



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

06-47629

54. TÍTULO **"FAGOS AISLADOS Y SU USO COMO DESINFECTANTE EN ALIMENTO O PARA
LA HIGIENIZACIÓN DEL AMBIENTE INDUSTRIAL"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C12N 7/00**

71. SOLICITANTE **NESTEC S.A.**

DOMICILIO **VEVEY, SUIZA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P 53.215**

22. BOGOTÁ, D.C. **18 MAY 2006**

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-047629- -00000-0000
Fec: 2006-05-18 17:05:56 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE IYII
Eve: 379 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folio: 73

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: NESTEC S.A. Dirección: Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey, Suiza. Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza Lugar de Constitución: Suiza Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: illcco@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá- Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: BREEUWER, Pieter; BOISSIN-DELAPORTE, Catherine; JOOSTEN, Henricus y LARDEAU, Annick. Dirección: Chemin de la Pierre 5, CH-1023 Crissier; 985, route de Méribel, Le Clos Chanay, F-01170 Echevenex; Chemin des Crocus 1. CH-1074 Mollie-Margot y Avenue des Boveresses 28, CH-1010 Lausanne. Nacionalidad o Domicilio: Suiza y Francia		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2004/012585</u> Fecha: <u>06/11/04</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2005/049813 A1</u> Fecha: <u>02/06/05</u>			
6 Título (54) FAGOS AISLADOS Y SU USO COMO DESINFECTANTE EN ALIMENTO O PARA LA HIGIENIZACIÓN DEL AMBIENTE INDUSTRIAL			
7 Clasificación Internacional (51) <u>C12N 7/00</u> <i>AGIK 35/76</i>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>EP</u>	(32) Fecha <u>19.11.2003</u>	(31) Número de Solicitud <u>03026432.9</u>
9 Comprobante de Pago No. <u>06-33,693</u> Fecha: <u>5 de Mayo de 2006</u>			

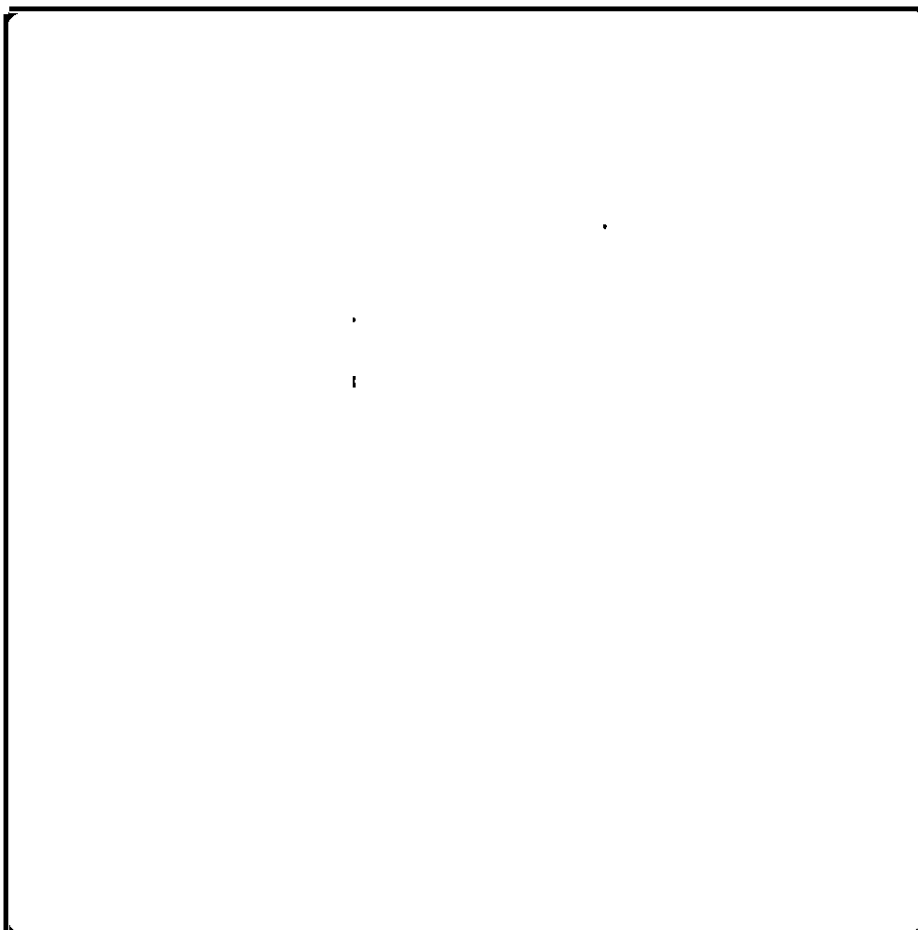
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☒ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción..

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquéñ T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 33,693
FECHA : MAYO 5 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-047629-00000-0000
Fec: 2006-05-18 17:05:55 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTEIYII
Eve: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION
Folios: 73

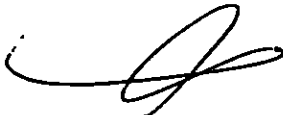
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47044958	05/05/2006	4,650,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

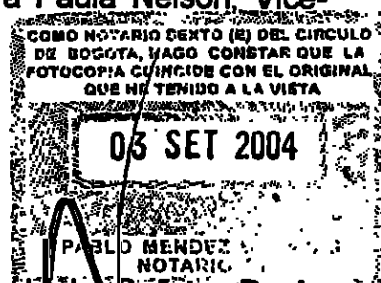

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCIÓN OFICIAL No.283/04 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 01 DE SEPTIEMBRE DE 2004 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL SEGÚN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de poder conferido en inglés y español por **NESTEC S.A.**, una sociedad organizada y existe de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey, Suiza, y otorgado a los Doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARÍA y/o ENRIQUE ÁLVAREZ**, todos domiciliados en Bogotá, Colombia, Calle 72 No. 5 – 83 (Piso 6º).

Dado el 5 de agosto de 2004. Firma ilegible de la Señora Paula Nelson, Vice-Presidente de Nestec S.A.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Legalización por parte del suscrito Notario de la firma de la Señora **Paula NELSON** quien desempeña el cargo de **Vice-Presidente** de la compañía **NESTEC S.A.**, una sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de **Suiza**, domiciliada en **Vevey (Suiza)**. Además, dicho Notario certifica que el signatario, según las leyes de **Suiza**, tiene facultad para otorgar el presente documento. Los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos el 24 de marzo de 1997, y de todo ello da fe.

Firma de Jean-Daniel RUMPF.

Sello: Jean-Daniel RUMPF – Notario. Estampilla de 4 Frs.

Traducción Oficial No. 283/04.
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOIS - ESPANOL
Res. Minjusticia No. 2680/91

5

Legalización No. 7.135. El Notario Jean-Daniel RUMPF, en Vevey, Distrito de Vevey, Cantón de Vaud, Suiza, certifica la firma puesta en la página anterior por la Señora Paula Nelson, Directora adjunta de Nestec S.A., en Vevey, la cual compromete en forma válida con su firma individual.

Dado en Vevey, el once de agosto de dos mil cuatro. Firma ilegible del Notario.

Sello: Jean-Daniel RUMPF – Notario. Estampilla de 4 Frs.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. - País: Suiza

El presente documento público

2. - ha sido firmado por el Señor Jean-Daniel RUMPF
3. - obrando en calidad de Notario en Vevey
4. - con sello de Jean-Daniel RUMPF, Notario

CERTIFICADO

5. - En Lausana 6.- El 12 de agosto de 2004
7. - Por la Cancillería de Estado del Cantón de Vaud
8. - Bajo el número 6705
9. - Sello: Cancillería del Consejo de Estado – Libertad y Patria - Emolumento de 25 Fr.
10. - Por el Canciller de Estado, firma de P. Equey.

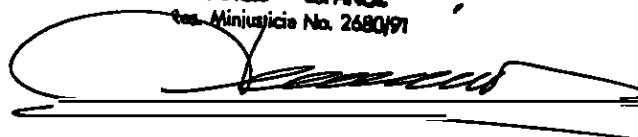
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

Traducción oficial No. 283/04.

Traductor: Jean-Jacques Turpin.

Bogotá, D.C., 1 de septiembre de 2004.

Traducción Oficial No. 283/04
JEAN - JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOES - ESPANOL
Res. Minjusticia No. 2680/91



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SEP -2 A 11: 09

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Fernando

661229

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO 21 DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONFIERE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

03 SET 2004

PABLO MEJIAZ F.A. ... S
NOTARIO

Los abajo firmados, NESTEC S.A., una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza

con domicilio en Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, NESTEC S.A., a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements, and in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests, and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good, all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 5th August 2004

Paula NELSON - Vice President



NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



NOTARY

NOTARY

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Vevey {ss

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Vevey {ss

Hoy 11 de Agosto de 2004, compareció
PAULA NELSON, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es Vicepresidente

On this 11th day of August, 2004,
personally came

Paula NELSON

to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he/she is the

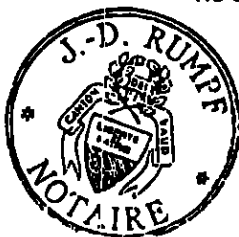
Vice President of NESTEC S.A., the
company named within, a Corporation organized and
existing under the laws of the Switzerland, domiciled
at the City of Vevey, Switzerland legally constituted
for a period of tenure not yet expired, which exercises
its corporate purposes according to the laws of
Switzerland, that the deponent is authorized by said
Company to confer this power of attorney; that the
seal affixed hereunto by the deponent in the name
and on behalf of said Corporation is the corporate
seal thereof; and that the purpose for which this
instrument is granted is included within the corporate
purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Vevey, Switzerland, under date of March 24 1997
and hereby certifies that under the laws of said
County the foregoing acknowledgment is sufficient
proof that the facts therein contained are true and
correct as the same are stated and he attests.

