

NOVEDOSO BACTERIÓFAGO PAS-MUP-1 DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* Y SU USO PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un bacteriófago aislado de la naturaleza que infecta y destruye células de *Pasteurella multocida*, y a un método para prevenir y tratar las infecciones por *Pasteurella multocida* usando una composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un bacteriófago Myoviridae Pas-MUP-1 (Acceso No. KCTC 12706BP) que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Pasteurella multocida* de manera específica, el cual tiene un genoma representado por la secuencia de nucleótidos SEQ. ID. No. 1, y un método para prevenir las infecciones de *Pasteurella multocida* y posteriormente tratarlas usando la composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo.

2. Descripción de la técnica relacionada

20

Pasteurella multocida es un bacilo inmóvil Gramnegativo, el cual se clasifica de acuerdo con los polisacáridos capsulares en 5 tipos: A, B, D, E y F. En detalle, *Pasteurella multocida* tipo A se asocia con enfermedades pulmonares en bovinos, ovinos y porcinos, *Pasteurella multocida* tipo B provoca sepsis hemorrágica en bovinos y búfalos, y *Pasteurella multocida* tipo D desencadena rinitis atrófica en cerdos. Como tal, *Pasteurella multocida* da lugar a múltiples enfermedades en animales de granja, llevando a serias pérdidas económicas en la industria ganadera. Por lo tanto, se requiere desarrollar un nuevo procedimiento para prevenir enfermedades y condiciones causadas por *Pasteurella multocida* en animales, y adicionalmente tratar las infecciones por *Pasteurella multocida*.

En los animales de granja, los antibióticos se utilizan bastante para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida*. Sin embargo, están emergiendo cepas bacterianas resistentes a antibióticos a fin de reducir continuamente la efectividad de los antibióticos. Además, dicho uso de antibióticos para animales está siendo

35



prohibido mediante regulaciones nacionales más fuertes. Por lo tanto, actualmente se requiere el desarrollo de un nuevo procedimiento efectivo incluso más que los antibióticos. Especialmente, se preferirán los métodos amigables con el ambiente.

- 5 Recientemente, el uso de bacteriófagos ha llamado nuestra atención como una nueva manera de tratar infecciones bacterianas. Particularmente, la razón de nuestro creciente interés en bacteriófagos es porque el tratamiento basado en bacteriófagos es un método amigable con la naturaleza. Los bacteriófagos son microorganismos extremadamente pequeños que infectan bacterias, los cuales, en pocas palabras, se
- 10 denominan fagos. Una vez el bacteriófago infecta la bacteria, el bacteriófago prolifera en el interior de la célula de la bacteria. Después de la proliferación, la progenie destruye la pared de la célula bacteriana para escapar del huésped, lo que sugiere que el bacteriófago tiene la capacidad de destruir a las bacterias. La infección del bacteriófago se caracteriza por su alta especificidad, de manera que cierto
- 15 bacteriófago infecta únicamente a una bacteria específica. Esto es, las bacterias que pueden ser infectadas por cierto bacteriófago son limitadas, lo que sugiere que el bacteriófago que puede destruir solo una bacteria específica y no puede dañar a otras bacterias. Debido a esta especificidad celular, el bacteriófago tiene efectos antibacterianos sobre las bacterias blanco y excluye bacterias comensales en
- 20 condiciones ambientales o internas del animal. Convencionalmente, antibióticos universales para uso terapéutico de bacterias afectan varios tipos de bacterias de manera coincidente, lo cual resulta en una gran cantidad de problemas de contaminación del ambiente, perturbación de la microflora normal de los animales y similares. Afortunadamente, el uso de bacteriófagos no afecta la microflora normal y
- 25 similares, por la destrucción selectiva de la bacteria diana. Por lo tanto, los bacteriófagos pueden ser seguros y, por consiguiente, con menor probabilidad de efectos adversos comparados con cualquier otro antibiótico.

- Los bacteriófagos se encontraron por primera vez por el bacteriólogo inglés Twort en
- 30 1915, cuando advirtió que las colonias de *Micrococcus* se fundían y se volvían transparentes por algo desconocido. En 1917, el bacteriólogo francés d'Herelle descubrió que la *Shigella dysenteriae* en el filtrado de heces de un paciente con disentería se fundían por algo, y estudió más a fondo 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*.

