrodo anterior también debe limpiarse.
- Permita que el alcohol se seque durante 2 minutos. Luego cierre la capucha.

15

- Inicie el extractor de ozono.
- Encienda la mesa
- Encienda la máquina de corona
- Coloque el material en el centro de la mesa de corona.
- Cierre la tapa.

20

- Inicie el tratamiento corona presionando "inicio" en los controles de la mesa.
- La superficie de la película será tratada.
- Tan pronto como se complete el tratamiento, apague la máquina de corona.
- Abra la cubierta.

25

- Cubra el material con una solución bacteriófaga y extiéndalo con un esparcidor estéril.
- Coloque el material en una placa estéril
- Coloque todos los interruptores en la posición "apagado"
- Limpie la mesa y el electrodo con alcohol al 70%.

Material de lavado

30

[0085]

- El material debe lavarse 3 veces en PBS
- Deje que el material se seque al aire en una campana laminar durante 2 horas

35

Ensayo de actividad antibacteriana

[0086]

40

- Preparar superposiciones de agar
- Se coloca cuidadosamente un cuadrado de material tratado en la parte superior del conjunto de capa de agar
- La placa se incuba boca arriba.
- Después de la incubación se puede cuantificar una zona de limpieza alrededor del material.

45

"Cultivo" SOP

Bacterias apropiadas

[0087]

50

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella sp.*
- *Enterobacter sp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus cereus*
- *Acinetobacter baumannii*

55

Equipos y materiales requeridos

60

[0088]

- Caldo de nutrientes

65

- Bucle de cultivo estéril.

ES 2 790 635 T3

- Cultivo bacteriano cultivado en agar nutritivo
- Rotulador negro.

5 • Incubadora giratoria a 37°C.

- Quemador Bunsen.

10 • Recipiente universal estéril de 30 ml

Preparación de bacterias

[0089]

15 • Etiquete el lado del recipiente universal de 30 ml con el nombre del operador, la fecha y el microorganismo cultivado.

- Encienda el quemador de Bunsen a fuego alto.

20 • Retire la tapa del recipiente universal de 30 ml.

- Agregue 15 ml de caldo nutritivo estéril al recipiente universal estéril de 30 ml.

- Cierre la tapa del recipiente universal de 30 ml.

25

- Retire el bucle estéril de la envoltura de plástico.

- Retire la tapa de la placa de Petri que contiene agar nutritivo y cultivo bacteriano.

30 • Retire una sola colonia aplicando suavemente el bucle estéril a la colonia.

- Coloque la tapa sobre la placa de Petri.

- Retire la tapa del recipiente universal de 30 ml que contiene caldo de nutrientes.

35

- Agregue el ciclo de cultivo que contiene la colonia bacteriana al caldo de nutrientes durante 2 segundos.

- Retire y deseche el bucle de cultivo en la caja de riesgo biológico.

40 • Cierre la tapa del recipiente universal de 30 ml.

Almacenamiento de bacterias

[0090]

45

- Inserte un recipiente universal de 30 ml en una incubadora orbital compacta Stuart a 37°C

- Ajuste la incubadora a 150 RPM.

50 • Almacene el cultivo durante 16 horas.

- Retire el recipiente universal de 30 ml de la incubadora.

55 • El crecimiento bacteriano se indica cuando la solución del caldo de nutrientes se vuelve turbia en comparación con el caldo de nutrientes estéril.

- Si la solución de caldo aún está clara, deséchela y no la use.

- Los cultivos de caldo no pueden almacenarse y deben desecharse después de su uso.

60

Bacterias y bacteriófagos

[0091] Las bacterias y bacteriófagos fueron adquiridos de las reservas internas. Todas las bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio se detallan en la Tabla 2. Todas las bacterias se cultivaron de acuerdo con las instrucciones contenidas en el SOP correspondiente.

65

Tabla 2 – Bacterias y bacteriófagos utilizados en este estudio.

Bacterias	Medio	Bacteriófagos líticos
<i>P. aeruginosa</i> NC2000	Agar / caldo de nutrientes	ΦLIN24

- 5
- Fuente de muestras de agua*
- 10 **[0092]** La muestra de agua de mar se obtuvo de la playa Troon y la muestra de agua dulce se obtuvo de Drumpellier Lochs, Escocia, Reino Unido.
- Preparación de celulosa*
- 15 **[0093]** Se utilizó polvo de celulosa, tamaño de partícula promedio de 50 µm en este estudio. El polvo de celulosa a tratar con descarga en corona se manejó asépticamente.
- Inmovilización de bacteriófagos en celulosa*
- 20 **[0094]** Polvo de celulosa se colocó sobre la mesa de descarga en corona como se detalla en la inmovilización SOP. Se preparó una solución bacteriófaga de concentración de 1×10^7 PFU/ml para la inmovilización. La celulosa se trató con 2 tratamientos de descarga corona a 7,5 kV y se aplicó asépticamente una solución de bacteriófago de 10 ml al material. El polvo de celulosa se filtró al vacío para eliminar cualquier exceso de bacteriófagos en solución.
- 25 *Preparación de placa de 96 pocillos con bacteriófago inmovilizado y no inmovilizado en ambientes de mar y agua dulce.*
- [0095]** Cada pocillo de la placa se llenó con 200 µl de volumen final con volumen equivalente/peso de 0,2 g de bacteriófagos libres/bacteriófagos inmovilizados.
- 30 *Almacenamiento de muestras*
- [0096]** Cada placa de 96 pocillos se incubó a 40°C durante el estudio para indicar un curso de tiempo acelerado. Las placas de 96 pocillos solo se retiraron antes del muestreo.
- 35 *Muestreo de la supervivencia de bacteriófagos*
- 40 **[0097]** Cada muestra se analizó por triplicado mediante la adición de los contenidos de un solo pozo a 9 ml de caldo nutriente y 1 ml de cultivo líquido de la bacteria huésped *Pseudomonas aeruginosa* NCO2000. Las muestras se incubaron a 37°C durante dos horas en una incubadora orbital. Después de la incubación, las muestras se filtraron usando filtros de 0,2 µm y se diluyeron en serie 1/10 usando PBS para dilución a concentraciones de 1×10^{-1} - 1×10^{-8} . Un ensayo de placa se realizó mediante el método de superposición de agar blando, 200 µl de cada concentración incluyendo la concentración “pura” se sembró en placas de agar de nutrientes antes de inocularse. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche en una incubadora compacta LEEC. Después de la incubación, se contaron las placas visibles y se determinó PFU/ml.
- 45 **Ejemplo 2**
- 50 **[0098]** Los datos mostrados en la Figura 2 demuestran que los bacteriófagos inmovilizados eran más resistentes a la exposición UV de bacteriófagos libres.
- Ejemplo 3**
- 55 **[0099]** Las figuras 3 a 6 muestran la estabilidad en condiciones de almacenamiento de las preparaciones que comprenden bacteriófago unido covalentemente en diversas condiciones.
- 60 **[0100]** La Fig. 3 muestra la estabilidad al almacenamiento del fago único de *Peptobacterium* inmovilizado en celulosa. En este ejemplo, la preparación se almacenó en líquido (PBS), a 4°C en alícuotas de un solo uso.
- [0101]** La Fig. 4 muestra la estabilidad de almacenamiento del fago único de *Peptobacterium* inmovilizado en perlas de copolímero. En contraste con la Fig. 3, arriba, las perlas de copolímero se almacenaron a 4°C en partes alícuotas de un solo uso, pero se almacenaron en condiciones secas.
- 65 **[0102]** La Fig. 5 muestra el grado relativo de supervivencia (es decir, estabilidad) del bacteriófago libre e inmovilizado cuando se expone a condiciones de estrés. Las condiciones de estrés utilizadas se exponen a continuación:
- i. Húmedo - 4 semanas a 4°C

ii. Seco - 4 semanas a 4°C

iii. 30 segundos de exposición UV

iv. 1 minuto a 85°C.