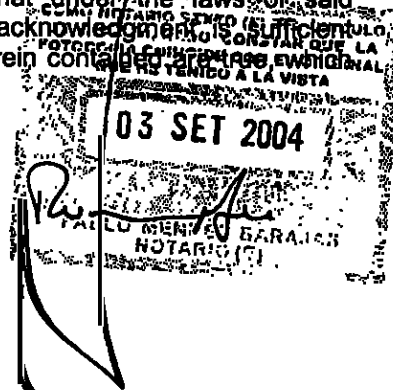
de NESTEC S.A., la
compañía nombrada en el documento que antecede,
una sociedad debidamente organizada y existente
conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la
ciudad de Vevey, Suiza legalmente constituida
para un período de duración que aún no ha
terminado, que ejerce su objeto social; conforme a
las leyes de Suiza, que el declarante está autorizado
por dicha Compañía para conferir este poder; que el
sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre
y en representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Vevey, Suiza, con fecha
24 Marzo, 1997, y certifica que de
conformidad con la legislación de dicho País, la
anterior declaración juramentada es prueba
suficiente de que los hechos sobre que ella versa son
ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

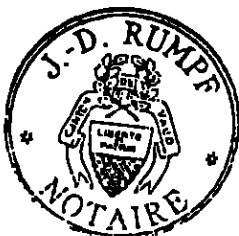


J.D



Légalisation No 7'135.-

Le notaire JEAN-DANIEL RUMPF, à Vevey, District de Vevey, Canton de
Vaud, Suisse, certifie authentique la signature apposée d'autre ---
part par M^{me} Paula NELSON, directrice-adjointe de la société ----
NESTEC S.A., à Vevey, qu'elle engage valablement par sa signature -
individuelle. -----
VEVEY, LE ONZE AOÛT DEUX MILLE QUATRE. -----



J.D Rumpf

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

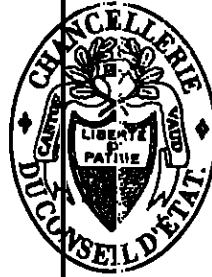
1. Pays: SUISSE

Le présent acte public

2. a été signé par Jean-Daniel Rumpf

3. agissant en qualité de notaire à Vevey

4. est revêtu du sceau/timbre de J.-D. Rumpf notaire



Attesté

5. à Lausanne

6. le 12 août 2004

7. par la Chancellerie d'Etat du Canton de Vaud

8. sous No 6705

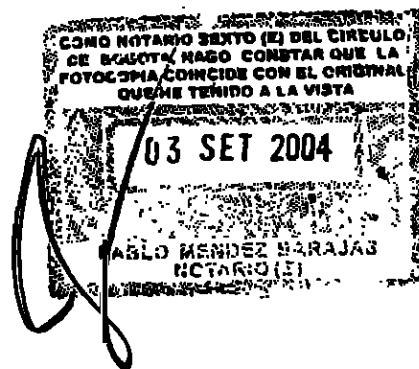
9. Sceau/timbre:

10. Signature
pr le Chancelier d'Etat:



Fr. 25.-


P. Equey



Retiro Folios 8, 9 y 10
- Talletas
- Extracto

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/012585

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC7 C12N7/00 C12N7/02 A61K35/76

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, EMBASE, Dato WPI, PAJ,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GRIMONT F ET AL: "Relaciones de AND entre bacteriófagos del grupo morphologico C3"	1,11-13, 15,17,19
Y	CURRENT MICROBIOLOGY 1981 ESTADOS UNIDOS, Vol. 6, no. 2, 1981, páginas 65-69, XP009027844 resumen, Tabla 1, Tabla 2,	14,16, 18,20-26
X	GRIMONT F ET AL: "Características de los cinco bacteriófagos de enterobacterias pigmentadas de Amarillo"	1,11-13, 15,17,19
Y	CURRENT MICROBIOLOGY 1981 ESTADOS UNIDOS, Vol. 5, no. 1, 1981, páginas 61-66, XP009027826 resumen, Tabla 1, Resultados Discusión	14,16, 18,20-26
	----- ---/---	

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

*** Categorías especiales de documentos citados:**

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

22 de febrero de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

03/03/2005

Nombre y dirección del correo de ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70)340-3016

Funcionario autorizado

Bretherick, J

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP2004/012585

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	BREEUWER P ET AL: "Desecación y tolerancia al calor de Enterobacter sakazakii" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 5, 26 de septiembre de 2003 (2003-09-26), páginas 967-973, XP002273937 ISSN: 1364-5072 resumen; Introducción; Discusión, esp. último párrafo. -----	1,11-26
Y	WO 03/054173 A (NESTLE S.A.; ERUESSOW HARALD (CH); BRUTTIN ANNE (CH); SIDOTI JOSETTE) 3 de julio de 2003 (2003-07-03) reivindicaciones, resumen de la invención, p.3-4; Descripción detallada de la invención, esp. paragrafo bridging pp. 4 y 5, p. 6-9 esp. p. 6, líneas 11-20 y p. 7, líneas 4-11 -----	1,11-26
Y	US 6 322 783 B1 (TAKAHASHI SEISHI) 27 de noviembre de 2001 (2001-11-27) Revelaciones de la invención, columna 3-5; Mejor modo de la invención, columnas 5-8.; columna 10, línea 52-columna 11, línea 9; columna 11, línea 10-línea 60. -----	1,11-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012585A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N7/00 C12N7/02 A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRIMONT F ET AL: "DNA relatedness among bacteriophages of the morphological group C3"	1,11-13, 15,17,19
Y	CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 6, no. 2, 1981, pages 65-69, XP009027844 Abstract, Table 1, Table 2,	14,16, 18,20-26
X	GRIMONT F ET AL: "Characteristics of five bacteriophages of yellow-pigmented enterobacteria"	1,11-13, 15,17,19
Y	CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 5, no. 1, 1981, pages 61-66, XP009027826 Abstract, Table 1, Results Discussion.	14,16, 18,20-26
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2005

Date of mailing of the international search report

03/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bretherick, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012585

12

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BREEUWER P ET AL: "Desiccation and heat tolerance of Enterobacter sakazakii." JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 5, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 967-973, XP002273937 ISSN: 1364-5072 Abstract; Introduction; Discussion, esp. last paragraph.	1,11-26
Y	WO 03/054173 A (NESTLE SA ;BRUESSOW HARALD (CH); BRUTTIN ANNE (CH); SIDOTI JOSETTE) 3 July 2003 (2003-07-03) Claims; Summary of invention, p.3-4; Detailed description of invention, esp. paragraph bridging pp. 4 and 5, p.6-9, esp. p. 6, lines 11-20 and p. 7, lines 4-11.	1,11-26
Y	US 6 322 783 B1 (TAKAHASHI SEISHI) 27 November 2001 (2001-11-27) Disclosure of invention, columns 3-5; Best Mode of Invention, columns 5-8.; Column 10, line 52-column 11, line 9; Column 11, line 10-line 60.	1,11-26

— 43 —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/012585

13

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 03054173	A	03-07-2003	AU	2002366854 A1	09-07-2003
			BR	0214928 A	30-11-2004
			WO	03054173 A1	03-07-2003
			EP	1458856 A1	22-09-2004
			US	2004223954 A1	11-11-2004
US 6322783	B1	27-11-2001	AU	3869297 A	19-03-1998
			WO	9808944 A1	05-03-1998
			JP	2002335957 A	26-11-2002

16

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA, SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
2 de junio de 2005 (02.06.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/049813 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes¹: C12N 7/00, 7/02, A61K 35/76
- (21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2004/012585
- (22) Fecha de Registro Internacional: 6 de noviembre de 2004 (06.11.2004)
- (25) Idioma de registro: Inglés
- (26) Idioma de Publicación: Inglés
- (30) Información de Prioridad: 03026432.9 19 de Noviembre de 2003 (19.11.2003) EP
- (71) Solicitante (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos): NESTEC S.A.[CH/CH]; Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventor: e

(75) Inventor/solicitante (para Estados Unidos solamente): BREEUWER, Pieter [NL/CH]; Chemin de la Pierre 5, CH-1023 Crissier (CH). BOISSIN-DELAPOSTE, Catherine [FR/FR]; 985, route de Méribel, Le Clos Chanay, F-01170 Echevenex (FR). JOOSTEN, Henricus [NL/CH]; Chemin des Crocus 1, CH-1074 Mollic-Margot (CH). LARDEAU, Annick [FR/CH]; Avenue des Boveresses 28, CH-1010 Lausanne (CH).

(74) Agente: CHAUTARD, Cécile; Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda clase de protección nacional requerida): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

- en cuanto a la facultad del solicitante para aplicar y obtener una patente (Regla 4.17 (ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- relativo al derecho del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17 (iii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- relativo a la calidad de inventor (Regla 4.17 (iv)) para Estados Unidos de América solamente

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: FAGOS AISLADOS Y SU USO COMO DESINFECTANTE EN ALIMENTO O PARA LA HIGIENIZACIÓN DEL AMBIENTE INDUSTRIAL

(57) Resumen: La presente invención se refiere a aislados fagos que tienen una fuerte actividad lítica contra cepas de *Enterobacter sakazakii* y su uso como agentes antimicrobianos en productos alimenticios, en particular en formulas infantiles y para la higienización de ambientes industriales. La invención también se refiere a composiciones alimenticias y agentes antimicrobianos preparados a partir de los mismos.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 June 2005 (02.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/049813 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 7/00,
7/02, A61K 35/76

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/012585

(22) International Filing Date:
6 November 2004 (06.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
03026432.9 19 November 2003 (19.11.2003) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): NESTEC
S.A. [CH/CH]: Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BREEUWER,
Pieter [NL/CH]: Chemin de la Pierre 5, CH-1023
Crissier (CH). BOISSIN-DELAPOORTE, Catherine
[FR/FR]: 985, route de Méribel, Le Clos Chanay, F-01170
Echevenex (FR). JOOSTEN, Henricus [NL/CH]: Chemin
des Crocus 1, CH-1074 Mollie-Margot (CH). LARDEAU,
Annick [FR/CH]: Avenue des Boveresses 28, CH-1010
Lausanne (CH).

