

PATENTE DE INVENCION

=====
File: 959-19, SPAIN.

Int. Cl.:

A23K

439604

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE COMPOSICIONES ALIMENTICIAS
PARA COMBATIR LA DISENTERIA DE INVIERNO, DIARREA Y SERPIGO
EN RUMIANTES.

=====
Solicitante: HERSHEY FOODS CORPORATION, entidad norteamericana,
residente en Hersheym Pennsylvania 17003,
EE.UU. de A.

=====
La presente invención se relaciona con un procedimien-
to de obtención de composiciones alimenticias para combatir la
disenteria de invierno o diarrea o serpigo en rumiantes. Más
particularmente, la invención se relaciona con la producción de
5 alimentos a base de esporas de Bacillus uniflagellatus.

El microorganismo utilizado en la práctica de
esta invención está designado por Bacillus uniflagellatus.

Un cultivo del organismo se encuentra depositado en la American Type Culture Collection (ATCC No. 15.134) y se encuentra disponible al público a partir de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852.

5

Las características morfológicas y fisiológicas de Bacillus uniflagellatus se encuentran detalladamente en la Patente USA No. 3.617.448, concedida el 2 de noviembre de 1.971 y titulada "Antibiotic and Methods of Producing and Using It."

10

Otras materias publicadas relativas a Bacillus uniflagellatus, cuyas descripciones se incorporan aquí con fines de referencia, son los artículos: Bacillus uniflagellatus: Sp.N. Its Unusual Characteristics, The Southwestern Naturalist 13(3), 349-352, 10 Diciembre, 1968; Inhibition of Tobacco Mosaic Virus By A Bacterial Extract, Phytopathology, Vol. 59, No. 5, 658-662, Mayo 1969; y Rabies and Its Diagnosis (1968).

15

La disentería de invierno y la diarrea, son dos enfermedades serias en los rumiantes y afectan de un modo adverso a la ganancia de peso de tales animales. En los casos fuertes, estas enfermedades, particularmente la disentería de invierno, pueden resultar fatales para el animal. Los animales con estas enfermedades requieren grandes cantidades de alimento para conseguir una cantidad dada de

20

25

ganancia de peso.

En adición, la infección fungal, serpigo, es una enfermedad común entre los rumiantes. Como mínimo, el serpigo conduce a un fuerte malestar en parte del animal. Puede hacer que el animal se hiera el mismo al rascarse contra alambres o ballas. En los casos más severos, la enfermedad puede dañar seriamente al animal e incluso puede conducir a consecuencias fatales.

Los rumiantes que incluyen ganado vacuno, ovejas, gansos, ciervos y búfalos, constituyen las fuentes más importantes de los alimentos mundiales derivados de animales. Un factor limitativo con respecto a la disponibilidad de estos alimentos, consiste en la ganancia de peso conseguida por los rumiantes por unidad determinada de alimento. Cualquier factor que interfiera adversamente con dicha ganancia de peso, tal como las enfermedades de rumiantes, disentería de invierno, diarrea y serpigo, constituye un factor limitativo en el suministro mundial de alimentos derivados de animales.

Esta invención tiene como objeto la provisión de una composición para evitar la disentería de invierno, diarrea y serpigo en rumiantes.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un alimento para animales que evita la extensión de las enfermedades altamente infecciosas, como son la disen-

tería de invierno, diarrea y serpigo, en los rumiantes.

Los anteriores y otros objetos son satisfechos por la presente invención, la cual comprende incorporar esporas de Bacillus uniflagellatus en los alimentos suministrados a los rumiantes, caracterizándose el método para evitar la disentería de invierno, diarrea y serpigo en rumiantes por la alimentación de esporas de Bacillus uniflagellatus.

Las esporas de Bacillus uniflagellatus pueden alimentarse a los rumiantes dispersándose en sus alimentos, dispersándose de un modo uniforme dichas esporas sobre un vehículo. El alimento puede ser o bien el alimento sólido normal de los animales, o en el caso de rumiantes muy jóvenes, tales como animales de 1 día de edad, el alimento puede ser la leche suministrada al rumiante.

