



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0610705-2 A2**

(22) Data de Depósito: 26/05/2006  
(43) Data da Publicação: 30/10/2012  
(RPI 2182)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 35/76  
A61K 9/19  
A23K 1/17  
A61K 9/22  
A61K 9/52  
A61K 9/62

(54) **Título:** ADMINISTRAÇÃO BACTERIANA EM SISTEMAS DE RETENÇÃO DE ANIMAL

(30) **Prioridade Unionista:** 26/05/2005 US 60/685,108

(73) **Titular(es):** Gangagen Life Sciences Inc

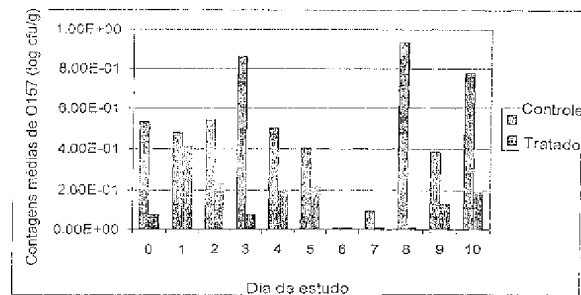
(72) **Inventor(es):** Englehardt, Rainer, Murthy, Kishore

(74) **Procurador(es):** GUERRA ADV.

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2006000864 de 26/05/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/125319de 30/11/2006

(57) **Resumo:** ADMINISTRAÇÃO BACTERIANA EM SISTEMAS DE RETENÇÃO DE ANIMAL. A presente invenção é direcionada ao método de redução de uma população de um patógeno alvo em um animal ou dentro de um cativeiro. O método envolve a administração de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago, ou ambos, ao animal, de maneira que uma, ou mais de uma estirpe de bacteriófago é liberada in vivo e adsorve-se a um ou mais de um patógeno alvo, dessa forma, reduzindo o patógeno, ou mais de um patógeno do animal. A estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago pode ser administrada como uma dose de tratamento antes do processamento futuro do animal, uma dose de tratamento seguida por uma dose de manutenção, ou uma dose de manutenção, para administrar os patógenos alvo em cativeiro.



**“ADMINISTRAÇÃO BACTERIANA EM SISTEMAS DE RETENÇÃO DE ANIMAL”.**

A presente invenção relaciona-se a métodos para redução de bactérias dentro dos sistemas de retenção de animal. Mais especificamente, a presente invenção fornece métodos para controlar bactérias patogênicas em um animal, sistemas de produção de animal como cativeiro, cercado de criação e o semelhante, ou uma combinação destes.

**HISTÓRICO DA INVENÇÃO**

A contaminação de carne e produtos derivados de carne destinados ao consumo humano é um problema contínuo na indústria alimentícia. De preocupação particular estão os patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.*, todos dos quais podem causar doenças ocasionadas pelos alimentos nos humanos. A doença humana devido a esses patógenos é também, muitas vezes, causada pelo consumo de produtos derivados de carne contaminados incluindo carnes de galinha, peru, vaca e porco. Esses patógenos podem também possuir um risco à saúde dos humanos diretamente comprometidos na produção de animais. Ainda, outros patógenos contidos no trato intestinal de animais podem ser, direta ou indiretamente, um risco à saúde aos animais.

As fontes de contaminação bacteriana de porcos, aves e gado são numerosas, incluindo acomodação e alimentação precárias. A alimentação seca, usada para suínos, aves, gado e outros animais de produção pode ser contaminada com bactérias incluindo *Salmonella* e *E. coli*. Essa contaminação pode ocorrer durante o processamento, o armazenamento ou o transporte. Por exemplo, uma fonte comum de contaminação de carne e produtos derivados de carne do gado de corte é o matadouro, onde a contaminação da carcaça por bactérias ou no couro, pêlo ou fezes pode ocorrer.

Ao objetivar a redução das doenças causadas por alimentos aos humanos, a pesquisa foi transferida para intervenção pré-abate no animal vivo. Métodos probióticos, dietéticos e anti-patógenos foram todos usados na tentativa de atingir esse objetivo.

5 Por exemplo, a Patente Norte-Americana Nº 5.965.128 (Doyle et al; vide também Zhao et al (1998) J Clin Microbiol, 36, 641-647) ensina o uso de bactérias probióticas para reduzir ou prevenir o transporte de E. coli O157:H7 no gado experimentalmente inoculado. Entretanto, o método estudado pela Patente Norte-Americana 5.965.128 é altamente invasivo e envolve a inoculação do gado  
10 através de uma canulação no rúmen. Esse método não fornece um método conveniente de administração das bactérias probióticas. Outros estudos (Brashears et al (2003) J Food Prot, 66, 748-754; Younts-Dahl et al (2004) J Food Prot, 67, 889-893) mostraram que a suplementação com Lactobacillus, Propionibacterium microbianos, ou ambos, pode diminuir a E. coli O157:H7 derramada no gado, mas  
15 não eliminará o patógeno. Resultados semelhantes são divulgados por Garner e Ware (US 2003/0175305, US 2003/0175306, US 2003/0175307 e WO 2004/030624).

Alterações no regime dietético também foram investigadas com relação à redução do patógeno derramado no gado. Allen et al (Patente Norte-Americana Nº  
20 6.270.812) ensina o uso de um suplemento de alga marinha na dieta final de cativeiro para reduzir E. coli patogênica nas amostras fecais pós-abate. Outros (Braeden et al (2004) J Food Prot, 67, 1824-1828) descobriram que a suplementação da alimentação com Tasco-14 reduziu o predomínio de E. coli O157:H7 no gado. Outros ainda (Diez-Gonzalez et al (1998) Science, 281, 1666-  
25 1668) mostraram que a troca abrupta de gado alimentado com grão para uma dieta

com feno reduz a população de E. coli. Entretanto, a magnitude dos efeitos dietéticos nos níveis de E. coli O157:H7 no gado varia e os resultados permanecem controversos.

5 A localização e eliminação específica de patógenos a partir de gado, aves e suínos é outra abordagem na batalha contra doença causada por alimentos. Por exemplo, antibióticos, como neomicina, reduziram significativamente as fezes com E. coli O157:H7 no gado (Ransom et al (2003) Research Fact Sheet, National Cattleman’s Beef Association [Associação Nacional dos Produtores de Gado de Corte], Centennial CO). Embora a neomicina não seja usada na medicina humana, o  
10 uso extensivo desse antibiótico pode resultar no desenvolvimento de resistência a antibióticos controlados como gentamicina, canamicina etc, comumente usados na medicina humana. Uma condenação européia sobre o uso profilático de antibióticos nos alimentos e a possibilidade de disseminação extensa de resistência a antibiótico desencoraja o uso desses compostos.

15 Os bacteriófagos foram também considerados para uso no tratamento de fezes do animal. Os bacteriófagos (ou “fagos”) são vírus bacterianos que especificamente infectam e matam bactérias e são amplamente distribuídos na natureza. Os fagos reconhecem receptores na superfície bacteriana, atacam-nos e injetam seu material genético na célula hospedeira. Eles degradam o DNA da  
20 bactéria hospedeira e sintetizam seu próprio material genético e proteínas de revestimento adquiridas, então, re-montam múltiplas cópias de partículas de bacteriófago antes de romper a célula. Os bacteriófagos liberados infectarão então e destruirão bactérias adicionais no ambiente circundante. Esse processo continua até todas as bactérias serem eliminadas do sistema.

25 A patente norte-americana 6.656.463 divulga a redução de populações

de Salmonella nos suínos usando fago Felix 0-1. Smith et al (J Gen Microbiol (1987) 133, 1111-1126) mostraram que os fagos podem ser úteis no controle de infecções por E. coli enterotoxigênicas na criação. O estudo mostrou que fagos específicos da estirpe poderiam curar ou prevenir a diarreia causada por E. coli nos bezerros através de uma dose oral única, ou através do borrifa da palha com fagos. Entretanto, os fagos foram apenas eficientes se administrados antes ou simultaneamente com a administração de E. coli. Além disso, o patógeno usado por Smith et al é distinto da E. coli O157:H7 e os fagos considerados como sendo eficazes nesse estudo não reconhecerão E. coli O157:H7; Kudva et al (Appl Env Microbiol (1999) 65, 3767-3773) mostraram que os fagos foram eficientes na redução da quantidade ou eliminação de E. coli O157:H7 das culturas. Especificamente, nenhum fago único poderia eliminar uma cultura de E. coli O157:H7, entretanto uma mistura de três fagos O157-específicos foi capaz de eliminar as bactérias das culturas. Entretanto, os experimentos in vitro de Kudva et al (1999) não indicam que esses fagos seriam eficientes no controle de E. coli O157:H7 in vivo na criação. Outros estudos in vitro foram relatados; entretanto, nenhuma eficácia ou eficácia baixa é observada quando esses fagos são testados in vivo (vide Callaway T.R. et al. (2004) J Animal Sci. 82(E.Suppl): E93-99 para revisão). Melhorias adicionais precisam ser realizadas para usar eficazmente fagos para reduzir infecção por E. coli O157 de gado.

A Patente Norte-Americana No 6.485.902 (Waddell et al) ensina o uso de bacteriófagos específicos para reduzir os níveis de E. coli O157:H7 no trato gastrointestinal de gado. Uma mistura de seis fagos foi administrada oralmente em altas dosagens aos bezerros antes e após o desafio com E. coli O157:H7. Esse estudo mostrou que o predomínio da E. coli O157:H7 nas fezes foi reduzido em

comparação com bezerros não recebendo fagos. Entretanto, as altas dosagens exigidas pelo método sugerem a inativação dos bacteriófagos no trato gastrointestinal.

Apesar do saneamento pós-abate melhorado, a doença causada por alimentos nos humanos devido à carne e produtos derivados contaminados é um problema contínuo na indústria alimentícia. Geralmente, essas doenças podem ser atribuídas a *E. coli*, *Salmonella* e/ou *Campylobacter*. Vários métodos foram investigados com relação à redução da incidência de patógenos nas aves, nos suínos e no gado, incluindo: suplementação com bactérias probióticas, suplementos dietéticos, alterações dietéticas, antibióticos e bacteriófagos. Entretanto, muitos métodos são economicamente não-viáveis, controversos ou não comprovados. Além disso, muitos estudos usam experimentalmente animais infectados, que podem não refletir verdadeiramente o efeito de tratamento anti-patógeno nos animais naturalmente infectados.

## RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se a um método de redução de bactérias patogênicas dentro dos sistemas de retenção de animal.

É um objetivo da presente invenção para fornecer um método para reduzir bactérias dentro de um sistema de retenção de animal.

A presente invenção fornece um método (A) para reduzir uma população de um, ou mais de um patógeno alvo, presente em um animal compreendendo, administrando uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componentes fago, ou uma combinação destes, ao animal, de maneira que uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componentes fago, ou combinação destes, seja liberada in vivo e adsorvida e reduza

a população de um ou mais de um patógeno alvo do animal.

No processo conforme descrito acima, um ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componente fago ou combinação destes, pode ser administrado em uma dosagem de tratamento de aproximadamente 10<sup>7</sup> a 10<sup>13</sup> pfu por animal por dia de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 dias.

Alternativamente, a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, pode ser administrada em uma dosagem de manutenção de aproximadamente 10<sup>5</sup> a aproximadamente 10<sup>10</sup> pfu por animal por dia durante os próximos 30 a 90 dias. Todavia, em outra alternativa, a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, pode inicialmente ser administrada em uma dosagem de tratamento de aproximadamente 10<sup>7</sup> a aproximadamente 10<sup>13</sup> pfu por animal por dia de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 dias, seguida por uma dosagem de manutenção de aproximadamente 10<sup>5</sup> a aproximadamente 10<sup>10</sup> pfu por animal por dia durante os próximos 30 a 90 dias.

O bacteriófago de liberação controlada ou os componentes fago descritos acima podem ser administrados através da adição podem ser administrados através da adição à alimentação do animal ou através do fornecimento da água, através da inalação ou injeção intramuscular, intraperitoneal ou intratecal ou através da administração retal, tópica ou em combinação desses métodos.

A presente invenção também fornece um método (B) para redução de uma população de um ou mais de um patógeno alvo presente dentro de um sistema de retenção, compreendendo, administrando uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componente fago, à alimentação do animal,

ao fornecimento de água, a um animal ou uma combinação destes, de maneira que a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, seja liberada na alimentação, no fornecimento da água, no trato digestivo de um animal, no estrume, ou em uma combinação destes e adsorve-se ao, e mate o, patógeno alvo no ambiente circundante, dessa forma reduzindo a população do patógeno ou mais de um patógeno alvo dentro do sistema de retenção. O bacteriófago de liberação controlada ou os componentes fago descritos acima podem ser administrados através da adição à alimentação do animal ou ao fornecimento de água, através da inalação ou injeção intramuscular, intraperitoneal ou intratecal ou através da administração retal, tópica ou em uma combinação desses métodos. O sistema de retenção pode incluir, entre outros, um cativeiro, uma sala de espera antes do abate, um cercado de criação, incluindo, por exemplo, um armazém de criação ou sala de criação, um zoológico, sistemas de aquacultura abertos ou fechados, outros locais de acomodação de animal ou os de sempre.

