

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 467**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A23K 10/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/KR2011/009964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11852167 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2655603**

54 Título: **Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende el mismo**

30 Prioridad:

21.12.2010 US 201061425553 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.12.2016

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, SI YONG;
SHIN, SOO AN;
PARK, MIN TAE;
CHO, YOUNG WOOK;
KANG, IN HYE y
SHIN, EUN MI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 593 467 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo bacteriófago y a una composición antibacteriana que comprenden el mismo.

Técnica anterior

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae, caracterizada como bacterias gramnegativas, facultativamente anaerobias, no formadoras de esporas, con forma de bastón, y la mayoría de las cepas se mueven con flagelos. *Salmonella* tiene un contenido medio de GC genómico de un 50-52 %, que es similar al de *Escherichia coli* y *Shigella*. El género *Salmonella* es un microorganismo patógeno que causa infecciones en ganado así como en seres humanos. La división serológica contiene a *Salmonella enterica*, una especie de *Salmonella bacterium*, que tiene una diversidad de serotipos que incluyen *Gallinarum*, *Pullorum*, *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Typhi*, *Choleraesuis*, y *derby* (Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strokebine NA. *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*. En Murry PR, Baron EJ, y col., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. Washington DC American Society for Microbiology 1999;467-74; Ryan KJ. Ray CG (editores) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4ª ed). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.). De ellos, *Salmonella Gallinarum* y *Pullorum* son agentes patógenos adaptados en aves de corral, *Salmonella Typhi* un agente patógeno adaptado en seres humanos, *Salmonella Choleraesuis* y *Salmonella derby* son agentes patógenos adaptados en porcino, y *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* agentes patógenos para seres humanos y animales. Cada serovariedad causa enfermedad en las respectivas especies, dando como resultado un daño enorme a granjeros o consumidores.

Además, *Salmonella Enteritidis* (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "SE") y *Salmonella Typhimurium* (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "ST") son patógenos zoonóticos, que no muestran especificidad de huésped, al contrario que SG o SP (ZooBises Report; Reino Unido 2003).

SE y ST producen salmonelosis en aves, cerdos y ganado vacuno. La salmonelosis, causada por bacterias de *Salmonella*, es una infección aguda o crónica del tracto digestivo en el ganado, y muestra los síntomas principales de fiebre, enteritis, y septicemia, en ocasiones neumonía, artritis, aborto, y mastitis. La salmonelosis se produce en todo el mundo y, con mayor frecuencia, durante los meses de verano (T.R. Callaway y col., *J. Anim. Sci.* 86: E163-E172, 2008). En el ganado, algunos síntomas habituales incluyen pérdida de apetito, fiebre, diarrea de color marrón oscuro o moco sanguinolento en las heces. La infección aguda en los terneros conduce a una muerte rápida y la infección durante el embarazo conduce a muerte del feto debida a septicemia, dando como resultado un aborto prematuro (www.livestock.co.kr). En cerdos, la salmonelosis se caracteriza clínicamente por tres síndromes principales: septicemia aguda, enteritis aguda, y enteritis crónica. La septicemia aguda se produce en lechones de 2-4 meses de edad y la muerte normalmente se produce a los 2-4 días después del inicio de los síntomas. La enteritis aguda se produce durante el periodo de engorde y se acompaña de diarrea, fiebre elevada, neumonía, signos nerviosos. En algunos casos graves se puede producir decoloración de la piel. La enteritis crónica se acompaña de diarrea continua (www.livestock.co.kr).

Una vez que se produce un brote de salmonelosis por SE y ST en aves de corral, cerdos, y ganado vacuno, es difícil curar solamente con agentes terapéuticos. Las razones son que la bacteria *Salmonella* presenta una fuerte resistencia a diversos fármacos y vive en células que son impermeables a los antibióticos desde la aparición de los síntomas clínicos. Hasta ahora, no ha habido procedimientos para tratar de forma eficaz la salmonelosis causada por SE y ST, incluyendo antibióticos (www.lhca.or.kr).