En toda esta memoria y reivindicaciones adjuntas, las esporas, a menos que se especifique claramente lo contrario, se refieren a aquellas esporas de Bacillus uniflagellatus que, después de la germinación dentro del tracto digestivo del rumiante, le liberan antibiótico. De este modo, no todas las esporas de Bacillus uniflagellatus liberan antibiótico tras la germinación dentro del tracto digestivo de los rumiantes. Por ejemplo, cuando se desarrolla Bacillus uniflagellatus en un medio de subproductos de chocolate que contiene concentraciones muy elevadas de glucosa, tal como

unos 30 g de glucosa por litro, las esporas producidas a partir de dichos medios raramente son eficaces, si es que lo son, para evitar la disentería de invierno, diarrea o serpigo en rumiantes, debido a que tales esporas no liberan antibiótico tras la germinación dentro del tracto digestivo del rumiante. Un medio de subproductos de chocolate deberá contener preferiblemente por lo menos unos 10 g por litro de glucosa, para producir una cantidad apreciable de esporas y antibiótico. En el medio de cultivo, y en lugar de la glucosa, se puede utilizar un azúcar, tal como sucrosa que proporciona glucosa al ser disociado por Bacillus uniflagellatus. En la mayoría de los medios, se prefiere la sucrosa a la glucosa, debido a que es más barata y a causa de que las bacterias pueden disociarla antes que a la glucosa. Esto reduce al mínimo la presencia de glucosa en exceso.

El Bacillus uniflagellatus puede ser desarrollado en diversos medios nutrientes, para producir el antibiótico indicado en la Patente 3.617.448. Esta patente describe medios adecuados de zanahoria y casaminoácido. Otro medio de cultivo adecuado puede derivarse de subproductos de la fabricación de chocolate, tales como pastillas prensadas y pastillas de espulsor.

Las pastillas prensadas en un subproducto de la industria confitera. Se preparan sometiendo una mezcla de chocolate y productos de confitería, tales como dulces de

5 desecho, barras dulces mal envueltas a partir de los cuales se ha prensado mantequilla, a presiones del orden de 5,6 a 490 kg/cm² y temperaturas de 52 a 121°C, y ulterior granulación del producto. Los ingredientes variarán grandemente en función de los materiales de partida, pero normalmente incluirán azúcar de caña, sólidos de leche, cacao, mantequilla, cacahuetes y almendras. Por ejemplo, una forma de pastillas prensadas puede tener un análisis de 12 % en peso de proteína, 7 % en peso de grasa y 3 % en peso de fibra, si bien el análisis variará en función de las materias primas. El uso principal de las pastillas prensadas reside en los alimentos para animales.

15 Las pastillas de expulsor se derivan de fragmentos de cáscaras de cacao y polvo a partir del cual se ha expulsado la mantequilla mediante la temperatura y presión. Puede disponerse de un equipo comercial para obtener pastillas de expulsor a partir de gránulos de pepitas de cacao sin tostar, restos de limpieza del tostador y diversas fracciones de cáscara del proceso de cascarillado. Las temperaturas normales usadas para obtener las pastillas de expulsor, son del orden de 93 a 177°C. Después de la presurización, se granula la pastilla de expulsor. Al igual que las pastillas prensadas, las pastillas de expulsor constituyen un material convencional en el comercio y un subproducto de la industria confitera.

20

25

A modo de ejemplo, y de ningún modo limitativo, las esporas de Bacillus uniflagellatus que producen antibiótico tras la germinación, se pueden derivar de un medio nutriente de pastilla prensada de subproducto de chocolate y de pastilla de expulsor, como sigue:

EJEMPLO A

En 10 litros de agua destilada se mezclan, con fuerte agitación, 650 g de pastilla de expulsor de malla 100, 100 g de pastilla prensada de malla 100, 2 g de nitrato amónico y 2 g de cloruro amónico. La mezcla resultante se esteriliza luego sometiéndola en un autoclave a una presión de 1,05 kg/cm² relativos, durante 1 hora. A continuación, el medio se inocula con un cultivo de Bacillus uniflagellatus, manteniéndose el medio a una temperatura de 32°C. Se burbujea aire a través del medio inoculado (Bacillus uniflagellatus es aeróbico) durante un periodo de 12 a 14 días.

La mezcla se centrifuga luego para separar todos los materiales sólidos.

El material acuoso de la centrifuga puede ser entonces extractado con éter para la producción de antibiótico.