(74) Agent: CHAUTARD, Cécile; Avenue Nestlé 55, CH-1800
Vevey (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following desig-
nations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

- with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ISOLATED PHAGES AND THEIR USE AS DISINFECTANT IN FOOD OR FOR SANITATION OF FACTORY EN-
VIRONMENT

(57) Abstract: The present invention relates to phages isolates having a strong lytic activity against *Enterobacter sakazakii* strains
and their use as anti-microbial agent in food products, in particular infant formula, and for sanitation of factory environments. The
invention also relates to food compositions and anti-microbial agents prepared thereof.

WO 2005/049813 A1

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente NO 7564/WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 2004/012585	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 06.11.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 19.11.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C12N7/00, C12N7/02, A61K35/76		
Solicitante NESTEC S.A. et al.		
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>6</u> hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de _____ hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).		
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases del Reporte ☐ Casilla No. II Prioridad ☐ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial. ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☒ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la demanda 13.06.2005	Fecha de terminación de este reporte 25.11.2005	
Nombre y dirección de correo de la IPEA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx:523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Bretherick, J Teléfono No. +49 89 2399-8415	

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem.

☐ Este Reporte se basó en una traducción del idioma original al siguiente idioma _____, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:

- ☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3. y 23.1 (b)).
- ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4)
- ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, páginas

1-20 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-27 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/3-3/3 como se presentaron originalmente

☐ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2©)..

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No.
 PCT/EP2004/012585

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citasiones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	14,16,18,20-26
	No: Reivindicaciones	1,11-13,15,17,19
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	2-10,27
	No: Reivindicaciones	1,11-26
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	1-27
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Norma 70.7)

ver hoja separada

Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

Los siguientes defectos en la forma o en los contenidos de la solicitud internacional se han encontrados:

ver hoja separada

El examen se realiza sobre los **siguientes documentos de solicitud**:

Descripción, páginas:

1-20 como se registraron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-27 como se registraron originalmente

Dibujos, hojas:

1/3-3/3 como se registraron originalmente

Con respecto a la parte V, Art. 33(1)-(4) PCT:

1. La materia objeto de la reivindicación 1 no es nueva sobre

D1: GRIMONT F ET AL: "Relaciones de AND entre bacteriófagos del grupo morphologico C3" CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 6, no. 2, 1981, páginas 65-69, XP009027844 o

D2: GRIMONT F ET AL: "Características de los cinco bacteriófagos de enterobacterias pigmentadas de Amarillo" CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 5, no. 1, 1981, páginas 61-66, XP009027826.

Ambas referencias enseñan fago lítico que son activos contra **Enterobacter sakazakii**.

Más aún, esta vista también aplica a los productos alimenticios de las reivindicaciones 11-13 y 15, porque estos aislados se obtuvieron del agua, un producto alimenticio esencial (ver, D1 Tabla, parte superior). Lo mismo aplica con respecto a la materia objeto de las reivindicaciones 17 y

19 para agentes genéricos que se definen como (adecuados) para descontaminación de productos alimenticios e higienización de ambientes industriales genéricos.

Las anteriores reivindicaciones son entonces deficientes bajo el Art. 33(1)(2) PCT.

2. La materia objeto de las reivindicaciones 14, 16, 18, 20-26 no se considera que involucra in nivel inventivo bajo el Art. 33(1)(3) PCT.

La descontaminación de alimentos tales como leche en polvo y otras áreas infectadas con **Enterobacter sakazakii** así como las infecciones que involucren el organismo, es un problema conocido, ver por ejemplo

D3: BREEUWER P ET AL: "Desecación y tolerancia al calor de **Enterobacter sakazakii**" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 5, 2003, páginas 967-973, XP002273937 ISSN: 1364-5072, Discusión, último párrafo. El problema técnico, generalmente aplicado es entonces considerado como la provisión de medios y/o métodos para la erradicación de **Enterobacter sakazakii**. Este problema se aprecia en la técnica, (ver D3, resumen y Discusión, último párrafo).

D4: WO 03 054173 A (NESTLE SA; BRUESSOW HARALD (CH); BRUTTIN ANNE (CH); SIDOTI JOSETTE) Julio 3 2003 (2003-07-03) ha resuelto este problema en enterobacterias genéricas con el uso de composiciones bacteriófagas que son líticas a un rango de cepas bacterianas, incluyendo E. coli patogénica y Salmonella. Aquí se hace referencia a las reivindicaciones, resumen de la invención en las páginas 3-4, descripción detallada de la invención, páginas 6-9, esp. P. 6 líneas 11-20 t p. 7, líneas 4-11. Note que la concentración de fago recomendada es la misma que la especificada en las reivindicaciones 18 y 24, (página 8, líneas 19-20).

Es conocido existe fago que es lítico hacia E. sakazakii de D1 y D2. Parecería lógico para el experto aplicar el conocimiento de D1 y D2 en el contexto de descontaminación de esta especie. El experto simplemente combinaría la enseñanza de D4 con el conocimiento de D1 o D2 que es posible seleccionar tal fago lítico para **Enterobacter sakazakii** y su uso y arribo en la materia objeto de las reivindicaciones.

Este es igualmente el caso para D5; US-B1-6 322 783 (TAKAHASHI SEISHI) Noviembre 27 de 2001 (2001-11-27), que también revela usos de bacteriófago para la descontaminación de ambientes.

3. La materia objeto restante reivindicada se considera actualmente nueva y que involucra in nivel inventivo, ya que un rango de huésped amplio no sería necesariamente esperado de un fago particular. La materia objeto de las reivindicaciones 2, 10 y 27 es sin embargo, deficiente bajo el Art. 5 PCT, porque los microorganismos descritos allí no han estado disponibles públicamente. El experto, por lo tanto, no puede repetir los experimentos que conducen al descubrimiento de un fago *per se*. Note que la introducción de información adicional relacionada por ejemplo, con la deposición de material biológico hecha bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimiento de Patente de Abril 28 de 1997 produciría una deficiencia bajo R. 70.2(c) PCT.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NO 7564/WO	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA16	
International application No. PCT/EP2004/012585	International filing date (day/month/year) 06.11.2004	Priority date (day/month/year) 19.11.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N7/00, C12N7/02, A61K35/76		
Applicant NESTEC S.A. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☒ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 13.06.2005	Date of completion of this report 25.11.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Bretherick, J Telephone No. +49 89 2399- 3415 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2004/012585

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-20 as originally filed

Claims, Numbers

1-27 as originally filed

Drawings, Sheets

1/3-3/3 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/012585

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	14,16,18,20-26
	No: Claims	1,11-13,15,17,19
Inventive step (IS)	Yes: Claims	2-10,27
	No: Claims	1,11-26
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/012585

The examination is being carried out on the following application documents:

Description, pages:

1-20 as originally filed

Claims, No.:

1-27 as originally filed

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

Regarding Part V, Art. 33(1)-(4) PCT:

1. The subject-matter of claim 1 is not new over

D1: GRIMONT F ET AL: 'DNA relatedness among bacteriophages of the morphological group C3' CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 6, no. 2, 1981, pages 65-69, XP009027844 or

D2: GRIMONT F ET AL: 'Characteristics of five bacteriophages of yellow-pigmented enterobacteria' CURRENT MICROBIOLOGY 1981 UNITED STATES, vol. 5, no. 1, 1981, pages 61-66, XP009027826.

Both these references teach lytic phage which are active against **Enterobacter sakazakii**.

Moreover, this view also applies to food products of claims 11-13 and 15, since these isolates were obtained from water, an essential food product, (see D1 Table, top). The same applies with respect to the subject-matter of claims 17 and

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/012585

19 for generic agents which are defined as (suitable) for decontamination of food products or sanitation of generic factory environments.

The claims above are thus deficient under Art. 33(1)(2) PCT

2. The subject-matter of claims 14, 16, 18, 20-26 is not considered to involve an inventive step under Art. 33(1)(3) PCT.

The decontamination of foods such as powdered milk and other areas infected with **Enterobacter sakazakii** as well as infections involving the organism is a commonly known problem, see for example

D3: BREEUWER P ET AL: 'Desiccation and heat tolerance of **Enterobacter sakazakii**.' JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 5, 2003, pages 967-973, XP002273937 ISSN: 1364-5072, Discussion, last paragraph. The technical problem, generally applied is thus considered to be the provision of means and/or methods for the eradication of **Enterobacter sakazakii**. This problem is appreciated in the art, (see D3, abstract and Discussion, last paragraph).

D4: WO 03 054173 A (NESTLE SA ;BRUESSOW HARALD (CH); BRUTTIN ANNE (CH); SIDOTI JOSETTE) 3 July 2003 (2003-07-03) has solved this problem in generic enterobacteria with the use of bacteriophage compositions which are lytic to a range of bacterial strains, including pathogenic **E. coli** and Salmonella. Here reference is made to the claims, summary of the invention on pages 3-4, detailed description of the invention pages 6-9, esp. p. 6 lines 11-20 and p. 7, lines 4-11. Note that the phage concentration recommended is the same as that specified in claims 18 and 24, (pages 8, lines 19-20).