5

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 sobre bacteriófagos solo han continuado en algunos países del oeste europeo 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 incremento de bacterias resistentes a antibióticos. De manera que, los bacteriófagos sobresalen una vez más como un novedoso agente antibacterial que puede reemplazar a los antibióticos convencionales. Además, la reciente regulación sobre el uso de antibióticos ha sido fortalecida por los gobiernos a nivel mundial. El interés en los bacteriófagos está en mayor aumento, así como el logro de las aplicaciones industriales.

Como se demostró anteriormente, los bacteriófagos tienden a ser altamente específicos por las bacterias. La especificidad frecuentemente hace a los bacteriófagos efectivos sobre una parte de las bacterias, incluso las pertenecientes al mismo tipo. Adicionalmente, la efectividad del bacteriófagos es diferente, dependiendo de la cepa bacteriana diana. Por lo tanto, es necesario coleccionar varios tipos de bacteriófagos que sean útiles para controlar eficientemente bacterias específicas. De manera que, con el objeto de desarrollar el uso de bacteriófagos para hacer frente a *Pasteurella multocida*, varios bacteriófagos (varios tipos de bacteriófagos que proporcionan actividad antibacterial contra *Pasteurella multocida*) deben ser adquiridos. Además, los bacteriófagos resultantes deben ser cribados, sean o no superiores en cuanto a resistencia antibacteriana y espectro.

30

Por lo tanto, los presentes inventores trataron de desarrollar una composición aplicable para la prevención o tratamiento de infecciones de *Pasteurella multocida* mediante el uso de un bacteriófago que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Pasteurella multocida* selectivamente, y además establecer un método para prevenir o tratar las infecciones de *Pasteurella multocida* usando la composición.

35



En consecuencia, los presentes inventores aislaron bacteriófagos adecuados para este propósito y aseguraron la secuencia de nucleótidos del genoma que distingue al bacteriófago de la presente invención de otros bacteriófagos. Entonces, hemos desarrollado una composición que comprende el bacteriófago aislado como un
5 ingrediente activo, confirmando que esta composición puede usarse eficazmente para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida*, permitiendo la realización de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un bacteriófago Myoviridae Pas-MUP-1 (número de registro KCTC 12706BP) que se aísla de la naturaleza y puede destruir células de *Pasteurella multocida* de manera específica, el cual tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos SEQ. ID. No. 1.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para la prevención de infecciones de *Pasteurella multocida*, la cual comprende el bacteriófago Pas-MUP-1 que puede infectar y destruir células de *Pasteurella multocida*, como un ingrediente activo y un método para prevenir las infecciones de
20 *Pasteurella multocida* usando dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición aplicable para el tratamiento de infecciones de *Pasteurella multocida*, la cual comprende el bacteriófago Pas-MUP-1 que puede infectar y destruir células de *Pasteurella*
25 *multocida*, como un ingrediente activo y un método para tratar las infecciones de *Pasteurella multocida* usando dicha composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un desinfectante para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida* usando dicha composición.

30 También es otro objeto de la presente invención proporcionar un aditivo para piensos efectivo en la cría de animales mediante la prevención y tratamiento de infecciones de *Pasteurella multocida* usando dicha composición.



Para alcanzar los anteriores objetivos, la presente invención proporciona un bacteriófago Myoviridae Pas-MUP-1 (número de depósito KCTC 12706BP) que es aislado de la naturaleza y puede destruir células de *Pasteurella multocida* de manera específica, el cual tiene el genoma representado por la secuencia de nucleótidos SEQ.

5 ID. No. 1, y un método para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida* usando una composición que comprende el bacteriófago como un ingrediente activo.

El bacteriófago Pas-MUP-1 ha sido aislado por los presentes inventores y depositado en la Colección Coreana de Tipos de Cultivos, Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología el 7 de noviembre 2014 (número de depósito KCTC 12706BP).

Adicionalmente, la presente invención también proporciona un desinfectante y un aditivo para piensos aplicables para la prevención o tratamiento de infecciones de *Pasteurella multocida*, los cuales comprenden el bacteriófago Pas-MUP-1 como un

15 ingrediente activo.