Para recuperar las esporas del material de fondo centrifugado, dicho material de fondo se seca en vacío a una torta sólida mientras se encuentra a una temperatura

de 80°C. Después del secado, la torta dura se molitura y se tamiza a un grado que pase a través de un tamiz de malla 100. Si se desea, se pueden emplear otros tamaños de malla, por ejemplo dentro de una gama de malla 50 a 325.

5 Otro método para la producción de esporas de Bacillus uniflagellatus que proporcionan antibiótico tras la germinación dentro del tracto digestivo de rumiantes, es como sigue:

EJEMPLO B

10 En 10 litros de agua destilada, se mezclan 300 g de pastilla de expulsor de malla 100, y 100 g de pastilla prensada de malla 100 y la mezcla se agita completamente para asegurar la total difusión de los sólidos por todo el líquido. La mezcla de 10 litros se coloca entonces en un
15 esterilizador de vapor de agua a una presión comprendida entre 1,05 y 1,4 kg/cm² durante un periodo de 90 minutos.

Tras sacarse del esterilizador y enfriarse a 32-34°C, se inocular con un cultivo esporulado de Bacillus uniflagellatus, como el de un tubo inclinado de agar,
20 el cual se funde por calor y se vierte en agua.

La mezcla puede tratarse en un matrón de 12 litros manteniéndola a una temperatura de 32 a 34°C y agitándolo y suministrando a la misma oxígeno mediante burbujeo de aire filtrado a través de agua, durante un periodo
25 de 14 días. Se prefiere la temperatura de 32 a 34°C, si

bien se pueden emplear temperaturas algo más elevadas o inferiores.

5 La mezcla se puede entonces centrifugar y separarse el líquido para la extracción en la recuperación del antibiótico. Los sólidos se pueden separar y secar, molturar y tamizar y recogerse como un polvo que contiene las esporas.

10 Alternativamente, todo el cultivo, al término de los 14 días, se puede pasar a través de un secador por aspersión, separando el agua y recuperando tanto las esporas como el antibiótico en forma de un polvo fino. Este último procedimiento es preferible puesto que evita la necesidad de centrifugar, secar, molturar, tamizar y recoger.

15 Al medio de cultivo de pastilla prensada-pastilla de expulsor, se pueden añadir estimuladores del crecimiento, para incrementar el rendimiento de células viables de Bacillus uniflagellatus. Se ha encontrado que un estimulador del crecimiento, sobresaliente, para Bacillus uniflagellatus, en medios de subproductos de chocolate, consiste
20 en medula de cacahuete. Si bien todos los cacahuetes se comportan igualmente de un modo eficaz que las médulas de cacahuete como estimuladores del crecimiento, se prefieren las médulas de cacahuete a causa de su precio bastante inferior. De este modo, en la mayoría de las operaciones confiteras,
25 es conveniente separar las médulas de cacahuete de

los cacahuetes, debido al sabor relativamente desagradable y corta vida en almacenamiento de las médulas de cacahuete. La separación de las médulas de cacahuete de los cacahuetes se puede efectuar por procedimientos comerciales bien conocidos que se utilizan actualmente en la industria confitera. Las médulas de cacahuete y los cacahuetes no constituyen un estimulador del crecimiento para Bacillus uniflagellatus con medios de cultivo a base de zanahoria.

Para ilustrar el efecto de estimulación del crecimiento de las médulas de cacahuete sobre Bacillus uniflagellatus, se llevó a cabo una comparación entre un medio de cultivo de control de pastilla de expulsor, pastilla prensada, nitrato amónico y cloruro amónico, como se indica anteriormente en el ejemplo A, un medio idéntico que contenía también un extracto acuoso de médula de cacahuete. Las médulas de cacahuete estaban presentes (aunque se derivaran de un extracto acuoso) en una proporción de 4 % en peso de médulas de cacahuete, basado en los componentes sólidos totales del medio de cultivo. Con el medio de cultivo de control, se obtuvo una media de 16.920.000 células viables por ml después de 72 horas de fermentación a 32°C, mientras que con el medio idéntico que contenía el extracto de médula de cacahuete, se obtuvo una media de 42.620.000 células viables por ml después de 72 horas de fermentación a 32°C.