Os fagos podem ser administrados aos animais quando eles forem trazidos para um sistema de retenção, por exemplo, um cercado de retenção ou criação, como um cativeiro, de diferentes fazendas com situação de controle de patógeno variada. Administrando fagos aos animais em uma dose de  $10^7$  a aproximadamente  $10^{13}$  pfu por animal por dia durante 1 a aproximadamente 12 dias. Esta poderia ser seguida por uma dose de manutenção de  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  pfu por animal por dia durante os próximos 30 a 90 dias. O uso desse protocolo ajuda a reduzir a contaminação geral da fazenda por esse patógeno.

A presente invenção também fornece um método de prevenção da expansão de infecções em um animal, causadas por um ou mais de um patógeno

alvo. O método compreende a administração de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago, componente fago, ou ambos, ao animal, de maneira que a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago, componente fago, ou ambos, seja liberada dentro do trato digestivo do animal, anexe-se ao e mate o patógeno alvo, dessa forma, reduzindo a população do patógeno ou de mais de um patógeno alvo nas fezes do animal. O patógeno alvo pode ser E. coli O157:H7, Staphylococcus aureus, Treponema ou outro patógeno carregado no trato gastrintestinal ou uma combinação destes. A estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago, componente fago, ou ambos, pode ser fornecida como uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componente fago, ou ambos.

A presente invenção fornece ainda protocolos de tratamento para a redução de patógenos, por exemplo, entre outros, E. coli, Salmonella, Campylobacter e Staphylococcus, nos animais. Os animais a serem transportados ou que serão abatidos podem ser tratados com uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componente fago, ou ambos, 5-7 dias antes de serem transportados. Usando essa abordagem, o nível de patógeno dos animais será reduzido a níveis baixos no dia 3-5 do tratamento, dessa forma, permitindo o transporte seguro dos animais a partir aproximadamente do dia 4 do tratamento em diante. Isso fornece uma janela "de transporte e processamento com segurança" durante a qual os animais do sistema de retenção, por exemplo, entre outros, um cercado de retenção ou criação, como cativeiro, podem ser transportados e processados de forma segura.

Além disso, a presente invenção fornece um uso de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componente fago, ou ambos, para distribuição às fezes do animal para prevenir a expansão de infecções

bacterianas através das fezes. A estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componente fago, ou ambos, pode ser distribuída diretamente às fezes (ex vivo) em uma forma não encapsulada, ou pode ser administrada ao animal em uma forma de liberação controlada através da distribuição às fezes através do intestino do animal.

5

O uso de bacteriófagos para reduzir bactérias patogênicas em animais, ou dentro dos animais e sistemas de retenção de animal, incluindo zoológicos e cercado de retenção ou criação como um cativeiro, ajudarão a aumentar a segurança de fontes alimentícias, bem como ajudarão a reduzir a contaminação por patógeno de produtos agrícolas, água fonte, animais e o ambiente em geral. Por exemplo, além da redução da expansão de E. coli O157:H7, que pode causar sérios problemas de saúde nos humanos, os bacteriófagos também podem reduzir as contagens de Staphylococcus aureus, que podem infectar as tetas e o úbere do gado e causar mastite. Além disso, infecções por Treponema que causam doença do casco podem ser tratadas dessa maneira agindo como um banho nas patas quando os animais estiverem andando na sala. O bacteriófago específico de patógeno alvo, componentes fago ou ambos, pode ser seguramente administrado aos animais sem afetar a flora bacteriana não-patogênica naturalmente presente no animal ou no ambiente.

10

15

20

Esse processo supera as desvantagens do ofício anterior tratando os animais com bacteriófagos seguros em um sistema de distribuição eficaz. Além disso, administrando bacteriófago de liberação controlada ou componentes fago, o tempo de residência do bacteriófago ou dos componentes fago in vivo pode ser ajustado para assegurar um nível viável e sustentado da população de bacteriófago ou componente fago dentro do trato digestivo ou intestino do animal durante um

25

período de tempo desejado e, se desejado, nas fezes do animal para administrar o animal, os sistemas de retenção do animal ou cercado de criação, como um cativeiro, ou ambos, a populações de patógeno alvo. O bacteriófago ou componentes do bacteriófago não possuem toxinas ou outros compostos potencialmente prejudiciais ao meio-ambiente. Esses bacteriófagos altamente eficazes fornecem um meio economicamente viável e seguro para controlar populações bacterianas nas criações, nos animais e em outros animais, bem como nos sistemas de retenção de animal incluindo cercados de retenção ou criação, como um cativeiro, e em outros locais de acomodação de animal (especialmente em agricultura de alta intensidade) e nos ambientes circundantes.

O presente resumo da invenção não necessariamente descreve todas as características da invenção.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Estas e outras características da invenção se tornarão mais aparentes a partir da seguinte descrição na qual referência é feita às figuras anexadas, onde:

A FIGURA 1 mostra a titulação do fago aplicado ao leite em pó desnatado (Antes) e que foi obtido após a imobilização e ressuspensão (Após).

A FIGURA 2 mostra a titulação do fago aplicado à proteína de soja em pó (Antes) e que foi obtido após a imobilização e ressuspensão (Após).

A FIGURA 3 mostra o efeito da encapsulação sobre a atividade do bacteriófago. Os títulos do fago antes e após a encapsulação são mostrados.

A FIGURA 4A mostra o efeito de pH baixo na estabilidade de fagos encapsulados. Títulos de fagos encapsulados foram determinados antes e após a moagem. Todas as concentrações de fago foram corrigidas com relação ao peso do material encapsulado. A FIGURA 4B mostra o efeito do pH baixo na infectividade do fago. Os

fagos não foram imobilizados nem encapsulados.

A FIGURA 5 mostra a estabilidade dos fagos imobilizados encapsulados durante um período de 4,5 meses (131 dias) e 10 meses (311 dias) quando armazenados em temperatura ambiente (RT) ou em 4°C, respectivamente.

5 A FIGURA 6 mostra a redução do predomínio de E. coli O157:H7 nos animais tratados por fago, em comparação com animais de controle, em um período de estudo de 10 dias.

10 A FIGURA 7 mostra a redução na quantidade de animais E. coli O157:H7-positivos no grupo tratados com fago em comparação com grupo de controle, em um período de 10 dias.

A FIGURA 8 mostra o nível de bacteriófago livre no estrume de animais tratados em um período de 10 dias.

15 A FIGURA 9 mostra um modelo de RFLP representante dos fagos administrados antes e após a passagem pelo animal (gado). Os modelos foram obtidos usando três diferentes enzimas.

A FIGURA 10 mostra protocolo sugerido para o tratamento de gado antes do transporte para o abate. Períodos de transporte e processamento com segurança sugeridos também são identificados.

**DESCRIÇÃO DA MATERIALIZAÇÃO PREFERIDA**

20 A presente invenção relaciona-se com um método para redução de bactérias patogênicas dentro dos sistemas de retenção de animal. Mais especificamente, a presente invenção fornece métodos para controlar bactérias patogênicas em um animal, nos sistemas de produção de animal, como um cativeiro, cercado de criação e os semelhantes, ou uma combinação destes.

25 A seguinte descrição é de uma materialização preferida. A presente

J

invenção fornece um método para redução de uma população de um ou mais de um patógeno alvo presente em um animal, compreendendo, administrando uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, ao animal, de maneira que a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, seja liberada in vivo e dentro de um intestino, e aja para eliminar o patógeno ou mais de um patógeno do animal.

É também fornecido um método para redução de uma população de um ou mais patógeno alvo presente em um sistema de retenção de animal, por exemplo, entre outros, um cercado de retenção ou criação, como um cativeiro, compreendendo, fornecendo uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada e/ou componentes fago à alimentação do animal, à água para beber, a um animal ou uma combinação destes, de maneira que a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou ambos, seja liberada na alimentação, na água para beber, no trato digestivo do animal, no estrume ou em uma combinação destas e adsorvida ao patógeno alvo, dessa forma, matando ou reduzindo a população de um ou mais patógenos alvo dentro do sistema de retenção de animal. Os sistemas de retenção de animal podem incluir, entre outros, um cativeiro, uma sala de espera ou cerrado de retenção antes do abate, um cercado de criação, incluindo, por exemplo, um armazém de criação ou sala de criação, um zoológico, sistemas de aquacultura abertos e fechados, outros locais de acomodação de animal e locais semelhantes.

O termo "animal" ou "animais" significa qualquer animal que possa ser afetado por, ou carregar, um patógeno. Por exemplo, mas sem se limitar, em qualquer maneira, animais podem incluir animais para uso agrícola; exemplos não-limitantes incluem aves, como galinha ou peru e semelhantes; suínos; criação, termo

este que inclui todos os animais com casco como cavalos, bodes, ovelhas e gado – incluindo, entre outros, gado de corte, gado leiteiro e bisão – e os semelhantes. Os animais podem também incluir animais domesticados, por exemplo, entre outros, animais domésticos, como gatos, cães e semelhantes. Outro exemplo não-limitante de animais inclui várias espécies na aquacultura, como peixe e molusco.

O termo “bacteriófagos” ou “fago” é bem conhecido na área e geralmente indica um vírus que infecta bactérias. Os fagos são parasitas que se multiplicam dentro de células bacterianas usando algum ou todo o maquinário biossintético do hospedeiro e podem ser líticos ou lisogênicos. Os bacteriófagos usados em conformidade com a presente invenção podem ser qualquer bacteriófago, lítico ou lisogênico, que é eficaz contra um patógeno alvo importante. Entretanto, os bacteriófagos para uso na presente invenção são preferivelmente selecionados como sendo não-lisogênicos, o que significa que o DNA do fago não é incorporado no DNA genômico do hospedeiro após a infecção do fago. O fago específico para um ou mais de uma patógeno alvo pode ser isolado usando técnicas padrão na área, por exemplo, conforme estudado em Maniatis et al (1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; que está incorporado no presente para referência). Se desejado, um coquetel de diferente bacteriófago pode ser usado para abordar um ou mais de um patógeno, conforme descrito no presente documento.

De forma semelhante, “componente fago” ou “componentes fago” podem compreender qualquer componente fago, incluindo, entre outros, a cauda, uma proteína fago ou outra molécula constituinte ou construção molecular que seja eficaz na destruição, na redução do crescimento ou reprodução de uma bactéria alvo ou uma pluralidade de bactérias alvo.

Se desejado, um coquetel de estirpes de bacteriófagos, componentes fago ou ambos (também referidos como “bacteriófagos e/ou componentes fago”) pode ser usado contra um único alvo bacteriano, ou múltiplos alvos bacterianos. O termo “patógeno alvo” ou “bactéria alvo” significa bactéria patogênica que pode causar doença em humanos, animais, peixe, pássaros ou plantas. A bactéria alvo pode ser qualquer tipo de bactéria, por exemplo, entre outros, as espécies e estirpes bacterianas de Escherichia coli, Streptococci, Humicola, Salmonella, Campylobacter, Listeria, Lawsonia, Staphylococcus, Pasteurella, Mycobacterium, Hemophilus, Helicobacter, Mycobacterium, Mycoplasmi, Nesseria, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Bactericides, Pseudomas, Borrelius, Citrobacter, Propionobacter, Treponema, Shigella, Enterococcus, Leptospirex, Bacillii incluindo Bacillus anthracis e outras bactérias patogênicas aos humanos ou aos animais. Importantes são bactérias que são conhecidas por contaminar alimentações de animal, alimentações líquidas de animal ou sistemas de retenção de animal, incluindo, entre outros, cercados de retenção ou criação, como cativeiros, geralmente. De particular interesse estão as bactérias que também infectam criação, incluindo suínos e aves destinados ao consumo humano, por exemplo, entre outras, Salmonella, Campylobacter e E. coli O157:H7, ou qualquer combinação destas. Em outro exemplo não-limitante, o patógeno alvo pode ser E. coli, Staphylococcus, Treponema ou qualquer combinação destes.

Os bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser fornecidos em uma solução aquosa. A solução aquosa pode ser qualquer solução adequada para os fins da presente invenção. Por exemplo, os bacteriófagos e/ou componentes fago pode ser fornecidos na água ou em um meio adequado conforme conhecido na área, por exemplo, caldo LB, SM, TM, PBS, TBS ou outros tampões comuns. Por

exemplo, entre outros, os bacteriófagos podem ser armazenados no caldo LB.

Os bacteriófagos e/ou componentes fago também pode ser fornecidos em uma forma seca para adição com uma alimentação líquida de animal ou uma alimentação de animal. Exemplos de formas secas de bacteriófagos e/ou componentes fago incluem, entre outros, bacteriófagos liofilizados e/ou componentes fagos, bacteriófagos e/ou componentes fagos que são imobilizados em uma matriz, bacteriófagos e/ou componentes fago que são encapsulados conforme descrito abaixo, bacteriófagos e/ou componentes fago que são fornecidos na forma de comprimido conforme descrito abaixo ou uma combinação destes.