It is known that phage exist which are lytic towards **E. sakazakii** from D1 and D2. It would appear logical for the skilled person to apply the knowledge of D1 and D2 in the context of decontamination of this species. The skilled person would simply combine the teaching of D4 with the knowledge from D1 or D2 that it is possible to select for such phage lytic for **Enterobacter sakazakii** and their use and arrive at the subject-matter of the claims.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/012585

This is similarly the case for D5: US-B1-6 322 783 (TAKAHASHI SEISHI) 27 November 2001 (2001-11-27), which also discloses uses of bacteriophage for the decontamination of environments.

3. The remaining claimed subject-matter is currently considered to be new and to involve an inventive step, since such a broad host range would not necessarily be expected from one particular phage. The subject-matter of claims 2, 10, and 27 is however deficient under Art. 5 PCT, since the microorganisms therein described have not been made publicly available. The skilled person cannot therefore repeat the experiments leading to the phage discovery *per se*. Note that the introduction of additional information pertaining for example, to the deposition of biological material made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure of 28 April 1997 would result in a deficiency under R. 70.2(c) PCT.

**Fagos Aislados Y Su Uso Como Desinfectante En Alimento o Para
La Higienización Del Ambiente Industrial.**

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a aislados fagos que tienen una fuerte actividad lítica contra cepas de *Enterobacter sakazakii* y su uso como agentes antimicrobianos en productos alimenticios, en particular en formulas infantiles y para la higienización de ambientes industriales. La invención también se refiere a composiciones alimenticias y agentes antimicrobianos preparados a partir de los mismos.

**Fagos Aislados Y Su Uso Como Desinfectante En Alimento o Para
La Higienización Del Ambiente Industrial.**

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se relaciona con aislados de fagos que poseen una fuerte actividad lítica contra cepas de *Enterobacter sakazakii* y su uso como agente antimicrobiano en productos alimenticios, en particular en formulas infantiles, y para la higienización de los ambientes industriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enterobacterias representan una porción dominante de la "flora de recontaminación" de los productos lácteos preparados a base de leche pasteurizada. La presencia de estos a menudo indica una higiene inadecuada y/o una construcción deficiente de los equipos del proceso. Los miembros del género *Enterobacter* frecuentemente se encuentran en productos secos tales como leche en polvo.

Entre las enterobacterias, en especial la *E. sakazakii* puede provocar serias infecciones especialmente entre los individuos mas jóvenes. Se ha visto implicada en una extraña mas bien que severa forma de meningitis neonatal entre neonatos e infantes, en los cuales como modo de transmisión se ha visto involucrada la formula seca-infantil.

La fabricación aséptica de la fórmula infantil seca no es factible debido a que los costos para la producción serían muy elevados. Por lo cual los fabricantes confían en el uso de desinfectantes y zonas de trabajo higiénico específicas durante el proceso para proveer productos seguros. No obstante un bajo número de bacterias puede crecer hasta cantidades considerables cuando una fórmula infantil reconstituida no es consumida rápidamente ni es mantenida a temperatura ambiente. Esto puede transformar al producto en potencialmente peligroso para el infante que las consume.

En vista de las deficiencias del arte previo, el problema de la presente invención reside en proveer un alimento, en particular productos basados en leche, tales como fórmulas infantiles, las cuales pueden ser seguras incluso después del almacenamiento en condiciones que favorecen el crecimiento de *E. sakazakii*. También, la invención pretende desarrollar un agente seguro que puede ser utilizado para la descontaminación de *E. sakazakii* en cualquier producto alimenticio y para la higienización de los ambientes de una industria.

Este problema ha sido resuelto proveyendo preparaciones de bacteriófago con un potencial sustancialmente lítico contra *E. sakazakii*, las cuales son seguras y no tóxicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención desarrollar aislados de fagos nuevos y con un sustancial potencial lítico útiles contra *E. sakazakii* y los cuales puedan ser utilizados solos o en mezcla para prevenir o tratar a los productos alimenticios y a los ambientes de industrias, de las contaminaciones provocadas por *E. sakazakii*, en particular en las formulas infantiles.

Por ende, otro objetivo de la presente invención es proveer un producto alimenticio que contenga aislados de fago seleccionados para lisar a *E. sakazakii*, en particular una fórmula a base de leche, una composición nutricional, un producto alimenticio para mascotas, un suplemento dietético, o cualquier alimento en riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.

Es un objetivo adicional de la presente invención proveer un agente para la descontaminación del producto alimenticio y la higienización del ambiente de una industria, el cual comprende una cantidad efectiva de al menos un aislado de fago o una mezcla de fago tal como se describió anteriormente.

En otra modalidad la presente invención se refiere al uso de al menos un aislado de fago o mezcla de él, tal como se describe anteriormente, para la descontaminación de los productos alimenticios y para la higienización del ambiente de una industria o para la preparación de una composición dirigida

a la prevención o al tratamiento de las infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales.

Incluso es otro objetivo de la presente invención proveer un método de descontaminación de productos alimenticios o de higienización del ambiente de industria el cual comprende utilizar al menos una preparación de bacteriófago con un potencial sustancialmente lítico contra *E. sakazakii*, tal como se ha descrito antes.

Además, la presente invención se refiere a un método para seleccionar al aislado de fago con potencial sustancialmente lítico contra *E. sakazakii*, como se ha descrito antes.

Una ventaja principal de la presente invención, es que provee de un descontaminante que tiene una alta especificidad para *E. sakazakii*. Puede prevenir la contaminación y el desarrollo de *E. sakazakii* en cualquier producto alimenticio, siendo particularmente útil para los productos a base de leche tales como fórmulas infantiles. También puede ser eficiente para el tratamiento o prevención de las infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales.

Otra ventaja de la presente invención es que provee un agente el cual ayuda a desinfectar limpiar y descontaminar las áreas de trabajo o el equipo de procesos en las industrias, así como los suelos, paredes y similares.

Otra ventaja de la presente invención es que provee un agente que es ambientalmente seguro y no toxico para los humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Dentro de la siguiente descripción, el término "FSM-fago" se refiere a la colección de bacteriófagos de Food Safety Microbiology (microbiología segura para alimentos) (Nestlé Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Switzerland).

De acuerdo a un primer aspecto, un agente para la descontaminación de alimento y para la higienización del ambiente industrial, comprende al menos un aislado de fago con potencial sustancialmente lítico contra *E. sakazakii*.

Los fagos de acuerdo a la presente invención pueden ser obtenidos seleccionando bacteriófagos candidatos para aquellos que infectan a las cepas de *E. sakazakii* utilizando el ensayo de prueba de spot (Pelezar, M.J., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg. Microbiology concepts and applications, Chapter 16 Viruses; cultivation methods, pathogencity p.436-452, McGraw-Hill, Inc. New York 1993), o en un cultivo líquido (H.W. Ackermann and M.S. DuBow. Viruses of Prokaryotes volume 1. Chapter 6. Description and identification of new phages p.103-142. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, USA.) . El método para seleccionar los bacteriófagos de acuerdo a la presente invención se detallan en el ejemplo 1. Preferentemente el aislado de fago que tiene la capacidad de infectar:

i) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii*, del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en medio sólido y,

ii) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii*, del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en medio líquido,

los cuales fueron seleccionados.

En una modalidad preferida los aislados de fago son FSM-fago 67/33/1, FSM-fago F, FSM-fago 9/261, FSM-fago F/316 y FSM-fago 73/311/2, FSM-fago 73/261, FSM-fago 33/33/1, FSM-fago 28/145/2 y FSM-fago 10/261/1.

En una modalidad más preferida los fagos FSM-fago10/261/1, FSM-fago73/261, FSM-fago 33/33/1, FSM-fago 67/33/1, FSM-fago F/316, FSM-fago 9/261, y FSM-fago 73/311/2 juntos con sus correspondientes han sido depositados a modo de ejemplo en el Instituto Pasteur, 28 rue du docteur Roux, F-

75024 Paris CEDES 15, FRANCE, el 14 de noviembre de 2003, bajo el número de deposito CNMC-I3127, CNMC I-3128, CNCM I-3129, CNCM I-3130, CNCMI-3131, CNCMI-3132 y CNCMI-3133, respectivamente.

De manera ventajosa, los fagos depositados son capaces de lisar al menos el 80% de la bacteria *E. sakazakii* de la colección de Nestlé Research Centre collection compuesta de 39 cepas. Esta colección es representativa para *E. sakazakii* la cual puede ser encontrada en los productos alimenticios, en particular en las formulas infantiles. Con el material de fago de acuerdo a la presente invención, se puede obtener una cobertura de alrededor del 97% utilizando una mezcla de fago de al menos 2 fagos. Preferentemente como los fagos no son capaces de reconocer a las bacterias no relacionadas tales como a las bacterias Gram negativas ácido lácticas.

Por lo cual, de acuerdo a un aspecto adicional la presente invención se refiere al uso de al menos un aislado de fago como se ha descrito antes, en cualquier producto alimenticio o suplemento nutricional, para prevenir la contaminación por *E. sakazakii*. Ejemplos de productos de alimentos o productos farmacéuticos son leche, yogurt, requesón, queso, leches fermentadas, productos a base de leche fermentada, helados, productos en base a cereal fermentado, leche en polvo, fórmulas o tabletas infantiles, suspensiones líquidas, suplemento oral seco, suplemento oral húmedo,

alimentación seca por tubo. Los métodos para preparar estos son de conocimiento común.

