

REF: Case No. O.101 London,
DIVISIONAL.-

Como divisional de la solicitud de patente
Nº. 391.698 del 28 de mayo de 1.971

417901

Nº 417.901

F.C. 8-1-70
Int. Cl. A23K/c12K



MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: UNILEVER N.V.

RESIDENCIA: Burgemeester s'Jacobplein 1, ROTTERDAM,

Holanda.-

ENUNCIADO: UN METODO MEJORADO PARA LA PRODUCCION DE

PIENSO.-

Prioridad: Patente británica n.º 26746/70 del 3.6.70

417901

14 AGO 1950



1

Esta invención se refiere a la cría de cerdos y especialmente concierne a la provisión de un régimen para reducir su susceptibilidad a los trastornos del tracto gastrointestinal.

5

Estos trastornos son debidos frecuentemente a la presencia en el intestino de una o más variedades patógenas de la bacteria Escherichia coli, especialmente las variedades que presentan los serotipos siguientes:

10

<u>Clasificación de Weybridge</u>	<u>Clasificación internacional de serotipos</u>
G7	O8 : K87 (B) K88a,b(L)
E65	O45 : K
E57	O138 : K81 (B)
E4	O139 : K82 (B)
E68II	O141 : K85a,b → K85a,c(B)
G1253	O147 : K89 (B) K88a,c(L)
Abbotstown	O149 : K91 K88a,c(L)

15

20

Cuando el ambiente de la dieta del cerdo es alterado, por ejemplo cuando es realojado o destetado, el cambio de circunstancias deja el sistema del cerdo en un estado favorable a la proliferación de las variedades patógenas de E. coli; y los trastornos gastro-intestinales que pueden producirse entonces reducen la salud general del animal y el ritmo de aumento de peso y con frecuencia producen la muerte.

25

30

Esta invención es el resultado de nuestro descubrimiento de que el intestino del cerdo puede ser estimulado a producir anticuerpos de las variedades patógenas de E. coli ya presentes allí, introduciendo en el intestino (a diferencia de la introducción en la corriente sanguínea, como ocurre por inyección) las endotoxinas de uno o más de



41790114

1 los serotipos de E. coli antes citados, sustancialmente
exentas de los organismos E. coli vivos.

5 Al especificar como "endotoxinas" la sustancia que
ha de ser introducida en el intestino del cerdo, no preten-
demos excluir de esta sustancia la presencia de exotoxinas
o la presencia del material celular dentro del cual están
encerradas las endotoxinas en la bacteria viva; simplemen-
to queremos decir que las endotoxinas son de importancia
fundamental para obtener el efecto inmunológico deseado
10 mientras que las exotoxinas y los residuos celulares no lo
son. Sin embargo, en ocasiones será conveniente dejar las
exotoxinas o los residuos celulares o ambos asociados con
las endotoxinas; en primer lugar, por ahorrarse la moles-
tia de separarlas y en segundo lugar, para poder utilizar
15 la capacidad antigénica que posean.

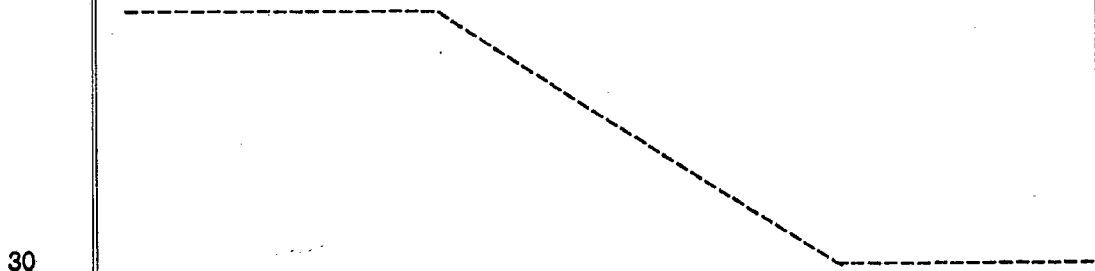
Como ya se ha indicado, la introducción en el in-
testino ("administración") de las endotoxinas de uno sola-
mente de los estereotipos de E. coli anteriores ejerce cier-
to efecto beneficioso, en tanto en cuanto entonces se ha
reducido la capacidad de ese serotipo para producir daños.
20 Sin embargo, es preferible administrar las endotoxinas de
todos los serotipos. Las endotoxinas que han de ser admi-
nistradas pueden ser obtenidas cultivando cada serotipo
(se puede obtener una muestra de cada uno de ellos del La-
boratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura
y Pesquerías, New Haw, Weybridge, Surrey, Inglaterra) y
cuando el crecimiento del microorganismo, y por lo tanto
la producción de endotoxinas, ha llegado a un grado adecua-
do, matar los microorganismos proliferantes y liberar las
25 endotoxinas. Esto puede realizarse por ebullición o en auto-
30