Al igual que en el ganado, SE y ST causan infecciones en seres humanos a través del ganado y sus productos, lo que conduce a intoxicación alimentaria por *Salmonella*. La ingesta de productos de ganado porcino infectados cocinados de forma inadecuada (por ejemplo, productos de carne, productos de ave, huevos y productos secundarios) infecta a los seres humanos. La intoxicación alimentaria por *Salmonella* en seres humanos normalmente implica el inicio rápido de dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. Los síntomas normalmente aparecen a las 6-72 horas después de la ingesta del organismo y pueden persistir durante un periodo tan largo como 4-7 días o incluso mayor (NSW+HEALTH. 2008,01,14.).

De acuerdo con un informe de los CDC (The Centers for Disease Control and Prevention, EE.UU.), un 16 % de los brotes de intoxicación alimentaria en seres humanos entre 2005 y 2008 se atribuyeron a bacterias de *Salmonella*, siendo SE y ST responsables de un 20 % y un 18 % de las mismas, respectivamente. Con respecto a la intoxicación alimentaria por *Salmonella* en seres humanos entre 1973 y 1984, los vehículos de transmisión alimentaria implicados fueron supuestamente pollo (5 %), carne de res (19 %), cerdo (7 %), productos lácteos (6 %), y pavo (9 %). En 1974-1984, el ensayo de contaminación bacteriana en pollos para consumo durante el procedimiento de matanza mostraba un 35 % o más de incidencia de *Salmonella*. En 1983, la *Salmonella* se aisló en un 50,6 % de pollos, un 68,8 % de pavo, un 60 % de ganso, un 11,6 % de cerdo, y un 1,5 % de carne de res. Además, en una encuesta realizada en 2007 se indicó que la *Salmonella* se encontraba en un 5,5 % de carne de aves de corral sin procesar y un 1,1 % de cerdo sin procesar. En particular, se reveló que SE normalmente originada a partir de huevos

o carne de aves de corral, y ST de carne de cerdo, carne de aves de corral, carne de res contaminadas (www.cdc.gov; Centers for Disease Control and Prevention (CDC)). Por ejemplo, la intoxicación alimentaria causada por SE ha aumentado rápidamente en Estados Unidos, Canadá y Europa desde 1988, y algunos estudios epidemiológicos demostraron que esto se atribuía a huevos o alimentos que contenían huevo (Agre–Food Safety Information Service (AGROS). Domestic and foreign food poisoning occurrence and management trend. February, 2008). Una evaluación de riesgo dirigida por la FAO y la OMS en 2002 indicó que la incidencia de salmonelosis en seres humanos transmitida a través de huevos y carne de ave de corral parecía tener una relación lineal con el predominio de *Salmonella* observado en aves de corral. Esto significa que, cuando se reduce el predominio de *Salmonella* en aves de corral, la incidencia de salmonelosis en seres humanos disminuirá (*Salmonella* control at the source; Organización Mundial de la Salud. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Nota informativa n.º 03/2007). Recientemente, las preocupaciones con respecto a la seguridad alimentaria se han visto impulsadas por brotes de *Salmonella* en productos tan variados como cacahuates, espinacas, tomates, pistachos, pimientos y, más recientemente, masa para galletas (Jane Black y Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009).

Por estas razones, las infecciones por *Salmonella* se deben notificar en Alemania (secciones 6 y 7 de la ley alemana sobre prevención de enfermedades infecciosas, Infektionsschutzgesetz). Entre 1990 y 2005, el número de casos oficialmente registrados disminuyó de aproximadamente 200.000 casos a aproximadamente 50.000. Se calcula que una de cada cinco personas en Alemania es portadora de *Salmonella*. En Estados Unidos, cada año se informan aproximadamente 40.000 casos de infección por *Salmonella* (en.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-2).

Por lo tanto, existe una necesidad urgente del control de SE y ST, que causa salmonelosis en ganado vacuno y seres humanos. Los esfuerzos colaboradores de USDA y FDA han desarrollado una serie de estrategias eficaces para prevenir la salmonelosis que causa aproximadamente 1 millón de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos. Entre ellas una regla final, expedida por la FDA, es reducir la contaminación en huevos. La FDA ahora exige que los productores de huevos los analicen de forma regular para detectar *Salmonella* letal durante la producción, almacenamiento y transporte de los huevos. Como resultado, se calcula que cada año se evitarán 79.000 enfermedades y 30 muertes debidas a huevos contaminados (Jane Black y Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009). En Dinamarca, algunos cálculos conservadores de un análisis de costes y beneficio que compara los costes de control de la *Salmonella* en el sector de producción con los costes globales de salud pública por salmonelosis sugieren que las medidas de control de *Salmonella* ahorraron a la sociedad danesa 14,1 millones de dólares americanos en el año 2001 (*Salmonella* control at the source. Organización Mundial de la Salud. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Nota informativa n.º 03/2007).