La composición de acuerdo a la presente invención también puede comprender a los excipientes comunes, en particular edulcorantes, agentes del sabor o preservantes. Además puede comprender un prebiótico y/o un microorganismo probiótico. Las composiciones de la invención pueden ser formuladas de acuerdo a cualquiera técnica de un número de técnicas que son bien conocidas en este arte.

En otra modalidad, se prepara una composición alimenticia que contiene al menos un aislado de fago de acuerdo a la presente invención. Esta composición puede ser una formula completa nutricional, una fórmula infantil, un producto lácteo, una bebida congelada o estable al almacenamiento, agua, una sopa un suplemento dietético, un reemplazo de alimento, una barra nutricional o un confite nutricional. En una modalidad más preferida, los fagos pueden ser adicionados a una formula infantil en polvo.

En otra modalidad, un producto alimenticio común puede ser enriquecido con al menos un aislado de fago de acuerdo a la presente invención. Por ejemplo, una leche fermentada, un yogurt, un queso fresco, una leche cuajada, un artículo de confitería, por ejemplo una bebida dulce o edulcorada, una barra de confitería, hojuelas de cereales o barras para el desayuno, bebidas, leche en polvo, productos

basados en soya, productos fermentados no lácteos o suplementos nutricionales para la nutrición clínica.

Una vez que un aislado de fago ha sido seleccionado de acuerdo a la presente invención, dicho aislado de fago puede ser incluido solo o en una mezcla de fago, dentro de un producto tal como se mencionaba antes en una cantidad de al menos 10^4 pfu (unidad formadora de placas)/ml o gramo (dependiendo de si los fagos son adicionados en estado seco o en estado líquido), y más preferentemente desde alrededor 10^6 hasta alrededor de 10^{11} pfu/ml o gramo. El aislado de fago puede ser preparado mediante secado por aspersión, liofilizado, o en un envase de muestra líquida que utiliza al producto como material de soporte, por ejemplo leche en polvo para formula infantil. También puede ser utilizado como un suplemento para ser mezclado con el producto antes de servir, como un envase adicional (por ejemplo un sachet).

También, la aplicación de los fagos de acuerdo a la presente invención o la aspersión u otra forma de aplicar los fagos a un ambiente industrial, se realiza con el objetivo de inhibir el crecimiento de las bacterias blanco. Tales composiciones pueden ser preparadas de acuerdo a métodos convencionales. Para esta solicitud, la cantidad de fagos preferentemente es al menos alrededor de 10^6 pfu (unidad formadora de placas)/ml o gramo, y más preferentemente desde 10^6 hasta alrededor de 10^{11} pfu/ml o gramo.

Se entregan los siguientes ejemplos solamente a modo de ilustración y de ningún modo deberían ser considerados como limitando la materia de la presente invención. Los ejemplos son precedidos por una breve descripción de las figuras.

Figura 1 corresponde a un diagrama que representa el crecimiento de la mezcla de cepa *E. sakazakii* (FSMCC#145, 286, 290, 305, 1987/2NL) en caldo BHI inoculado con 10^8 pfu/ml en mezcla de fago (FSMCC-fago #67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (•) o sin mezcla de fago ().

Figura 2 corresponde a un diagrama que representa el crecimiento de la mezcla de cepa *E. sakazakii* (FSMCC#145, 286, 290, 305, 1987/2NL) en formulas infantiles reconstituidas con 10^8 pfu/ml en mezcla de fago (FSMCC-fago #67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (•) o sin mezcla de fago ().

Figura 3 corresponde a un diagrama que representa el crecimiento de la mezcla de cepa *E. sakazakii* (FSMCC#145, 286, 290, 305, 1987/2NL) sobre la superficie de discos de acero inoxidable tratados con 10^8 pfu/ml en la mezcla de fago (FSMCC-fago #67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2) (•) o sin mezcla de fago ().

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Selección de los fagos de acuerdo a la invención

Una colección de 114 aislados de fagos que se originaron a partir de la colección de bacteriófago de Nestlé

Food Safety Microbiology, se probaron contra 39 cepas de *E. sakazakii* que provenían de la colección de cultivos de Food Safety Microbiology (FSMCC). Las cepas se enumeran en la tabla 1 y 2, respectivamente,

	Origen	FSMCC No.
1	Ambiente industrial	9/145/1
2	"	9/145/2
3	"	9/145/3
4	"	9/145/4
5	"	9/145/5
6	"	9/261
7	"	9/261/2
8	"	10/145/1
9	"	10/145/2
10	"	10/145/3
11	"	10/145/4
12	"	10/261/1
13	"	10/261/2
14	"	10/261/3
15	"	10/261/4
16	"	10/261/5

	Origen	FSMCC No.
58	Aguas contaminadas (lodo primario)	64/33/2
59	"	64/311
60	Aguas contaminadas (desagüe del canal al lago)	66/311/1
61	"	66/311/2
62	"	67/33/1
63	"	67/33/2
64	"	67/300/1
65	"	67/300/2
66	"	67/311/1
67	"	67/311/2
68	Aguas contaminadas (llegada del agua antes de la filtración en arena)	61/MC9/1
69	"	61/MC9/2
70	"	61/MC9/3
71	Aguas contaminadas (lodo primario)	64/MC9/1
72	"	64/MC9/2
73	Aguas contaminadas (desagüe del canal al lago)	66/MC9/1

17	Agua de desecho	16/145
18	Ambiente industrial	22/145/1
19	"	22/145/2
20	"	22/145/3
21	"	22/145/4
22	"	22/145/4
23	"	23/16
24	"	23/145/1
25	"	23/145/2
26	"	23/145/3
27	"	23/145/4
28	"	23/145/5
29	"	23/1387
30	"	28/16
31	"	28/145/1
32	"	28/145/2
33	"	33/33/1
34	"	33/33/2
35	"	33/33/3
36	"	33/33/4
37	"	33/33/5
38	"	46/MC9/1
39	"	46/MC9/2
40	"	58/MC9/1
41	"	58/MC9/2
42	"	58/MC9/3
43	Aguas	61/33/5

74	"	66/MC9/2
75	"	67/MC9/1
76	"	67MC9/2
77	Aguas contaminadas (ingreso de agua)	73/33/1
78	"	73/33/2
79	"	73/261/1
80	"	73/261/2
81	"	73/300/1
82	"	73/300/2
83	"	73/311/1
84	"	73/311/2
85	"	73/MC9/1
86	"	73/MC9/2
87	Aguas contaminadas (salida de agua)	74/MC9/1
88	"	74/MC9/2
89	Aguas contaminadas (agua biológica)	75/311/1
90	"	75/311/2
91	"	75/MC9/1
92	"	75/MC9/2
93	Aguas contaminadas (entrada de agua)	76/33/1
94	"	76/33/2
95	"	76/311/1
96	"	76/311/2
97	"	76/311/3
98	"	76/311/4
99	"	76/311/5
100	"	76/MC9/1

	contaminadas				
44	"	61/33/6	101	"	76/MC9/2
45	"	61/33/7	102	Aguas contaminadas (salida de agua)	77/33/1
46	"	61/33/8	103	"	77/33/2
47	"	61/300	104	"	77/311/1
48	"	61/300/1	105	"	77/311/2
49	"	61/300/2	106	"	77/MC9/1
50	"	61/311/1	107	"	77/MC9/2
51	"	61/311/2	108	Aguas contaminadas (agua biológica)	78/33/1
52	"	61/311/3	109	"	78/33/2
53	"	61/311/4	110	"	78/311/1
54	"	61/311/5	111	"	78/311/2
55	"	62/300/1	112	"	78/MC9/1
56	"	62/300/2	113	"	78/MC9/2
57	Aguas contaminadas (lodo primario)	64/33/1	114	Ambiente industrial	F/316

Tabla 1: Aislados de fagos investigados

Código de FSM	Origen	Código de FSM	Origen
Mal-16(16)	Producto terminado: cereales	300	Ambiente de industria lechera
261	Fórmula infantil	303	Ambiente de industria lechera
265	Munich University	305	Ambiente de industria lechera
266	Desconocido	308	Ambiente de industria lechera

44

269	Desconocido	309	Ambiente de industria lechera
270	Ambiente de industria lechera	311	Ambiente de industria lechera
271	Ambiente de industria lechera	313	Ambiente de industria lechera
272	Ambiente de industria lechera	314	Ambiente de industria lechera
273	Ambiente de industria lechera	316	Ambiente de industria lechera
274	Ambiente de industria lechera	318	Ambiente de industria lechera
280	Ambiente de industria lechera	322	Ambiente de industria lechera
281	Ambiente de industria lechera	323	Ambiente de industria lechera
284	Ambiente de industria lechera	1360	Ambiente de industria lechera
286	Ambiente de industria lechera	1387-2NL	Ambiente de industria lechera
288	Ambiente de industria lechera	MC7	Wageningen University
290	Ambiente de industria lechera	MC8	Wageningen University
292	Ambiente de industria lechera	MC9	Wageningen University
297	Ambiente de industria	MM10	Wageningen University

	lechera		
298	Ambiente de industria lechera	MM11	Wageningen University

Tabla 2: Cepas de *Enterobacter sakazakii*

Muestreo en medio sólido

Aislamiento de placas y amplificación de fago

Muestreo

Se toman muestras de aguas contaminadas (aproximadamente 50 ml) para la investigación de bacteriófagos. Se deben medir el pH de cada muestra utilizando tiras de papel pH (si el pH es inferior a 5, ajustar a 7 con NaOH 1N).

Las muestras luego son sometidas a las siguientes etapas:

- 1.- Centrifugación por 10 minutos a 2.500 g (para eliminar los residuos importantes)
- 2.- Filtración del sobrenadante utilizando un filtro de 0,20 μm (para eliminar las bacterias)
- 3.- Realizar los ensayos tal como sigue o mantener las muestras a 4°C por 1 o 2 días máximo.