[0103] La Fig. 6 muestra La estabilidad de almacenamiento de la patata bacteriófaga libre e inmovilizada almacenada en presencia del agente antimicótico vegetal Neozil. El almacenamiento fue en PBS con Neozil a 4°C durante la noche.

[0104] La Tabla 3 muestra la actividad del bacteriófago unido covalentemente a varios sustratos después de períodos de almacenamiento - se mantuvo una actividad significativa en todos los casos.

Tabla 3

Material	Condiciones de almacenamiento	Repetir uso	Huesped	Fago	Fecha de inicio	Fecha final/ultima prueba	Actividad mantenida
Cuadros de nylon	Seco a 4°C	Sí	<i>S. aureus</i>	K	1 feb 2011	4 feb 13 (2 años 3 días)	Sí
Perlas de copolimero de 1mm	Húmedo a 4°C	No	<i>P. aeruginosa</i>	S1	22 mar 12	22 mayo 13 (1 año 2 meses)	Sí
Celulosa	Mojado a 4°C	No	<i>Peptobacterium</i>	FP01	11 mar 2011	3 jun 13 (2 años 3 meses)	Sí
Celulosa	Seco a 4°C	No	<i>Peptobacterium</i>	FP01	13 sep 11	3 sep 12 (1 año 3 meses)	Sí
Alginato	Húmedo a 4°C	No	<i>Salmonella</i>	Shield	1 mayo 2012	1 jun 12 (1 meses)	Sí

Ejemplo 4

[0105] Las figuras 7 a 11 muestran la estabilidad de las preparaciones que comprenden bacteriófagos covalentemente unidos en el suelo.

[0106] Las figuras 7 y 8 muestran la supervivencia de bacteriófagos libres y inmovilizados sobre tiras de celulosa y nylon, respectivamente, se incubaron en muestras de suelo estériles y no estériles. Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente utilizando celulosa de un solo uso o tiras de nylon.

[0107] La Fig. 9 muestra la supervivencia del polvo de celulosa tratado con fago de *Peptobacterium* después de la incubación en suelo no estéril. La Fig. 10 muestra la actividad antibacteriana y, por lo tanto, la eficacia/eficacia del fago superviviente. Estas pruebas se realizaron a temperatura ambiente utilizando *Peptobacterium* como huésped.

[0108] La Fig. 11 muestra el grado de actividad antibacteriana que se muestra cuando se inmovilizan múltiples tipos de bacteriófagos en nylon en presencia de bacterias huésped susceptibles y no susceptibles, es decir, tanto las bacterias huésped como las no huésped están expuestas al bacteriófago.

[0109] La Fig. 12 muestra la actividad antibacteriana del bacteriófago de *Salmonella* inmovilizado en láminas de alginato. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando láminas de alginato que se almacenaron en condiciones secas a 4°C.

Ejemplo 5 - Alimentación de camarones

[0110] Los gránulos de alimentación para camarones se prepararon de la siguiente manera: una formulación de proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas que comprende 182 g/kg de harina de pescado, 200 g/kg de polvo de arroz, 300 g/kg de mezcla de molino, 118 g/kg de harina de trigo, 185 g/kg de harina de coco y 15 g/kg de premezcla de vitaminas y minerales se mezclaron completamente en un mezclador de doble eje.

[0111] Un pulverizador se utiliza para moler la mezcla en un polvo fino.

[0112] Luego se usó un acondicionador para exponer el polvo fino a vapor a alta presión (150 psi) durante 30 minutos.

Esto aumentó el contenido de humedad del polvo, además de comenzar a convertir el almidón en una forma fácilmente digerible.

5 [0113] A continuación el polvo acondicionado entró en un molino de gránulos para producir gránulos de 1,5 mm de diámetro.

[0114] Los gránulos se sometieron a una segunda etapa de acondicionamiento para facilitar la unión del almidón y/o gluten en el gránulo. Este paso aumentó dramáticamente la estabilidad del gránulo en agua.

10 [0115] Los gránulos se enfriaron y secaron. Los gránulos secos se pulverizaron posteriormente con una suspensión acuosa de bacteriófago unida covalentemente a partículas de nylon de 100 micras de diámetro medio a una concentración de 10^9 CFU ml⁻¹ se dejaron secar y luego se procesaron en recipientes.

15 **Ejemplo 6 - Piensos para peces**

[0116] Gránulos de pienso para peces se hicieron como sigue:

Una formulación de proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas que comprende 201 g/kg piensos para peces, 11 g/kg de aceite de pescado, 251 g/kg de salvado de arroz, 254g/kg de mezcla de molino, 150 g/kg de harina de copra, 118 g/kg de arroz partido, 10 g/kg de harina de trigo y 5 g/kg de premezcla de vitaminas y minerales se mezclaron completamente en un mezclador de doble eje.

[0117] Se usó un pulverizador para moler la mezcla en un polvo fino.

25 [0118] Se usó un acondicionador para exponer el polvo fino a vapor a alta presión (150 psi) durante 30 minutos.

[0119] A continuación el polvo acondicionado entró en una molienda de gránulos para producir gránulos de 5 mm de diámetro.

30 [0120] Los gránulos se enfriaron y se secaron. Los gránulos secos se pulverizaron posteriormente con una suspensión acuosa de bacteriófago unido covalentemente a partículas de celulosa de diámetro medio de 50 micras a una concentración de 10^9 CFU ml⁻¹ se dejaron secar y luego se procesaron en recipientes.

35 **Ejemplo 7 - Gránulos para peces con bacteriófagos unidos covalentemente**

[0121] Gránulos de alimento para peces sobre la base de germen de trigo (composición: germen de trigo, derivados de origen vegetal, harina de pescado y derivados de pescado, levaduras, extractos de proteínas vegetales, moluscos y crustáceos, vitaminas y minerales) se sometieron a dos pases a través de una máquina de corona de lecho plano a 7,5KV. Los gránulos se rociaron inmediatamente con solución de bacteriófagos (1×10^7 pfu/ml de Lin24) y se secaron al aire, y se almacenaron durante dos semanas a temperatura ambiente.

40 [0122] Se preparó un césped de *Campylobacter jejuni* (ATCC12851) sobre placas de Petri y gránulos de pescado fragmentados recuperados del almacenamiento y colocados en la superficie. Estos se incubaron a 37°C durante 36 horas.

45 [0123] El examen de los platos mostró zonas de limpieza alrededor de los fragmentos de gránulos, ilustrados en la Fig. 13. Los gránulos tratados de manera similar sin tratamiento corona estaban inactivos (no mostrados) sin zonas visibles de limpieza.

50 [0124] El experimento se repitió con las pastillas a base de maíz (derivados de maíz de origen vegetal, harina de pescado y derivados de pescado, levaduras, vitaminas y minerales y Spirulina), con resultados similares (no mostrados).

55 **Ejemplo 8 - Tratamiento de la infección por Vibrio de camarones**

[0125] Desarrollamos los siguientes protocolos para el tratamiento de las infecciones por *Vibrio* de camarones.

Aislamiento de bacteriófagos que muestran actividad lítica contra *Vibrio parahaemolyticus*

60 [0126] El aislamiento de bacteriófagos que muestran actividad lítica contra *V. parahaemolyticus* se lleva a cabo utilizando 3 métodos. Las muestras ambientales se añaden directamente a un recubrimiento de agar *V. parahaemolyticus* y también se incubó a 37°C durante 9 h con un cultivo de *V. parahaemolyticus*. Las muestras de *V. parahaemolyticus* también se someten a 1 mg/ml de mitomicina C para inducir la replicación de bacteriófagos.