“Liberação controlada” significa que o agente administrado ao animal, por exemplo, um ou mais de um bacteriófago e/ou componente fago está presente em uma composição compreendo várias formulações do bacteriófago ou de mais de um bacteriófago e/ou componente fago. Por exemplo, o bacteriófago ou mais de um bacteriófago e/ou componente fago pode estar presente em uma forma líquida ou seca compreendendo um ou mais de um bacteriófago e/ou componente fago, bacteriófagos ou componentes fago liofilizados, bacteriófagos e/ou componentes fagos que são imobilizados em uma matriz, bacteriófagos e/ou componentes fago que são encapsulados, bacteriófagos e/ou componentes fago que são fornecidos na forma de cápsula, bacteriófagos e/ou componentes fago que são fornecidos na forma de comprimido, bacteriófagos e/ou componentes fago que são encapsulados, em cápsulas, em comprimidos ou em uma combinação destes, onde as formas encapsuladas, em cápsula ou comprimido dos bacteriófagos e/ou componentes fago compreendem composições que liberam os bacteriófagos e/ou componentes fago em diferentes taxas com várias regiões de um trato digestivo de um animal ou nas fezes do animal. As composições dos encapsulados, da cápsula ou dos comprimidos

podem incluir polímeros, ceras, géis, compostos que inibem a água, repelem a água, ou ambos, ácidos graxos, açúcares, proteínas ou materiais sintéticos, para realizarem a liberação de um agente dentro da composição de uma maneira controlada. Várias composições de liberação controlada compreendendo bacteriófagos ou componentes fagos podem ser usadas, de maneira que os bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser liberados antes da administração a um animal, durante a passagem através do trato digestivo do animal ou após deixar o animal.

A composição de bacteriófagos imobilizados da presente invenção  
exibe propriedades de armazenamento desejáveis e pode ser misturada com a  
alimentação de animais incluindo, entre outros, gado, pássaros, aves, animais  
domésticos, peixe e molusco a fim de auxiliar na redução do predomínio da bactéria  
alvo. Bacteriófagos de liberação controlada e/ou componentes fago, presentes como  
um líquido, imobilizados, encapsulados, cápsulas, comprimidos ou uma combinação  
destes, podem ser misturados com outros aditivos ou suplementos aplicados à  
alimentação de animal, como parte do regime de alimentação diário, conforme  
necessário ou incorporado na alimentação em grãos. Dessa forma, a fixação dos  
bacteriófagos e/ou componentes fago na alimentação poderia ser evitada.  
Alternativamente, a adesão à alimentação ou ao fago encapsulado e/ou ambos pode  
ser aumentada para fornecer mistura e distribuição melhoradas. O bacteriófago de  
liberação controlada e/ou componentes fago podem também ser misturados com a  
água para beber. Adicionalmente, formas alternativas de administração, por  
exemplo, entre outras, inalação, injeção intramuscular, intraperitoenal, intratecal,  
vaginal, retal, tópica ou uma combinação destas, podem ser usadas para administrar  
os bacteriófagos de liberação controlada, componentes fago, ou ambos, da presente

invenção.

A liofilização de bacteriófago e/ou componentes fago pode ser realizada usando qualquer procedimento de liofilização conhecido, por exemplo, entre outros, métodos divulgados em Clark e Geary (1973, Preservation of bacteriophages by freezing and freeze-drying, Cryobiology, 10, 351-360; Ackermann et al. 2004, Long term bacteriophage preservation, World Federation Culture Collections Newsletter, 38, 35) (ambos os quais estão incorporados no presente para referência).

Os bacteriófagos, ou componentes fago, ou ambos, podem também ser fornecidos imobilizados em uma matriz. O termo matriz significa qualquer matriz sólida adequada que seja solúvel em água, capaz de ser ingerida ou capaz de ser absorvida por um animal, ou adequada para uso com alimentação líquida animal. Adicionalmente, a matriz pode ser não-solúvel em água, considerando-se que quaisquer fagos absorvidos podem ser liberados da matriz dentro de um ambiente aquoso. A matriz deve ser capaz de adsorver os bacteriófagos e/ou componentes fago em sua superfície e liberando os bacteriófagos e/ou componentes fago em um ambiente adequado. Os bacteriófagos e/ou componentes fago não devem se aderir de maneira rígida à matriz porque dessa forma eles não poderiam ser liberados mediante re-suspensão adequada em um meio. Preferivelmente, os bacteriófagos e/ou componentes fago adsorvidos, imobilizados são não covalentemente associados com a matriz, de maneira que eles podem ser liberados da matriz quando desejado. Exemplos não-limitantes de uma matriz que pode ser usada de acordo com a presente invenção inclui leite em pó desnatado, proteína de soja em pó, albumina em pó, proteínas celulares simples, trehalose, manitol ou outro açúcar em pó ou álcool de açúcar, carvão, espuma de látex, plástico derivado de planta

sintética, como, entre outros, plástico de soja ou plástico de milho, ou outras superfícies inertes, materiais à base de carboidrato solúveis em água ou uma combinação destes. Preferivelmente, a matriz é geralmente reconhecida como segura (GRAS).

5 Os bacteriófagos, ou componentes fago, ou ambos, em solução aquosa podem ser aplicados à matriz através de qualquer método conhecido na área, por exemplo, gotejamento ou borrifação, considerando-se que a quantidade da matriz exceda a quantidade da solução aquosa de bacteriófago e/ou componentes de fago. Prefere-se que a matriz permaneça em um estado seco ou semi-seco e que  
10 uma suspensão líquida de bacteriófagos (e/ou componentes fago) e a matriz não seja formada. Uma vez que a solução de bacteriófago é adicionada à matriz, a matriz pode ser misturada usando um dispositivo mecânico e permitindo-a secar no ar. O bacteriófago pode também ser imobilizado na matriz sólida usando granuladores e secadores de leito de fluido comercialmente disponíveis. Desses métodos, borrifar a  
15 solução de bacteriófago sobre a matriz é preferido.

A composição anti-bacteriana compreendendo de bacteriófagos imobilizados ou componentes fago, ou ambos, e a matriz podem ser secas em uma temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 50°C ou qualquer quantidade entre elas, por exemplo, em uma temperatura de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14,  
20 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou 50°C ou qualquer quantidade entre elas. Por exemplo, a composição anti-bacteriana pode ser seca em uma temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C ou qualquer quantidade entre elas, ou de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25° ou qualquer quantidade entre elas. O processo de secagem pode também ser  
25 acelerado fornecendo um fluxo de ar sobre ou através da composição anti-

bacteriana. Alternativamente, a secagem pode ser realizada aquecendo-se o material imobilizado a vácuo.

Após um período de secagem, solução aquosa adicional pode ser aplicada à matriz se desejado, e a matriz foi seca novamente. Esse processo pode ser repetido conforme necessário para obter a quantidade desejada de fago na matriz. A titulação de fago na matriz pode ser prontamente determinada usando técnicas padrão.

Os bacteriófagos e/ou componentes fago imobilizados ou liofilizados podem também ser encapsulados antes da administração a um animal como um aditivo alimentar. O termo "encapsulado" significa que os fagos imobilizados, ou componentes fago, ou ambos, são revestidos com uma substância que aumenta a resistência do fago aos estresses psico-químicos de seu ambiente. Os fagos e/ou componentes fago imobilizados podem ser revestidos com qualquer substância conhecida na área, por qualquer método adequado conhecido na área, por exemplo, mas não limitado àquele divulgado na publicação norte-americana 2003/0109025 (Durand et al., que está incorporada no presente para referência). Nesse método, micro-gotas da substância de revestimento são injetadas em uma câmara contendo uma estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago imobilizado, ou componentes fago, ou ambos, da presente invenção e rapidamente resfriada. Alternativamente, uma composição de revestimento pode ser misturada com o bacteriófago e/ou componentes fagos imobilizados ou com mais de um bacteriófago e/ou componentes fagos imobilizados, da presente invenção, mexendo ou agitando constantemente e resfriada ou seca conforme necessário.

A substância de revestimento pode ser qualquer substância de revestimento conhecida na área. Por exemplo, mas não querendo ser limitante, a

substância de revestimento pode abranger uma substância com uma temperatura de fusão entre aproximadamente 20°C e 100°C, por exemplo, entre aproximadamente 30°C e 80°C, ou qualquer temperatura entre elas; por exemplo, a temperatura de fusão pode ser de 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 ou 100°C ou qualquer temperatura entre elas. Se a substância de revestimento tiver de ser ingerida ou usada para uma aplicação oral, então, é preferido que a substância seja uma substância de grau alimentício. Exemplos não-limitantes dessas substâncias incluem ácidos graxos vegetais, ácidos graxos como ácido palmítico e ácido esteárico, por exemplo, Stéarine<sup>TM</sup>, ceras animais, ceras vegetais, por exemplo, cera de Carnaúba e derivados de cera. Outras moléculas aditivas podem ser adicionadas à substância de revestimento; esse aditivo pode incluir antioxidantes, açúcares, proteínas ou outro material sintético.

Substâncias de revestimento adicionais também podem ser usadas, por exemplo, materiais à base de não-lipídios (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana Nos 6.723.358; e 4.230.687, que estão incorporadas no presente para referência), por exemplo, açúcares ou outros componentes à base de carboidratos que são solúveis em água. O bacteriófago, ou componente fago, ou ambos, na composição da presente invenção também pode ser revestido com outras substâncias que não são de grau alimentício. Outras moléculas aditivas podem ser adicionadas à substância de revestimento; esses aditivos podem incluir antioxidantes, açúcares, proteínas ou materiais sintéticos.

O processo de encapsulação à base de lipídio protege os bacteriófagos, componentes fago, ou ambos, a alguma extensão de um ambiente áspero em que os bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser expostos a, por

exemplo, ambiente de pH baixo em uma variação de condições de alimentação líquida fermentada, ou o sistema digestivo de um animal. O material à base de lipídio selecionado para encapsulação deve também exibir a propriedade que este rompe dentro de um ambiente desejado, de maneira que os bacteriófagos e/ou componentes fago sejam liberados. Por exemplo, enzimas digestivas podem degradar o material encapsulador e auxiliar na liberação dos bacteriófagos e/ou componentes fago dentro do intestino de um animal, ou enzimas dentro da alimentação líquida fermentada podem auxiliar na liberação de alguns dos bacteriófagos e/ou componentes fago da encapsulação. Como resultado, diversos materiais para encapsulação dos bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser usados, de maneira que se desejado, haja liberação selecionada dentro da alimentação líquida fermentada, e a liberação dentro do intestino de um animal, ao mesmo tempo em que protege os bacteriófagos, componentes fago, ou ambos. Além disso, o bacteriófago e/ou componentes fago que são encapsulados usando materiais à base de não-lipídio serão dissolvidos na água, liberando bacteriófagos ou componentes fago imediatamente, ou logo após a mistura com meio de alimentação líquida. O bacteriófago e/ou componentes fago podem também ser liberados em um modelo de tempo controlado mediante a formulação selecionada, ou se as preparações forem fornecidas dentro de uma cápsula ou na forma de comprimido. As formulações de cápsula ou comprimido podem auxiliar na liberação controlada do bacteriófago e/ou componentes fago dentro do meio de alimentação líquida. Portanto, as misturas de bacteriófagos de liberação controlada, componentes fago, ou ambos, que são misturados ou encapsulados com diferentes materiais podem ser combinados ou misturados com alimentação animal, alimentação animal líquida ou, de outra forma, administrados a um animal.

Os bacteriófagos e/ou componentes fago imobilizados, liofilizados e/ou encapsulados podem também ser fornecidos em uma forma de cápsula. O termo "forma de cápsula" significa que os fagos ou componentes fago imobilizados, liofilizados e/ou encapsulados, ou ambos, são fornecidos em uma cápsula, por exemplo, uma cápsula mole, que pode ser solubilizada dentro de um ambiente aquoso. A cápsula pode ser feita de qualquer substância conhecida na área, por exemplo, entre outras, gelatina, goma-laca, cera, compostos sintéticos ou outros compostos.

Os bacteriófagos e/ou componentes fago imobilizados, liofilizados e/ou encapsulados podem também ser fornecidos em uma forma de comprimido. O termo "forma de comprimido" significa que os fagos imobilizados, liofilizados e/ou encapsulados, ou componentes fago, ou ambos, são fornecidos em um comprimido pressionado que é dissolvido em um ambiente aquoso. O comprimido pode ser feito de qualquer substância adequada conhecida na área, por qualquer método adequado conhecido na área. Por exemplo, o comprimido pode compreender ligantes e outros componentes necessários na produção de um comprimido que são conhecidos por um perito da área. O comprimido pode ser um comprimido de liberação imediata, onde os bacteriófagos e/ou componentes fago são liberados na alimentação líquida mediante dissolução do comprimido, ou pode compreender uma composição de liberação controlada, onde os bacteriófagos e/ou componentes fago são liberados dentro de um ambiente aquoso, incluindo a alimentação líquida, o intestino do animal ou ambos, em uma maneira tempo-dependente. Vide WO 02/45695; US 4.601.894; US 4.687.757, US 4.680.323, US 4.994.276, US 3.538.214, US (que estão incorporadas no presente para referência) com relação a diversos exemplos de formulações de liberação controlada que podem ser usadas

para auxiliar na liberação de tempo controlado de bacteriófago, ou componentes fago em ambientes aquosos.