Dado que el bacteriófago Pas-MUP-1 incluido en la composición de la presente invención destruye eficientemente células de *Pasteurella multocida*, se considera efectivo para prevenir o tratar enfermedades (infecciones) causadas por *Pasteurella multocida*. Por lo tanto, la composición de la presente invención puede ser utilizada para la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*.

20

En esta descripción, el término "prevención" o "prevenir" indica (i) detener las infecciones de *Pasteurella multocida*; y (ii) detener el desarrollo de enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*.

25

En esta descripción, el término "tratamiento" o "tratar" indica (i) suprimir las enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*; y (ii) aliviar la condición de enfermedad causada por *Pasteurella multocida*.

30

En esta descripción, el término "aislamiento" o "aislado" indica todas las acciones para separar el bacteriófago por medio de técnicas experimentales y para 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 uno que generalmente se usa en la preparación de formulaciones farmacéuticas, los cuales se ejemplifican con lactosa, dextrosa, sucrosa, sorbitol, manitol, almidón, goma acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa micro cristalina, polivinil pirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, polihidroxibenzoato, 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, emulsificantes, agentes suspensores y preservantes, además de los ingredientes anteriores.

En la composición de la presente invención, el bacteriófago Pas-MUP-1 se incluye como un ingrediente activo. En este punto, el bacteriófago Pas-MUP-1 se incluye en una 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 preferiblemente 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 ser formulada por métodos convencionales llevadas a cabo por personas versadas en la técnica con vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes en la forma de dosis unitaria o en envases con múltiples dosis. La formulación puede estar en la forma de solución, suspensión o emulsión en agua o en un medio soluble en agua, extracto, polvo, gránulos, tabletas o cápsulas y adicionalmente, se puede incluir un agente dispersante o estabilizante.

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.

Para este proceso, otros bacteriófagos que pueden conferir actividad antibacteriana contra otras especies bacterianas puede comprenderse adicionalmente en la composición de la presente invención con el objetivo de mejorar su efectividad.



Adicionalmente, otros tipos de bacteriófagos que tienen actividad antibacteriana contra *Pasteurella multocida* pueden ser comprendidos en la composición de la presente invención. Además, estos bacteriófagos se pueden combinar adecuadamente para maximizar efectos antibacterianos, debido a que la actividad
5 antibacteriana contra *Pasteurella multocida* puede ser diferencial respecto de la resistencia y espectro antibacterianos.

EFEECTO VENTAJOSO

10 El método para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida* usando esta composición que comprende el bacteriófago Pas-MUP-1 como un ingrediente activo, tiene la ventaja de la alta especificidad por *Pasteurella multocida*, comparado con los métodos convencionales basados en materiales químicos incluyendo los antibióticos convencionales. Es decir, la composición de la presente invención puede ser usada
15 para prevenir las infecciones de *Pasteurella multocida* de manera específica sin afectar la microflora normal y, en consecuencia, tiene menos efectos secundarios. En general, cuando se usan las sustancias químicas como los antibióticos, las bacterias comensales también se destruyen debilitando la inmunidad en animales con varios efectos secundarios. Mientras tanto, la composición de la presente invención usa el
20 bacteriófago aislado de la naturaleza como un ingrediente activo, de modo que es muy amigable con la naturaleza. Además, la actividad antibacterial del bacteriófago contra la bacteria blanco es diferente, incluso si pertenece a la misma especie, respecto de la resistencia y el espectro antibacterianos (dentro de varias cepas *Pasteurella multocida*, el rango antibacterial del bacteriófago contribuye a cada cepa.
25 Típicamente, los bacteriófagos usualmente son efectivos sobre una parte de las cepas bacterianas incluso en la misma especie. Es decir, la actividad antibacterial del bacteriófago es diferente dependiendo de la cepa bacteriana a pesar de pertenecer a la misma especie). Entonces, el bacteriófago de la presente invención puede proporcionar actividad antibiótica contra *Pasteurella multocida* diferente a la
30 suministrada por otros bacteriófagos que actúan sobre *Pasteurella multocida*. Por lo tanto, el bacteriófago de la presente invención puede proporcionar diferente aplicabilidad para la industria ganadera.



BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se comprende mejor con referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

5

La Figura 1 es una micrografía electrónica que muestra la morfología del bacteriófago Pas-MUP-1.