Una enfermedad de aves domésticas causada por *Salmonella bacterium* es la tifosis aviar (TA), que está causada por un agente patógeno, *Salmonella Gallinarum* (denominado "SG" en lo sucesivo en el presente documento). La tifosis aviar (TA) es una enfermedad septicémica de aves domésticas tales como pollo y pavo, y el curso puede ser agudo o crónico con mortalidad elevada. Un informe reciente ha propuesto que la tifosis aviar se produce frecuentemente Europa, América del Sur, África, y en el sudeste asiático, con daños que aumentan cada año. Los brotes de FT en Corea del Sur se han notificado desde 1992 y las pérdidas económicas causadas por la FT en gallinas ponedoras de huevos morenos son muy graves (Kwon Yong–Kook, 2000 Annual Report on Avian Diseases. Information publication by National Veterinary Research & Quarantine Service. March, 2001; Kim Ae–Ran y col., The prevalence of pullorum disease–fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J. Vet. Res. 46(4): 347–353, 2006).

La pullorosis también está causada por una cepa de la bacteria *Salmonella*, *Salmonella Pullorum* (denominada "SP" en lo sucesivo en el presente documento). La pullorosis se produce en cualquier edad o estación, pero los pollos jóvenes son particularmente susceptibles a la enfermedad. Durante el último siglo, ha sido una enfermedad grave entre pollos jóvenes de 1-2 semanas de edad o más jóvenes. Desde la década de 1980, su aparición ha disminuido en gran medida. Sin embargo, ha vuelto a aumentar desde mediados de 1990 (Kwon Yong–Kook, 2000 Annual Report on Avian Diseases. Information publication by National Veterinary Research & Quarantine Service. March, 2001; Kim Ae–Ran y col., The prevalence of pullorum disease–fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J. Vet. Res. 46(4): 347–353, 2006).

En Corea del Sur, los brotes de tifosis aviar y pullorosis han aumentado desde la década de 1990, provocando daños económicos a los granjeros. Por esta razón, se ha usado una vacuna de SG viva atenuada en pollos de engorde para consumo para prevenir la tifosis aviar desde 2004 (Kim Ae–Ran y col., The prevalence of pullorum disease–fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J. Vet. Res. 46(4): 347–353, 2006). Su eficacia es dudosa, y el uso de la vacuna viva no se permite en aves ponedoras debido al riesgo de infecciones transmitidas por el huevo. Desafortunadamente, aún no hay estrategias preventivas disponibles en el mercado frente a la pullorosis, similar a la tifosis aviar. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas maneras de evitar la tifosis aviar y la pullorosis.

Mientras tanto, el bacteriófago es un tipo de virus especializado que infecta y destruye solamente bacterias, y se puede autorreplicar solamente dentro de las bacterias huésped. El bacteriófago consiste en material genético en forma de ADN o ARN mono o bicatenario rodeado por una cobertura proteica. Los bacteriófagos se clasifican según

su estructura morfológica y material genético. Existen tres formas estructurales básicas del bacteriófago conforme a su estructura morfológica: una cabeza con forma de icosaedro (de veinte lados) con una cola; una cabeza con forma de icosaedro sin una cola; y una forma filamentosas. Basándose en la estructura de su cola, los bacteriófagos que tienen una cabeza con forma de icosaedro con una cola y ADN lineal bicatenario como material genético, se en tres familias: Myoviridae, Siphoviridae, y Podoviridae, que se caracterizan por colas contráctiles, no contráctiles largas, y no contráctiles cortas, respectivamente. Los bacteriófagos que tienen una cabeza con forma de icosaedro sin una cola y ARN o ADN como material genético se dividen basándose en la forma de su cabeza componentes, y la presencia de una cobertura. Los bacteriófagos filamentosos que tienen ADN como material genético se dividen basándose en su tamaño, forma, cobertura, y componentes del filamento (H.W. Ackermann. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000; Arch. Virol., 146: 843–857, 2001; Elizabeth Kutter y col., Bacteriophages Biology and Application; CRC press).