417901¹⁴ AGO



1 clave. Los cultivos esterilizados completos, cada uno de
los cuales contiene exotoxinas y residuos celulares así co-
mo endotoxinas, pueden ser combinados después y administra-
dos. Sin embargo, en lugar de esterilizar los cultivos com-
5 pletos, es preferible separar las bacterias (convenientemen-
te por centrifugación) y tratarlas en un pequeño volumen
de un medio acuoso (por ejemplo, agua o solución salina) pa-
ra matar las bacterias y producir la liberación de las en-
dotoxinas.

10 La forma más sencilla y más económica de matar las
bacterias separadas es por calentamiento. Si el calentamien-
to es suficientemente prolongado - por ejemplo, 1 hora a
100°C, 20 minutos a 125°C - gran parte de la endotoxina es
liberada de su asociación con las paredes celulares de las
15 bacterias matadas y liberada al medio en el cual se está
efectuando la calefacción. Las endotoxinas combinadas resi-
duales pueden ser pasadas a solución, según hemos hallado,
por tratamiento con un enzima como tripsina, lisozima,
pepsina, lipasa o mezclas de las mismas. Los resultados de
20 procesos de tratamiento típicos se encuentran compendiados
en la Tabla I, que indica las proporciones relativas
(título) de endotoxinas liberadas al agua mediante un
tratamiento preliminar para matar las bacterias, seguido de
un tratamiento con enzima para liberar la endotoxina que ha
25 quedado combinada a las paredes celulares bacterianas.



417901

- 5 -

14 AGO 1951
417901
14 AGO 1951

TABLA I

Endotoxina total liberada por tratamiento destructivo seguido de tratamiento de las bacterias matadas con enzima durante 1 hora a 37°C

Treatmento destructivo - exposición a	Endotoxina liberada	tripsina	lisozima	pepsina	lipasa	tripsina	lipasa	tripsina	lisozima	pepsina
-	320 *	1280	640	2560	1280	1280	1280	1280	1280	5120
100°C durante 20 minutos	1280	2560	1280	5120	2560	2560	2560	5120	5120	5120
125°C durante 20 minutos	2560	2560	2560	5120	-	-	-	5120	5120	5120
Ondas ultrasónicas (probeta de 9 mm; 1,5 amperios) a 0°C durante 30 minutos	640	2560	640	1280	1280	1280	1280	640	640	320
pH 3,5 a 45°C durante 60 minutos	640	640	320	640	320	1280	1280	2560	2560	5120
butanol acuoso al 5% a 37°C durante 2 horas	640	2560	2560	1280	-	1280	1280	2560	2560	1280

* Liberación debida a la lisis natural del microorganismo.