65 [0127] La presencia de bacteriófagos líticos se confirma por la formación de placas claras en un recubrimiento de agar *V. parahaemolyticus*.

Caracterización de bacteriófagos

5 [0128] Cada bacteriófago lítico aislado se caracteriza por determinar el intervalo de huéspedes, la eficiencia del tamaño de la explosión del recubrimiento (EOP), la curva de crecimiento, la caracterización molecular y el análisis de restricción.

Intervalo de huéspedes y eficiencia del revestimiento

10 [0129] Cada bacteriófago se agrega a las superposiciones de agar de cada *V. parahaemolyticus* aislado para determinar el intervalo de huéspedes. La EOP se determina agregando muestras de una serie de factores de dilución a las superposiciones de agar de cada *V. parahaemolyticus* aislado.

Medición del tamaño de la explosión y las curvas de crecimiento

15 [0130] El tamaño de la explosión de cada bacteriófago se determina para cada *V. parahaemolyticus* aislado por incubación de un cocultivo de bacterias y bacteriófagos. Se toman muestras en diferentes momentos para establecer la cantidad de bacterias y la cantidad de bacteriófagos que quedan en la solución. El tamaño de la explosión se calcula usando el siguiente cálculo:

20
$$\text{Tamaño de explosiones} = (\text{Número de bacteriófagos durante el período estacionario}) / (\text{Número de bacteriófagos durante el período de latencia})$$

Análisis de restricción

25 [0131] El ADN del bacteriófago se somete a digestión mediante enzimas de restricción para asegurar que se usen bacteriófagos genéticamente idénticos en el cóctel de bacteriófagos.

Prueba de actividad antimicrobiana

30 [0132] Pruebas de tanque se utilizan para medir la actividad de un bacteriófago inmovilizado en *V. parahaemolyticus*. Este sistema consiste en agua salada estéril inoculada con una concentración bacteriana conocida y un tanque que contiene suplementos para replicar las condiciones del estanque. Las bacterias se agregan al agua salada que contiene una concentración conocida de bacteriófagos inmovilizados.

35 [0133] La multiplicidad de infección (MOI) se varía para determinar el impacto a diferentes concentraciones (Tabla 4).

Tabla 4: Prueba de tanque MOI

	MOI	Bacteriófagos (pfu/mL)	Bacteria (cfu/mL)
40	10	1×10^7	1×10^6
	1	1×10^6	1×10^6
	0,1	1×10^5	1×10^6
	0,01	1×10^4	1×10^6

45

Resultados y criterios de éxito

[0134] Los siguientes son los resultados identificados:

- 50
- Un banco de cultivo bacteriano que contiene 3 patógenos *V. parahaemolyticus*
 - Dos bacteriófagos totalmente caracterizados presentan actividad lítica a ambas cepas de *V. parahaemolyticus*
 - Cada bacteriófago y un cóctel de bacteriófagos inmovilizados en celulosa y alimento para camarones y sometidos a pruebas de actividad antimicrobiana en una capa de agar y pruebas de tanque.
 - Un mínimo de una reducción de 2 log en bacterias observada por bacteriófagos inmovilizados en cada prueba de tanque.
- 55

Pruebas de laboratorio y tanque

60 [0135] El objetivo de esta etapa es ejemplificar aún más la efectividad del cóctel bacteriófago inmovilizado en el tratamiento de *V. parahaemolyticus* realizando pruebas de laboratorio adicionales y realizando una prueba de tanque que contenga camarones vivos.

Prueba de vida útil

65 [0136] La vida útil a largo plazo de la fórmula de bacteriófago inmovilizado se evalúa a diferentes temperaturas de almacenamiento usando métodos estándar. Esto determina las condiciones de almacenamiento recomendadas y la

vida útil de un producto final.

Modelo de infección con camarón vivo

5 **[0137]** Los camarones se añaden a depósitos separados y se sometieron a 3 concentraciones diferentes de *V. parahaemolyticus*. Esto determina la concentración requerida para provocar la patología SMT. Los camarones se evalúan para la infección por *V. parahaemolyticus* del hepatopáncreas observando las diferencias en el tamaño del hepatopáncreas, el peso total frente a los controles y la mortalidad general.

10 Prueba de tanque con camarones vivos

[0138] Para evaluar la eficacia de las opciones de tratamiento, los camarones se alimentan con una concentración específica de alimento que contiene bacteriófagos inmovilizados y una concentración específica de bacteriófagos inmovilizados que contienen celulosa. Los camarones tratados están expuestos a una dosis infecciosa de *V. parahaemolyticus*. Camarones se evalúan, para infección por *V. parahaemolyticus* del hepatopáncreas, diferencias en el tamaño del hepatopáncreas y el peso total frente a los controles, y mortalidad general.

Procedimientos

20 Pruebas de vida útil

[0139] El material inmovilizado se almacena a 4°C, temperatura ambiente y a 30°C para representar un clima tropical. También se compara la vida útil de la solución de bacteriófago libre almacenada a cada temperatura. Cada material y solución se agregan a las superposiciones de agar de todos los aislamientos de *V. parahaemolyticus*. La actividad antimicrobiana se confirma por la presencia de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del material. El material se muestrea en diferentes momentos hasta que cesa la actividad antimicrobiana.

Modelo de infección con camarones vivos

30 **[0140]** Se utiliza un total de 20 camarones *L. vannamei* para el modelo de infección. Un total de 5 camarones están expuestos a diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus*. Cada camarón se mantiene en un tanque individual. Las concentraciones son 1x10⁴ UFC, 1x10² UFC y 10 UFC que representan dosis subletales. *V. parahaemolyticus* se introduce mediante la ingestión de partículas de alimentos de camarones, sonda invertida o inyección directa.

35 Prueba de tanque

[0141] Un total de 5 repeticiones que contienen 10 camarones post larvales *L. vannamei* se exponen a la alimentación de camarones con bacteriófago inmovilizado y celulosa con bacteriófago inmovilizado. Un total de 5 repeticiones que contienen 10 camarones *L. vannamei* de etapa post larval también están expuestas al bacteriófago libre agregado a la alimentación de camarones y al bacteriófago libre agregado a la celulosa. Todos los tratamientos se secan y se incuban durante 7 días a temperatura ambiente antes del tratamiento.

45 **[0142]** Después de una dosis de tratamiento, los camarones se exponen entonces a una dosis infecciosa de *V. parahaemolyticus* según lo determinado en el modelo de infección. *V. parahaemolyticus* se administra mediante la ingestión de partículas de alimentos de camarones, la deglución inversa o mediante inyección directa. La mortalidad del camarón se registra diariamente y, tras la mortalidad, se mide el hepatopáncreas de cada camarón y se toman muestras de los recuentos bacterianos y la presencia de nódulos hemocíticos y necrosis hialina del tejido. Los camarones tratados se comparan con los grupos de control que constan de camarones expuestos a *V. parahaemolyticus* solo y camarones expuestos a cada tratamiento de bacteriófago solo. El estudio se realiza durante 50 30 días o en función de los resultados del modelo de infección.

Resultados y criterios de éxito

55 **[0143]** Los siguientes son los resultados identificados:

- El protocolo de inmovilización está optimizado.
- La vida útil del bacteriófago inmovilizado a temperatura elevada, temperatura ambiente y a 4°C comienza y se determina a lo largo del estudio.
- La efectividad del bacteriófago inmovilizado como biocontrol se confirma con camarones vivos.
- El éxito se define como una reducción estadísticamente significativa en las diferencias en el tamaño del hepatopáncreas y el peso total frente a los controles, y la mortalidad por camarones o la patología del hepatopáncreas cuando se expone al tratamiento con bacteriófagos inmovilizados.

