

NOVEDOSO BACTERIÓFAGO CLO-PEP-1 DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* Y SU USO PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un bacteriófago aislado de la naturaleza que infecta y destruye células de *Clostridium perfringens*, y a un método para prevenir y tratar las infecciones de células de *Clostridium perfringens* mediante el uso de una composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un bacteriófago Myoviridae Clo-PEP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Clostridium perfringens* específicamente, el cual tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 (número de registro en el KCTC 12664BP), y a un método para prevenir las infecciones de células de *Clostridium perfringens* y después de eso tratar mediante el uso de la composición que comprende dicho bacteriófago como un ingrediente activo.

2. Descripción de la técnica relacionada

Clostridium perfringens es una bacteria patogénica y anaerobia obligatoria (raramente sobrevive en la presencia de oxígeno) que provoca enfermedades graves que incluyen enteritis necrótica y toxicidad alimentaria en seres humanos y animales tales como ganado vacuno, porcino y cabras, etc. Las enterotoxinas producidas por *Clostridium perfringens* son usualmente toxinas hemolíticas y toxinas necróticas, que comprenden cuatro tipos de toxinas principales, α , β , ϵ y ι . De acuerdo con su presencia, *Clostridium perfringens* se clasifica en seis tipos toxigénicos, del A al F. *Clostridium perfringens* tipo A es un patógeno causante principal de toxicidad alimentaria, y *Clostridium perfringens* tipo C es un patógeno causante principal de enteritis necrótica.



Recientemente, ha existido un aumento de las infecciones de *Clostridium perfringens* en la industria avícola. Por lo tanto los corrales de pollo están sufriendo de estos casos, ya que se vuelven frecuentes en una gran población de pollos, así como latentes sin manifestación de síntomas durante un período de tiempo largo. Especialmente en pollos de engorde, las infecciones de *Clostridium perfringens* tienden a ocurrir frecuentemente en todo el mundo, de modo que se reconoce profundamente como un patógeno principal hoy en día. Por otra parte, en la industria agropecuaria se informa que los casos infecciosos de *Clostridium perfringens* están en aumento. Teniendo en cuenta un daño significativo en la industria ganadera por este *Clostridium perfringens*, se necesita urgentemente desarrollar un método para prevenir o tratar las infecciones de *Clostridium perfringens*. Se ha usado una variedad de antibióticos para prevenir o tratar tales infecciones de células de *Clostridium perfringens*. Sin embargo, de acuerdo con el reciente aumento de bacterias resistentes a antibióticos, se necesita urgentemente una alternativa eficaz.

Recientemente, el uso de bacteriófagos ha llamado nuestra atención como una nueva forma de tratar las infecciones bacterianas. Particularmente, la razón de nuestro gran interés en los bacteriófagos es porque el tratamiento basado en bacteriófagos es un método que no daña la naturaleza. Los bacteriófagos son microorganismos extremadamente pequeños que infectan las bacterias, que en pocas palabras se denominan fagos. Una vez que el bacteriófago infecta las bacterias, el bacteriófago prolifera en el interior de la célula bacteriana. Después de la proliferación completa, las progenies destruyen la pared de la célula bacteriana para escapar del huésped, lo que sugiere que el bacteriófago tiene la capacidad de destruir las bacterias. La infección por bacteriófagos se caracteriza por alta especificidad, de manera que un bacteriófago determinado infecta solamente una bacteria específica. Es decir, las bacterias que pueden ser infectadas por un bacteriófago determinado son limitadas, lo que sugiere que el bacteriófago puede destruir solamente una bacteria específica y no puede dañar otras bacterias.

Los bacteriófagos se descubrieron por primera vez por el bacteriólogo inglés Twort en 1915 cuando se dio cuenta de que las colonias de *Micrococcus* se fundían y se volvían



transparentes por algo desconocido. En 1917, el bacteriólogo francés d'Herelle descubrió que *Shigella dysenteriae* en el filtrado de las heces de un paciente con disentería se fundía debido a algo, y estudió más aún este fenómeno. Como resultado, identificó al bacteriófago de manera independiente, y lo denominó como bacteriófago que significa un asesino de bacterias. Desde entonces, se han identificado continuamente bacteriófagos que actúan específicamente contra tales bacterias patogénicas como *Shigella*, *Salmonella Typhi* y *Vibrio cholerae*.