A composição antibacteriana da presente invenção, em uma forma líquida, uma forma seca, incluindo bacteriófagos e/ou componentes fago que são liofilizados ou adsorvidos em uma matriz, encapsulados, ou dentro de uma forma de cápsula ou comprimido, ou uma combinação destas, podem ser misturados com uma alimentação animal, ou uma alimentação animal líquida para produzir uma alimentação animal tratada ou uma alimentação líquida animal tratada e ajudar a reduzir a quantidade de bactérias na alimentação. Essa alimentação tratada, tanto na forma líquida quanto na forma sólida, pode ser usada para alimentar qualquer criação, incluindo suínos ou aves. Se bacteriófagos de liberação controlada e/ou componentes fago forem usados isolados ou em combinação com bacteriófagos e/ou componentes fago não encapsulados para tratar a alimentação, então, além de reduzir o conteúdo de bactérias da alimentação, redução adicional na contaminação dos animais com bactérias ou nas fezes animais pode ser obtida. O uso de bacteriófagos de liberação controlada, componentes fago, ou uma combinação destes, auxilia em livrar o animal de bactérias já presentes no intestino antes do processamento adicional do animal.

O termo "alimentação animal" significa uma alimentação animal que é seca ou que compreenda menos do que aproximadamente 25% w/w de conteúdo de umidade. Preferivelmente, o conteúdo de umidade é de aproximadamente 5 a 20% w/w ou de aproximadamente 10 a 15% w/w. A alimentação animal pode geralmente compreender um componente cereal que pode incluir trigo, cevada, soja, farelo de trigo e outros cereais e um componente não-cereal que pode incluir vitaminas, minerais, proteína, gordura e outros suplementos. Entretanto, outros componentes

podem também estar presentes na alimentação animal. A definição da composição da alimentação animal não deve ser limitante em nenhuma maneira.

A alimentação animal pode também ser uma alimentação animal líquida. O termo "alimentação animal líquida" significa uma alimentação animal que é uma mistura de água e alimentos e inclui uma alimentação líquida não fermentada (NFLF) e uma alimentação líquida fermentada (FLF). A alimentação animal líquida geralmente tem um componente cereal que pode compreender trigo, cevada, soja, farelo de trigo e outros cereais e um componente não-cereal que pode compreender vitaminas, minerais, proteína, gordura e outros suplementos. Há dois tipos de alimentação líquida: não fermentada e fermentada. A alimentação líquida não fermentada é uma mistura de alimentos e água feita imediatamente antes da alimentação. A alimentação líquida fermentada é uma mistura de alimentos e água que é armazenada em uma dada temperatura, durante uma dada quantidade de tempo, para permitir que a fermentação seja começada antes da alimentação dos animais. A fermentação da alimentação completa, ou apenas do componente cereal pode ser realizada. A fermentação natural da alimentação, iniciada pela flora natural presente nos alimentos, pode produzir ácido láctico suficiente para ter um efeito benéfico. Alternativamente, bactérias do ácido láctico (LAB) podem ser adicionadas para inocular a alimentação líquida (conforme descrito por Mann nas Patentes Norte-Americanas 6.326.037; 6.699.514 e Pedido de Patente Norte-Americana Publicado 2001/0055633, que está incorporado no presente para referência). Qualquer tipo de alimentação líquida, por exemplo, NFLF, FLF, FLF compreendendo LAB, pode ser usado no método da presente invenção. Além disso, outros componentes podem também estar presentes na alimentação animal líquida. A definição da composição de alimentação animal líquida não deve ser limitante em nenhuma maneira.

A fermentação da alimentação líquida pode ser realizada por qualquer método conhecido na área. Por exemplo, o que não deve ser considerado limitante em nenhuma maneira, a alimentação líquida pode ser preparada misturando refeição e água em uma razão de aproximadamente 1,5:1 a 4:1 ou qualquer quantidade entre elas e armazenando em um tanque fechado sob agitação em uma temperatura na faixa de aproximadamente 15°C a 30°C durante um tempo de aproximadamente 24 horas a 10 dias, ou qualquer quantidade entre elas. Em um exemplo não-limitante alternativo estudado por Canibe and Jensen ((2003) J. Anim. Sci., 81, 2019-2031; que está incorporado ao presente para referência), a refeição é misturada em água em uma razão 1:2,5 e é armazenada em 20°C em um tanque fechado sob agitação durante um período de 4 dias.

Uma alimentação animal tratada é uma alimentação animal misturada com uma quantidade eficaz de uma composição antibacteriana tem uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago, um ou mais de um componente fago de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago ou uma combinação destes. A alimentação animal pode ser misturada com uma forma seca ou líquida da composição antibacteriana. A alimentação animal tratada ou alimentação animal líquida tratada compreende uma quantidade eficaz de uma composição antibacteriana. A alimentação animal tratada pode ser preparada por um método conhecido na área. Por exemplo, a composição antibacteriana pode ser misturada com a alimentação animal em uma forma seca, por exemplo, entre outras, um pó ou uma preparação liofilizada pode ser misturada com a alimentação animal ou a composição antibacteriana pode ser aplicada à alimentação animal em uma forma líquida, por exemplo, como um spray, porção ou gotejamento, para produzir uma alimentação animal tratada. A alimentação animal tratada pode então ser seca. A quantidade eficaz de composição antibacteriana

tendo uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago, um ou mais de um componente fago de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago, ou uma combinação destes, é de aproximadamente  $10^3$  pfu/g a  $10^{13}$  pfu/g de peso seco de alimentação animal; por exemplo, de aproximadamente  $10^5$  pfu/g a  $10^9$  pfu/g de peso seco de alimentação animal. Em um exemplo adicional, a quantidade da estirpe ou de mais de uma estirpe de bacteriófago, um ou mais de um componente fago de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago, ou uma combinação destes, pode ser de aproximadamente  $10^6$  pfu/g a  $10^8$  pfu/g de peso seco da alimentação animal.

A alimentação animal líquida pode ser fermentada (FLF) ou alimentação líquida não fermentada (NFLF). Quando NFLF é usada, os bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser adicionados à alimentação antes de misturar, ou após misturar com água. Ao usar FLF, os bacteriófagos ou componentes fago podem ser adicionados antes, durante ou após a fermentação. Por exemplo, os bacteriófagos ou componentes fago, ou ambos, podem ser adicionados antes da fermentação da alimentação. Em um exemplo mais específico, os bacteriófagos e/ou componentes fago podem ser adicionados antes da fermentação. Uma quantidade de aproximadamente  $10^3$  pfu/ml a  $10^{13}$  pfu/ml de alimentação líquida pode ser usada, ou qualquer quantidade entre elas; por exemplo,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  pfu de bacteriófagos e/ou componentes fago pode ser adicionada por ml de alimentação líquida. Em um exemplo não-limitante, de aproximadamente  $10^5$  pfu/ml a  $10^9$  pfu/ml de alimentação animal líquida. Em um exemplo adicional, a quantidade dos bacteriófagos, componentes fago ou combinação destes pode ser de aproximadamente  $10^6$  pfu/ml a  $10^8$  pfu/ml de alimentação animal líquida. Já que os bacteriófagos são tipicamente ativos em um ambiente compreendendo um pH maior

do que 2,5, os bacteriófagos podem ser adicionados a FLF (em uma pH tipicamente na variação de pH de aproximadamente 3 a 9 ou qualquer quantidade entre elas, por exemplo, um pH de aproximadamente 5) e ainda exibem atividade biológica. Se um pH menor for observado dentro da FLF, por exemplo, se bactérias de ácido láctico forem introduzidas à alimentação líquida, então, os bacteriófagos, bacteriófagos encapsulados, ou uma combinação destes, podem ser usados para tratar a FLF com bacteriófagos sendo adicionados antes da adição das bactérias de ácido láctico. Quando os bacteriófagos ou componentes fago são adicionados antes da fermentação, a adição pode ser antes ou após a mistura da alimentação com água.

A presente invenção pode ser usada para alimentação animal ou alimentação animal líquida destinada para qualquer tipo de animal, incluindo, entre outros, animais para uso agrícola. Por exemplo, mas sem desejar ser limitante em nenhuma maneira, a alimentação animal tratada, ou alimentação animal líquida tratada, feita de acordo com a presente invenção, pode ser usada para alimentar animais para uso agrícola, incluindo, entre outros, aves, como galinha ou peru, e semelhantes; suínos; criação como cavalos, bodes, ovelhas, gado de corte, gado de leite e bison e semelhantes; animais domesticados, como animais domésticos, incluindo cães, gatos e semelhantes; peixe e molusco; bem como animais dentro de zoológicos ou outros sistemas de retenção de animal. Entretanto, deve-se compreender que o bacteriófago de liberação controlada, componentes fago, ou ambos, pode ser administrado a um animal através de outras vias incluindo, entre outras, oral, inibição, inalação, injeção, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal, retal, tópica ou uma combinação destas, conforme exigido.

O animal deve receber um ou mais de um bacteriófago de liberação controlada ou componentes fago em qualquer quantidade eficaz para reduzir a

população de patógeno alvo no animal. Por exemplo, os bacteriófagos de liberação controlada podem ser administrados em uma dosagem na variação de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{13}$  pfu por animal por dia, ou qualquer quantidade entre elas, por exemplo, aproximadamente  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  ou  $10^{13}$  pfu por animal por dia durante o período de tempo desejado. Por exemplo, e sem querer ser limitante, os bacteriófagos podem ser administrados em uma dosagem de tratamento de aproximadamente  $10^9$  a  $10^{13}$  pfu por dia ou aproximadamente  $10^8$  a  $10^{11}$  pfu por dia, ou aproximadamente  $10^9$  a  $10^{11}$  pfu por dia. O período de tratamento pode ser durante um período de 1 a aproximadamente 12 dias, ou qualquer quantidade entre elas, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 dias antes do processamento adicional do animal. Alternativamente, uma dosagem de manutenção de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{10}$  pfu por dia pode ser usada, ou qualquer quantidade entre elas. Por exemplo, a dose de manutenção pode ser de aproximadamente  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  ou  $10^9$  ou  $10^{10}$  pfu por dia durante um período de tempo desejado. Por exemplo, e sem querer ser limitante, o período de manutenção desejado pode ser de aproximadamente 10 a 180 dias, ou qualquer quantidade entre elas; por exemplo, o período de manutenção pode ser de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 ou 180 dias, ou qualquer quantidade entre elas. Em um exemplo não-limitante, o período de manutenção pode ser de aproximadamente 30 a 90 dias, ou aproximadamente 30 a 60 dias. Alternativamente, a administração de bacteriófagos de liberação controlada ou componentes fago pode ser realizada em uma dosagem de tratamento de  $10^9$  a  $10^{13}$  por dia ou qualquer quantidade entre elas, durante um período de 1 a aproximadamente 12 dias, ou qualquer quantidade entre elas, por exemplo, 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 dias, seguida por uma dosagem de manutenção de aproximadamente 10<sup>5</sup> a 10<sup>10</sup> pfu, ou qualquer quantidade entre elas, durante um período de tempo desejado, por exemplo, entre outros, de aproximadamente 10 a 180 dias, aproximadamente de 30 a 90 dias ou aproximadamente de 30 a 60 dias, ou qualquer quantidade entre elas, antes do processamento adicional do animal.

Portanto, a presente invenção fornece um método para reduzir uma população de um ou mais de um patógeno alvo em um animal compreendendo, administrando uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago, ou ambos, ao animal, de maneira que a estirpe do bacteriófago ou mais de uma estirpe de bacteriófago seja liberado in vivo e adsorve-se a um ou mais de um patógeno alvo, dessa forma, reduzindo o patógeno ou mais de um patógeno do animal. Além disso, na etapa de administração, a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago, ou ambos, pode, por exemplo, ser administrada ao animal durante um período de tempo de aproximadamente 1 a 12 dias, ou de aproximadamente 5 a 7 dias, ou qualquer quantidade entre elas, após esse tempo, o animal pode ser transportado, por exemplo, para abate. Nesse caso, como resultado do período de tratamento, a carga de patógeno nos animais, por exemplo, entre outros, E. coli O157 é reduzida ou eliminada durante um adicional de 48-72 horas durante o qual o animal será abatido. Esse método assegura que os animais que irão ser abatidos contenham uma carga de patógeno reduzida e que os animais mais limpos estejam sendo processados dentro da fábrica de processamento.

A presente invenção também fornece um método para reduzir uma população de um ou mais patógeno alvo presente em um animal, compreendendo, administrando uma estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação

controlada ou componente fago, ou ambos, ao animal em uma dosagem de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{13}$  pfu por animal por dia durante um período de tempo desejado, de maneira que essa estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, seja liberada in vivo e aja para eliminar o patógeno ou mais de um patógeno do animal.

Ao administrar bacteriófago de liberação controlada ou componentes fago a um animal usando um regime de tratamento, de manutenção, ou ambos os regimes conforme descrito acima, as quantidades de populações de bactérias alvo diminuem no animal, nas fezes do animal e dentro do cercado de retenção ou criação, como um cativeiro, em geral. Ao usar o método da presente invenção, redução de patógenos alvo pode ser atingida, dessa forma, aumentando a segurança do fornecimento de alimentos para consumo pelos humanos.

Portanto, a presente invenção também fornecer um método para reduzir uma população de um ou mais de um patógeno alvo presente em um sistema de retenção de animal, por exemplo, entre outros, um cercado de retenção, como um cativeiro, um cercado de criação, por exemplo, um armazém ou sala, um zoológico e semelhantes. O método compreendendo, administrando uma estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, ou componentes fago, que são capazes de adsorver-se e matar o patógeno alvo, à alimentação animal, à água potável, a um animal, ou uma combinação destas, de maneira que a estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlado ou componente fago, ou ambos, seja liberada na alimentação, na água potável, no trato digestivo do animal, nas fezes do animal ou em uma combinação destes, e reduza a população do patógeno alvo ou de mais de um patógeno alvo dentro do sistema de retenção animal.