10

La Figura 2 es una fotografía ilustrando la capacidad del bacteriófago Pas-MUP-1 para destruir células de *Pasteurella multocida*. La zona clara en la placa de cultivos es la formación de la placa por lisis de las células de la bacteria blanco.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

15

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.

20

Ejemplo 1: Asilamiento de un bacteriófago capaz de destruir *Pasteurella multocida*

25

Las muestras se colectaron de la naturaleza para aislar el bacteriófago capaz de destruir *Pasteurella multocida*. Las cepas de *Pasteurella multocida* usadas para el aislamiento de bacteriófagos en la presente memoria fueron las cepas que habían sido aisladas por los presentes inventores e identificadas como *Pasteurella multocida* previamente.

30

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 *Pasteurella multocida* a la proporción de 1/1000, seguido de cultivo en agitación

35

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 *Pasteurella multocida* a una proporción de 1/1000, seguido de cultivo en agitación 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 suficientemente 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 µm. El filtrado resultante se usó en un ensayo de puntos para examinar si el bacteriófago capaz de *Pasteurella multocida* estaba incluido en él o no.

El ensayo de puntos se realizó de la siguiente manera; el medio TSB se inoculó con *Pasteurella multocida* en la proporción de 1/1000, seguido de cultivo con agitación a 37°C durante toda la noche. 3 ml (OD₆₀₀=1.5) del caldo de cultivo de *Pasteurella multocida* preparado anteriormente se dispersó en la placa con TSA (agar de soja tríptica; digerido pancreático de caseína, 17 g/L; digerido papaico de soya, 3 g/L; cloruro de sodio, 5 g/L; agar, 15 g/L). La placa permaneció en una cámara durante cerca de 30 minutos para secarla. Luego del secado, 10 µl del filtrado resultante se extendió directamente sobre la superficie del césped de *Pasteurella multocida* y se secó por cerca de 30 minutos. Después del secado, 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 *Pasteurella multocida* estaba incluido en el filtrado. A través del procedimiento anterior, pudo obtenerse el filtrado que contenía el bacteriófago capaz de destruir las células de *Pasteurella multocida*.

Después de eso, el bacteriófago se aisló a partir del filtrado confirmado anteriormente que incluía el bacteriófago capaz de destruir células de *Pasteurella multocida*. 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 *Pasteurella multocida*, seguido del cultivo a 37°C 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 *Pasteurella multocida* en una proporción de 1/50, seguido de cultivo a 37°C 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 microscopia electrónica. 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. Con base en las características morfológicas, se confirmó que el bacteriófago aislado anteriormente pertenecía a la familia Myoviridae.

La solución que contenía el bacteriófago puro confirmado anteriormente se sometió a purificación. El caldo de cultivo de *Pasteurella multocida* se añadió a la solución que contenía el bacteriófago puro al volumen de 1/50 del volumen total de la solución del bacteriófago, seguido de un nuevo 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. 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 del tampón (10 mM



Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% gelatina, pH 8.0). Esta solución se denominó suspensión del bacteriófago o solución del bacteriófago.

5 Como resultado, el bacteriófago puro purificado anteriormente se colectó, y se denominó bacteriófago Pas-MUP-1 y luego se depositó en la Colección Coreana de Tipos de Cultivos, Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea el 7 de noviembre de 2014 (número de depósito KCTC 12706BP).

Ejemplo 2: Separación y análisis de la secuencia del genoma del bacteriófago

Pas-MUP-1

El genoma del bacteriófago Pas-MUP-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 *Pasteurella multocida* incluidas en la suspensión, se adicionaron 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. 30 minutos más tarde, para eliminar la actividad de la DNAasa I y la 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/l) 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 agregaron 10 ml de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1, seguido de mezclar 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 Pas-MUP-1.



La secuencia de nucleótidos del genoma del bacteriófago Pas-MUP-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 Pas-MUP-1 tiene un tamaño de 39,497 pb y la secuencia de nucleótidos del genoma completo tiene la secuencia SEQ. ID. No. 1.

Con base en la secuencia genómica del bacteriófago Pas-MUP-1 obtenida anteriormente, se investigó la similitud con otras secuencias genómicas reportadas previamente mediante el uso de BLAST. A partir del resultado de BLAST, se demuestra que no existe una secuencia genómica que tenga más del 50% de homología con esta secuencia del bacteriófago Pas-MUP-1.