Ejemplo 9

65 **[0144]** Camarones de agua salada fueron expuestos a *Vibrio parahaemolyticus*, el agente causante de AHPND

(trastorno de necrosis de hepatopáncreas agudo). A continuación, esta infección se trató dando al camarón una alimentación que comprende bacteriófagos inmovilizadas activos contra *V. parahaemolyticus*.

Adquisición y cultivo de microorganismos y bacteriófagos

[0145] La designación de la cepa de *V. parahaemolyticus* 0004 ha mostrado mortalidad en camarones y está disponible para el trabajo inmediato. *V. parahaemolyticus* 0004 se cultivará habitualmente utilizando los métodos detallados anteriormente. El bacteriófago DRGS ha demostrado tener actividad lítica contra *V. parahaemolyticus* 0004 y se utilizará para el estudio.

Configuración del tanque de camarones

[0146] Se instalaron dos tanques de agua salada de 17 litros con un filtro biológico maduro y movimiento de agua proporcionado por una bomba de circulación. Para el estudio se usó agua salada con una salinidad de 34 ppm purificada usando ósmosis inversa y mantenida a una temperatura de 26°C.

Supervivencia de camarones de agua salada y absorción de comida

[0147] Un total de 20 camarones de agua salada *Thor amboinensis* se adquirieron y se añadieron 10 especímenes a 2 tanques separados. En este estudio se utilizó alimento para camarones de 1 mm de diámetro fabricado por CP Foods y se evaluó la absorción del alimento por camarones durante 3 días.

Inmovilización del bacteriófago

[0148] El material de alimentación de CP se desinfectó por exposición a luz UV durante 30 minutos antes de exponerse dos veces a tratamientos corona a 7,5 kV. Se aplicó un total de 10 ml de un stock de 1×10^8 PFU de bacteriófago a 20 gramos de material de alimentación. Cada material se lavó 3 veces en agua destilada estéril y se secó en una cabina de flujo laminar. La actividad antimicrobiana se evaluó usando una capa de agar y usando la prueba de cultivo para determinar la actividad antimicrobiana.

Programa de cuidado y alimentación de *Thor amboinensis*

[0149] Los camarones se alimentaron regularmente dos veces al día con alimento equivalente al 5% de su peso corporal estimado. Un tanque se alimentó con alimentación de CP no tratada y el otro tanque se alimentó con alimentación que comprende bacteriófago inmovilizado. La alimentación se produjo durante 3 días antes de la inoculación de los tanques con *V. parahaemolyticus* y se mantuvo durante la inoculación.

Inoculación y evaluación de la salud de camarones

[0150] Cada tanque se dosificó con un cultivo de *V. parahaemolyticus* para hacer un volumen final de 1×10^8 UFC/ml en el tanque. La salud del camarón se evaluó después de 6 horas de exposición y cada camarón recibió una calificación utilizando los criterios descritos en la Tabla 5. La salud se evaluó diariamente. Se tomó una muestra de agua del tanque diariamente para proporcionar recuentos de bacterias en cada tanque. Para los recuentos bacterianos, una muestra de agua del tanque se sometió a 8 x 1/10 de diluciones en serie y una muestra se colocó en placas sobre agar TCBS. Para los recuentos de bacteriófagos, una muestra de agua del tanque se pasó por un filtro de 0,2 µM y se sometió a 8 x 1/10 diluciones en serie y una muestra de 100 µl se añadió a un recubrimiento de agar nutritivo blando de *V. parahaemolyticus* 0004 3% NaCl.

Tabla 5 Evaluaciones de evaluación de la salud del camarón

Clasificación	Descripción
A	Vivo, movimiento regular, sin dolencias observables, apetito.
B	Vivo, movimiento limitado, respuesta limitada a estímulos, apetito.
C	Vivo, incapaz de moverse/pararse, respuesta muy limitada a los estímulos, sin apetito.
D	Muerto.

Resultados

[0151] Todo el material que contenía bacteriófago inmovilizado mostró actividad antimicrobiana y dio como resultado una reducción de 2 log cuando se expuso directamente a la bacteria en solución. No se observaron víctimas de camarones antes de la inoculación con *V. parahaemolyticus* en ambos tanques (Tabla 6; Figura 14). Se observó un total de 8 camarones víctimas en el control sin tratamiento y se observó un total de 1 camarón víctima en el tanque de tratamiento (Tabla 6; Figura 14). Se observó que los camarones sobrevivientes en el tanque de control sin tratamiento aumentaron la morbilidad en comparación con los camarones sobrevivientes en el tanque de tratamiento (Tabla 6; Figura 14). No se observaron diferencias significativas en el número de bacterias en cada tanque y se aisló

significativamente más bacteriófago del tanque de tratamiento (Tabla 7).

Tabla 6 - Evaluaciones de salud de *Thor amboinensis* utilizadas en este estudio

Hora	Sin control de tratamiento	Tratamiento de bacteriófagos inmovilizados
Día 0	A - 10 B - 0 C - 0 D - 0	A - 10 B - 0 C - 0 D - 0
Día 1	A-10 B - 0 C - 0 D - 0	A - 10 B - 0 C - 0 D - 0
Día 2	A-10 B - 0 C - 0 D - 0	A - 10 B - 0 C - 0 D - 0
Día 3 (inoculación)	A - 0 B - 1 C - 4 D - 5	A - 8 B - 1 C - 1 D - 0
Día 4	A - 0 B - 2 C - 0 D - 8	A - 9 B - 0 C - 0 D - 1
Día 5	A - 0 B - 0 C - 2 D - 8	A - 9 B - 0 C - 0 D - 1

Tabla 7 - Número de bacterias y bacteriófagos recuperados de cada tanque.

Tanque de prueba	Número de <i>V. parahaemolyticus</i> (UFC/ml)	
	Día 3	Día 4
Sin control de tratamiento	1 x10 ⁶	1,2x10 ⁴
Tanque de bacteriófago inmovilizado	1,1x10 ⁶	1x10 ⁴

Conclusiones

[0152] Bacteriófago inmovilizado en alimento para camarones confiere un efecto protector sobre camarones *Thor amboinensis* expuestos a una dosis infecciosa grande de una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* que se sabe que causa AHPND en camarones acuícolas. No se encontraron diferencias significativas en los números de *V. parahaemolyticus* en el agua del tanque, lo que indica que el efecto protector está ocurriendo localmente en el sitio de la infección. Al final de la prueba, se sacrificaron 3 camarones y se confirmó la presencia de bacteriófagos en el intestino.