A continuación se indica un método preferido para

producir esporas de Bacillus uniflagellatus que suministran antibiótico tras la germinación dentro del tracto digestivo de ruminantes, haciendo uso de médulas de cacahuete como estimulador:

5

EJEMPLO C

En 11 litros de agua destilada, se mezclan 400 g de pastilla de expulsor de malla 100, 100 g de pastilla prensada de malla 100 y 137,5 g de médulas de cacahuete y la mezcla se agita totalmente para asegurar la difusión completa de los sólidos por todo el líquido. La mezcla de 10 11 litros se coloca entonces en un esterilizador de vapor de agua a una presión comprendida entre 1,05 y 1,4 kg/cm² durante un periodo de 90 minutos.

Tras su extracción del esterilizador y enfriamiento a 32-34°C, se inocula con un cultivo esporulado de 15 Bacillus uniflagellatus, como el procedente de un tubo inclinado de agar, el cual se funde por calor y se vierte en la mezcla.

La mezcla puede tratarse en un matrón de 12 litros 20 manteniéndola a una temperatura de 32-34°C y agitándola, suministrando oxígeno a la misma por burbujeo de aire filtrado a través de ella, durante un periodo de 14 días.

La mezcla se deja entonces sedimentar y se decanta el líquido sobrenadante para la extracción y recuperación de antibiótico. El residuo se pasa a través de un 25

secador por aspersión que separa el agua y recupera tanto las esporas como el antibiótico en forma de un polvo fino. Este último procedimiento es preferible ya que evita la necesidad de centrifugar, secar, molturas, tamizar y recoger.

5

Cuando las esporas de Bacillus uniflagellatus se producen según cualquiera de los métodos antes descritos, las mismas se recuperan como un polvo sustancialmente uniforme con el resto del medio de cultivo en el cual se producen las esporas. Este polvo proporciona un vehículo inerte, barato, que evita el empleo de concentraciones de esporas demasiado elevadas y asegura una distribución más homogénea de esporas disponibles, protege las esporas contra la abrasión cuando han de ser utilizadas y prácticamente es atóxico para los rumiantes y esporas. El vehículo también protege a las esporas contra una excesiva aireación. En adición, estos métodos de producción tienen la ventaja extremadamente beneficiosa, tanto económica como ecológicamente, de no disponer de residuos de fermentación. Por lo tanto, y mientras que la mayor parte de los procesos de fermentación tienen que hacer frente al problema costoso de distribución de los sólidos del medio de fermentación, con el producto según la invención se retiene la totalidad de los sólidos.

10

15

20

25

Con el fin de evitar que las esporas germinen

antes del tratamiento de los rumiantes, deberá controlarse el contenido en agua de la combinación de esporas-vehículo en polvo para que no exceda de un 10 % en peso. Normalmente no existe ninguna justificación económica para reducir el porcentaje en peso de agua a un valor inferior a 4 % en peso. Por el término "porcentaje en peso de agua" tal y como se utiliza en esta memoria, se quiere dar a entender la determinación obtenida comparando el peso inicial al peso después del secado en bandejas durante 48 horas a 100°C bajo un vacío de 686 mm (un vacío igual a una presión absoluta de 76 mm de mercurio aproximadamente o a una presión de 0,1 atmósferas).

De este modo, las esporas tendrán una vida en almacenamiento de muchos meses. Por lo tanto, se ha encontrado que una dispersión sustancialmente uniforme de 24.000.000 a 29.000.000 de esporas por gramo en el vehículo citado que tiene menos de 10 % en peso de agua, hierve aproximadamente el 25 % de su potencia cuando se almacena durante 6 meses a temperatura ambiente en un recipiente tapado.

El vehículo derivado del medio de cultivo deberá ser barato, estable en el almacenamiento, inerte y atóxico para los rumiantes y para Bacillus uniflagellatus.

Con el fin de proporcionar una mezcla económica y eficaz para el tratamiento de rumiantes, la producción

de esporas puede ser controlada para producir aproximadamente de 100.000 a 1.000.000.000 de esporas por gramo de la mezcla que incluye las esporas y el vehículo en polvo inerte. Si bien pueden utilizarse concentraciones superiores e inferiores, las mismas son antieconómicas, de modo que se prefiere la gama anterior. El método del ejemplo C anterior producirá, en promedio, unos 29.000.000 de esporas por gramo de la mezcla en polvo, constituyendo las esporas por debajo del 0,5 % en peso aproximadamente de la mezcla. Se cree que existe de 325.000.000.000 a 350.000.000.000 de esporas en un gramo de esporas puras.

