

NOVEDOSO BACTERIÓFAGO ESC-COP-1 DE *E. COLI* TIPO F18 PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA Y SU USO PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE *E. COLI* TIPO F18 PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un bacteriófago aislado de la naturaleza que infecta y destruye *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, y un método para prevenir y tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 Esc-COP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir específicamente cepas de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, que tiene un genoma representado por la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 (número de registro en el KCTC 12662BP), y un método para prevenir las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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

Existen dos tipos de *Escherichia coli* (*E. coli*): *E. coli* no patogénica y *E. coli* patogénica. La *E. coli* no patogénica está en la flora residencial normal en los intestinos y es beneficiosa para lograr un equilibrio con otras enterobacterias, ayudando a la digestión, etc. La *E. coli* patogénica se adhiere a la pared intestinal a través de los pili para proliferar y produce enterotoxinas que provocan diarrea.

La *E. coli* patogénica afecta a diversos tipos de ganado sin importar las edades y da lugar a la diarrea, un síntoma notable, que posiblemente conduce a una alta mortalidad debido a la deshidratación. En Corea, se informa que esta diarrea se



produce en casi todas las granjas de ganado. Además, en caso de infecciones mixtas por Rotavirus, Coronavirus, protozoos Coccidium y similares, este brote es estimulado debido al daño de la mucosa enteral y los síntomas son muy graves, en comparación con el caso de infecciones individuales. Existen varias cepas patogénicas de *E. coli* que provocan diarrea. Principalmente, se ha informado con frecuencia que la *Escherichia coli* tipo F18 productora de toxina Shiga provoca diarrea grave y edema en los cerdos. La *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga se une a las células epiteliales del intestino a través de los pili (F18) para secretar la toxina Shiga. La toxina secretada es absorbida en los vasos sanguíneos lo que aumenta la presión sanguínea y daña las arteriolas, generando así edema en cada parte del cuerpo y se acompaña de convulsiones, parálisis y similares. Considerando el daño significativo en la industria ganadera provocado por la *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, se necesita desarrollar urgentemente un método para prevenir y tratar tales infecciones de manera eficaz. Una variedad de antibióticos se han usado para prevenir o tratar tales infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de un bacteriófago que se aísla de la naturaleza y puede destruir a *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga selectivamente, y además establecer un método para prevenir o tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 distinga 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, lo que conduce a la realización de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar un bacteriófago Myoviridae Esc-COP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 12662BP). Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para la prevención de infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, que comprende el bacteriófago Esc-COP-1 que puede infectar y destruir a *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, como un ingrediente activo, y un método para prevenir las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para el tratamiento de infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, que comprende el bacteriófago Esc-COP-1 que puede infectar y destruir a *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, como un ingrediente activo, y un método para tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un desinfectante para prevenir y tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de dicha composición.

Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un bacteriófago Myoviridae ESC-COP-1 que se aísla de la naturaleza y puede destruir específicamente a *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, que tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 (número de registro en el KCTC 12662BP), y un método para prevenir y tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de una composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo. El bacteriófago Esc-COP-1 se ha 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 12662BP). La presente invención proporciona además un desinfectante, un aditivo para el agua potable y un aditivo alimentario aplicables para la prevención o el tratamiento de infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, que comprende el bacteriófago Esc-COP-1 como un ingrediente activo.

Dado que el bacteriófago Esc-COP-1 incluido en la composición de la presente invención destruye *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga eficazmente, se considera eficaz para prevenir o tratar diarrea provocada por *E. coli* (infecciones) causadas por *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. Por lo tanto, la composición de la presente invención puede utilizarse para la prevención y el tratamiento de la diarrea provocada por *E. coli* cuya causa es *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. En esta descripción, la diarrea provocada por *E. coli* incluye síntomas provocados por las infecciones de *E. coli* acompañadas de fiebre, diarrea y similares.



En esta descripción, el término "tratamiento" o "tratar" indica (i) suprimir la diarrea provocada por *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga; y (ii) aliviar la diarrea provocada por *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga.