1

5

10

15

20

25

30

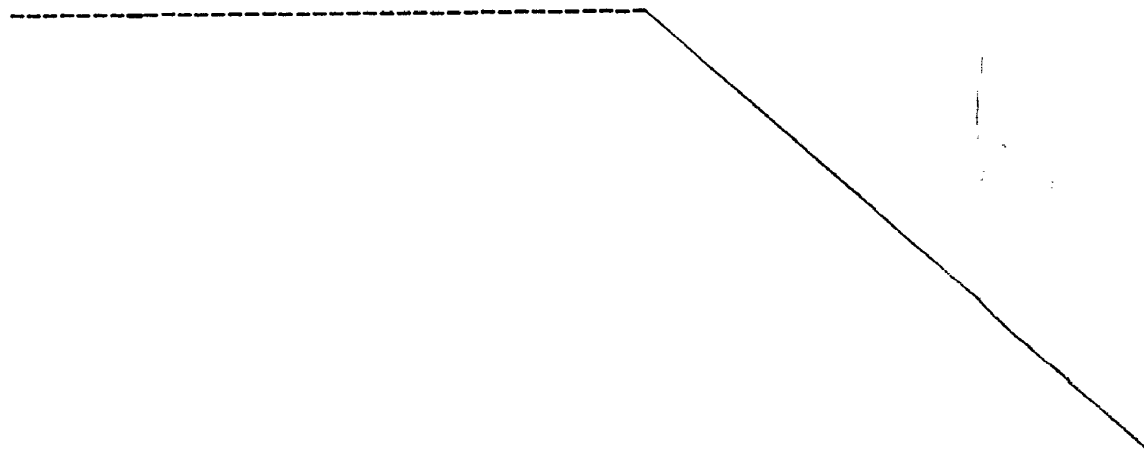
417901

TABLA I

1
5
10
15
20
25
30

Tratamiento des- tructivo - exposición a	Endotoxina liberada	Endotoxina total liberada por tratar de las bacterias <u>maltadas</u>			
		<u>tripsina</u>	<u>lisozima</u>	<u>pepsina</u>	<u>lipasa</u>
-	320 *	1280	640	2560	1280
100°C durante 20 minutos	1280	2560	1280	5120	2560
125°C durante 20 minutos	2560	2560	2560	5120	-
Ondas ultrasóni- cas (probeta de 9 mm; 1,5 ampe- rios) a 0°C du- rante 30 minutos	640	2560	640	1280	1280
pH 3,5 a 45°C du- rante 60 minutos	640	640	320	640	320
butanol acuoso al 5% a 37°C duran- te 2 horas	640	2560	2560	1280	-

* Liberación debida a la lisis natural del microorganismo.