Un análisis de la mezcla en polvo, producida por el método del ejemplo C anterior, revela lo siguiente:

	<u>Ingrediente</u>	<u>% en peso</u>
15	Grasa total	9,76 %
	Proteína total	24,6 %
	Geniza total	5,9 %
	Carbohidratos totales (calculado como almidón)	11,1 %
20	Azúcares reductores totales (calculado como glucosa)	1,25 %

Para alimentar las esporas y vehículo a los rumiantes, se pueden emplear diversos métodos. Así, los animales pueden ser alimentados con las esporas directamente, y si es necesario por alimentación forzada. Alternativamente, y preferiblemente, las esporas se pueden incorporar en

los alimentos del animal. Se ha encontrado que el empleo de las esporas y vehículo que se derivan de los ejemplos A, B y C anteriores, se pueden alimentar directamente a rumiantes como parte de su alimentación, sin que por ello pierda las características de sabor el alimento. Esto se cumple tanto con alimentos sólidos, tales como grano, como con alimentos líquidos, tales como leche.

Aunque teóricamente una spora de germinación simple liberará algo de antibiótico, se ha encontrado que deben ingerirse por lo menos 10.000.000 de esporas cada día durante el tratamiento, con preferencia 100.000.000 o más de esporas por día. Puesto que no se ha detectado ninguna toxicidad notable en las esporas o en el antibiótico derivado de las mismas, para los rumiantes, no existe una cantidad máxima, estrechamente definida, de esporas a incluir en la dieta diaria del rumiante. Sin embargo, y como materia práctica, no se cree que en la mayoría de los rumiantes exista una justificación económica para superar la dosis de 1.000.000.000 de esporas por día.

La duración del tratamiento deberá ser suficiente para asegurar que las esporas germinen dentro de la panza. En ciertos casos, es suficiente un solo tratamiento. En términos generales, es preferible prolongar el tratamiento durante al menos una semana, en especial haciendo que el animal ingiera las esporas cada día durante una se-

mana. Si es factible, el tratamiento puede prolongarse ventajosamente a un periodo de 2 a 3 meses. Puesto que del tratamiento con las esporas de Bacillus uniflagellatus no se deriva ningún daño notable, el hecho de asegurar, adicionalmente, la prevención de disentería de invierno, diarrea y serpigo, justifica los tratamientos continuados.

La invención puede entenderse más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Debe entenderse que dichos ejemplos son solamente ilustrativos y de ningún modo limitativos.

EJEMPLO 1

Dentro de un establo, se tratan bueyes y novillos de 22 granjas lecheras, Holstein, de cruce Holstein-Angus de cruce Holstein-Charlois. En cada caso, el tratamiento se inicia cuando el animal tiene una edad de unos 3 meses y se continúa durante 2 ó 3 meses. De este modo, el tratamiento se inicia cuando el animal tiene una edad de 3 meses y se interrumpe cuando el animal alcanza los 5 ó 6 meses de edad. Los pesos de los animales en tratamiento oscilan entre 81 y 225 kg.

Entre noviembre de 1.972 y septiembre de 1.973, se tratan 94 cabezas con las esporas de Bacillus uniflagellatus dispersadas en un vehículo. La concentración de las esporas oscila entre 9.000.000 y 20.000.000 de esporas por gramo, dispersadas en un vehículo y procedentes del método

del ejemplo C. Cada ternero se alimenta dos veces al día, siendo cada alimentación de 7 gramos de las esporas y vehículo, de modo que, cada día, la alimentación total sea de 14 gramos de esporas y vehículo.

5 De las 94 cabezas trazadas durante este periodo de 10 meses, no se presentó ningún caso de disentería de invierno o diarrea. Algunos de los animales llegaron a tener serpigo en el establo. Sin embargo, en cada caso el serpigo apareció como inactivo. Por lo tanto, resultaron sin éxito los intentos para cultivar el serpigo a partir de tales
10 animales que habían sido tratados con las esporas de Bacillus uniflagellatus.

Los animales de las mismas 22 granjas lecheras, del año anterior, sufrieron en aproximadamente un 50 % de
15 disentería de invierno o diarrea. En adición, un 80 % aproximadamente de tales animales tuvieron serpigo.