Debido a la capacidad única del bacteriófago para eliminar bacterias, los bacteriófagos se han estudiado y anticipado como un mejor método para tratar infecciones bacterianas. Sin embargo, después que Fleming descubrió la penicilina, los estudios en bacteriófagos habían continuado solamente en algunos países europeos del este y la antigua Unión Soviética debido a la universalización de los antibióticos. Después del año 2000, el mérito de los antibióticos convencionales se desvaneció debido al aumento de bacterias resistentes a los antibióticos. De esta manera, los bacteriófagos se destacan una vez más como un nuevo agente antibacteriano que puede reemplazar a los antibióticos convencionales.

Además, la reciente regulación del uso de antibióticos se refuerza por los gobiernos a nivel mundial. El interés en los bacteriófagos está en mayor aumento así como el logro de las aplicaciones industriales.

Por lo tanto, los presentes inventores trataron de desarrollar una composición aplicable para la prevención o el tratamiento de infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de un bacteriófago que se aísla de la naturaleza y que puede destruir *Clostridium perfringens* selectivamente, y además establecer un método para prevenir o tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de la composición. Como resultado, los presentes inventores aislaron bacteriófagos adecuados para este propósito y aseguraron que la secuencia de nucleótidos del genoma pudiera distinguir al bacteriófago de la presente invención de otros bacteriófagos. Después, desarrollamos una composición que comprende el bacteriófago aislado como un ingrediente activo, y confirmamos que esta composición puede usarse eficazmente



para la prevención y el tratamiento de infecciones de *Clostridium perfringens*, lo que conduce a la realización de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar un bacteriófago Myoviridae Clo-PEP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Clostridium perfringens* específicamente, que tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 (número de registro en el KCTC 12664BP).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para la prevención de infecciones de *Clostridium perfringens*, que comprende el bacteriófago Clo-PEP-1 que puede infectar y destruir células de *Clostridium perfringens* como un ingrediente activo y un método para prevenir las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para el tratamiento de infecciones de *Clostridium perfringens*, que comprende el bacteriófago Clo-PEP-1 que puede infectar y destruir células de *Clostridium perfringens* como un ingrediente activo y un método para tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un desinfectante para prevenir y tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de dicha composición. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un aditivo para el agua potable para prevenir y tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de dicha composición.

Un objeto de la presente invención es proporcionar además un aditivo alimentario eficaz en la cría de animales al prevenir y tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de dicha composición.



Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un bacteriófago Myoviridae Clo-PEP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Clostridium perfringens* específicamente, que tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 (número de registro en el KCTC 12664BP), y un método para prevenir y tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el uso de una composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo.

El bacteriófago Clo-PEP-1 ha sido aislado por los presentes inventores y después se depositó en la Colección Coreana de Tipos de Cultivos, Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea el 21 de agosto de 2014 (número de registro en el KCTC 12664BP). La presente invención proporciona además un desinfectante, un aditivo para el agua potable, y un aditivo alimentario aplicable para la prevención o tratamiento de infecciones de *Clostridium perfringens*, que comprende el bacteriófago Clo-PEP-1 como un ingrediente activo.

Dado que el bacteriófago Clo-PEP-1 incluido en la composición de la presente invención destruye células de *Clostridium perfringens* de manera eficaz, se considera eficaz para prevenir o tratar diversas enfermedades provocadas por *Clostridium perfringens*. Por lo tanto, la composición de la presente invención puede utilizarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades (infecciones) provocadas por *Clostridium perfringens*.

En esta descripción, el término "tratamiento" o "tratar" indica (i) suprimir enfermedades provocadas por células de *Clostridium perfringens*; y (ii) aliviar enfermedades provocadas por células de *Clostridium perfringens*.

En esta descripción, el término "aislamiento" o "aislado" indica todas las acciones para separar el bacteriófago mediante el uso de diversas técnicas experimentales y asegurar las características que puedan distinguir este bacteriófago de otros, y además incluye la acción de proliferar el bacteriófago por medio de técnicas de ingeniería genética para proporcionarle utilidad.



El vehículo farmacéuticamente aceptable incluido en la composición de la presente invención es el que se usa generalmente para la preparación de una formulación farmacéutica, que se ejemplifica por lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, y aceite mineral, pero sin limitarse a ellos. La composición de la presente invención puede incluir adicionalmente lubricantes, agentes humectantes, edulcorantes, saborizantes, emulsionantes, agentes de suspensión, y conservantes, además de los ingredientes anteriores.