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 Esc-COP-1 se incluye como un ingrediente activo. En este punto, el bacteriófago Esc-COP-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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de esta composición que comprende el bacteriófago Esc-COP-1 como un ingrediente activo, tiene la ventaja de una alta especificidad para *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, en comparación con los métodos convencionales basados en los 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 Esc-COP-1.



la Figura 2 es una fotografía que ilustra la capacidad del bacteriófago Esc-COP-1 para destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. 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 del bacteriófago capaz de destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga

Las muestras se recogieron de la naturaleza para analizar el bacteriófago capaz de destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. Las *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga usadas para el aislamiento del bacteriófago en la presente descripción fueron las que habían aislado los presentes inventores e identificado como *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 trípica*) (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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga a la proporción de 1/1000, seguido de agitación del cultivo a 37 °C durante 3 ~ 4 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga a la proporción de 1/1000, seguido de agitación del cultivo a 37 °C durante 3 ~ 4 horas. Cuando la muestra contenía el bacteriófago, 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga estaba incluido en él o no.

El ensayo de puntos se realizó de la siguiente manera; el medio TSB se inoculó con *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga a la proporción de 1/1000, seguido de agitación del cultivo a 37 °C durante la noche. Tres $\text{m}\ell$ (1.5 de OD₆₀₀) del caldo de cultivo de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, 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 durante aproximadamente 30 minutos para secarse. Después del secado, 10 μ l del filtrado resultante se colocaron directamente sobre la superficie del césped de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga y se secó durante aproximadamente 30 minutos. Después de secar, la placa se incubó a 37 °C 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 a *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga estaba incluido en el filtrado. A través del procedimiento anterior, pudo obtenerse el filtrado que contenía el bacteriófago con la capacidad de destrucción de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga.

Después de eso, el bacteriófago se aisló a partir del filtrado confirmado anteriormente que incluía el bacteriófago capaz de destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, seguido del cultivo durante 4 ~ 5 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga a la proporción de 1/50, seguido del cultivo de nuevo durante 4 ~ 5 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga 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 4 ~ 5 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, se recogió el bacteriófago puro, purificado anteriormente, el cual se denominó como el bacteriófago Esc-COP-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 12662BP).

Ejemplo 2: Separación y análisis de secuencia del genoma del bacteriófago Esc-COP-1

El genoma del bacteriófago Esc-COP-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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, incluido 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 Esc-COP-1.

La secuencia de nucleótidos del genoma del bacteriófago Esc-COP-1 obtenida anteriormente se analizó mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS) con 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 Esc-COP-1 tiene un tamaño de 169,727 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 Esc-COP-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, se confirmó que la secuencia genómica del bacteriófago Esc-COP-1 tiene alta homología de secuencia con las secuencias del bacteriófago de *E. coli* vB_EcoM_ACG-C40 (núm. de registro del Genbank: JN986846.1), bacteriófago de *E. coli* RB14 (núm. de registro del Genbank: FH839692.1), bacteriófago de *E. coli* HY01 (núm. de registro del Genbank: KF925357.1), bacteriófago de *E. coli* RB51 (núm. de registro del Genbank: FJ839693.1) y bacteriófago de *E. coli* RB68 (núm. de registro del Genbank: KM607004.1) (96 %, 96 %, 97 %, 95 % y 95 %). Sin embargo, se discriminaron entre sí por el tamaño de sus genomas. Precisamente, se determinó que el genoma completo del bacteriófago Esc-COP-1 tiene un tamaño de 169,727 pb, mientras que el genoma completo del bacteriófago de *E. coli* vB_EcoM_ACG-C40 tiene un tamaño de 167,396 pb, el del bacteriófago de *E. coli* RB14 tiene un tamaño de 165,429 pb, el del bacteriófago de *E. coli* HY01 tiene un tamaño de 166,977 pb, el del bacteriófago de *E. coli* RB51 tiene un tamaño de 168,394 pb y el del bacteriófago de *E. coli* RB68 tiene un tamaño de 168,401 pb de manera distintiva. Además, se determinó que la cantidad de ORF (Marco Abierto de Lectura) dentro del genoma del bacteriófago Esc-COP-1 era de 275 ORF, mientras que la cantidad de ORF dentro del bacteriófago de *E. coli* vB_EcoM_ACG-C40 era de 273 ORF, el del bacteriófago de *E. coli* RB14 era de 274 ORF, el del bacteriófago de *E. coli* HY01 era de 257 ORF, y el del bacteriófago de *E. coli*