EJEMPLO 2

En un establo separado, se crían conjuntamente un grupo de 8 vaquillas Guernsey recién nacidas. En la madre
20 y en dos de dichas vaquillas, se desarrolla una purga viral que consiste en una diarrea altamente contagiosa debida a un virus específico. Normalmente, la purga viral se esparce rápidamente por todas las vaquillas del mismo establo. Debido a esta enfermedad, mueren la madre y las dos vaquillas con-
25 tagiadas. Las otras seis vaquillas se tratan con 14 gramos

de las esporas de Bacillus uniflagellatus en un vehículo, siendo la concentración de las esporas de 9.000.000 a 20.000.000 de esporas por gramo. En la leche de las vaquillas, se dispersan los 14 gramos de esporas de Bacillus uniflagellatus y vehículo, especialmente 14 gramos de las esporas y vehículo por 1,88 litros de leche. Rápidamente cada una de las 6 vaquillas beben la leche. El tratamiento se prolonga durante las tres primeras semanas de la vida de cada vaquilla. Sin excepción, y en el espacio de una semana, no se observa signo alguno de purga en ninguna de las vaquillas.

Si se desea, se pueden alimentar a los ruminantes esporas de Bacillus uniflagellatus . Sin embargo, esto es un despilfarro de esporas debido al gran número de esporas por gramo. Por las razones aquí indicadas, se prefiere usar las esporas dispersadas en un vehículo.

En los siguientes ensayos de la toxicidad, la muestra a ensayar contenía 32.000.000 de esporas por gramo sobre un vehículo derivado de subproductos de chocolate.

El ensayo extensivo de la toxicidad con mamíferos, no ha revelado toxicidad significativa alguna de las esporas de Bacillus uniflagellatus. A modo de ejemplo, los estudios de la irritación de la piel de conejos, realizados según Hazardous Substances Labeling Act Regulations, Parte 191, capítulo 1, Título 21, Code of Federal Regulations,

párrafo 191.11, llevados a cabo sobre 6 conejos, con dosis de 0,5 ml por paño, utilizando 4 paños en cada conejo, revelaron un índice de irritación primaria de la piel de 0.

Un ensayo de toxicidad por inhalación, realizado con 10 ratas, según Hazardous Substances Labeling Act, Parte 191, capítulo 1, Título 21, Code of Federal Regulations, párrafo 191.1; con una dosis máxima de 500 ml por litro, inhalada durante una hora, no produjo toxicidad o efectos letales. No se pudieron emplear convenientemente dosis mayores en los ensayos sin que las ratas murieran. Todos los animales del ensayo comieron del polvo de esporas, mostrando una rápida ganancia de peso. No se observó toxicidad, irritación o letalidad.

Se ensayó el valor LD₅₀ dérmico en conejos usando el procedimiento de ensayo indicado en "Appraisal Of The Safety Of Chemicals In Foods, Drugs and Cosmetics", publicado por Association of Food And Drug Officials de los Estados Unidos.

A cada nivel de dosis, se empleó un conejo macho

Resultados:	Conejo	Dosis (gm/kg)	Hiperemia	Edemia	Muertes
	1 M	5	0	0	0
	2 H	5	0	0	0
	3 M	10	0	0	0
	4 H	10	0	0	0
	5 M	15	0	0	0
	6 H	15	0	0	0
	7 M	20	0	0	0
	8 H	20	0	0	0
	9 M	25	0	0	0
	10 H	25	0	0	0

Ninguno de los animales exhibió reacciones en la piel en el espacio del periodo de dos semanas de observación.

5 Debido a la voluminosidad de la muestra de ensayo, no se pudieron emplear dosis superiores a 25 mg por kg.

Se llevó a cabo en ratas la determinación del valor LD₅₀ oral usando el método empleado como se describe en "Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics", publicado por Association of Food and Drug
10 Officials de los Estados Unidos.

<u>Resultados:</u>	<u>Dosis (gm/kg)</u>	<u>No. de Ratas</u>	<u>Supervivientes</u>
	10	10	10
	20	10	10
	30	10	10
15	40	10	10
	50	10	10

Cuando en el ensayo se utilizaron dosis superiores a 50 mg/kg, el material de ensayo suspendido fue transportado a los pulmones.

20 El material de ensayo, 32.000.000 de esporas por gramo, cuando se administró oralmente a ratas a un nivel de dosificación de 50 mg/kg, no produjo efectos tóxicos o letales en las ratas. Como no pudo evaluarse la dosis letal, tampoco pudo determinarse el valor LD₅₀ oral.