En la composición de la presente invención, el bacteriófago Clo-PEP-1 se incluye como un ingrediente activo. En este punto, el bacteriófago Clo-PEP-1 se incluye a la concentración de 1×10^1 pfu/ml $\sim 1 \times 10^{30}$ pfu/ml o 1×10^1 pfu/g $\sim 1 \times 10^{30}$ pfu/g, y preferentemente a la concentración de 1×10^4 pfu/ml $\sim 1 \times 10^{15}$ pfu/ml o 1×10^4 pfu/g $\sim 1 \times 10^{15}$ pfu/g.

La composición de la presente invención puede formularse mediante el método que pueden llevar a cabo las personas con experiencia en la técnica con el uso de un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable en la forma de dosis unitaria o en un envase con múltiples dosis. La formulación puede estar en la forma de solución, suspensión o emulsión en aceite o medio soluble en agua, extracto, polvo, gránulo, tableta o cápsula. En este punto, puede incluirse adicionalmente un agente dispersante o un estabilizador.

La composición de la presente invención puede prepararse como un desinfectante, un aditivo para el agua potable, o un aditivo alimentario de acuerdo con el propósito de uso, pero sin limitarse a ellos.

EFFECTO VENTAJOSO

El método para prevenir y tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* mediante el



uso de esta composición que comprende el bacteriófago Clo-PEP-1 como un ingrediente activo, tiene la ventaja de una alta especificidad para *Clostridium perfringens*, en comparación con los métodos convencionales basados en materiales químicos que incluyen los antibióticos convencionales. Esto significa que la composición de la presente invención puede usarse para prevenir o tratar las infecciones de *Clostridium perfringens* específicamente sin afectar otras bacterias residentes útiles, y en consecuencia tiene menos efectos secundarios. En general, cuando se usan materiales químicos tales como los antibióticos, las bacterias residentes en general también resultan dañadas lo que debilita la inmunidad en los animales con diversos efectos secundarios. Mientras tanto, la composición de la presente invención utiliza el bacteriófago aislado de la naturaleza como un ingrediente activo, de manera que no produce ningún daño a la naturaleza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La aplicación de las modalidades preferidas de la presente invención se comprende mejor con referencia a las figuras anexas, en donde:

la Figura 1 es una micrografía electrónica que muestra la morfología del bacteriófago Clo-PEP-1.

la Figura 2 es una fotografía que ilustra la capacidad del bacteriófago Clo-PEP-1 para destruir células de *Clostridium perfringens*. La zona clara en la placa de cultivo es la formación de placas de fagos por la lisis de las células bacterianas.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

Las modalidades prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.



Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, teniendo en cuenta esta descripción, pueden realizar modificaciones y mejoras dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de un bacteriófago capaz de destruir células de *Clostridium perfringens*

Las muestras se recogieron de la naturaleza para analizar el bacteriófago que tuviera la capacidad de destruir las células de *Clostridium perfringens*. Las células de *Clostridium perfringens* usadas para el aislamiento del bacteriófago en la presente descripción fueron las que habían aislado los presentes inventores e identificado como *Clostridium perfringens* anteriormente.

El procedimiento de aislamiento del bacteriófago se describe en detalle más adelante en la presente descripción. La muestra recogida se añadió al medio TSB (caldo de soya tríptica) (digerido pancreático de caseína, 17 g/L; digerido papaico de soya, 3 g/L; dextrosa, 2.5 g/L; cloruro de sodio, 5 g/L; fosfato dipotásico, 2.5 g/L) inoculado con células de *Clostridium perfringens* a la proporción de 1/1000, seguido de cultivo anaeróbico a 37 °C durante 12 horas. Una vez completado el cultivo, se llevó a cabo una centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante recuperado se inoculó con cultivo de *Clostridium perfringens* a la proporción de 1/1000, seguido de cultivo anaeróbico a 37 °C durante 12 horas. Cuando la muestra contenía el bacteriófago eficaz, el procedimiento anterior se repitió un total de 5 veces para aumentar el título del bacteriófago. Después de repetir el procedimiento 5 veces, se procedió a centrifugar la solución de cultivo a 8,000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante resultante. El sobrenadante recuperado se filtró mediante el uso de un filtro de 0.45 μ m. El filtrado obtenido se usó en un ensayo de puntos para examinar si el bacteriófago capaz de destruir a células de *Clostridium perfringens* estaba incluido en él o no.