901



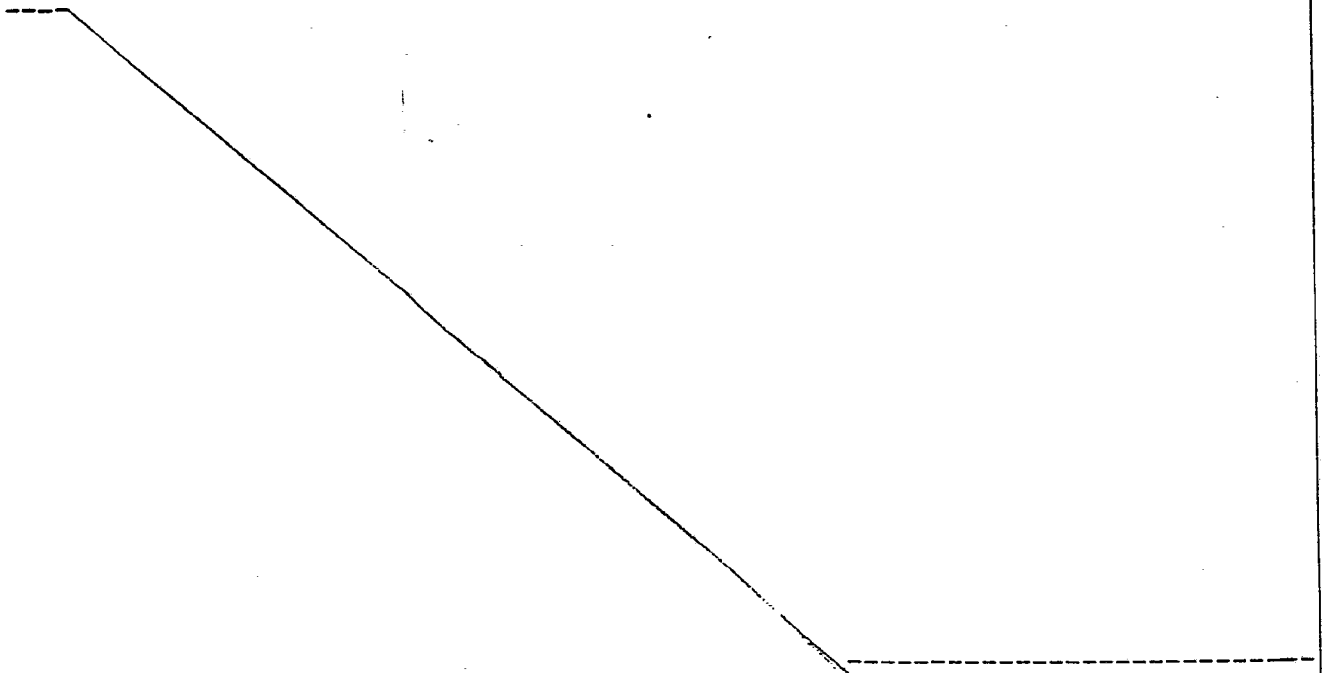
14 AGO 1973
417901 14 AGO 1973

TABLA I

Adtoxina total liberada por tratamiento destructivo seguido de tratamiento de las bacterias matadas con enzima durante 1 hora a 37°C

<u>tripsina</u>	<u>lisozima</u>	<u>pepsina</u>	<u>lipasa</u>	<u>lipasa + tripsina</u>	<u>lisozima + tripsina</u>	<u>lisozima + pepsina</u>
1280	640	2560	1280	1280	1280	5120
2560	1280	5120	2560	2560	5120	5120
2560	2560	5120	-	-	5120	5120
2560	640	1280	1280	1280	640	320
640	320	640	320	1280	2560	5120
2560	2560	1280	-	1280	2560	1280

tural del microorganismo.



417901

14



1

En la práctica, la administración de las endotoxinas al cerdo se realiza naturalmente por la boca, ya sea simplemente forzando la toma del material de cultivo esterilizado o mediante el agua de bebida o como ingrediente

5

de un pienso para cerdos, adecuadamente un pienso que contenga la fuente de proteína e hidratos de carbono, tal como un cereal, y las vitaminas y elementos minerales que son componentes esenciales de la dieta de los cerdos.

10

Hemos encontrado que los ingredientes del pienso de los cerdos, tales como harina de arenque, levadura, harina de trigo, avena machacada, cebada molida y leche descremada en polvo, tienen tendencia a combinar las endotoxinas de E. coli consigo mismas a pH 5,9 y más alto, como indica la siguiente Tabla II:

15

TABLA II

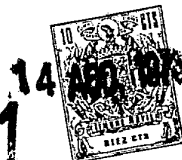
Ingrediente de la dieta	Título de endotoxina combinada por unidad de peso de ingrediente a pH				
	5.3	5.9	6.3	6.8	7.2
Harina de trigo	0	480	480	480	560
Avena machacada	0	0	0	320	560
20 Cebada molida	0	0	320	320	480
Harina de arenque	0	480	480	480	560
Levadura	0	320	480	480	560
Leche descremada en polvo	0	320	480	480	560

25

También hemos encontrado que los enzimas proteolíticos, como la tripsina, son capaces de liberar la endotoxina combinada de esta forma. Así, a pH 7,2, la tripsina libera alrededor de la mitad de la cantidad de endotoxina combinada anterior de la levadura y de la leche descremada en polvo.

30

417901



1 Además, hemos encontrado que las endotoxinas de E. coli precipitan de los sistemas acuosos a un pH inferior a 5, como indica la siguiente Tabla III:

TABLA III

5	pH	Título de endotoxina presente en la solución patrón después de ajustar al pH indicado
	7,0	320
	6,5	320
	6,0	320
10	5,5	320
	5,0	320
	4,5	160
	4,0	80
	3,2	40
15	2,5	40

Es conveniente incorporar las endotoxinas al pienso preparando en primer lugar una premezcla de las endotoxinas con uno de los ingredientes del pienso (adecuadamente la leche descremada) y agua y después mezclar la premezcla con los restantes ingredientes del pienso. Si se sigue este procedimiento, es conveniente, teniendo en cuenta los resultados de las Tablas II y III, ajustar la premezcla a un valor de pH comprendido entre 5 y 6, para asegurarse de que por ingestión por lo menos parte de la cantidad de endotoxinas del pienso resulte inmediatamente asequible para la estimulación del sistema inmune intestinal del cerdo.