A presente invenção fornece ainda protocolos de tratamento para a redução de patógenos, por exemplo, entre outros, E. coli, Salmonella, Campylobacter e Staphylococcus, nos animais. Sem querer ser limitante, os animais a serem transportados ou que serão abatidos podem ser tratados com uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada, componente fago, ou ambos, 5-7 dias antes de serem transportados. Usando essa abordagem, o nível de patógeno dos animais será reduzido a níveis baixos no dia 3-5 do tratamento, dessa forma, permitindo o transporte seguro dos animais a partir aproximadamente do dia 4 do tratamento em diante. Isso fornece uma janela "de transporte e processamento com segurança" durante a qual os animais do sistema de retenção, por exemplo, entre outros, um cercado de retenção ou criação, como cativeiro, podem ser transportados e processados de forma segura.

Além disso, a presente invenção fornece um uso de uma estirpe ou mais de uma estirpe de bacteriófago ou componentes fago, ou ambos, para distribuição ao estrume do animal para prevenir a expansão de infecções bacterianas através do estrume. O bacteriófago ou mais de um bacteriófago e/ou componentes fago pode ser distribuído diretamente ao estrume (ex vivo) em uma forma não encapsulada, ou pode ser administrado ao animal em uma forma encapsulada ou de liberação controlada para distribuição ao estrume através do intestino do animal.

A presença de bacteriófagos contra um patógeno alvo no estrume pode ser benéfica para prevenir o alastramento de infecções bacterianas causadas por vários patógenos. Além de reduzir o alastramento de E. coli O157:H7, que pode causar sérios problemas de saúde nos humanos, os bacteriófagos também podem reduzir as contagens de Staphylococcus, que pode infectar os bicos das mamas e o

úbero do gado e pode causar mastite. Além disso, as infecções por Treponema, que causam doença de casco, podem ser tratadas dessa maneira pela ação como lava-pé quando os animais estiverem andando no curral.

A presente invenção será melhor ilustrada nos exemplos que se seguem.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Isolamento, amplificação e titulação do fago

Os bacteriófagos foram isolados de amostras de estrume obtidas de fazendas de gado leiteiro e de gado de corte no Canadá. Deixou-se que as amostras de estrume reagissem com E. coli O157:H7 e foram colocadas em placas de ágar. Quaisquer placas de fago obtidas foram isoladas e purificadas de acordo com os protocolos padrão de purificação de fago (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Os fagos purificados isolados da maneira descrita acima foram amplificados usando a cepa de isolamento de E. coli O157:H7. O fago purificado e as bactérias foram misturados, deixados em temperatura ambiente por 10 minutos e amplificados de acordo com os protocolos padrão comumente usados na arte (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). As amostras amplificadas em caldo LB foram esterilizadas e usadas.

As concentrações de soluções de bacteriófagos foram determinadas usando os protocolos padrão de titulação de fagos (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). As preparações que contêm fagos foram diluídas com LB, misturadas e incubadas com E. coli O157:H7 por 10 minutos e colocados em placas de ágar. A

concentração de fagos foi determinada pelo número de placas obtidas nas diferentes diluições e multiplicando com o fator de diluição apropriado.

Exemplo 2: Imobilização de fagos

Os fagos específicos P10 e R4 de E. coli O157:H7, preparados conforme descrito no exemplo 1, foram imobilizados em duas matrizes diferentes: 5 leite em pó (sem gordura) e proteína de soja. Tanto o leite em pó (Carnation) quanto a proteína de soja (Supro) foram adquiridos de lojas de alimentos locais. Foram utilizados protocolos idênticos para ambos os materiais.

Um total de 50 g de pó (leite em pó ou proteína de soja) foi espalhado em um prato de vidro. Os fagos em solução foram uniformemente pulverizados em cada matriz em pó. Títulos variados de fagos, variando de 10<sup>5</sup> pfu/g a 10<sup>9</sup> pfu/g, foram usados com leite em pó, cada um deles produzindo resultados semelhantes. O fago-pó foi misturado e seco a 37°C por 2 horas, ou até estar completamente seco. A composição resultante de bacteriófagos foi enterrada em um pó fino, com 10 tamanhos de partículas na variação de 50-600 µm e um tamanho de partícula médio de 200 µm. Um total de 0,5 grama de cada composição em pó de bacteriófagos foi ressuspenso em 10 ml de água de osmose reversa (RO) e a recuperação de fagos foi testada. O leite em pó ou a proteína em soja em pó na ausência de bacteriófagos foi usado como um controle. Os resultados para as composições de bacteriófagos usando pó de leite seco como matriz são apresentados na Figura 1. Os resultados para as composições de bacteriófagos preparadas usando proteína de soja como 20 matriz são apresentados na Figura 2.

Para o fago imobilizado no leite em pó, os resultados mostram que o fago pode ser recuperado da composição de bacteriófagos e nenhuma perda na 25 atividade é observada. A Figura 1 mostra que o título de fago obtido após a

imobilização (“Depois”) é semelhante à quantidade de fago adicionada ao pó (“Antes”). Resultados semelhantes são observados para composições de bacteriófagos compreendendo proteína de soja (Figura 2, “Depois”: fago imobilizado; “Antes” quantidade de fago adicionada à matriz).

Esses resultados também mostram que os fagos imobilizados são prontamente liberados de uma matriz quando são introduzidos a um meio aquoso. Os resultados mostrados nas Figuras 1 e 2 são para fago direcionado para *E. coli*, os mesmos resultados são obtidos com bacteriófago direcionado para *Salmonella* e *Campylobacter*.

#### Exemplo 3: Encapsulamento de composição de bacteriófagos

As composições de bacteriófagos foram preparadas conforme descrito no Exemplo 2 e encapsuladas geralmente conforme descrito na publicação dos EUA 2003/0109025 (que é incorporada aqui por referência), com algumas modificações para preservar a atividade dos fagos. Em resumo, 400 g de fago imobilizado e 1,2 kg de ácidos graxos vegetais foram usados para encapsulamento. A temperatura máxima atingida pela preparação do fago encapsulado foi 39°C. Composições de bacteriófagos também são preparadas como um comprimido usando métodos padrão, por exemplo, conforme descrito em WO 02/45695; US 4,601,894; US 4,687,757, US 4,994,276, US 3,538,214, em que o agente farmacêutico é substituído por fago imobilizado conforme preparado no Exemplo 2.

Assim que a operação de revestimento for completada, as partículas de fagos imobilizados encapsulados foram coletadas e armazenadas em recipientes hermeticamente fechados. O tamanho médio de partícula foi entre 100 e 1000 µm. Os comprimidos compreendendo bacteriófagos também são armazenados em recipientes hermeticamente fechados. O efeito do encapsulamento no título de

composições de bacteriófagos imobilizados no pó de leite foi avaliado pela determinação da atividade da preparação de fago imobilizado antes (“Antes”, Figura 3) e depois (“Depois”, Figura 3) o encapsulamento. Para essa análise, os bacteriófagos encapsulados foram ressuspensos e moídos usando um liquidificador.

5 Os bacteriófagos encapsulados ressuspensos foram passados no liquidificador a fim de romper as partículas encapsuladas e liberar os bacteriófagos. Um total de 0,5 g de fago imobilizado encapsulado foi misturado com 45,5 ml de meio de ressuspensão (Caldo LB ou Água RO) e 250 µl de agente anti-espuma foi adicionado para impedir a formação de espuma no processo de moagem. Os  
10 resultados dessa análise são mostrados na Figura 3.

Resultados semelhantes são obtidos usando bacteriófago em comprimido.

Esses resultados demonstram que os bacteriófagos podem ser recuperados de uma composição encapsulada, ou em comprimido, de bacteriófagos,  
15 e o encapsulamento ou formação de comprimido não inativa o fago imobilizado. Os resultados mostrados na Figura 3 são para fago direcionado para *E. coli*; são obtidos resultados semelhantes com bacteriófagos direcionados para *Salmonella* e *Campylobacter*.

#### Exemplo 4: Estabilidade e liberação de bacteriófagos encapsulados

20 Os fagos foram imobilizados, encapsulados e colocados em comprimidos da maneira descrita no Exemplo 3. A liberação de fagos imobilizados encapsulados no rompimento físico ou químico foi testada da seguinte maneira: 0,5 g de fago imobilizado encapsulado foi misturado com 45,5 ml de meio de ressuspensão (Caldo LB ou Água RO). Um total de 250 µl de agente anti-espumante  
25 foi usado para impedir a formação de espuma durante o processo de moagem. Uma

amostra de controle de fagos imobilizados encapsulados foi preparada conforme descrito acima, mas não foi sujeitada à moagem, para determinar lixiviação não específica de bacteriófagos encapsulados no meio de ressuspensão. Os bacteriófagos em comprimidos são processados de uma maneira semelhante.

5 A estabilidade dos bacteriófagos encapsulados em pH baixo também foi examinada. Após a ressuspensão (conforme descrito acima), os fagos imobilizados encapsulados foram incubados por 30 ou 60 min a pH 2,15, neutralizados a pH 7,0 usando NaOH, depois foram moídos usando um liquidificador; uma outra amostra (controle) foi ressuspensa e imediatamente moída.  
10 Tanto as amostras de controle quanto as de teste foram esterilizadas por filtro usando um filtro de seringa antes do uso. Os bacteriófagos em comprimidos são processados de uma maneira semelhante.

A Figura 4A mostra os resultados dessas análises. Os dados mostram que a ressuspensão do fago imobilizado encapsulado resulta em concentrações de  
15 fagos de aproximadamente  $1 \times 10^7$  pfu/g. Do mesmo modo, somente a incubação dos fagos a pH 2,15 não causa liberação significativa de fagos (concentração de fagos de aproximadamente  $1 \times 10^6$  pfu/g após 30 minutos, ou uma concentração de fagos de aproximadamente  $3 \times 10^7$  pfu/g após 60 minutos). Entretanto, após a moagem e o rompimento das partículas de bacteriófagos encapsulados, a  
20 quantidade de fago liberada é aproximadamente a mesma quantidade que foi carregada no pó de leite para a imobilização (cerca de  $5 \times 10^9$  pfu/g). A incubação de fagos não-encapsulados e não-imobilizados a pH 2,15 por 30 e 60 minutos, entretanto, resultou em perda essencialmente completa de infectividade de fagos (Figura 4B). Resultados semelhantes são obtidos usando bacteriófagos em  
25 comprimidos.

Esses resultados demonstram que bacteriófagos podem ser liberados após o rompimento de partículas de bacteriófagos encapsulados. Além disso, esses resultados mostram que os bacteriófagos encapsulados podem ser expostos a um pH de 2,15 por período prolongado de tempo, com pouca ou sem perda na atividade (título). Os resultados para bacteriófagos não-encapsulados e não-imobilizados são consistentes com os resultados de Jepson e March (2004, Vaccine, 22:2413-2419), em que uma perda drástica de viabilidade de bacteriófagos foi observada após somente 5 minutos em pH abaixo de 2,2. Essa perda na atividade é evidenciada pelo encapsulamento dos bacteriófagos conforme descrito na presente invenção. Resultados semelhantes são obtidos usando bacteriófagos em comprimidos.

Os resultados mostrados nas Figuras 4A e 4B são para fago direcionado para E. coli; resultados semelhantes são obtidos com bacteriófagos direcionados para Salmonella e Campylobacter.

Exemplo 5: Estabilidade de fago imobilizado

Os bacteriófagos foram imobilizados em uma matriz, neste caso, pó de leite conforme descrito no Exemplo 2, e o material foi armazenado em temperatura ambiente (RT) ou em 4oC em recipientes hermeticamente fechados. As amostras foram obtidas em diferentes momentos, e os títulos de fagos foram determinados em um período de 10 meses. A concentração inicial de fagos foi de 3 X 10<sup>6</sup> pfu/g.

A Figura 5 mostra que os fagos imobilizados (composição de bacteriófagos) são estáveis em temperatura ambiente ou 4oC por, pelo menos, 131 dias (4,5 meses) e são estáveis por, pelo menos, 311 dias (10 meses) a 4oC. A adição de um dessecante ou o armazenamento dos bacteriófagos em um ambiente dessecante pode aumentar mais a viabilidade da composição de bacteriófagos.

Exemplo 6: Tratamento de gado naturalmente contaminado por E. coli

O157:H7, usando bacteriófagos encapsulados

Neste estudo de variação de dose, bezerros de corte em confinamento, de raça mestiça exótica e provindos de compra de leilão foram usados em todas as fases. O peso individual de animal de animais do estudo era entre 200 kg e 250 kg (441 libras e 551 libras). No Dia -4, 50 a 100 gramas de amostras fecais foram obtidos de cada animal e 40 animais com cultura positiva para E. coli O157:H7 foram identificados para uso no estudo.

Os animais selecionados para esse estudo foram alocados para grupos diferentes usando uma tabela de randomização gerada por computador para um dos três grupos experimentais: um grupo de controle ou um grupo tratado com fagos (1010 pfu/animal/dia). Cada grupo tinha 20 animais, com 10 animais sendo abrigados em cada curral.

O alimento foi formulado para atender ou exceder os requisitos nutricionais de animais confinados e foi testado para garantir que esteja livre de bacteriófagos de O157:H7 e E. coli O157:H7 antes do estudo. Permitiu-se que os animais consumissem alimento e água de modo ad libitum ao longo de todo o período de alimentação.