El ensayo de puntos se realizó de la siguiente manera; el medio TSB se inoculó con células de *Clostridium perfringens* a la proporción de 1/1000, seguido de cultivo



anaeróbico a 37 °C durante la noche. Tres $\text{m}\ell$ ($\text{OD}_{600}=2.0$) del caldo de cultivo de *Clostridium perfringens* preparado anteriormente se dispersó en la placa con TSA (agar de soja tríptica; digerido pancreático de caseína, 17 g/L; digerido papaico de soja, 3 g/L; cloruro de sodio, 5 g/L; agar, 15 g/L). La placa permaneció en una cámara anaeróbica durante aproximadamente 30 minutos para secarse. Después del secado, 10 μl del filtrado resultante se colocaron directamente sobre la superficie del césped de *Clostridium perfringens* y se secó durante aproximadamente 30 minutos. Después de secar, la placa se incubó a 37 °C en una condición anaeróbica durante un día y después, se examinó para determinar la formación de zonas claras en la superficie del césped bacteriano. Si se generaba una zona clara donde había caído el filtrado, podía juzgarse que el bacteriófago capaz de destruir células de *Clostridium perfringens* estaba incluido en el filtrado. A través del procedimiento anterior, pudo obtenerse el filtrado que contenía el bacteriófago capaz de destruir las células de *Clostridium perfringens*.

Después de eso, el bacteriófago se aisló a partir del filtrado confirmado anteriormente que incluía el bacteriófago capaz de destruir células de *Clostridium perfringens*. El ensayo convencional de placas de fagos se usó para el aislamiento de bacteriófagos puros. En detalle, una placa de fagos formada en el transcurso del ensayo de placas de fagos se tomó mediante el uso de una punta esterilizada, que se añadió después a la solución de cultivo de *Clostridium perfringens*, seguido del cultivo en una condición anaeróbica a 37 °C durante 12 horas. Una vez completado el cultivo, se llevó a cabo una centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante. El sobrenadante recuperado se inoculó con cultivo de *Clostridium perfringens* a la proporción de 1/50, seguido del cultivo en una condición anaeróbica a 37 °C durante 12 horas. Para aumentar el título del bacteriófago, el procedimiento anterior se repitió al menos 5 veces. Después, se llevó a cabo una centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante. El ensayo de placas de fagos se realizó con el sobrenadante obtenido. En general, el aislamiento del bacteriófago puro no se completa mediante un procedimiento de una vez, por lo que el procedimiento anterior se repitió mediante el uso de la placa de fagos formada anteriormente. Después de al menos 5 veces de repetición del procedimiento, se obtuvo la solución que contenía el



bacteriófago puro. El procedimiento para el aislamiento del bacteriófago puro se repitió generalmente hasta que las placas de fagos generadas se volvieran similares en tamaño y morfología. El aislamiento final del bacteriófago puro se confirmó mediante la observación al microscopio electrónico. El procedimiento anterior se repitió hasta confirmar el aislamiento del bacteriófago puro bajo microscopio electrónico. La observación al microscopio electrónico se realizó mediante el método convencional. Brevemente, la solución que contenía el bacteriófago puro se cargó en una rejilla de cobre, seguido de tinción negativa con acetato de uranilo al 2 %. Después del secado de este, la morfología se observó bajo microscopio electrónico de transmisión. La micrografía electrónica del bacteriófago aislado en la presente invención se presenta en la Figura 1. A partir de la observación morfológica, el bacteriófago aislado anterior se identificó como perteneciente a la familia Myoviridae.

La solución que contenía el bacteriófago puro confirmado anteriormente se sometió a purificación. El caldo de cultivo de células de *Clostridium perfringens* se añadió a la solución que contenía el bacteriófago puro al volumen de 1/50 del volumen total de la solución del bacteriófago, seguido del cultivo de nuevo durante 12 horas. Una vez completado el cultivo, se llevó a cabo una centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 5 veces para obtener una solución que contenía cantidad suficiente del bacteriófago. El sobrenadante obtenido de la centrifugación final se filtró mediante un filtro de 0.45 µm, seguido de la precipitación convencional con polietilenglicol (PEG). Particularmente, PEG y NaCl se añadieron a 100 ml del filtrado hasta alcanzar 10 % PEG 8000/NaCl 0.5 M, que permaneció a 4 °C durante 2 ~ 3 horas. Después, se llevó a cabo una centrifugación a 8,000 rpm durante 30 minutos para obtener el precipitado de bacteriófago. El precipitado de bacteriófago resultante se resuspendió en 5 ml de tampón (Tris-HCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Gelatina al 0.1 %, pH 8.0). Esta solución se denominó como la suspensión del bacteriófago o solución del bacteriófago.