Durante la infección, un bacteriófago ataca a una bacteria e inserta su material genético en la célula. Después de esto, un bacteriófago sigue uno de dos ciclos de vida, lítico o lisogénico. Los bacteriófagos líticos utilizan la maquinaria de la célula para preparar los componentes del fago. A continuación destruyen o lisan la célula, liberando nuevas partículas de fago. Los bacteriófagos lisogénicos incorporan su ácido nucleico en el cromosoma de la célula huésped y se replican con la misma en forma de una unidad sin destruir la célula. En ciertas condiciones, los fagos lisogénicos se pueden inducir para que sigan un ciclo lítico.

Después del descubrimiento de los bacteriófagos, inicialmente se depositó muchísima confianza en su uso para terapia en enfermedades infecciosas. Sin embargo, cuando los antibióticos de amplio espectro comenzaron a usarse de forma habitual, se observó que los bacteriófagos eran innecesarios debido a un espectro diana específico. No obstante, el uso incorrecto y el abuso de antibióticos han dado como resultado el aumento de las preocupaciones con respecto a la resistencia a antibióticos y los efectos nocivos de antibióticos residuales en los alimentos. En particular, se sabe que el promotor del crecimiento antimicrobiano (AGP), añadido a alimentos de animales para aumentar su crecimiento, induce resistencia a antibióticos y, por lo tanto, recientemente se ha introducido la prohibición del uso del AGP. En la Unión Europea, el uso de todos los AGP estaba prohibido desde 2006. Corea del Sur ha prohibido el uso de algunos AGP a partir de 2009, y está considerando restricciones sobre el uso de todos los AGP en 2013–2015.

Estas preocupaciones crecientes con respecto al uso de antibióticos han conducido a una reaparición del interés en los bacteriófagos como una alternativa a los antibióticos. En el documento de patente de Estados Unidos 6.485.902 (Uso de bacteriófagos para control de O157 de *Escherichia coli*, expedida en 2002) se divulgan siete bacteriófagos para control de O157:H de *E. coli*. En el documento de Patente de Estados Unidos 6.942.858 se divulgan dos bacteriófagos para control de diversos microorganismos (expedida a Nymox in 2005). Muchas compañías han intentado desarrollar de forma activa diversos productos usando bacteriófagos. EBI Food System (Europe) desarrolló un aditivo alimentario para prevenir la intoxicación alimentaria causada por *Listeria monocytogenes*, denominado Listex-P100, que es el primer producto de bacteriófago aprobado por la FDA de EE.UU. También se desarrolló un producto basado en fagos, LMP-102 como aditivo alimentario frente a *Listeria monocytogenes*, aprobado como GRAS (generalmente reconocido como seguro). En 2007, se desarrolló un lavado basado en fagos producido por OmniLytics para prevenir la contaminación por O157 de *E. coli* de carne de res durante la matanza, aprobado por el Servicio de Seguridad e Inspección de USDA (FSIS). En Europa, el fago NCIMB 30008 de *Clostridium sporogenes* y el fago NCIMB 30008 de *Clostridium tyrobutiricum* se registraron como conservantes de alimentos frente a LA contaminación de alimentos por *Clostridium* en 2003 y 2005, respectivamente. Tales estudios muestran que actualmente se están efectuando investigaciones en bacteriófagos para su uso como antibióticos frente a patógenos zoonóticos en productos de ganado.

Sin embargo, la mayoría de los estudios de biocontrol de fagos se han centrado en el control de *E.coli*, *Listeria* y *Clostridium*. La *Salmonella* también es un agente patógeno zoonótico y algunos daños debidos a este agente patógeno no se reducen. Como se ha mencionado anteriormente, dado que SE y ST presentan resistencia a múltiples fármacos, en Corea del Sur se ha realizado vigilancia de resistencia antimicrobiana a nivel nacional bajo el Decreto de Aplicación de la Ley para la Prevención de Enfermedades Contagiosas (Orden Ejecutiva 16961), la Ordenanza de aplicación de la Ley para la Prevención de Enfermedades Contagiosas (Orden 179 del Ministerio de Salud y Bienestar Social) y la Organización del Instituto Nacional de la Salud (Orden Ejecutiva 17164). Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollo de bacteriófagos para controlar *Salmonella*.