Para animais do grupo de controle, 10 g por animal do material de encapsulamento de controle sozinho (não contendo fago) foi bem misturado em sua ração de 1 dia. O material de encapsulamento foi aplicado na ração por um período de 5 dias.

Para animais dos grupos tratados com fagos, foi usado um coquetel de 3 bacteriófagos imobilizados (ver Exemplo 2) e encapsulados (ver Exemplo 3). Um total de 10 g por animal da preparação de bacteriófagos encapsulados (equivalente a 1010 pfu/animal/dia) na dose apropriada foi bem misturado com a ração de 1 dia

de alimento de tal modo que os fagos foram dados para os animais em um período de 24 horas. O material de encapsulamento foi aplicado no alimento por um período de 5 dias.

Os animais foram abrigados em uma instalação fechada de nível 1.

5 Amostragens fecais duplicadas de 50 a 100 gramas foram coletadas nos Dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 do estudo. Uma amostra foi usada para determinar as contagens de bacteriófagos, e a outra foi usada para determinar a excreção de E. coli O157:H7 e contagens de coliformes totais. Uma nova manga de palpção foi usada para cada animal para coletar as amostras fecais, que foram  
10 então transferidas para um recipiente adequado e armazenadas a 4°C antes da remessa.

Além de sangue, 10 a 20 gramas dos seguintes tecidos específicos foram coletados após o sacrifício: fígado, baço, rim, tríceps, semitendinoso e diafragma.

15 A excreção de E. coli O157:H7, a contagem de E. coli e coliforme fecal total e a contagem total de bacteriófagos foram comparadas entre os grupos experimentais usando métodos estatísticos analíticos e descritivos apropriados, controlando quanto ao fato de que as medições representam medidas repetidas em cada animal.

20 Redução nas contagens de E. coli O157:H7 em gado naturalmente portador de patógeno

O tratamento com fagos dos grupos de teste de bezerros administrado do Dia 2 ao Dia 4 resultou em uma queda significativa na excreção de E. coli O157:H7 em comparação com o grupo de controle (ver a Figura 6). A carga bacteriana foi consistentemente maior no grupo de controle em comparação com o  
25

grupo tratado com fagos. A excreção bacteriana permaneceu maior no grupo de controle em comparação com o grupo tratado com fago, mesmo após o último dia de tratamento, sugerindo a recontaminação decorrente de maior carga de patógenos no curral.

5 Além do nível de excreção de E. coli O157:H7, o número total de animais com excreção em cada um dos períodos de tratamento (Dia 1-6) assim como o período pós-tratamento (Dias 7-10) foi menor nos grupos tratados com fagos em comparação com o grupo de controle (ver a Figura 7). Isto demonstra a eficácia de fagos encapsulados na redução da carga de patógenos em animais de fazenda  
10 assim como redução no número de animais portando o patógeno.

Foram obtidos resultados semelhantes em estudos usando dosagens de bacteriófagos de 109 pfu/animal/dia e 1011 pfu/animal/dia.

Excreção de fagos de E. coli O157:H7 dos animais

15 A excreção dos três fagos usados no protocolo de tratamento acima foi acompanhada ao longo do curso do estudo.

Foi observado um aumento no número de excreção específica de E. coli O157:H7 no grupo tratado com fagos após a administração, alcançando números altos no dia 1 e permanecendo nesses níveis durante os próximos 4 dias (ver a Figura 8). Os níveis de excreção de fagos alcançaram menos de 100 pfu/g, no  
20 dia 6, que está bem dentro do nível histórico de excreção de fagos observada em muitos animais confinados.

Os dados sugerem que os fagos administrados a bezerros são depositados de modo eficaz nos intestinos, passam a acidez do abomaso e são mantidos nos níveis desejados ao longo do período de administração dos fagos.  
25 Entretanto, os fagos são eliminados do sistema em cerca de 1-2 dias após a última

dose de fagos, sugerindo que não existe nenhuma retenção de fagos nos animais em decorrência de ligação não-específica. No curso da triagem de animais confinados, níveis baixos de fago nativo em muitos animais foram observados; portanto, pode não ser necessário levar a contagem de fagos abaixo dos níveis históricos no final do tratamento.

#### Análise RFLP de fagos

Todos os fagos recuperados no curso do estudo foram analisados por RFLP para determinar se os fagos isolados dos animais tratados com fagos foram os mesmos fagos que aqueles usados para o tratamento. O DNA dos fagos foi purificado a partir das placas e usado para análise. Placas bem isoladas foram usadas para a amplificação e DNA foi preparado dos lisados.

Os padrões de RFLP obtidos do DNA de fagos isolado de amostras fecais indicaram que todos os três fagos usados para o tratamento sobreviveram à passagem pelos adomasos e chegaram no intestino delgado. O padrão de RFLP dos fagos individuais também revelou que não houve nenhuma alteração nos fagos administrados no nível genômico como um resultado da passagem pelo trato GI em bezerros. Um padrão de RFLP representativo de um dos fagos administrados usando três enzimas diferentes é fornecido na Figura 9.

Esses dados apontam ainda a utilidade desses fagos como eficazes agentes anti-infecciosos.

#### Captação de tecido dos fagos

Os animais foram sacrificados no final do estudo (Dia 10) e os tecidos foram colhidos na necropsia. Os seguintes tecidos foram colhidos: fígado, baço, rim, tríceps, semitendinoso e diafragma. As amostras de tecidos foram homogeneizadas e testadas quanto a fagos. Não foi detectado nenhum fago em nenhum dos tecidos

analisados, nem no sangue.

Foram obtidos resultados semelhantes em estudos usando dosagens de bacteriófagos de 109 pfu/animal/dia e 1011 pfu/animal/dia.

#### Protocolos de tratamento

5 O protocolo de tratamento proposto para a redução de E. coli O157:H7 no gado antes do abate é o seguinte: todos os animais indo para o abate são tratados com um coquetel de fagos uma semana antes de serem enviados. Usando essa abordagem, o nível de patógenos de todos os animais será reduzido a níveis bastante baixos (próximo ou abaixo do nível de detecção conforme visto nos  
10 presentes estudos) no dia 3-5 do tratamento, permitindo assim envio seguro dos animais do dia 4 de tratamento em diante. Isto fornece uma janela de uma semana de “envio e processamento seguros” durante os quais o gado do confinamento pode ser enviado e processado com segurança (ver Figura 10). Isto também dá ao fazendeiro uma janela de  $\pm 3$  dias ao redor da data de envio.

15 Todas as citações são incorporadas aqui por referência.

A presente invenção foi descrita no que diz respeito a uma ou mais incorporações. Entretanto, ficará aparente a pessoas com habilidade na arte que podem ser feitas inúmeras variações e modificações sem se afastar do escopo da invenção conforme definido nas reivindicações.

### REIVINDICAÇÕES

1. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, caracterizada por compreender a administração de uma ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada ou componente de fagos, ou ambos, no animal, como a cepa, ou mais de uma cepa, de bacteriófagos que é liberada *in vivo* e absorve ao patógeno, ou mais de um patógeno-alvo, reduzindo assim o patógeno, ou mais de um patógeno do animal.
2. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos com liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, ser administrada em uma dosagem de tratamento de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{13}$  pfu por animal de aproximadamente 1 dia a aproximadamente 12 dias.
3. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos com liberação controlada, ou componentes de fago, ser administrada em uma dosagem de manutenção de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  pfu por animal por dia.
4. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos com liberação controlada ou componentes de fago, ou ambos, ser administrada na dosagem de tratamento de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  de aproximadamente

12 dias, seguida por uma dosagem de manutenção de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  pfu por animal por dia.

5 **5. “UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela etapa de administração incluir oral, inalação, injeção, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, retal, tópica ou uma combinação dessas.

10 **6. “UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pela administração oral incluir o fornecimento de uma ou mais de uma cepa de bacteriófagos com liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, no alimento dos animais, na água para beber ou uma combinação desses.

15 **7. “UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos com liberação controlada ou componentes de fago, ou ambos, ser imobilizada em uma matriz, liofilizada, imobilizada em uma matriz e encapsulada, liofilizada e encapsulada, fornecida em uma forma de cápsula, fornecida em uma forma de comprimido, ou uma combinação desses.

20 **8. “UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pela matriz ser selecionada do grupo consistindo de pó de leite desnatado proteína de soja, pó de albumina, proteínas de células únicas, trehalose, manitol, açúcar, álcool de açúcar, outros materiais à base de carboidratos e hidrossolúveis, plásticos de origem vegetal sintéticos e uma combinação desses.

25 **9. “UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM**

**PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL**", de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo bacteriófago ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componente de fago, ou ambos, ser encapsulado usando um material selecionado do grupo consistindo de ácidos graxos vegetais, ácido graxo, ácido esteárico, ácido palmítico, uma cera animal, uma cera vegetal, cera de carnaúba e um derivado de cera.

10. **"UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL"**, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** por um bacteriófago ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componentes de fagos, ou ambos, ser encapsulado usando um material selecionado do grupo consistindo de açúcares e materiais à base de lipídios solúveis.

11. **"UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL"**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo componente de fago ser selecionado do grupo consistindo de uma cauda de fago, uma proteína de fago e uma combinação desses.

12. **"UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO"**, **caracterizada** por compreender a administração de uma ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada, ou componentes de fagos no alimento do animal, água para beber, um animal, ou uma combinação desses, tal como uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada, ou componentes de fagos, é liberada no alimento, a água para beber, um trato digestivo do animal, estrume, ou uma combinação desses, e absorve e mata o patógeno-alvo, reduzindo assim a população de um patógeno-alvo ou mais de um patógeno-alvo no

sistema de detenção.

13. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** por uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, é administrada em uma dosagem de tratamento de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{13}$  pfu por animal de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 dias.

14. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** por uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada, ou componentes de fago, ser administrada em uma dosagem de manutenção de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  pfu por animal por dia.

15. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** por uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, ser administrada em uma dosagem de tratamento de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{13}$  pfu de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 dias, seguida por uma dosagem de manutenção de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  pfu por animal por dia.

16. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pela etapa de

administração incluir oral, inalação, injeção, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, retal, tópica ou uma combinação dessas.

17. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pela administração oral incluir o fornecimento de uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, no alimento do animal, água para beber ou uma combinação desses.

18. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** por um bacteriófago ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componentes de fago, ou ambos, ser imobilizado em uma matriz, liofilizado, imobilizado em uma matriz e encapsulado, liofilizado e encapsulado, fornecido em uma forma de cápsula, fornecida em uma forma de comprimido ou uma combinação dessas.

19. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** pela matriz ser selecionada do grupo consistindo de pó de leite desnatado proteína de soja, pó de albumina, proteínas de células únicas, trehalose, manitol, açúcar, álcool de açúcar, outros materiais à base de carboidratos e hidrossolúveis, plásticos de origem vegetal sintéticos e uma combinação desses.

20. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** pelo bacteriófago

63

ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componente de fago, ou ambos, ser encapsulado usando um material selecionado do grupo consistindo de ácidos graxos vegetais, ácido graxo, ácido esteárico, ácido palmítico, uma cera animal, uma cera vegetal, cera de carnaúba e um derivado de cera.

5 21. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** por um bacteriófago ou mais de um bacteriófago de liberação controlada, componentes de fagos, ou ambos, ser encapsulado usando um material selecionado do grupo consistindo de  
10 açúcares e materiais à base de lipídios solúveis.

22. **“UM MÉTODO PARA REDUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE UM PATÓGENO-ALVO OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO PRESENTE EM UM SISTEMA DE DETENÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo componente de fago ser selecionado do grupo consistindo de uma cauda de fago, construção  
15 molecular, uma proteína de fago e uma combinação desses.

23. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por, na etapa de administração, uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada ou componente de fago, ou ambos, ser  
20 administrada no animal por um período de 5-7 dias.

24. **“UM MÉTODO PARA REDUZIR A POPULAÇÃO DE UM OU MAIS DE UM PATÓGENO-ALVO EM UM ANIMAL”**, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada** por, após a etapa de administração, o animal ser abatido.

25 25. **“UM MÉTODO PARA PREVENIR O ALASTRAMENTO DE INFECÇÕES EM UM ANIMAL CAUSADO POR UM OU MAIS PATÓGENOS-ALVO”**, o método

**caracterizado** por compreender a administração de uma ou mais cepas de bacteriófagos, componente de fago, ou ambos, no animal, como uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos, componente de fago, ou ambos, que é liberada no trato digestivo do animal e se prende e mata o patógeno-alvo, reduzindo assim a população de um patógeno-alvo ou mais de um patógeno-alvo na carcaça do animal.

26. **“UM MÉTODO PARA PREVENIR O ALASTRAMENTO DE INFECÇÕES EM UM ANIMAL CAUSADO POR UM OU MAIS PATÓGENOS-ALVO”**, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizada** pelo patógeno-alvo ser *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Treponema* ou um outro patógeno levado no trato gastrintestinal, ou uma combinação desses.

27. **“UM MÉTODO PARA PREVENIR O ALASTRAMENTO DE INFECÇÕES EM UM ANIMAL CAUSADO POR UM OU MAIS PATÓGENOS-ALVO”**, de acordo com as reivindicação 25 ou 26, **caracterizada** por uma cepa ou mais de uma cepa de bacteriófagos, componente de fago, ser fornecida como uma cepa de bacteriófagos de liberação controlada, componente de fago, ou ambos.