Basados en este resultado, se concluye que el bacteriófago Pas-MUP-1 es un nuevo bacteriófago no reportado anteriormente. Junto con este resultado, en este documento se refiere que cuando los bacteriófagos son diferentes en su tipo, su resistencia antibacteriana y espectro se vuelven típicamente diferentes. Por lo tanto, se concluye que el bacteriófago Pas-MUP-1 proporciona un tipo diferente de actividad antibacteriana valiosa comparada con otros bacteriófagos mencionados anteriormente.

Ejemplo 3: Investigación de la capacidad de destrucción del bacteriófago Pas-MUP-1 contra *Pasteurella multocida*

Se investigó la capacidad de destrucción del bacteriófago aislado Pas-MUP-1 contra *Pasteurella multocida*. 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. La *Pasteurella multocida* empleada para esta investigación correspondió a 10 cepas las cuales fueron aisladas e identificadas como *Pasteurella multocida* anteriormente por los presentes inventores. El bacteriófago Pas-MUP-1 demostró su capacidad de destrucción contra 9 cepas de la *Pasteurella multocida* usada 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 Pas-MUP-1 para destruir *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas aeruginosa*



cada una en una prueba separada. Como resultado, se encontró que el bacteriófago Pas-MUP-1 no tiene la actividad destructiva contra estos microorganismos.

Por lo tanto, se confirma que el bacteriófago Pas-MUP-1 tiene la habilidad específica de destruir *Pasteurella multocida* y un amplio espectro antibacteriano contra *Pasteurella multocida*, sugiriendo que el bacteriófago Pas-MUP-1 de la presente invención puede usarse como un ingrediente activo de la composición para prevenir y tratar las infecciones de *Pasteurella multocida*.

10 **Ejemplo 4: Efecto preventivo del bacteriófago Pas-MUP-1 en las infecciones de *Pasteurella multocida***

100 µl de la solución del bacteriófago Pas-MUP-1 a 1×10^8 pfu/ml se adicionó a un tubo que contenía 9ml de TSB, solamente se añadió el mismo volumen de TSB. Luego, el cultivo de *Pasteurella multocida* se agregó 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 *Pasteurella multocida*. Como se presenta en la Tabla 1, el crecimiento de células de *Pasteurella multocida* se inhibió en el tubo al que se le añadió la solución del bacteriófago Pas-MUP-1, mientras que el crecimiento de *Pasteurella multocida* no fue inhibido en el tubo sin adición de la solución del bacteriófago Pas-MUP-1.

【Tabla 1】

25 Inhibición del crecimiento *Pasteurella multocida*

Ítem	OD ₆₀₀		
	0 min.	60 min.	120 min.
(-) solución de bacteriófago	0.501	0.876	1.201
(+) solución de bacteriófago	0.501	0.308	0.286

Los resultados anteriores indican que el bacteriófago Pas-MUP-1 no solamente inhibe el crecimiento de *Pasteurella multocida* sino que además las destruye. Por lo tanto, se concluye que el bacteriófago Pas-MUP-1 puede ser usado como un ingrediente activo de la composición para prevenir las infecciones de *Pasteurella multocida*.



Ejemplo 5: Efecto preventivo del bacteriófago Pas-MUP-1 en las infecciones de *Pasteurella multocida* en un modelo animal