Para el aislamiento de los bacteriófagos, las muestras pretratadas antes han sido probadas en paralelo con o sin pre-amplificación. Una vez que la presencia de fago es detectada, estas son amplificadas y almacenadas.

Análisis sin pre-amplificación

Etapa 1: Preparación del cultivo bacteriano:

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que se deja en crecimiento durante la noche a 30°C, en una infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225), y luego se transfiere 0,5 ml de este cultivo a 4 ml de BHI fresco y se incuba durante 1 hora a 40°C.

Etapa 2: Adición de las muestras de bacterias:

Se agrega 100 µl de cultivo de *E. sakazakii* (preparado como antes se indico) + 100 µl de la muestra tratado para ser ensayada, en tubo que contiene 3 ml de agar blando BHI (caldo BHI + 0,6% de agar) mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Etapa 3: Inoculación de las placas de Petri:

Se mezcla el contenido del tubo en un Vortex (± 2 segundos). Luego, se vierte el contenido completo del tubo sobre la superficie de una placa de Petri que contiene una delgada capa de agar BHI y se deja solidificar en el mesón. Se encuba las placas invertidas durante la noche a 30°C.

Etapa 4: Interpretación de resultados:

Se nota la presencia o ausencia de placas de lisis en cada placa de Petri.

Etapa 5: Controles

Se prepara un control positivo (cepa *E. sakazakii* No. 261 + fago activo contra esta cepa a una concentración de 2-3 log pfu/ml): Se aplica en las etapas 1 a 4.

Se prepara un control negativo sin adición de fago: se aplica en las etapas de 1 a 4 sin agregar el fago o la muestra a ser probada.

Análisis con pre-amplificación:

Etapa 1- Día 1: Preparación del cultivo bacteriano:

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que se deja en crecimiento durante la noche a 30°C, en una infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225), y luego se transfiere 0,5 ml de este cultivo a 4 ml de BHI fresco y se incuba durante 1 hora a 40°C.

Etapa 2: Día 1: Amplificación del fago en la muestra

En un tubo que contiene 4 ml de caldo de BHI, se agrega 100 µl del cultivo de *E. sakazakii* (preparado como se indico en la etapa 1)+1 ml de muestra tratada para ser ensayada y se incuban de 3 a 5 horas a 30°C bajo agitación a 150-200 rpm. Se deja reposar durante la noche en el mesón.

Etapa 3: Día 2: Centrifugación de 10 minutos a 2.500 rpm.

Etapa 4 -Día 2: Preparación del cultivo bacteriano:

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que ha sido crecido durante la noche a 30°C, en infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225), luego 0,5 ml de este cultivo se transfiere a 4 ml de BHI fresco y se incuba 1 hora a 40°C.

Etapa 5- Día 2: Adición de las muestras a las bacterias

Agregar 100 µl de cultivo de *E. sakazakii* (preparado como antes se indico) + 100 µl de la muestra obtenida de la etapa 3, en tubo que contiene 3 ml de agar blando BHI (caldo BHI + 0,6% de agar) mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Etapa 6- Día 2: Inoculación de las placas de Petri:

Se mezcla el contenido del tubo en un Vortex (± 2 segundos). Luego, se vierte el contenido completo del tubo sobre la superficie de una placa de Petri que contiene una delgada capa de agar BHI y se deja solidificar en el mesón. Se encuba las placas invertidas durante la noche a 30°C.

Etapa 7- Día 3: Interpretación de los resultados:

Se nota la presencia o ausencia de placas de lisis en cada placa de Petri.

Cuando se detecta la presencia del fago, estos se amplifican y sin almacenados.

Amplificación de una placa de lisis

Etapa 1: Preparación del cultivo bacteriano:

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que ha crecido durante la noche a 30°C, en una infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225), luego 0,5 ml de este cultivo se transfiere a 4 ml de BHI fresco y se incuba 1 hora a 40°C.

Etapa 2: Amplificación del pfu:

En un tubo que contiene 4 ml de caldo de BHI, se agrega 100 µl desde el cultivo de *E. sakazakii* (preparado como se indico en la etapa 1) + 1. pfu aislado (cortado desde el agar) y luego se incuba por un período de 3 a 5 horas a 30°C bajo agitación a 150-200 rpm. Los tubos se dejan permanecer durante la noche sobre el mesón.

Etapa 3: Centrifugación de 10 minutos a 2.500 rpm.

Etapa 4: Filtración del sobrenadante utilizando un filtro de 0,20 µm (para eliminar las bacterias)

Enumeración de los fagos

Etapa 5: Preparación del cultivo bacteriano

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que ha crecido durante la noche a 30°C, en una infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225), luego 0,5 ml de este cultivo se transfiere a 4 ml de BHI fresco y se incuba 1 hora a 40°C.

Etapa 6: Adición de los fagos a las bacterias:

Se adiciona en un tubo que contiene 3 ml de agar blando BHI (caldo BHI + 0,6% de agar) mantenido a $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 μl de cultivo de *E. sakazakii* (preparado como antes se indico) + 100 μl de una muestra diluida de manera seriada, la cual es obtenida de la etapa 4.

Etapa 7: Inoculación de las placas de Petri:

Se mezcla el contenido de un tubo con Vortex (± 2 segundos) y se vierte el contenido total de tubo sobre la superficie de una placa de Petri que contiene una delgada capa de agar BHI. Luego, se deja solidificar sobre el mesón y se incuban las placas invertidas durante la noche a 30°C .

Etapa 8: Interpretación de los resultados:

Se enumeran las placas de lisis de cada placa de Petri

Almacenamiento después de la amplificación

Etapa 1: La preparación de las alícuotas:

Se distribuye en crio-tubos, un volumen de aproximadamente 1,5 ml de la solución de fago amplificada y filtrada (obtenida de la etapa 4 del párrafo de "amplificación de una placa de lisis").

Etapa 2: Adición de glicerol:

A cada tubo se agrega 15% de glicerol estéril y se mezcla rápidamente utilizando un Vortex.

Etapa 3: Congelamiento rápido de los tubos en nitrógeno líquido.

Etapa 4: Almacenamiento de los tubos en un congelador a -20°C

Análisis en medio líquido

Etapa 1, Día 0: Preparación del cultivo bacteriano:

Se prepara un cultivo de *E. sakazakii* que ha sido crecido durante la noche a 30°C en infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid CM225).

Etapa 2: Día 1: Preparación del cultivo bacteriano:

Se transfiere 0,1 ml de este cultivo en 4 ml de BHI fresco y se incuba 6 horas a 40°C (fase de crecimiento estacionario de las células). Se diluyen las células hasta 3 log cfu/ml en sal Triptona (TS, Oxoid L42).

Etapa 3: Día 1: Ensayo en microplaca de titulación

Se investiga la efectividad de los fagos contra *E. sakazakii* en un ensayo en microplaca de titulación. Cada placa

se carga con cada uno de los microorganismos de ensayo como sigue:

Pocillos externos, 200 μ l de BHI (control blanco), otros pocillos, 20 μ l de *E. sakazakii* preparado en la etapa 2. Se almacenan durante la noche estas microplacas de titulación a 4°C.

Etapa 4: Día 2: Ensayo de microplaca de titulación

Se deja las microplacas de titulación en el refrigerador. Se agregan en los pocillos de control negativo, 180 μ l de BHI y en los pocillos de ensayo, 160 μ l de BHI más 20 μ l de suspensión de fago (concentración final de 8 log pfu/ml). Se lee la densidad óptica a 620 nm (tiempo cero) en la microplaca de titulación, utilizando un lector de microplaca multiescan MCC340. Luego las placas son incubadas a 37°C en ambiente de aire y se lee la OD_{620nm} después de 6 horas 30 minutos y 8 horas y 30 minutos de incubación.

Etapa 5: Día 3: Ensayo de microplaca de titulación

Después de la ultima lectura, las placas se dejan a temperatura ambiente por un periodo total de 24 horas. Después de lo cual se lee finalmente una vez la OD_{620nm}.

RESULTADOS

Siguiendo al ensayo en medio sólido, son seleccionados los aislados de fagos que son activos contra al

menos 9 de las 39 cepas de *E. sakazakii* seleccionadas del grupo: FSM-16; 33; 261; 265;266; 269; 270; 271; 272; 273; 274; 280; 281; 284; 286; 288; 290; 292; 297; 298; 300; 303; 305; 308; 309; 311, 313; 314; 316; 318; 322; 323; 1360; 1387/2NL; MC7; MC8; MC9; MM10 y MM1. Por lo cual, los 11 aislados de fago (incluyendo los fagos FSM-fago 67/33/1, FSM-fago F/316, FSM-fago 9/261, y FSM-fago 73/311/2) se representan en la tabla 3. Algunos aislados de fagos probaron ser eficiente contra al menos 20 de las 39 cepas bacterianas.