La invención tiene especial aplicación en el aumento de la resistencia a la infección de los cerdos en la fase de destete, cuando están especialmente sometidos a tensión. Administrando la sustancia endotoxínica antes de que

41790

14 AGO



1 el cerdo haya sido destetado, por ejemplo comenzando a la
edad de 4 a 10 días y continuando hasta el destete, el in-
testino del cerdo puede ser estimulado a producir los anti-
cuerpos apropiados, de forma que en el momento en que el
5 cerdo es separado de la madre, existe en el intestino una
circulación de anticuerpos suficientemente alta para hacer
frente a cualquier proliferación de E. coli o por lo menos
para reducir la gravedad de cualquier enfermedad que se pro-
duzca. El material endotoxínico puede ser incorporado para
10 este fin en el llamado "pienso de arrastre", es decir, un
pienso especialmente formulado para cumplir los requisitos
nutritivos de los cerdos en la fase anterior al destete.
El pienso se da a los cerdos con precaución para evitar que
la madre se lo coma, generalmente haciendolo accesible so-
lamente a través de una estrecha entrada.

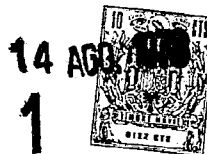
15 Las dosis mínimas son del orden de 1 a 5 unidades
(para la medida de una unidad véanse los Ejemplos poste-
riores) de las endotoxinas de cada serotipo de E. coli por
cerdo y por día. Sin embargo, hemos observado que los cer-
dos que reciben 1000 veces esta cantidad no presentan efec-
tos nocivos. Un nivel muy adecuado para la inclusión en el
20 pienso del cerdo es de 10^4 a 10^5 unidades de las endotoxi-
nas de cada serotipo por kilogramo de pienso.

25 La invención es ilustrada mediante los siguientes
ejemplos.

EJEMPLO 1

Preparación y aislamiento de endotoxinas

30 Se preparan endotoxinas de cada uno de los siete se-
rotipos de E. coli antes mencionados, siguiendo en general
el método de Westphal, Luderitz y Bister (1952) Z. Natur.



417901

1 Forsch. 7, 148.

5 Un cultivo secado por congelación de E. coli se re-
constituye en peptona-agua y se incuba a 37°C durante 6 ho-
ras. Después de un crecimiento adecuado, se determina la pu-
reza del cultivo sobre una placa de agar sangre de oveja
lavada y después se utiliza para inocular tubos inclinados
de agar nutritivo (Oxoid) en matraces de Roux. El cultivo
es desarrollado a 37°C durante la noche y las bacterias son
recogidas en agua destilada estéril. La suspensión bacteria-
10 na obtenida es dispensada asépticamente en frascos Univer-
sal de 30 ml y centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos.
El líquido que sobrenada se separa y el gránulo residual
de bacterias se suspende de nuevo en 4 ml de agua destilada
estéril y después se seca por congelación.

15 Con objeto de aislar las endotoxinas, se suspenden
0,5 g de E. coli secada por congelación en 5 ml de NaCl
0,15 M y se añaden 10 ml de fenol acuoso al 90 % como agen-
te de lisis. La mezcla se calienta a 68°C durante 30 minu-
tos, con agitación continua, después de lo cual se centri-
fuga a 4000 rpm para compactar los residuos celulares. Se
20 separa la fase acuosa y se enfría a 4°C y a la misma se
añaden lentamente 10 volúmenes de etanol enfriado con hie-
lo. El precipitado así formado se redisuelve en agua y los
ácidos nucleicos se precipitan de la solución por adición
de 2 volúmenes de etanol y se separan. De la solución resi-
25 dual se precipitan las endotoxinas por adición de otros
8 volúmenes de etanol. Se separan por centrifugación, se
lavan con etanol enfriado con hielo y se disuelven de nue-
vo en NaCl 0,15 M. (Esta solución de endotoxinas es denomi-
nada Reactivo 1).
30

14 AGO. 1948



417901

1

EJEMPLO 2

Determinación de endotoxinas

a. Preparación de antisueros

5 Se preparan sueros hiperinmunes específicos ("Antisueros") en conejos blancos de Nueva Zelanda contra organismos destruidos por el calor (100°C, 2,5 horas) y lavados de cada uno de los serotipos de E. coli.