Se investigó el efecto preventivo del bacteriófago Pas-MUP-1 en cerdos destetados
5 afectados por *Pasteurella multocida*. Se agruparon 4 cerdos destetados de 25 días de edad; en total 2 grupos de cerdos fueron criados en cada corral (1.1 m × 1.0 m). Se instaló el sistema de calefacción y se controló el ambiente circundante. La temperatura y la humedad del corral se controlaron consistentemente y el piso se limpió cada día. Desde el primer día del experimento, los cerdos del grupo
10 experimental (agregando el antibiótico) se alimentaron con piensos adicionados con el bacteriófago Pas-MUP-1 a 1×10^8 pfu/g de acuerdo con el procedimiento convencional de alimentación, mientras que el grupo de control (sin adición del bacteriófago) se alimentó con el mismo alimento sin la adición del bacteriófago Pas-MUP-1 de acuerdo con el procedimiento convencional. Desde el séptimo día del
15 experimento, los piensos de ambos grupos fueron contaminados con 1×10^8 cfu/g de *Pasteurella multocida* durante 2 días y, a continuación, se proporcionaron dos veces al día respectivamente, para el grupo experimental y de control a fin de producir las infecciones de *Pasteurella multocida*. A partir del día siguiente del suministro de piensos contaminados durante 2 días (el noveno día del experimento), los cerdos del
20 grupo experimental (con bacteriófago adicionado) se alimentaron nuevamente con los piensos adicionados con el bacteriófago Pas-MUP-1 a 1×10^8 pfu/g sin contaminar *Pasteurella multocida* de acuerdo con el procedimiento convencional de suministro de alimento como antes, mientras que los cerdos del grupo control (sin adición de bacteriófago) se alimentaron con el mismo pienso sin adición del bacteriófago de
25 acuerdo con el procedimiento convencional. A partir del noveno día del experimento, se analizaron todas las pruebas de los animales para identificar si se detectaron células de *Pasteurella multocida* en su descarga nasal o no. En detalle, las muestras de descarga nasal (hisopo nasal en el interior de la cavidad nasal) se esparcieron en placas de agar sangre, se incubaron a 37°C durante 18 - 24 horas para el crecimiento
30 de las colonias bacterianas. Luego, las colonias resultantes fueron cribadas para seleccionar las células de *Pasteurella multocida*. Usando las muestras de colonia seleccionadas anteriormente, se llevó a cabo la reacción de polimerasa en cadena (PCR) específica para *Pasteurella multocida* a fin de identificar las células de *Pasteurella multocida*. El resultado se presenta en la Tabla 2.



【Tabla 2】

Detección de *Pasteurella multocida* (valores promedio)

Días	<i>Pasteurella multocida</i> colonias por placa (No.)					
	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Grupo de control (- bacteriófago)	15	14	16	15	14	13
Grupo experimental (+ bacteriófago)	4	3	1	0	0	0

De los resultados anteriores se confirma que el bacteriófago Pas-MUP-1 de la presente invención puede ser efectivo para suprimir las infecciones de *Pasteurella multocida*.

Ejemplo 6: Efecto terapéutico del bacteriófago Pas-MUP-1 en las infecciones de *Pasteurella multocida*

Se investigó el efecto terapéutico del bacteriófago Pas-MUP-1 en animales afectados por *Pasteurella multocida*. Cuatro cerdos al destete de 25 días de edad se agruparon; un total de 2 grupos de cerdos se criaron en un corral de cerdos (1.1 m × 1.0 m). Se proporcionó un sistema de calefacción y se controló el ambiente circundante. La temperatura y la humedad del corral de cerdos se controlaron consistentemente y el suelo se limpió todos los días. En el cuarto día del experimento, todos los cerdos fueron rociados en la cavidad nasal con 5 ml de una suspensión (10^9 cfu/ml) de *Pasteurella multocida* suspensión. La suspensión de *Pasteurella multocida* inoculada anteriormente se preparó de la siguiente manera: se cultivó *Pasteurella multocida* en un medio TSB a 37°C durante 18 horas y luego las células bacterianas resultantes se recuperaron. Se añadió solución salina (pH 7.2) al sedimento de células bacterianas para obtener una suspensión celular a una concentración de 10^9 CFU/ml. A partir del día siguiente del reto con *Pasteurella multocida*, el grupo experimental (con solución de bacteriófago adicionada) se administró nasalmente con el bacteriófago Pas-MUP-1 a 10^9 PFU/individuo dos veces al día por la misma vía que la utilizada para la administración anterior. El grupo control (no tratados con la solución del bacteriófago) no recibió ningún tratamiento. Los piensos y el agua potable se proporcionaron igualmente a ambos grupos. A partir del tercer día después del reto de *Pasteurella multocida* (el séptimo día del experimento), todos los animales se examinaron cada



día para determinar si habían o no sufrido de rinitis atrófica causada por *Pasteurella multocida*. La rinitis atrófica causada por *Pasteurella multocida* se evaluó detectando la presencia de células de *Pasteurella multocida* en la descarga nasal como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

5

【Tabla 3】

Detección de *Pasteurella multocida* (valores promedio)

	Colonias por placa de <i>Pasteurella multocida</i> (No.)							
Días	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Grupo control (- bacteriófago)	21	25	20	24	27	18	20	21
Grupo experimental (+ bacteriófago)	6	5	3	0	1	0	0	0

A partir de los anteriores resultados, se confirma que el bacteriófago Pas-MUP-1 de la presente invención puede ser muy efectivo para tratar las infecciones de *Pasteurella multocida*.