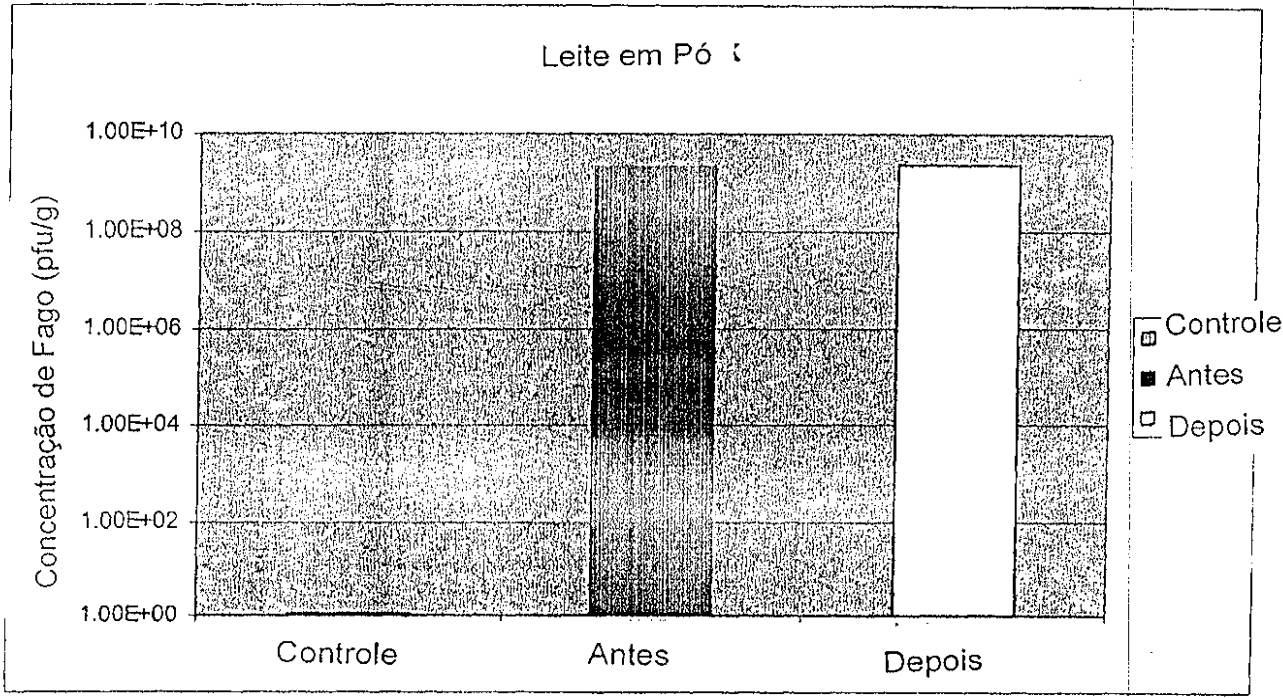


FIG. 1

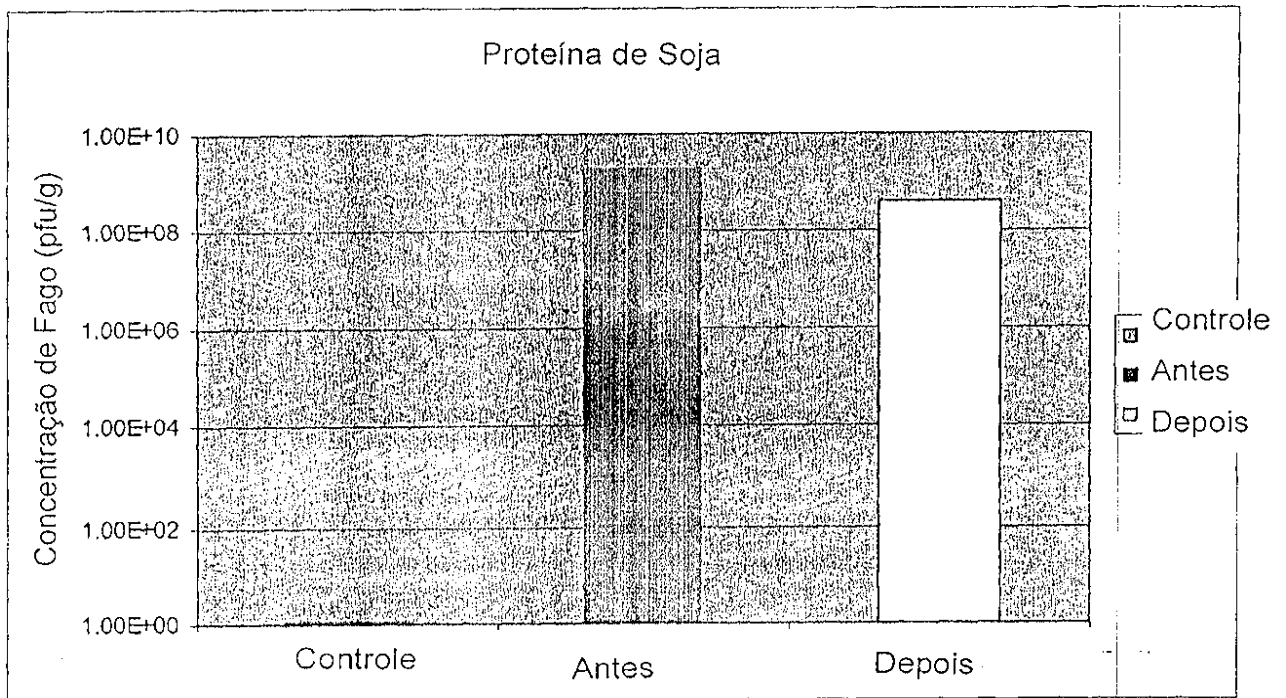


FIG. 2

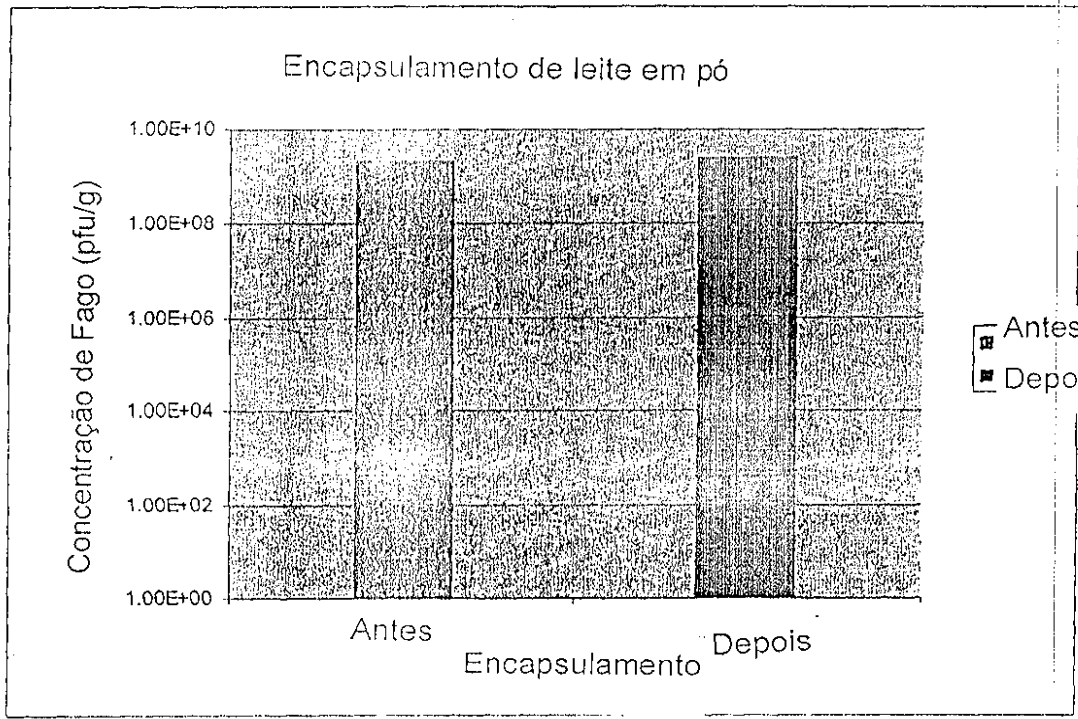


FIG. 3

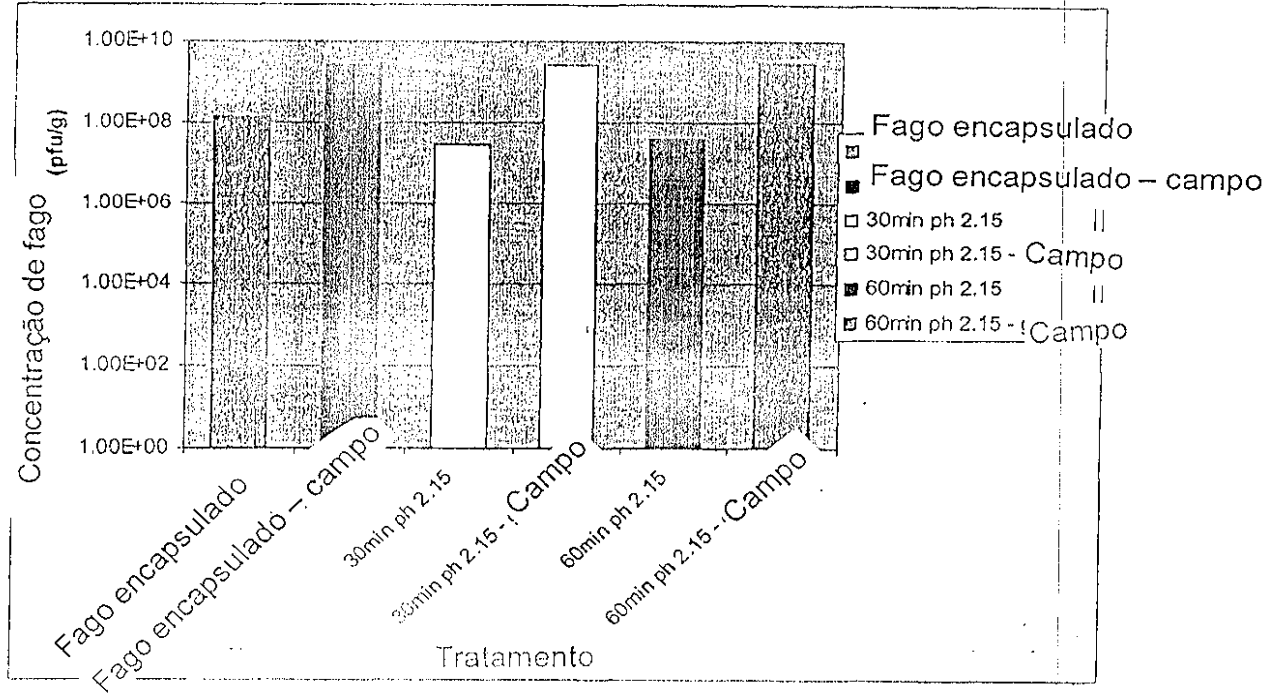


FIG. 4A

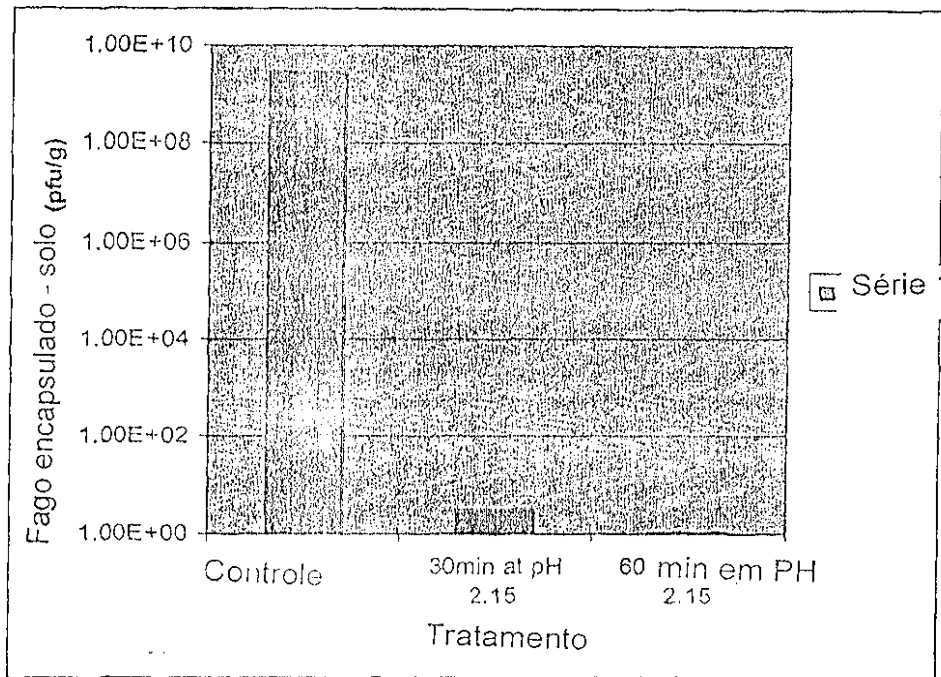


FIG. 4B

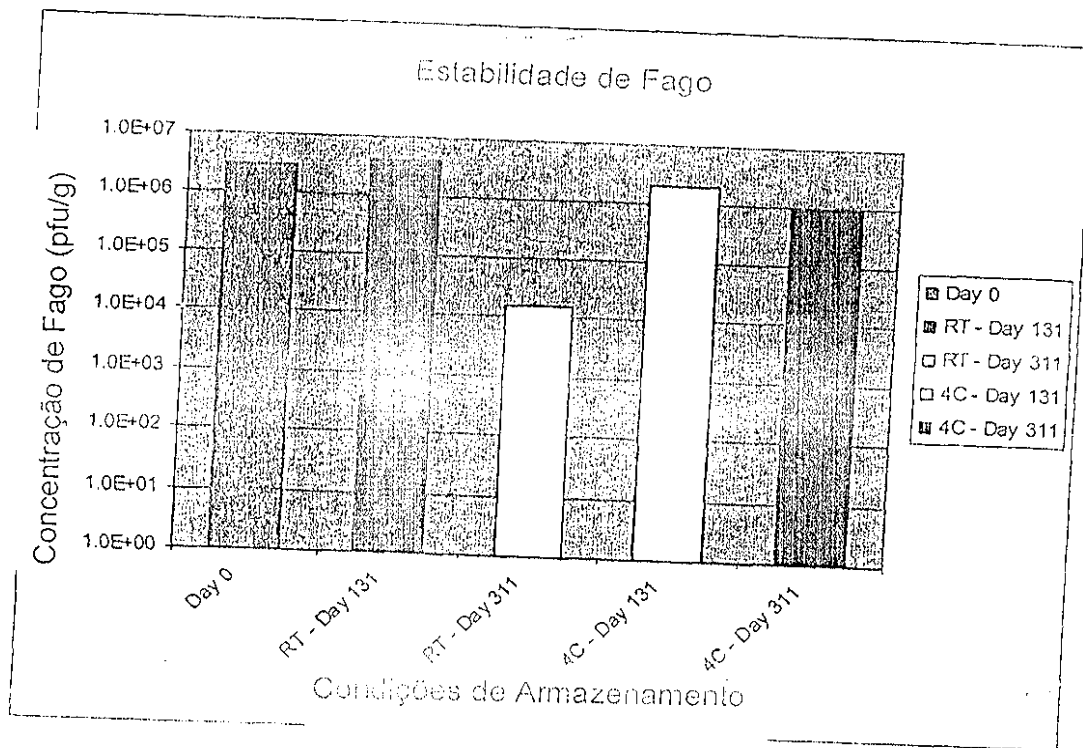


FIG. 5

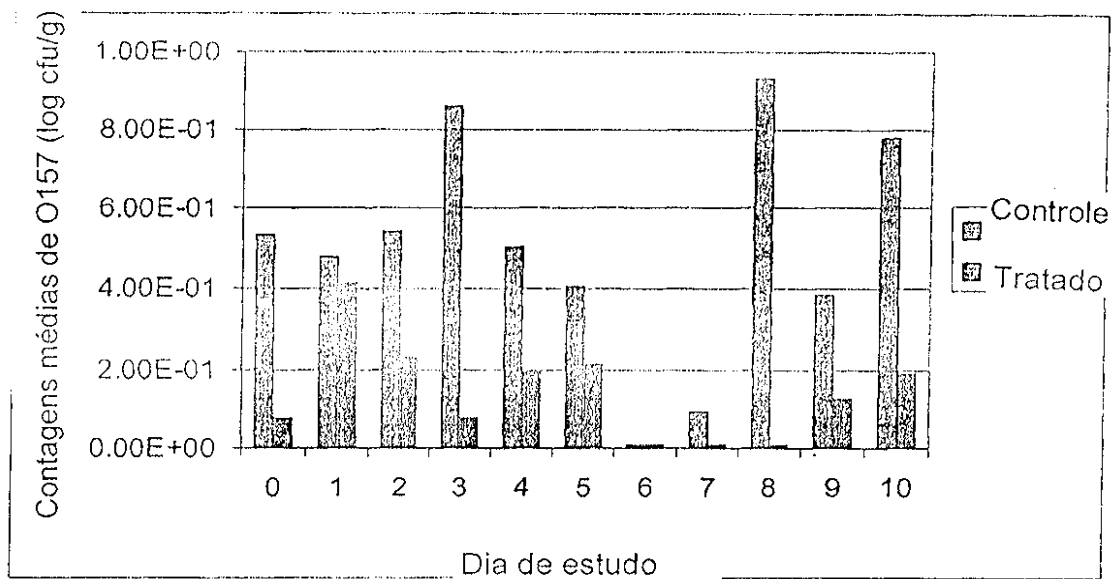


FIG. 6

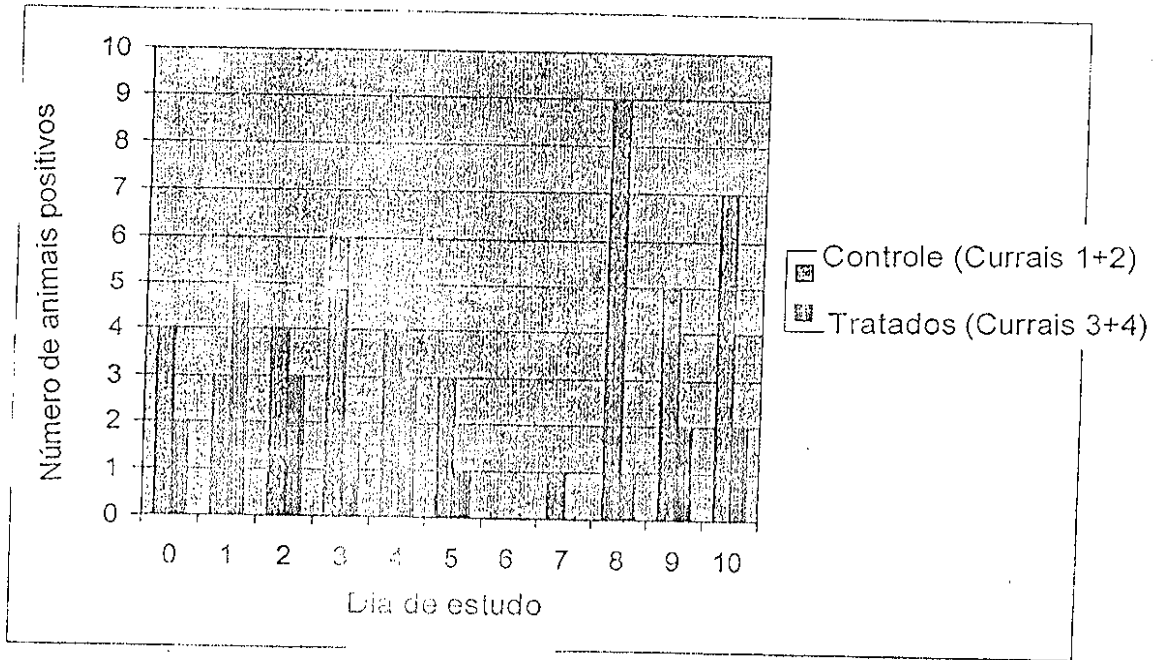


FIG. 7

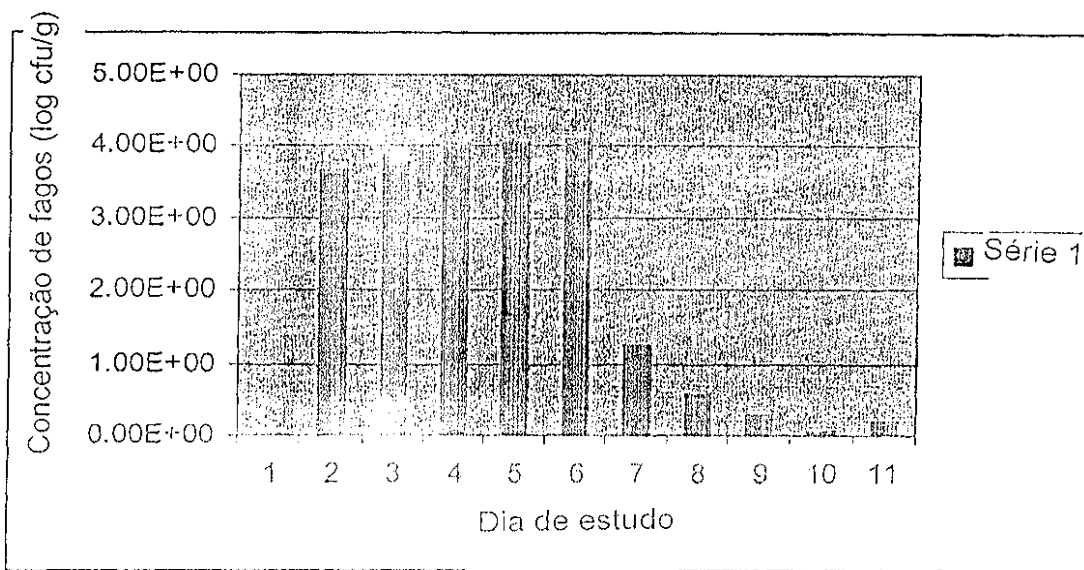


FIG. 8

2 log  $\lambda$  Bst Dra I Hae III Ssp I  
comp 1 GLE 02 comp 1 GLE 02 comp 1 GLE 02

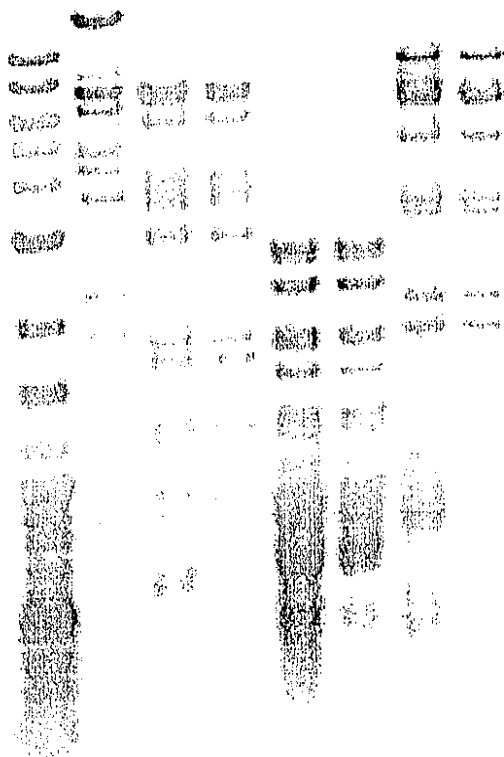


FIG. 9

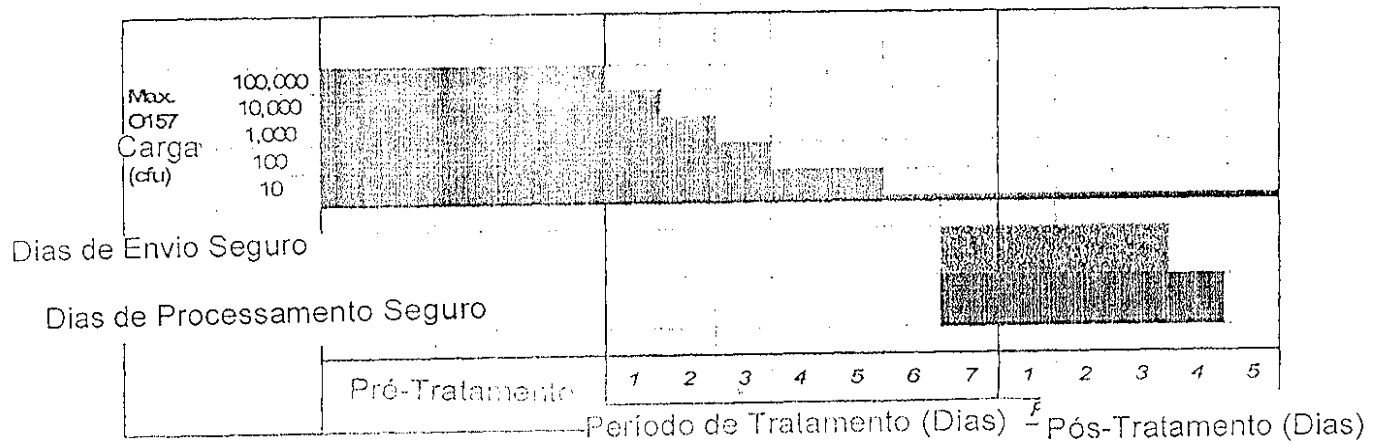


FIG. 10

**RESUMO****“ADMINISTRAÇÃO BACTERIANA EM SISTEMAS DE RETENÇÃO DE ANIMAL”.**

A presente invenção é direcionada ao método de redução de uma população de um patógeno alvo em um animal ou dentro de um cativeiro. O método envolve a

5 administração de uma ou mais de uma estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago, ou ambos, ao animal, de maneira que uma, ou mais de uma estirpe de bacteriófago é liberada in vivo e adsorve-se a um ou mais de um patógeno alvo, dessa forma, reduzindo o patógeno, ou mais de um patógeno do

10 animal. A estirpe de bacteriófago de liberação controlada ou componente fago pode ser administrada como uma dose de tratamento antes do processamento futuro do animal, uma dose de tratamento seguida por uma dose de manutenção, ou uma dose de manutenção, para administrar os patógenos alvo em cativeiro.