[0153] Por lo tanto, la invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura, generalmente de camarones, langostinos y peces.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición que comprende bacteriófagos unidos covalentemente a una partícula o gránulo para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en peces o crustáceos, en donde la partícula o gránulo comprende carbohidratos o proteínas a las que los bacteriófagos están unidos covalentemente.
- 2.** Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la partícula o gránulo está hecho de material comestible.
- 10 **3.** Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en el tratamiento de infecciones en crustáceos por especies de bacterias *Vibrio*.
- 15 **4.** Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para uso en el tratamiento de infecciones en peces por especies de bacterias *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Moritella*, *Rickettsia*, *Piscirickettsia*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Photobacterium*.
- 20 **5.** Alimento para crustáceos o peces, que comprende bacteriófagos unidos covalentemente a una partícula para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en peces o crustáceos, en donde la partícula comprende carbohidratos o proteínas a las cuales están unidos covalentemente los bacteriófagos.
- 6.** Alimento para uso según la reivindicación 5, en donde la partícula está hecha de material comestible.
- 25 **7.** Alimento para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para uso en el tratamiento de infección por especies de bacterias *Vibrio* en crustáceos.
- 8.** Alimento para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, para uso en el tratamiento de infecciones por bacterias *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Moritella*, *Rickettsia*, *Piscirickettsia*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Photobacterium* en peces.
- 30 **9.** Un método para preparar alimento para peces o crustáceos que comprende mezclar bacteriófagos unidos covalentemente a partículas en componentes de alimento, para producir alimento que comprende dichas partículas, en donde las partículas comprenden carbohidratos o proteínas a las cuales los bacteriófagos están unidos covalentemente.
- 35 **10.** Un método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende:
- (a) combinar componentes de alimentación para formar una mezcla,
 - (b) tratar térmicamente la mezcla para (i) aumentar su contenido de humedad, o (ii) calentar y cocinar la mezcla, o (iii) tanto (i) como (ii),
 - 40 (c) enfriar la mezcla tratada y
 - (d) agregar posteriormente las partículas a la mezcla tratada y enfriada y, opcionalmente, formar gránulos de alimentación que comprenden bacteriófagos unidos covalentemente a las partículas.
- 45 **11.** Un método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, que comprende agregar las partículas a los gránulos de alimentación formados, pulverizando opcionalmente los gránulos con una solución o suspensión de las partículas.
- 50 **12.** Alimento para crustáceos o peces que comprende componentes alimenticios comestibles a los que se une covalentemente el bacteriófago, para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas en peces o crustáceos, en donde los componentes alimenticios comestibles comprenden carbohidratos o proteínas a las que se une covalentemente el bacteriófago.
- 13.** Alimento para uso según la reivindicación 12, en forma de gránulos, opcionalmente de diámetro de hasta 25 mm.
- 55 **14.** Un método para preparar alimento para peces o crustáceos que comprende unir covalentemente bacteriófagos a los gránulos de alimentación, en donde el gránulo comprende carbohidratos o proteínas a las que están unidos covalentemente los bacteriófagos.
- 60 **15.** Un método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende formar gránulos a partir de componentes de alimentación, activar los gránulos y combinar gránulos activados con una solución o suspensión de bacteriófagos.