25 No se observaron manifestaciones tóxicas en ningún

momento después de la administración del material del ensayo. De hecho, los animales mostraron un aumento de peso definitivo.

Se llevó a cabo un ensayo de irritación de ojos usando los métodos descritos en Hazardous Substances Labeling Act Regulations, Parte 191, capítulo 1, Título 21, Code of Federal Regulations, párrafo 191.12.

Dosis : 0,1 g en uno de los ojos de cada uno de 6 conejos

	Días						
Conejo #1	1	2	3	4	5	6	7
I. Cornea							
A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0
B. Area	0	0	0	0	0	0	0
AxBx5							
15 II. Iris							
A. Valores	0	0	0	0	0	0	0
x5							
III. Conjuntiva							
A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0
B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0
20 C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0
(AxBxC) x 2'							
Total	0	0	0	0	0	0	0

		Dias						
		1	2	3	4	5	6	7
	Conejo # 2							
	I. Cornea							
5	A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0
	B. Area	0	0	0	0	0	0	0
	AxBx5							
	II. Iris							
	A. Valores	0	0	0	0	0	0	0
	x5							
10	III. Conjuntiva							
	A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0
	B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0
	C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0
	(A+B+C)x2							
	Total	0	0	0	0	0	0	0
15	Conejo # 3							
	I. Cornea							
	A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0
	B. Area	0	0	0	0	0	0	0
	AxBx5							
	II. Iris							
20	A. Valores	0	0	0	0	0	0	0
	x5							
	III. Conjuntiva							
	A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0
	B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0
	C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0
25	(A+B+C) x2							
	Total	0	0	0	0	0	0	0

		Dias							
		1	2	3	4	5	6	7	
	Conejo # 4								
	I. Cornea								
5	A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0	
	B. Area	0	0	0	0	0	0	0	
	AxBx5								
	II. Iris								
	A. Valores	0	0	0	0	0	0	0	
	x5								
	III. Conjuntiva								
10	A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0	
	B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0	
	C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0	
	(A+B+C) x 2								
	Total	0	0	0	0	0	0	0	
	<hr/>								
	Conejo # 5								
15	I. Cornea								
	A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0	
	B. Area	0	0	0	0	0	0	0	
	AxBx5								
	II. Iris								
20	A. Valores	0	0	0	0	0	0	0	
	x5								
	III. Conjuntiva								
	A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0	
	B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0	
	C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0	
	(A+B+C) x2								
25	Total	0	0	0	0	0	0	0	

		Días						
		1	2	3	4	5	6	7
	Conejo #6	1						
	I. Cornea							
	A. Opacidad	0	0	0	0	0	0	0
5	B. Area	0	0	0	0	0	0	0
	Ax5							
	Bx5							
	II. Iris							
	A. Valores	0	0	0	0	0	0	0
	x5							
10	III. Conjuntiva							
	A. Rojez	0	0	0	0	0	0	0
	B. Quemosis	0	0	0	0	0	0	0
	C. Descarga	0	0	0	0	0	0	0
	(A+B+C) x2							
15	Total	0	0	0	0	0	0	0

N O T A

=====

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO DE OBTEN-
 CION DE COMPOSICIONES ALIMENTICIAS PARA COMBATIR LA DISEN-

TERIA DE INVIERNO, DIARREA Y SERPIGO EN RUMIANTES; caracterizándose por lo siguiente:

5 1.- Procedimiento de obtención de composiciones alimenticias para combatir la disenteria de invierno, diarrea y serpigo en rumiantes, caracterizado porque esporas de Bacillus uniflagellatus (ATCC No. 15.134) se dispersan uniformemente en un vehículo atóxico y degustable para los rumiantes.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las esporas se mezclan íntimamente con el alimento de los rumiantes.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se mezclan al menos 10.000.000 de esporas de Bacillus uniflagellatus (ATCC No. 15.134) por ración alimenticia diaria.

4.- Procedimiento de obtención de composiciones alimenticias para combatir la disenteria de invierno, diarrea y serpigo en rumiantes, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

20 Esta Memoria consta de 25 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 NOV 1975

HERSHEY FOODS CORPORATION.

A. GÓMEZ ACEBU Y RUIZ
por el Abogado L. Costa Fernández