10 Se preparan suspensiones del organismo matado caliente en NaCl 0,15 M (aproximadamente 3×10^9 organismos/ml) y se inyectan intravenosamente. El programa de inmunización comienza con un volumen de inyección de 0,1 ml y es continuado cada cuarto día duplicando los volúmenes hasta 1,6 ml. Los conejos son desangrados 10 días después de completado el programa y la sangre obtenida es centrifugada.
15 Se recoge la capa superior de suero hiperinmune. (Este antisuero es denominado Reactivo 2).

b. Medida de la actividad de anticuerpos (anti-endotoxinas) en el antisuero

20 Unos eritrocitos de oveja son sensibilizados por tratamiento de una suspensión al 5 % de células empaquetadas lavadas con un volumen igual de la solución de endotoxina Reactivo 1, a 37°C durante 30 minutos. Las células sensibilizadas son separadas por centrifugación, lavadas para liberarlas del exceso de endotoxinas y suspendidas de nuevo
25 en NaCl 0,15 M para formar una suspensión al 2,5 % de eritrocitos de oveja sensibilizados a la endotoxina. (Esta suspensión es denominada Reactivo 3).

30 El Reactivo 2 (antisuero) es diluido en serie con NaCl 0,15 M para obtener una serie de soluciones de volúmenes iguales (1 volumen) de concentraciones de anticuerpo

41790 14 AGO 1974



1 1/5, 1/10, 1/20, 1/40..... $1/(5 \times 2^{n-1})$ de la del Reactivo 2
y a cada una de estas soluciones se agrega 1/5 volúmenes de
Reactivo 3. Se produce hemoaglutinación en las soluciones
de antisuero más concentradas y no en las más diluídas y se
5 toma como punto final de la valoración (determinado a 4°C)
el de la solución en la que justamente comienza a producir-
se la hemoaglutinación. En un procedimiento típico, el pun-
to final puede encontrarse en la doceava solución, es de-
cir, en la solución con una concentración de anticuerpos
10 $1/(5 \times 2^{11})$ de la del Reactivo 2. Debe decirse que el Reac-
tivo 2 tiene una concentración de antisuero de 5×2^{11}
(= 10.240).

c. Medida de la concentración de endotoxinas en solución
de concentración desconocida

15 La solución (Y) que ha de ser analizada se diluye
en serie con NaCl 0,15 M para obtener una serie de solucio-
nes de volúmen igual (3 volúmenes) de concentración de en-
dotoxinas 1/3, 1/6, 1/12, 1/24, etc. veces la de la solu-
ción Y. A cada una de estas soluciones se agrega un volu-
men de Reactivo 2 (antisuero) diluído de forma que tenga
20 una concentración de 20 (véase el epígrafe anterior) y des-
pués (al cabo de algunos minutos) un volumen de Reactivo 3
(eritrocitos de ovejas sensibilizados), dando unas concen-
traciones finales de endotoxina 1/5, 1/10, 1/20.....
25 $1/(5 \times 2^{n-1})$ veces la de la solución Y. La hemoaglutina-
ción es inhibida en las soluciones de endotoxina más concen-
tradas pero no ocurre en las más diluídas y el punto final
de la valoración se toma como el de la solución en la cual
la hemoaglutinación es justamente inhibida. En un procedi-
30 miento típico, esto puede ocurrir en la sexta solución,

417901

14



1 cuya concentración de endotoxinas es $1/(5 \times 2^5)$ veces la
de la solución Y. Puede decirse entonces que la solución Y
tiene una concentración de $5 \times 2^5 (= 160)$, equivalente a
5 160 unidades de endotoxina por mililitro (véase el Ejem-
plo 3).