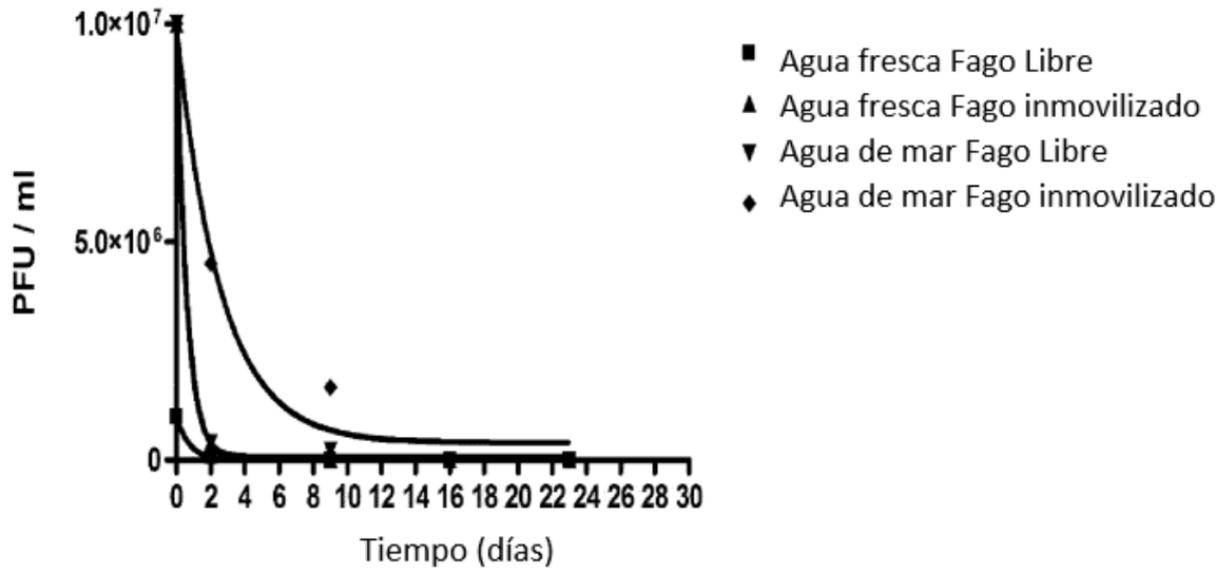


Fig. 1

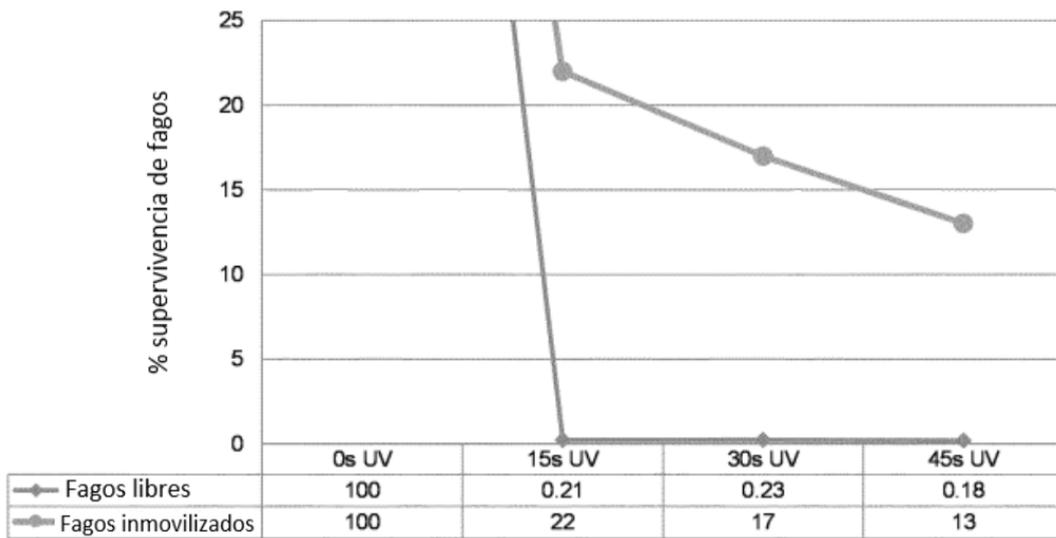


Fig. 2

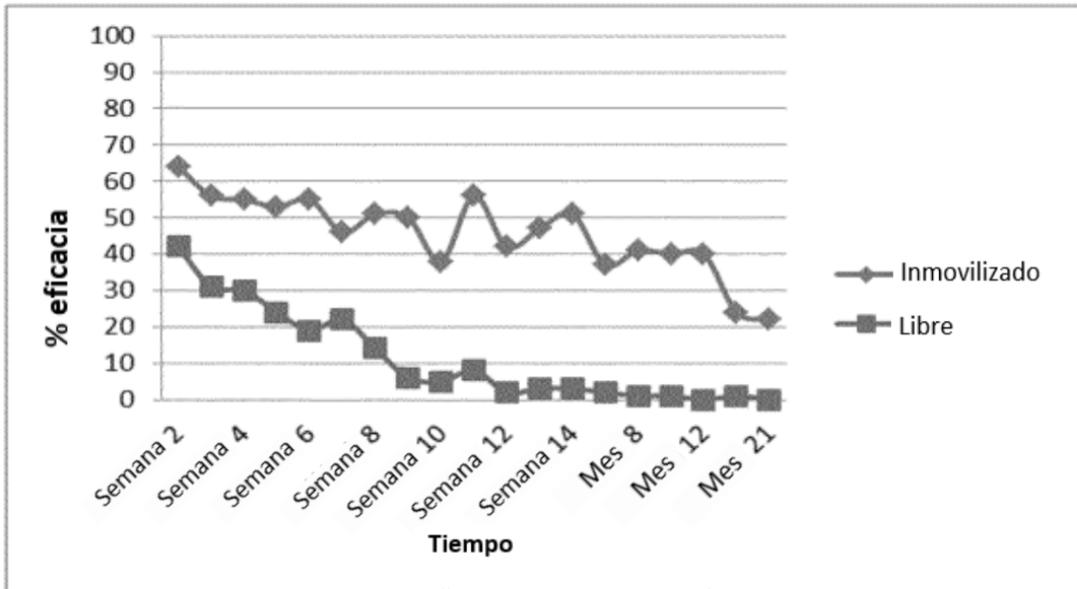


Fig. 3

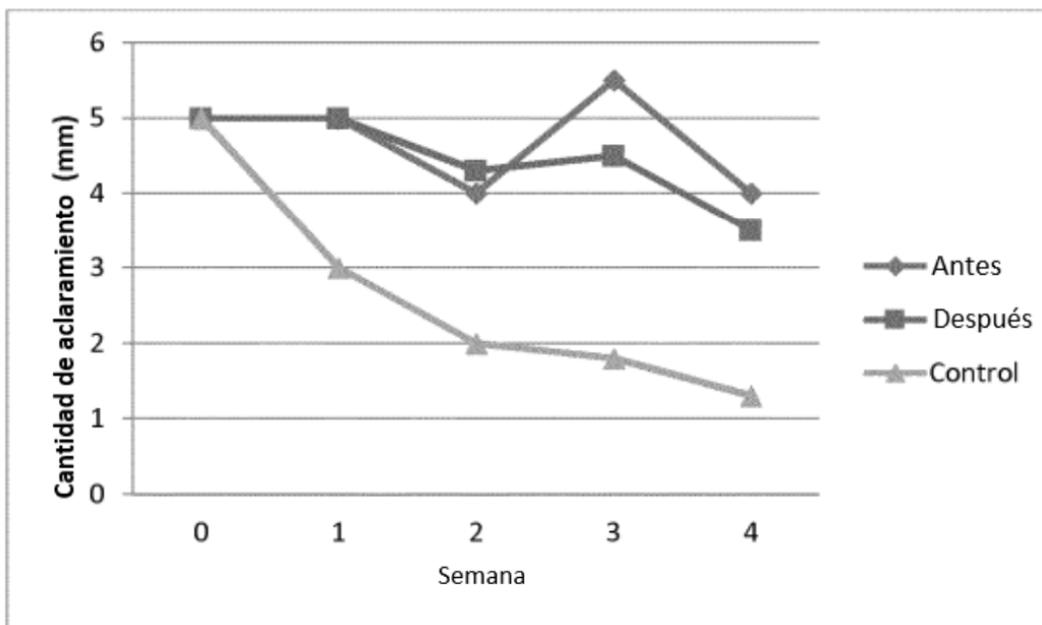


Fig. 4