Divulgación

Problema de la técnica

Con el objetivo de superar los problemas que incluyen la resistencia a antibióticos que se producen después del uso incorrecto o uso excesivo de antibióticos, efectos perjudiciales de la presencia de restos de antibióticos en los alimentos, y los problemas generados por el uso de antibióticos de amplio espectro, los presentes inventores aislaron de fuentes naturales un bacteriófago nuevo definido en la reivindicación 1, que tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella*, causante de enfermedades importantes en ganado, e identificaron sus propiedades morfológicas, bioquímicas y genéticas. Los presentes inventores descubrieron que el bacteriófago tal como se reivindica tiene una actividad bactericida específica frente a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella*

5 *typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* sin afectar a las bacterias beneficiosas, además de mostrar resistencia a ácidos, al calor y a la sequedad excelentes y, por tanto, se puede aplicar a las composiciones que se pueden usar en la prevención y tratamiento de la salmonelosis causada por *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium*, intoxicación alimentaria producida por *Salmonella* producida por productos de ganado contaminado, y enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella gallinarum* o *Salmonella pullorum*, en particular, tifosis aviar o pullorosis, y a varios productos para el control de *Salmonella*, tales como aditivos para piensos animales y el agua de bebida para ganado, desinfectantes para graneros y limpiadores de productos cárnicos, completando de este modo la presente invención.

Solución de la técnica

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo bacteriófago tal como se define en la reivindicación 1, que tiene una actividad específica frente a una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, que comprenden el bacteriófago tal como se define en la reivindicación 1 como principio activo.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un aditivo para pienso animal y agua de bebida, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como principio activo.

20 Otro objeto más de la presente invención es un desinfectante y producto de limpieza, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como principio activo.

Efectos ventajosos

25 El nuevo bacteriófago tal como se define en la reivindicación 1 tiene una actividad bactericida específica frente a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, y resistencia a ácidos y al calor y a la desecación excelentes. Por lo tanto, se puede usar en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, incluyendo salmonelosis, intoxicación alimentaria por *Salmonella*, tifosis aviar y pullorosis, y también usar para el control de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*.

Descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es una fotografía de microscopía electrónica de ΦCJ8, que muestra que ΦCJ8 pertenece al grupo morfológico de la familia Siphoviridae, caracterizado por una cápside isométrica y una cola contráctil larga.

La FIG. 2 es una fotografía que muestra la formación de placas de ΦCJ8 en un cultivo de bacterias de *Salmonella*. Las placas de ΦCJ8 se formaron en los cultivos de SE, ST, SG y SP, pero no en los cultivos de SA, SB, SC y SD.

35 A: en un cultivo de SE;
B: en un cultivo de ST;
C: en un cultivo de SG;
D: en un cultivo de SP;
E: en un cultivo de SA;
F: en un cultivo de SB;
40 G: en un cultivo de SC; y
H: en un cultivo de SD;

La FIG. 3 es el resultado de SDS-PAGE del bacteriófago ΦCJ8 aislado, en el que se muestran patrones de proteína del bacteriófago, incluidas las proteínas principales de 41, 80, 15,5, 60 y 43 kDa (en el presente documento, como marcador, se usó la BenchMark Protein ladder (Invitrogen) sin teñir);

45 La FIG. 4 es el resultado de PFGE del bacteriófago ΦCJ8 aislado, que muestra el tamaño del genoma total de aproximadamente 39,2 a 44,1 kpb (en el que un patrón ADN CHEF de 5 kpb (BIO-RAD) se usa como marcador de tamaño).

La FIG. 5 es el resultado de la PCR, realizada usando cada conjunto de cebadores para el ADN genómico de ΦCJ8.