		Número de Bacteriófago (FSM-fago)										
		F/316	73/26 1/1	9/261	28/14 5/2	23/16	10/26 1/1	22/14 5/3	28/16	33/33 /1	67/33 /1	73/31 1/2
Nº	16	2	2	2	2	2		2	2	0	0	0
	33	2	0	2	2	0	0	0	0	2	2	2
	261	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	265	2	2	2						2	0	0
	266	2	2	2						2	2	0
	269	2	2	2						0	0	0
	270	2	0	2						0	2	0
	271	2	2	2						2	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	273	2	2	2						2	0	0
	274	2	2	2	0	0	2	0	0	0	2	2
	280	2	2	2						2	0	0
	281	2	2	2						2	0	0
	284	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	288	2	2	2						0	0	0
	290	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	297	2	2	2						0	0	0
	298		2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	300	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	303	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	0
	305	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	308		2	?							2	2
	309		2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	311	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
	313	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0

314	2	2	2						2	2	0
316	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
318	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
322	2	2	2						2	2	0
323	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
1360	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2
1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2
MC7	0		0	2	2	0				0	0
MC8	2		2	2	2	2				0	0
MC9	2		2	2	2	2				2	2
MM10	2		2	2	2	2				0	0
MM11	2		0	2	2	2				2	0

Tabla 3: Selección de los fagos de acuerdo a los resultados obtenidos en medio sólido.

Leyenda: 0 no activo; 2 activo.

Dichos fagos fueron probados en medio líquido para seleccionar los aislados de fago para la presente invención. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

		Número de Bacteriófago (FSM-fago)										
		67/33/1	10/261/ 1	F/316	9/261	33/33/1	73/311/ 2	28/145/ 2	73/261/ 1	23/16	28/16	22/145/ 3
Nº	16	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	0
	33	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	261	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
	265	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
	266	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2
	269	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
	270	2	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0
	271	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0
	272	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	273	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	274	2	2	2	0	2	2	?	0	0	2	2
	280	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	281	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0
	284	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	286	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0
	288	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	290	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	292	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	297	2	?	2	2	?	2	0	0	0	0	0
	298	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

5

300	0	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0
303	2	2	0	0	2	0	2	2	2	0	0
305	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
308	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
309	2	2	?	?	0	2	0	0	0	0	0
311	2	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0
313	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
314	0	?	2	2	?	0	2	0	0	0	0
316	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
318	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
322	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
323	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
1360	0	0	2	2	2	0	0	2	0	0	0
1387/2NL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	0
MC7	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
MC8	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
MC9	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0
MM10	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
MM11	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	0

Tabla 4: Selección de los fagos de acuerdo a los resultados obtenidos en el medio líquido.

Leyenda: 0 no activo; 2 activo

Como se puede deducir a partir de la tabla 4, algunos aislados de fagos reconocen más del 80% de las 39 cepas de *E. sakazakii*. Sin embargo otros aislados no reconocen ni el 10% de las cepas ensayadas. Los aislados de fago son además activos en medio liquido contra al menos 9 de las 39 cepas seleccionadas de *E. sakazakii* desde el grupo formado por:

FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, se

19

seleccionan los aislados fagos que pueden ser utilizados en la presente invención. Preferentemente, los siguientes 8 aislados de fago FSM-fago 67/33/1 (CNCM I-3130), FSM-fago F/316 (CNCM I-3131), FSM-fago 9/261 (CNCM I-3128), FSM 33/33/1, (CNCM I-3129) FSM-fago 28/145/2, FSM-fago 10/261/1 (CNCM I-3127).

Se apreciara que un experto en el arte podría examinar bien y seleccionar de buena forma otros aislados de fago de acuerdo a la presente invención, sometiendo estos a ensayos de análisis en medios de sólidos y líquidos tal como se detallo anteriormente.

Ejemplo 2: Evaluación de la eficiencia de la mezcla de bacteriófago contra una mezcla de diversas cepas de *Enterobacter sakazakii* en BHI y en formula infantil reconstituida (RIF)

Para poder evaluar la eficiencia de la mezcla de fago contra la mezcla de *E. sakazakii*, se realizo el siguiente experimento.

Se utilizó una mezcla de *E. sakazakii* FSM-145, 286, 290, 305 y 1387/2NL tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y en P. Breeuwer et al., 2003, Journal of Applied Microbiology 95; 967-973. El cultivo individual durante la noche (18 horas a 30°C) de estas cepas, se diluyó 1:1 en BHI fresco y se incubo durante 2 horas a 30°C. Se realizó una mezcla de estas cepas mezclando cantidades iguales de cada reserva. Luego, el caldo BHI o RIF se inoculo con 100 µl de la mezcla de *E. sakazakii*

(preparado como se describió anteriormente) de modo que la concentración final es de alrededor de 10 cfu/ml.

Fueron ensayadas las mezclas del aislado de fago que contenían FSM-fago 67/33/1 (CNCM I-3130), FSM-fago F/316 (CNCM I-3131), FSM-fago 9/261 (CNCM I 3132) y FSM-fago 73/311/2 (CNCM I-3133). Para esto, se agrego una cantidad variable de cada fago a los tubos que contenían la mezcla de *E. sakazakii* para alcanzar una concentración final de alrededor de 8 log pfu/ml. También se incluyo un control negativo sin adición de fago (BHI o RIF 9,9 ml + mezcla de *E. sakazakii* 100 µl).

Se incubo todos los inoculados a 30°C y las muestras fueron tomadas a diversos intervalos de tiempo: 0-2-4-6 horas. Para cada muestra, el número de bacterias presentes en el medio fue determinado por el método estándar de conteo de placa.

Resultados:

Los resultados son presentados en las figuras 1 y 2. Estas figuras muestran que una mezcla bacteriana crecerá hasta un numero elevado en ausencia de la mezcla de fago mientras que no se registro crecimiento en presencia de la mezcla de fago por un periodo mínimo de 6 horas y de hasta 24 horas.

En conclusión, estos experimentos demuestran que agregando la preparación de bacteriófagos de acuerdo a la presente invención contra *E. sakazakii*, a formulas infantiles reconstituidas (RIF) podría prevenir el crecimiento de *E. sakazakii* por al menos 6 horas.

Ejemplo 3: Efecto de la preparación de bacteriófago para la higienización ambiental.

Para poder evaluar la mezcla en la eficiencia de la mezcla de fago en superficies artificialmente contaminadas por una mezcla de cepa de *E. sakazakii*, se realizó el siguiente experimento.

Etapa 1: Preparación de las células bacterianas

Se utilizó una mezcla de las cepas de *E. sakazakii* (FSM-145, 286, 290, 205 y 1387/2NL (véase ejemplo 1 y 2)). El cultivo individual de estas cepas (18 horas a 30°C) se centrífugo a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El concentrado celular se cosecho y se diluyo en BHI hasta alcanzar una concentración celular de alrededor de 8 log cfu/ml. Una mezcla de estas cepas se realizo mezclando cantidades iguales de cada reserva.

Etapa 2: Adhesión

Se sumerge un disco de acero inoxidable de 1 cm² en una solución bacteriana preparada como se describió en la etapa 1. Se le permitió permanecer a temperatura ambiente bajo agitación suave por una hora.

Etapa 3: Lavado y secado

Para retirar las células no adheridas, los discos de acero inoxidable se retiraron y se lavaron 3 veces en solución

tampón fosfato (PBS: pH 7,0 Merck). El exceso de líquido se absorbió con papel Watman, luego los discos se secaron durante 30 minutos bajo flujo laminar. Para determinar el nivel de células adheridas, se aplicó la etapa 6 a algunos discos.

Etapa 4: Adición de la mezcla de fago

La mitad de los discos de acero inoxidable se sumergieron en una solución de mezcla de fago de 8 log pfu/ml que contenía los siguientes fagos FSM-fago 67/33/1 (CNCM I-3130), FSM-fago F/316 (CNCM I-3131), FSM-fago 9/261 (CNCM I-3132) y FSM-fago 73/311/2 (CNCM I-3133). Se dejó el envase a temperatura ambiente bajo agitación suave durante 6 horas. Se retiró algunos discos a diversos intervalos para la enumeración de la bacteria. En paralelo, se realizaron controles sin fago agregado.

Etapa 5: Lavado

A intervalos definidos algunos discos se retiraron, se lavaron 3 veces en PBS estéril y se secaron rápidamente sobre un papel absorbente estéril.

Etapa 6: Liberación celular y enumeración

Después de la etapa 5, se colocó cada disco en tubos que contenían 9 ml de TS. Los tubos se colocaron en un baño de sonicación (lleno con una mezcla de agua y hielo) durante un minuto a 50 KHz después de lo cual los tubos se agitaron por

10 segundos utilizando un Vortex. Se realizó la enumeración celular utilizando un método de plaqueo estándar.

Resultados:

Los resultados se presentan en la figura 3 la cual demuestra que la bacteria *E. sakazakii* en la mezcla de las cepas (FSMCC#145, 286, 290, 305 1987/2NL) no puede volver a ser recuperada a partir de la superficie de los discos de acero inoxidable tratados con 10^8 pfu/ml de fago en la mezcla de fago (FSMCC-fago # 67/33/1, F/316, 9/261, 73/311/2), mientras que sin las mezclas de fago las bacterias se mantuvieron viables y pudieron crecer levemente.

En conclusión, el tratamiento de la superficie de acero inoxidable con al menos 10^8 fagos por ml resulta en la destrucción de las bacterias *E. sakazakii*.

REIVINDICACIONES

1.- Un aislado de fago CARACTERIZADO porque sustancialmente es un lítico potencial contra *E. sakazakii*.

2.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque tiene la capacidad de infectar:

i) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en un medio de ensayo sólido utilizando el ensayo de prueba spot y

ii) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322;

FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en medio líquido.

3.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3127.

4.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3128.

5.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3129.

6.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3130.

7.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3131.

8.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3132.

9.- Un aislado de fago de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque es depositado bajo la referencia CNCM I-3133.

10.- Una mezcla de fago, que contiene al menos un fago aislado de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 1 a 9, CARACTERIZADA porque infecta al menos el 80% de las cepas de *E. sakazakii* del grupo que consiste de:

FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11.

11.- Un producto alimenticio, CARACTERIZADO porque contiene al menos un aislado de fago o una mezcla de fago con un sustancial potencial lítico contra *E. sakazakii*.