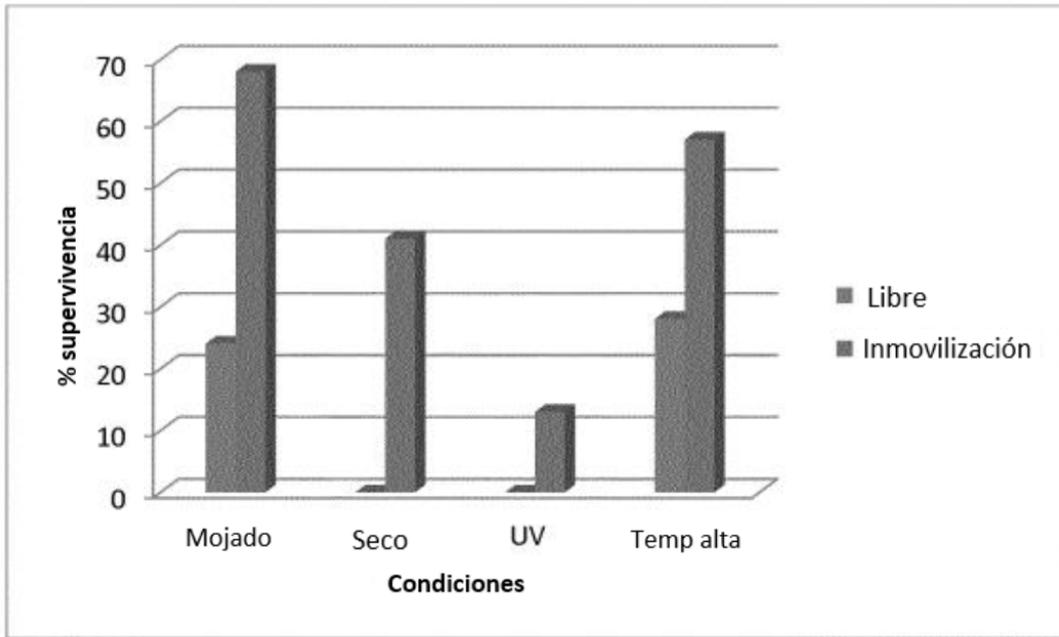


Fig. 5

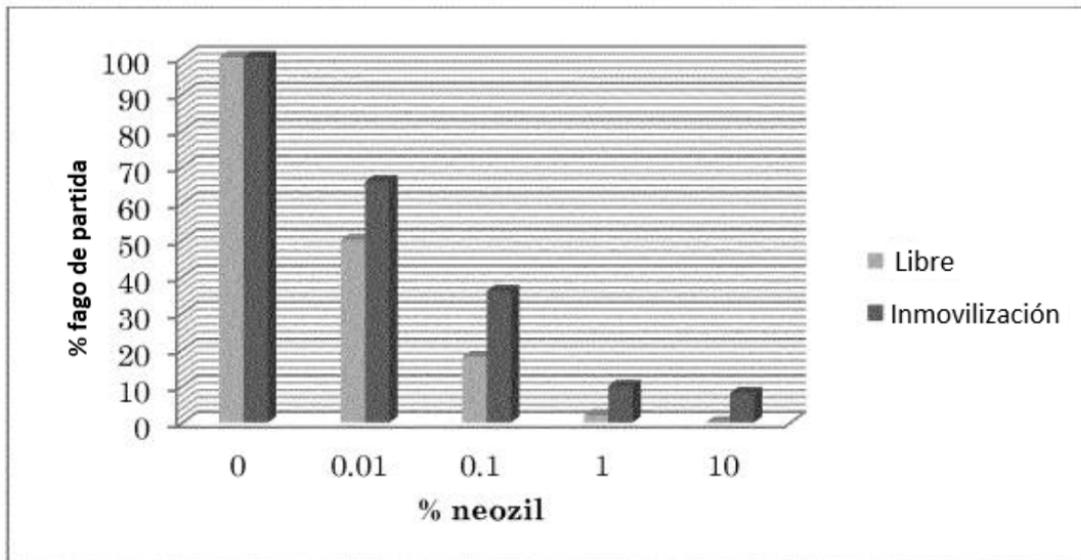


Fig. 6

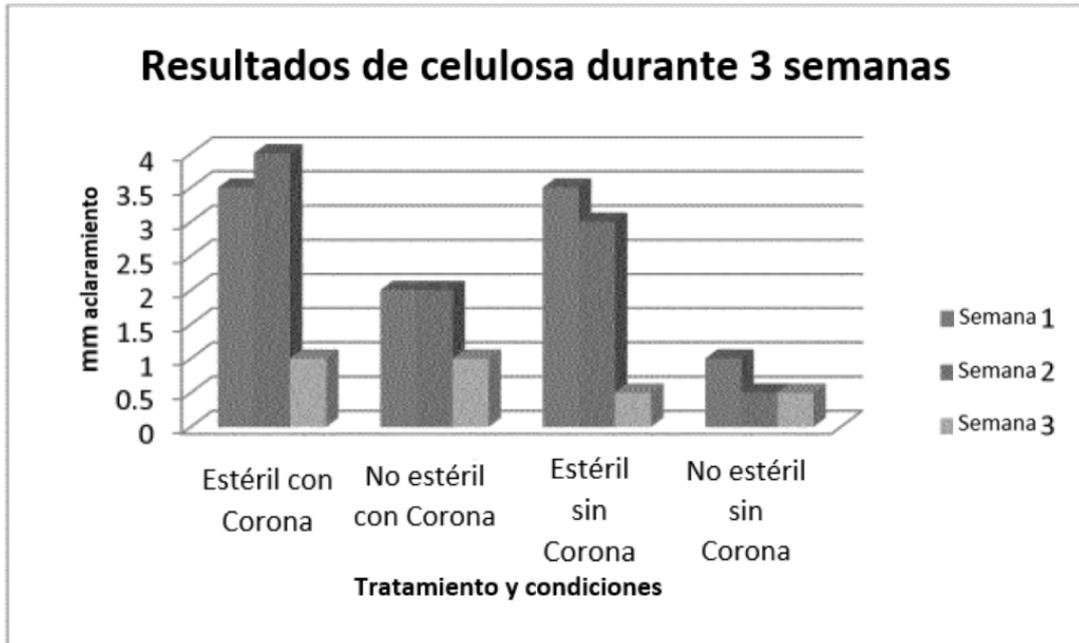


Fig. 7

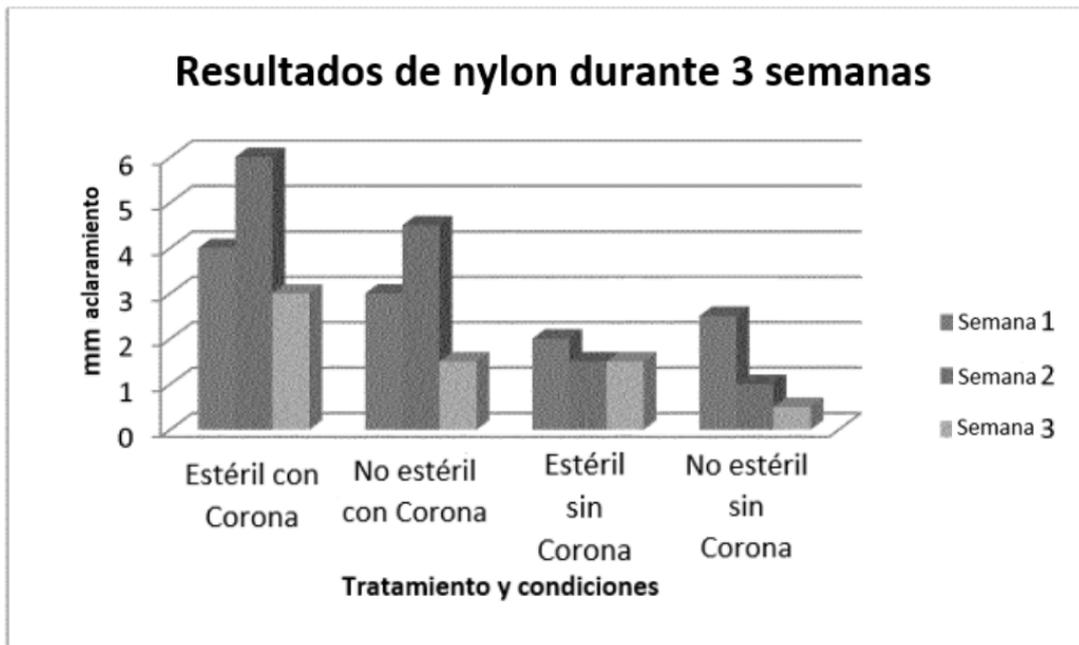


Fig. 8

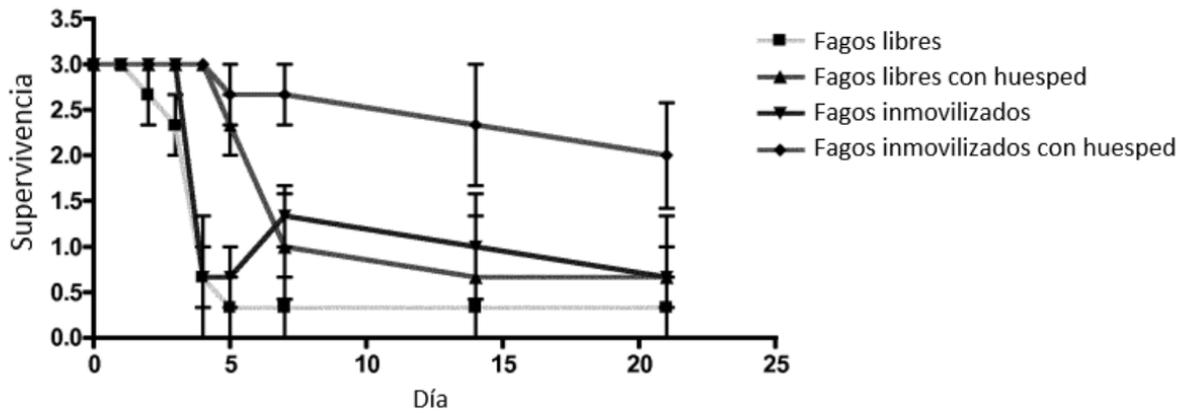