RB68 era de 276 ORF de manera distintiva. Pero la cantidad de ORF dentro del genoma del bacteriófago de *E. coli* RB51 era de 275 ORF, que es la misma que la del bacteriófago Esc-COP-1. Sin embargo, el arreglo de los ORF dentro del genoma del bacteriófago de *E. coli* RB51 fue muy diferente del bacteriófago Esc-COP-1.

Basados en este resultado, se concluye que el bacteriófago Esc-COP-1 debe ser un bacteriófago novedoso nunca antes informado.

Ejemplo 3: Investigación de la capacidad de destrucción del bacteriófago Esc-COP-1 contra *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga

Se investigó la capacidad de destrucción del bacteriófago aislado Esc-COP-1 contra *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. 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 *E. coli* tipo F18 productoras de toxina Shiga usadas para esta investigación fueron en total 10 cepas que se habían aislado e identificado como *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga anteriormente por los presentes inventores. El bacteriófago Esc-COP-1 demostró su capacidad de destrucción contra 9 cepas de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga usadas en este experimento. El resultado representativo de la prueba de la capacidad de destrucción se muestra en la Figura 2. Mientras tanto, también se investigó la actividad del bacteriófago Esc-COP-1 para destruir *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Como resultado, se concluyó que el bacteriófago Esc-COP-1 no tenía la actividad de destrucción contra estos microorganismos.

Por lo tanto, se confirmó que el bacteriófago Esc-COP-1 tiene la capacidad específica de destruir *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga y un amplio espectro antibacteriano contra *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, lo que sugiere que el bacteriófago Esc-COP-1 de la presente invención puede usarse como un ingrediente activo de la composición para prevenir y tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga.



Ejemplo 4: Efecto preventivo del bacteriófago Esc-COP-1 en las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga

Se añadieron 100 µl de la solución del bacteriófago Esc-COP-1 a 1×10^8 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 *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga se añadió a cada tubo para preparar una suspensión bacteriana en 0.5 de OD₆₀₀. Después de eso, los tubos se transfirieron a una incubadora a 37 °C, seguido de agitación del cultivo, durante el cual se observó el crecimiento de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. Como se presenta en la Tabla 1, el crecimiento de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga se inhibió en el tubo al que se le añadió la solución del bacteriófago Esc-COP-1, mientras que el crecimiento de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga no se inhibió en el tubo sin la solución del bacteriófago Esc-COP-1.

Tabla 1.

Inhibición del crecimiento de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga

Grupo	OD ₆₀₀		
	Cultivo durante 0 min.	Cultivo durante 60 min.	Cultivo durante 120 min.
(-) solución de bacteriófago	0.5	1.5	2.1
(+) solución de bacteriófago	0.5	0.4	0.3

Los resultados anteriores indican que el bacteriófago Esc-COP-1 no solamente inhibió el crecimiento de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga sino que además pudo destruirlas. Por lo tanto, el bacteriófago Esc-COP-1 puede usarse como un ingrediente activo de la composición para prevenir las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga.