Como resultado, el bacteriófago puro purificado anteriormente se recogió, el cual se denominó como el bacteriófago Clo-PEP-1 y después se depositó en la Colección



Coreana de Tipos de Cultivos, Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea el 21 de agosto de 2014 (número de registro en el KCTC 12664BP).

Ejemplo 2: Separación y análisis de secuencia del genoma del bacteriófago Clo-PEP-1

El genoma del bacteriófago Clo-PEP-1 se separó de la siguiente manera. El genoma se separó de la suspensión del bacteriófago obtenida en el Ejemplo 1. En primer lugar, para eliminar ADN y ARN de las células de *Clostridium perfringens* incluidas en la suspensión, se añadieron 200 U de DNAasa I y RNAasa A cada una a 10 mL de la suspensión del bacteriófago, que se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Treinta minutos más tarde, para eliminar la actividad de DNAasa I y RNAasa A, se añadieron 500 μL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M, que se incubó durante 10 minutos. La suspensión se incubó además a 65 °C durante 10 minutos y después se añadieron 100 μL de proteinasa K (20 mg/mL) para romper la pared externa del bacteriófago, seguido de incubación a 37 °C durante 20 minutos. Después de eso, se añadieron 500 μL de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 %, seguido de incubación a 65°C durante 1 hora. A esto se añadieron 10 mL de la mezcla de fenol:cloroformo:isoamilalcohol en una relación de 25:24:1, y se mezcló bien. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos para separar cada capa. Se obtuvo la capa superior, a la que se añadió alcohol isopropílico al volumen de 1.5 veces el volumen de la capa superior, seguido de centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos para precipitar el genoma del bacteriófago. Después de recoger el precipitado, se añadió etanol al 70 % al precipitado, seguido de centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos para lavar el precipitado. El precipitado lavado se recuperó, se secó al vacío y después se disolvió en 100 μL de agua. Este procedimiento se repitió para obtener una cantidad suficiente del genoma del bacteriófago Clo-PEP-1.

La secuencia de nucleótidos del genoma del bacteriófago Clo-PEP-1 obtenida anteriormente se analizó por Secuenciación de Nueva Generación (NGS) mediante el uso del dispositivo Mi-Seq de Illumina en el Centro Nacional de Instrumentación para el Manejo Ambiental, en la Universidad Nacional de Seúl. Como resultado, se sugiere



que el genoma final del bacteriófago Clo-PEP-1 tiene un tamaño de 50,401 pb y la secuencia de nucleótidos del genoma completo tiene la sec. con núm. de ident.: 1.

La similitud de la secuencia genómica del bacteriófago Clo-PEP-1 obtenida anteriormente con las secuencias genómicas de bacteriófagos informadas previamente se investigó mediante el uso de BLAST en la Web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A partir del resultado de BLAST, fue difícil encontrar secuencias del bacteriófago que tuvieran más del 50 % de homología de secuencia con esta secuencia del bacteriófago. Basados en este resultado, se concluye que el bacteriófago Clo-PEP-1 debe ser un bacteriófago novedoso no informado anteriormente.

Ejemplo 3: Investigación de la capacidad de destrucción del bacteriófago Clo-PEP-1 contra *Clostridium perfringens*

Se investigó la capacidad de destrucción del bacteriófago aislado Clo-PEP-1 contra *Clostridium perfringens*. Para esto, se observó la formación de zonas claras mediante el ensayo de puntos de la misma manera a la descrita en el Ejemplo 1. Las células de *Clostridium perfringens* usadas para esta investigación fueron 15 cepas en total que se habían aislado e identificado como *Clostridium perfringens* anteriormente por los presentes inventores. El bacteriófago Clo-PEP-1 demostró su capacidad de destrucción contra 12 cepas de células de *Clostridium perfringens* usadas en este experimento. El resultado representativo de la prueba de la capacidad de destrucción se muestra en la Figura 2. Mientras tanto, se investigó además la actividad del bacteriófago Clo-PEP-1 para destruir *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Como resultado, se decidió que el bacteriófago Clo-PEP-1 no tenía actividad de destrucción contra estos microorganismos.