Fig. 9

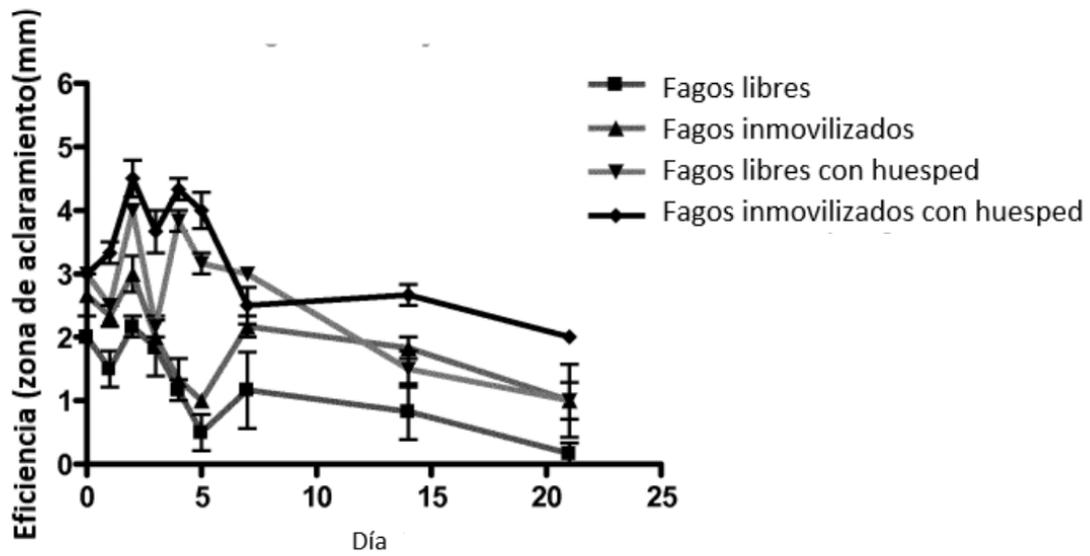


Fig. 10

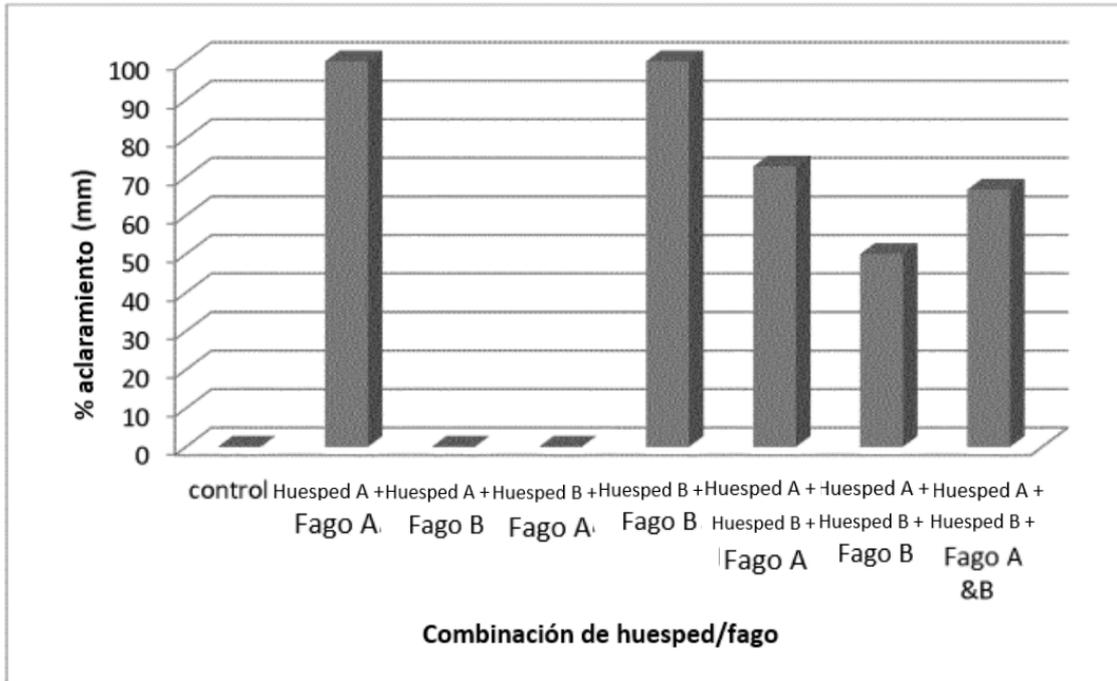


Fig. 11

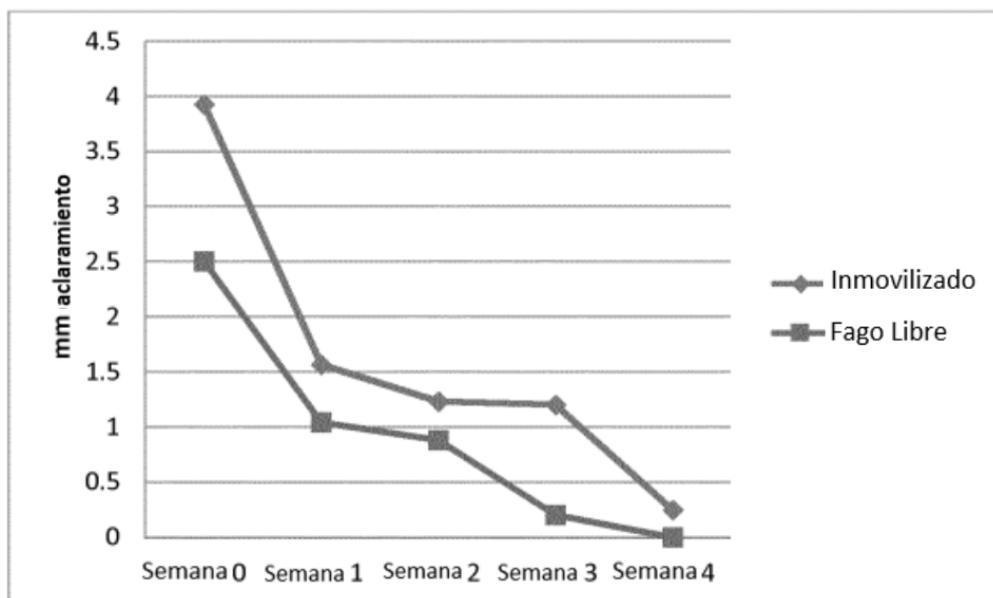


Fig. 12

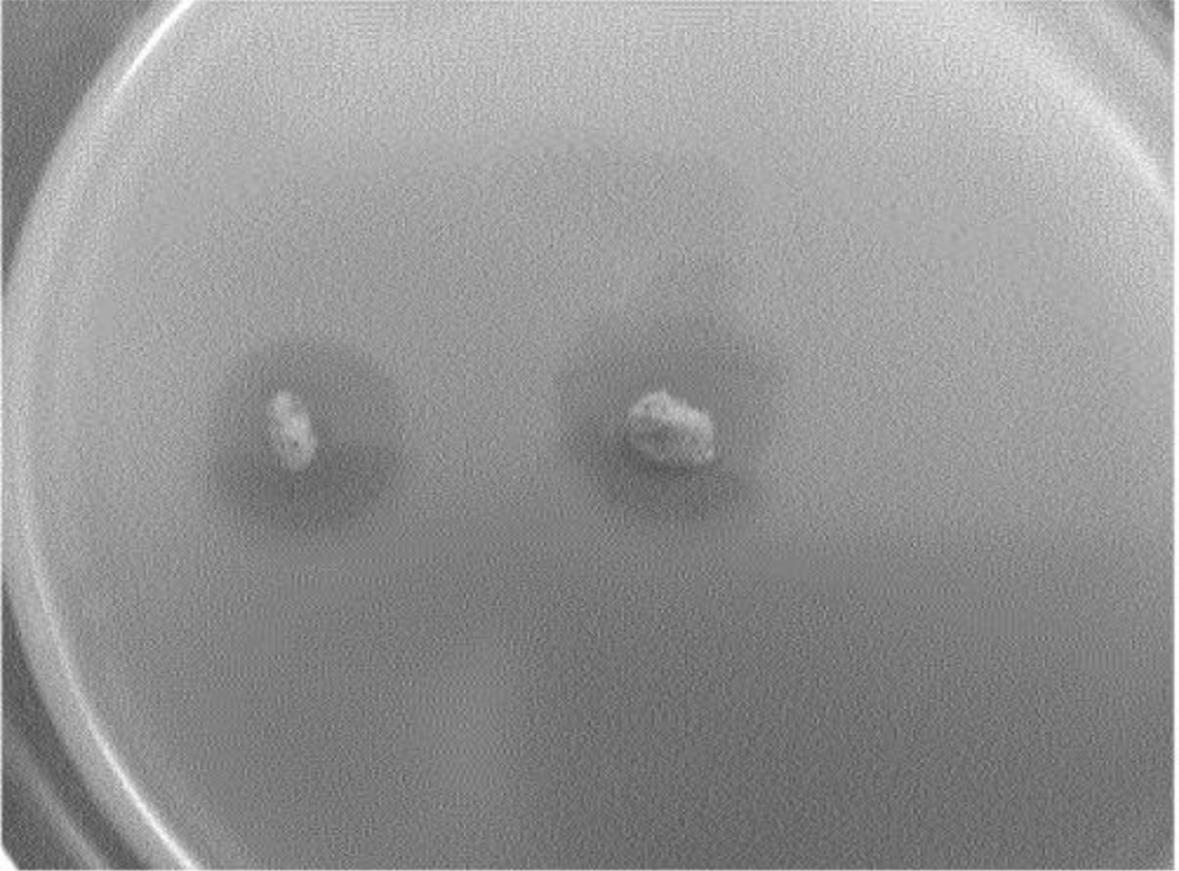


Fig. 13

Fig. 14