12.- Un producto alimenticio de acuerdo a la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque el aislado de fago o mezcla de fago es de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 10.

13.- Un producto alimenticio de acuerdo a la reivindicación 11 ó 12, CARACTERIZADO porque esta en la forma de un producto basado en leche, una composición nutricional, un alimento para mascotas, un suplemento dietético, o cualquier alimento en riesgo en contaminación por *E. sakazakii*.

14.- Un producto alimenticio de acuerdo a la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque el producto a base de leche es una leche fermentada, un yogurt, un requesón, un queso, un queso fresco, un producto fermentado, una leche cuajada, una bebida, un polvo a base de leche, una fórmula infantil o una fórmula infantil en polvo seca.

15.- Un producto alimenticio de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 11 a 14, CARACTERIZADO porque el aislado de fago o la mezcla de fago está comprendida en una cantidad efectiva para prevenir la contaminación y el desarrollo de *E. sakazakii* en dicho producto.

16.- Un producto alimenticio de acuerdo a la reivindicación 15, CARACTERIZADO porque el aislado de fago está presente en una cantidad de al menos $1 \cdot 10^4$ pfu por ml, o por gramo si es sólido, del producto.

17.- Un agente para la descontaminación de producto alimenticio, por medio de la prevención de la contaminación y desarrollo de *E. sakazakii* y para la higienización del ambiente de una industria, CARACTERIZADO porque comprende una cantidad efectiva de al menos un aislado de fago o de una mezcla de fago de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 10.

18- Un agente de acuerdo a la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque el aislado de fago está presente en una cantidad de al menos $1 \cdot 10^4$ pfu por ml, o por gramo si es sólido.

6a

19.- Un agente de acuerdo alguna de las reivindicaciones 17 ó 18, CARACTERIZADO porque el producto alimenticio es un producto basado en leche tal como la leche fermentada, un yogurt, un requesón, un queso, un queso fresco, productos basados en leche fermentada, leche cuajada, bebidas, polvos a base de leche, una formula infantil, una formula infantil en polvo seco; un producto fermentado no lácteo; un producto en base a soya; una formula nutricional, un producto lácteo, una bebida congelada o estable al almacenamiento, agua, sopa, un suplemento dietético, un reemplazo de alimento, una barra o confite nutricional, un producto de alimento para mascota, una bebida dulce o edulcorada, un helado, una barra de confitería, barras o hojuelas de cereal para el desayuno o un suplemento nutricional para la nutrición clínica o cualquier alimento en riesgo de contaminación por *E. sakazakii*.

20.- Uso de al menos un aislado de fago o mezcla de fago de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 10, CARACTERIZADO porque sirve para descontaminar los productos alimenticios y la higienización de un ambiente de una industria.

21.- El uso de acuerdo a la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque un producto alimenticio es un producto a

62

base de leche tal como leche fermentada, un yogurt, un requesón, un queso, un queso fresco, productos basados en leche fermentada, leche cuajada, bebidas, polvos en base a leche, una formula infantil, una formula infantil en polvo seco; un producto fermentado no lácteo; un producto en base a soya; una formula nutricional, un producto lácteo, una bebida congelada o estable al almacenamiento, agua, sopa, un suplemento dietético, un reemplazo de alimento, una barra o confite nutricional, un producto de alimento para mascota, una bebida dulce o edulcorada, un helado, una barra de confitería, barras o hojuelas de cereal para el desayuno o un suplemento nutricional para la nutrición clínica o cualquier alimento en riesgo de ser contaminado por *E. sakazakii*.

22.- Uso de al menos un aislado de fago de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 10, CARACTERIZADO porque sirve para la preparación de una composición dirigida a prevenir o tratar las infecciones provocadas por *E. sakazakii* en humanos o animales.

23.- El uso de acuerdo a una de las reivindicaciones 20 a 22, CARACTERIZADO porque el aislado de fago está presente en una cantidad eficiente para prevenir la contaminación y el desarrollo de enterobacterias *E. sakazakii*.

24. El uso de acuerdo a una de las reivindicaciones 20 a 23, CARACTERIZADO porque el aislado de fago o la mezcla de fago es utilizada en una cantidad de al menos $1,10^4$ pfu por ml.

25.- Un método para descontaminar los productos alimenticios o la higienización de un ambiente industrial, CARACTERIZADO porque comprende utilizar al menos un aislado de fago o mezcla de fago con un potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii*.

26.- Un método de acuerdo a la reivindicación 25, CARACTERIZADO porque el aislado de fago es de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 10.

27.- Un método para la selección de un aislado de fago con un potencial lítico sustancial contra *E. sakazakii*, CARACTERIZADO porque consiste en seleccionar el aislado de fago que tiene la capacidad de infectar:

i) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-

311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en un medio de ensayo sólido utilizando el ensayo de prueba de mancha, y

ii) al menos 9 cepas bacterianas de *E. sakazakii* del grupo que consiste de FSM-16; FSM-33; FSM-261; FSM-265; FSM-266; FSM-269; FSM-270; FSM-271; FSM-272; FSM-273; FSM-274; FSM-280; FSM-281; FSM-284; FSM-286; FSM-288; FSM-290; FSM-292; FSM-297; FSM-298; FSM-300; FSM-303; FSM-305; FSM-308; FSM-309; FSM-311; FSM-313; FSM-314; FSM-316; FSM-318; FSM-322; FSM-323; FSM-1360; FSM-1387-2NL; FSM-MC7; FSM-MC8; FSM-MC9; FSM-MM10 y FSM-MM11, en medio líquido.

Figura 1.

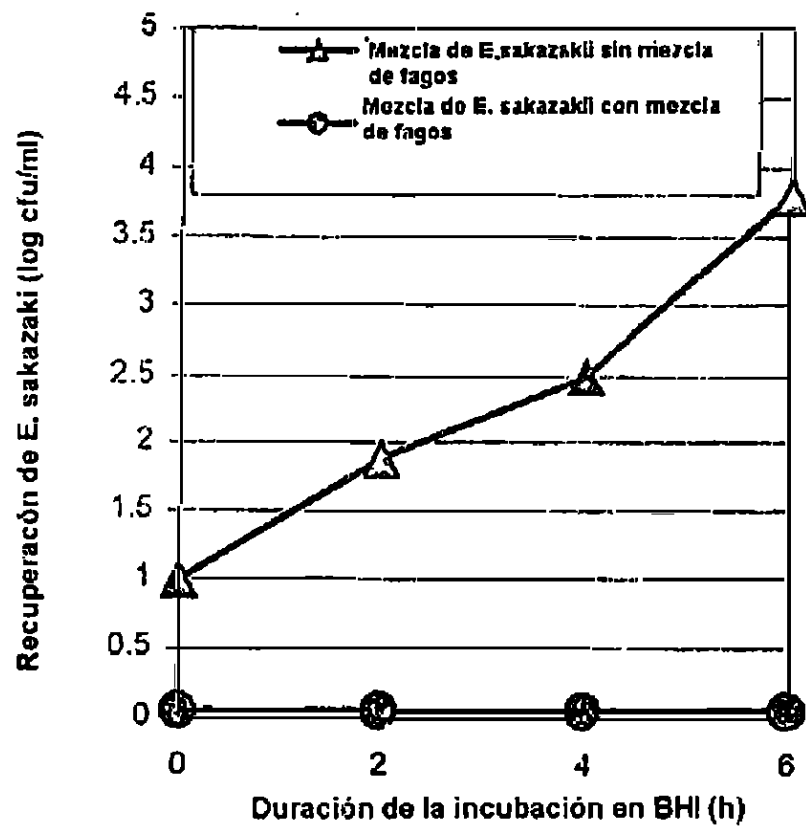


Figura 2.

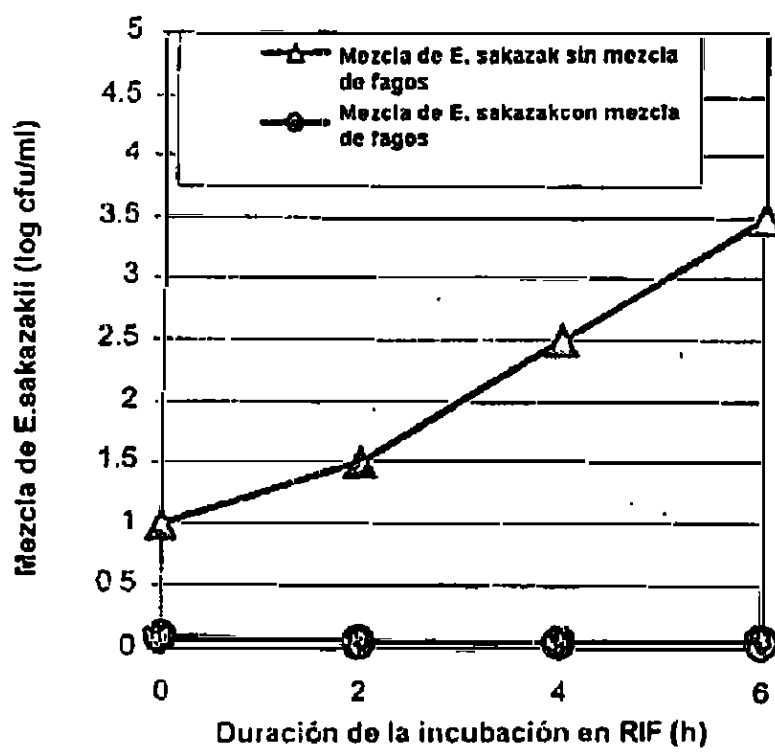


Figura 3.