Por lo tanto, se confirmó que el bacteriófago Clo-PEP-1 tiene la capacidad específica de destruir células de *Clostridium perfringens* y un amplio espectro antibacteriano contra *Clostridium perfringens*, lo que sugiere que el bacteriófago Clo-PEP-1 de la presente



invención puede usarse como un ingrediente activo de la composición para la prevención y el tratamiento de infecciones de *Clostridium perfringens*.

Ejemplo 4: Efecto preventivo del bacteriófago Clo-PEP-1 en las infecciones de *Clostridium perfringens*

Se añadieron 100 µl de la solución del bacteriófago Clo-PEP-1 a 1×10^9 pfu/ml a un tubo que contenía 9 ml de TSB. A otro tubo que contenía 9 ml de TSB, solamente se añadió el mismo volumen de TSB. Después, el cultivo de *Clostridium perfringens* se añadió a cada tubo para preparar la suspensión bacteriana en 0.5 de OD₆₀₀. Después de eso, los tubos se transfirieron a una incubadora anaeróbica a 37 °C, seguido del cultivo, durante el cual se observó el crecimiento de células de *Clostridium perfringens*. Como se presenta en la Tabla 1, el crecimiento de células de *Clostridium perfringens* se inhibió en el tubo al que se le añadió la solución del bacteriófago Clo-PEP-1, mientras que el crecimiento de células de *Clostridium perfringens* no se inhibió en el tubo sin la solución del bacteriófago Clo-PEP-1.

Tabla 1
Inhibición del crecimiento de *Clostridium perfringens*

Grupo	OD ₆₀₀		
	Cultivo durante 0 min.	Cultivo durante 60 min.	Cultivo durante 90 min.
(-) solución de bacteriófago	0.5	0.9	1.2
(+) solución de bacteriófago	0.5	0.3	0.2

Los resultados anteriores indican que el bacteriófago Clo-PEP-1 no solamente inhibe el crecimiento de células de *Clostridium perfringens* sino que además puede destruirlas. Por lo tanto, el bacteriófago Clo-PEP-1 puede usarse como un ingrediente activo de la composición para prevenir las infecciones de *Clostridium perfringens*.



Ejemplo 5: Efecto terapéutico del bacteriófago Clo-PEP-1 en las infecciones de *Clostridium perfringens*

Se investigó el efecto terapéutico del bacteriófago Clo-PEP-1 en animales afectados por células de *Clostridium perfringens*. 40 polluelos de 2 días de edad se administraron oralmente con 1×10^7 cfu de células de *Clostridium perfringens* para infectar a los animales. Estos se dividieron en 2 grupos al azar. Un grupo experimental se alimentó con una mezcla de 1×10^8 pfu del bacteriófago Clo-PEP-1 por 1 g de piensos. El otro grupo control se alimentó del mismo modo sin bacteriófago Clo-PEP-1. Después de 2 días de reto, se midió la cantidad de células de *Clostridium perfringens* dentro del contenido de heces y el ciego de los animales. En esta medición, para evitar la intervención de otras bacterias contaminantes, se usó un medio selectivo (placa de TSC agar: OXOID) para las células de *Clostridium perfringens*. Como resultado, se demostró que el grupo experimental alimentado con bacteriófago Clo-PEP-1, debe disminuir las células de *Clostridium perfringens* en el contenido de las heces más de 500 veces y en el contenido del ciego más de 300 veces, en comparación con el grupo control sin el bacteriófago Clo-PEP-1. A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el bacteriófago Clo-PEP-1 de la presente invención puede ser muy eficaz para tratar enfermedades infecciosas provocadas por *Clostridium perfringens*.