10

Ejemplo 7: Preparación de aditivos alimentarios y piensos

Los aditivos para pienso se prepararon mediante la adición de la solución del bacteriófago Pas-MUP-1 solución en la concentración de 1×10^8 pfu/g del aditivo para piensos. El método de preparación de este fue de la siguiente manera: Se añadió malto dextrina (40 %, p/v) a la solución del bacteriófago, se mezcló y luego se liofilizó. Finalmente, la mezcla seca se trituro en polvos finos. El procedimiento de secado anterior puede ser reemplazado por secado a una presión reducida, secado a temperatura cálida, o secado a temperatura ambiente. Para preparar el control, solamente se prepararon los aditivos para piensos que no contenían el bacteriófago, pero contenían solo el tampón (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% gelatina, pH 8.0).

25

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 8: Preparación de desinfectantes

Se prepararon desinfectantes que contenían el bacteriófago Pas-MUP-1 en una concentración de 1×10^8 pfu/ml mediante el uso de la solución del bacteriófago Pas-MUP-1. En detalle, para preparar el desinfectante, se agregó la solución del bacteriófago Pas-MUP-1 en la concentración de 1×10^8 pfu a 1 ml de tampón empleado para preparar la solución del bacteriófago, y luego se mezcló bien. Para preparar el control, la propia solución tampón anterior se usó como el desinfectante.

- Los dos tipos de desinfectantes preparados anteriormente se diluyeron en agua en una proporción de 1:1000, y se usaron como los desinfectantes finales.

Ejemplo 9: Efecto en la cría de cerdos

Se investigó el efecto de los piensos y el desinfectante, preparados en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 8, en la cría de cerdos. Particularmente, esta investigación se llevó a cabo mediante el examen de los grados de crecimiento de los animales y los signos clínicos asociados con la rinitis atrófica. Un total de 40 cerditos se agrupó en dos grupos, cada grupo estaba conformado por 20 cerditos (grupo A: grupo de prueba con pienso, grupo B: grupo de prueba con desinfectante). El experimento se continuó durante 2 semanas. Cada grupo se dividió en dos sub-grupos que comprendían 10 cerditos. Luego, los subgrupos se dividieron de acuerdo con el tratamiento del bacteriófago Pas-MUP-1 (sub-grupo-①: tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1; y sub-grupo-②: no tratado con el bacteriófago). Los cerditos usados en este experimento eran cerdos destetados de 20 días de edad. Cada subgrupo fue criado en una habitación separada ubicada a suficiente distancia entre sí. Cada subgrupo se dividió y se distinguió como se presenta en la Tabla 4.

【Tabla 4】

Subgrupos del experimento de cría de cerdos

Ítem	Subgrupo	
	Tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1	No tratado con el bacteriófago
Alimentado con piensos	A-①	A-②
Tratado con desinfectantes	B-①	B-②



Los piensos se suministraron de acuerdo con el método convencional de suministro de pienso como se muestra en la Tabla 4 con los piensos preparados en el Ejemplo 7. El tratamiento con desinfectantes 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. En consecuencia, se demuestra que el subgrupo tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1 debe ser significativamente sobresaliente en el grado de crecimiento, comparado con el subgrupo no tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1. Además, el signo clínico de rinitis atrófica no se encontró en el subgrupo tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1, pero se manifestó en cerca del 5% de los individuos del subgrupo no tratado con el bacteriófago. Adicionalmente, como se describe en Ejemplo 5, se examinaron los subgrupos separando o no las células de *Pasteurella multocida* de la descarga nasal. Como resultado, se muestra que las células de *Pasteurella multocida* deben ser detectadas en la descarga nasal de algunos animales del subgrupo no tratado con el bacteriófago, mientras que no se detectó en alguno de los animales del subgrupo tratado con el bacteriófago Pas-MUP-1.

A partir de los resultados anteriores, se confirma que los piensos y desinfectantes preparados de acuerdo con la presente invención fueron efectivos para mejorar los resultados en la cría de animales. Por lo tanto, se concluye que la composición de la presente invención puede ser aplicada eficientemente para mejorar 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.