EJEMPLO 3

A. Preparación de material de endotoxina

El siguiente procedimiento se sigue independientemente
para cada uno de los serotipos de E. coli antes citados.

- 10 (i) Se traza una raya de bacterias procedentes de un cul-
tivo de depósito sobre placas de agar sangre lavadas
y se incuba a 37°C durante 24 horas. Después se com-
prueba convencionalmente la pureza de la variedad en
las placas.
- 15 (ii) Unas colonias de la bacteria se transfieren desde las
placas a 50 ml de un caldo nutritivo Oxoid (Número de
catálogo CM 67). El caldo se mantiene a 37°C durante
24 horas.
- 20 (iii) El caldo completo obtenido en (ii) se utiliza para
inocular 1,5 litros de caldo nutritivo Oxoid nº 2 y
el caldo se incuba, con agitación, a 37°C durante 24
horas. Cada cultivo final así producido contiene al-
rededor de 10^{10} bacterias viables por mililitro y una
muestra del cultivo, cuando se trata a vapor a 125°C
25 durante 2 horas y se somete al procedimiento de ensa-
yo del Ejemplo 2, da un título de 2560, correspondien-
te a 2560 unidades de endotoxina por mililitro de cul-
tivo vaporizado.

30 Se reúnen los cultivos de todos los serotipos y la
mezcla se vaporiza durante 2 horas en un autoclave (125°C)

417901 14 AGO 1973



1 para matar las bacterias.

B. Preparación de un pienso para cerdos

5 El caldo esterilizado completo obtenido en A se ajusta a pH 5 y se incorpora en una proporción en peso de 15:85 a un pienso convencional para destete de cerdos de la siguiente composición:

	<u>% en peso</u>
leche descremada secada en rodillo	20
harina de pescado blanco	25
10 avena mondada aplastada (copos de avena)	36
azúcar (sacarosa)	10
levadura desecada (75 % sin extraer)	5,5
aceite de hígado de bacalao	2
cloruro sódico	0,5
15 suplemento mineral	1,0

La masa resultante se seca a 65°C hasta un nivel de humedad del 15 % aproximadamente.

EJEMPLO 4

20 El cultivo final de cada serotipo obtenido siguiendo el procedimiento de A del Ejemplo 3 es centrifugado para separar las bacterias, que después son suspendidas de nuevo en agua y calentadas a 125°C durante 30 minutos. Las bacterias matadas son tratadas después durante 3 horas a 37°C con una mezcla de los enzimas lisozima y pepsina y el

25 material total de endotoxinas resultante del tratamiento destructivo y del tratamiento con enzimas se somete a valoración. Se reúnen los materiales de endotoxinas valorados procedentes de todos los serotipos, se ajusta a pH 5 y se agregan sobre leche descremada. La mezcla se incorpora después a un pienso para cerdos convencional de la composición

30



417901

1 indicada en el Ejemplo 3, de forma que se obtenga una concentración de 10^4 unidades de las endotoxinas de cada serotipo por kg de pienso.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un método mejorado para la producción de pienso, caracterizado porque las endotoxinas de uno o más de los serotipos de E. coli 08, 045, 0138, 0139, 0141, 0147 y 0149, sustancialmente exentos de organismos vivos de E. coli se preparan preferentemente mediante cultivo de un serotipo, se separa por centrifugación la bacteria del cultivo y la bacteria separada se calienta para matar la bacteria y liberar de la misma las endotoxinas requeridas y se introducen en
15 el intestino de un cerdo, por vía bucal, para mejorar la resistencia del cerdo a los trastornos gastrointestinales.

20 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque las endotoxinas son administradas antes de que el cerdo haya sido destetado.

3. Un método según la reivindicación 2, caracterizado porque la administración se inicia a la edad de 4 a 10 días.

25 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que las endotoxinas son administradas en agua.

30 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las endotoxinas son administradas en un pienso para cerdos.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de invención que se solicita:

417901

24 DIC 1976



1 UN METODO MEJORADO PARA LA PRODUCCION DE PIENSO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de quince páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 14 agosto 1.973
BERNARDO UNGRIA
P.P.

10

15

20

25

30