Ejemplo 6: Preparación de aditivos alimentarios y piensos

Se preparó un aditivo alimentario que contenía el bacteriófago Clo-PEP-1 a una concentración de 1×10^8 pfu/g mediante el uso de la solución del bacteriófago Clo-PEP-1. El método de preparación de este fue de la siguiente manera: Se añadió maltodextrina (40 %, p/v) a la solución del bacteriófago y después, se añadió trehalosa al 10 % de la concentración final. Después de mezclar bien, la mezcla se liofilizó. Finalmente, la mezcla seca se trituró en polvos finos. El proceso de secado anterior puede sustituirse con secado al vacío, secado a temperatura cálida, o secado a temperatura ambiente. Para preparar el aditivo alimentario de control para la comparación, solamente se preparó un aditivo alimentario que no contenía el



bacteriófago pero contenía tampón (Tris-HCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, gelatina al 0.1 %, pH 8.0).

Los dos tipos anteriores de aditivos alimentarios se mezclaron con 1000 veces el volumen de pienso para cría de pollos respectivamente, lo que resultó en dos tipos de piensos finales.

Ejemplo 7: Preparación de aditivos para el agua potable y desinfectantes

El aditivo para agua potable y el desinfectante son diferentes en su uso previsto pero iguales en la composición, por lo que se han preparado de la misma manera. El aditivo para agua potable (o desinfectante) que contiene el bacteriófago Clo-PEP-1 a una concentración de 1×10^8 pfu/ml se preparó mediante el uso de la solución del bacteriófago Clo-PEP-1. Particularmente, para preparar el aditivo para el agua potable (o desinfectante), la solución del bacteriófago Clo-PEP-1 se añadió a la solución tampón para alcanzar 1×10^8 pfu/ml, que se mezcló bien. Para la comparación, la propia solución tampón anterior se usó como el aditivo para el agua potable (o desinfectante) que no contiene el bacteriófago.

Los dos tipos de aditivos preparados para el agua potable (o desinfectantes) se diluyeron en agua a la proporción de 1:1000, y después se usaron como agua potable o desinfectante.

Ejemplo 8: Efecto sobre la cría de pollos

Se investigó el efecto de los piensos, el agua potable y el desinfectante, preparados en el Ejemplo 6 y el Ejemplo 7, en la cría de pollos. Particularmente, la investigación se centró en la mortalidad. Un total de 120 polluelos de 2 días de edad se agruparon en tres grupos, y cada grupo estaba compuesto de 40 polluelos (grupo A: grupo de prueba con pienso, grupo B: grupo de prueba con agua potable; y grupo C: grupo de prueba con desinfectante). El experimento se continuó durante 4 semanas. Cada grupo se dividió en dos subgrupos que comprendían 20 polluelos cada uno. Los subgrupos se



dividieron de acuerdo con el tratamiento del bacteriófago Clo-PEP-1 o no (subgrupo-①: tratado con el bacteriófago Clo-PEP-1; y subgrupo-②: no tratado con el bacteriófago Clo-PEP-1). Los polluelos usados en este experimento se separaron en cada subgrupo y se criaron en una habitación separada ubicada a una distancia suficiente entre sí. Cada subgrupo se dividió y se denominó como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Subgrupos del experimento de cría de pollos

Item	Subgrupo	
	Tratado con el bacteriófago Clo-PEP-1	No tratado con el bacteriófago Clo-PEP-1
Alimentado con piensos	A-①	A-②
Proporcionado con el agua potable	B-①	B-②
Tratado con desinfectante	C-①	C-②

Los piensos se proporcionaron de acuerdo con el método convencional de suministro de pienso como se presenta en la Tabla 2 con los piensos preparados en el Ejemplo 6. El agua potable se proporcionó de acuerdo con el método convencional de suministro de agua como se presenta en la Tabla 2 con el agua potable preparada en el Ejemplo 7. Los pollos se trataron con el desinfectante tres veces a la semana alternando con el desinfectante convencional. Es decir, en el día cuando se roció el desinfectante de la presente invención, no se trató con el desinfectante convencional. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Mortalidad del experimento de cría de pollos

Grupo	Mortalidad (%)
A-①	0
A-②	40
B-①	5
B-②	35
C-①	0
C-②	35



A partir de los resultados anteriores, se confirmó que los piensos, el agua potable y el desinfectante, preparados de acuerdo con la presente invención, fueron eficaces en la reducción de la mortalidad de los animales. Por lo tanto, se concluye que la composición de la presente invención puede aplicarse de manera eficaz para la mejora de la productividad en la cría de animales.

Los expertos en la técnica comprenderán que las concepciones y modalidades específicas descritas en la descripción precedente pueden utilizarse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras modalidades para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. Aquellos con experiencia en la materia también comprenderán que tales modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones anexadas.