Ejemplo 5: Efecto terapéutico del bacteriófago Esc-COP-1 en las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga

Se investigó el efecto terapéutico del bacteriófago Esc-COP-1 en animales afectados por *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga. Cuatro cerdos al destete de 25 días de



edad se agruparon juntos; un total de 2 grupos de cerdos se criaron en un corral de cerdos (1.1 m × 1.0 m) durante 14 días. Se proporcionó un sistema de calefacción y se controló el ambiente circundante. La temperatura y la humedad del corral de cerdos se controlaron y el suelo se limpió todos los días. En el 7^{mo} día del experimento, todos los animales se administraron oralmente con 1 ml de la suspensión de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga mediante el uso de un tubo de inyección oral. La suspensión de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga administrada anteriormente se preparó de la siguiente manera: La *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga se cultivó en medio TSB a 37 °C durante 18 horas y las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación. Se añadió solución salina (pH 7.2) al sedimento de células bacterianas para obtener una suspensión celular a una concentración de 10⁹ CFU/ml. A partir del próximo día del reto con *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, el grupo experimental (cerdos tratados con solución del bacteriófago) se administraron oralmente con el bacteriófago Esc-COP-1 (10⁹ PFU/individuo) por la misma vía que la utilizada para la administración anterior, dos veces al día. El grupo control (cerdos no tratados con la solución del bacteriófago) no recibió ningún tratamiento. Los piensos y el agua potable se proporcionaron igualmente a ambos grupos. Después del reto con *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga, todos los animales se observaron cada día para determinar la presencia de diarrea o no. La observación se realizó mediante la medición del índice de diarrea. El índice de diarrea se estableció de la siguiente manera de acuerdo con la puntuación de la consistencia fecal (FC) (normal: 0, heces sueltas: 1, diarrea moderada: 2, y diarrea grave: 3). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Puntuación de la consistencia fecal

Días después de tipo F18 productora de toxina Shiga <i>E. coli</i> enteroinvasiva	0	1	2	3	4	5	6	7
Grupo Control (- solución de bacteriófago)	2.25	2.5	2.5	2.25	2	2	1.5	1.5



Grupo experimental (+ solución de bacteriófago)	2.5	1.75	1	0.5	0.25	0.25	0	0
--	-----	------	---	-----	------	------	---	---

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el bacteriófago Esc-COP-1 de la presente invención puede ser muy eficaz para tratar las infecciones de *E. coli* tipo F18 productora de toxina Shiga.

Ejemplo 6: Preparación de aditivos alimentarios y piensos

El aditivo para pienso que contenía el bacteriófago Esc-COP-1 a una concentración de 1×10^8 pfu/g se preparó mediante el uso de la solución del bacteriófago Esc-COP-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 para alcanzar 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 1,000 veces el volumen de pienso para la cría de cerdos 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 el agua potable (o desinfectante) que contenía el bacteriófago Esc-COP-1 a una concentración de 1×10^8 pfu/ $\text{m}\ell$ se preparó mediante el uso de la solución del bacteriófago Esc-COP-1. Particularmente, para preparar el aditivo para el agua potable



(o desinfectante), la solución del bacteriófago ESC-COP-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 en la cría de cerdos

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 cerdos. Particularmente, la investigación se enfocó en las condiciones de la diarrea mediante la puntuación de la consistencia fecal usada en el Ejemplo 5. Un total de 30 cerditos se agruparon en tres grupos, y cada grupo estaba compuesto de 10 cerditos (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 2 semanas. Cada grupo se dividió en dos subgrupos que comprendían 5 cerditos cada uno. Los subgrupos se dividieron de acuerdo con el tratamiento del bacteriófago Esc-COP-1 o no (subgrupo-①: tratado con el bacteriófago Esc-COP-1; y subgrupo-②: no tratado con el bacteriófago). Los cerditos usados en este experimento eran cerdos al destete de 20 días de edad 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 3.

Tabla 3

Subgrupos del experimento de cría de cerdos

Item	Subgrupo	
	Tratado con el bacteriófago Esc-COP-1	No tratado con el bacteriófago
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 3 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 3 con el agua potable preparada en el Ejemplo 7. El tratamiento con desinfectante se realizó 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 4.

Tabla 4

Puntuación de la consistencia fecal del experimento de cría de cerdos

Grupo	Puntuación de la consistencia fecal													
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
A-①	0	0	0.2	0.2	0	0	0	0.2	0.2	0	0	0	0.2	0
A-②	0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2
B-①	0.2	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0.2	0	0
B-②	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2
C-①	0.2	0.2	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0	0	0.2	0	0	0
C-②	0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4

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 diarrea 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.