50 A: Producto de la PCR de 3,5 kpb de longitud obtenido con un conjunto de cebador de las SEQ ID NO: 6 y 7;
B: Producto de la PCR de 2,1 kpb de longitud obtenido con un conjunto de cebador de las SEQ ID NO: 8 y 9;
C: Producto de la PCR de 1,6 kpb de longitud obtenido con un conjunto de cebador de las SEQ ID NO: 10 y 11;
D: Producto de la PCR de 1,2 kpb de longitud obtenido con un conjunto de cebador de las SEQ ID NO: 12 y 13; y
55 E: Producto de la PCR de 1,4 kpb de longitud obtenido con un conjunto de cebador de las SEQ ID NO: 14 y

15

La FIG. 6 es el resultado de un ensayo de resistencia a ácidos en el bacteriófago ΦCJ8, que muestra el número de bacteriófagos que sobreviven a pH 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,0, 9,0, 9,8 y 11,0. El bacteriófago ΦCJ8 no perdía su actividad hasta pH 2,5, pero la perdía completamente a pH 2,5 o inferior, en comparación con el control.

La FIG. 7 es el resultado de ensayo de resistencia al calor en el bacteriófago ΦCJ8, que muestra el número de bacteriófago que sobreviven a 37, 45, 53, 60, 70 y 80 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 minutos. El bacteriófago ΦCJ8 mantenía su actividad incluso tras la incubación a 60 °C durante 2 horas, pero la perdía totalmente después de incubarlo a 70 °C durante 2 horas.

La FIG. 8 es el resultado de ensayo de resistencia a desecación en el bacteriófago ΦCJ8 realizado a 60 °C durante 120 minutos con la ayuda de un concentrador SpeedVec, en el que cuando se compararon los cambios de titulación viral antes y después de la desecación para estudiar la estabilidad relativa, la actividad disminuyó aproximadamente 50 veces.

La FIG. 9 es un gráfico en el que los pesos corporales de las ratas se representan frente al tiempo después de la administración de una sola dosis y el bacteriófago ΦCJ8. No se encontraron cambios significativos en el peso corporal incluso 14 días después de la administración, en comparación con el control.

- : Grupo control de machos a los que se administró la solución mixta de Tris-HCl 20 mM y MgCl₂ 2 mM;
- : grupo control de machos a los que se administró ΦCJ8 a una concentración de 1×10^{12} ufp;
- : grupo control de hembras a las que se administró la solución mixta de Tris-HCl 20 mM y MgCl₂ 2 mM; y
- : grupo control de hembras a los que se administró ΦCJ8 a una concentración de 1×10^{12} ufp.

Mejor modo

De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación se refiere a un nuevo bacteriófago aislado que tiene una actividad bactericida específica frente a *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella gallinarum* (SG) o *Salmonella pullorum* (SP).

Los presentes inventores recogieron muestras de aguas residuales en los mataderos de pollos y aislaron un bacteriófago que tenía una actividad bactericida específica contra SE, ST, SG y SP (véase la FIG. 2 y la Tabla 1). Como resultado del examen morfológico con un microscopio electrónico, el bacteriófago de la presente invención pertenece al morfotipo de la familia Siphoviridae, caracterizado por una cápside isométrica y una cola larga no contráctil (véase la FIG. 1).

El bacteriófago de la presente divulgación incluye las principales proteínas estructurales con el tamaño de aproximadamente 41, 80, 15,5, 60 y 43 kDa, según lo medido por un análisis de patrones de proteína (véase la FIG. 3).

Adicionalmente, el bacteriófago de la presente divulgación tiene, genéticamente, un tamaño del genoma total de aproximadamente 44,1 to 49 kpb (véase la FIG. 4) y puede incluir una o más moléculas de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1 a 5 dentro de todo el genoma. Asimismo, como resultado de la comparación de la similitud genética con otras especies basándose en las secuencias de nucleótidos anteriores, ya que hay una similitud genética muy baja entre el bacteriófago de la presente invención y los bacteriófagos conocidos, el bacteriófago de la presente invención es nuevo (véase la Tabla 2). Más particularmente, cuando el bacteriófago de la presente invención se somete a PCR usando uno o más conjuntos de cebadores seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs 6 y 7, SEQ ID NO: 8 y 9, SEQ ID NO: 10 y 11, SEQ ID NO: 12 y 13, y SEQ ID NO: 14 y 15, los productos de PCR resultantes son aproximadamente 3,5, 2,1, 1,6, 1,2 y 1,4 kb de tamaño, respectivamente (véase la FIG. 5).

Además, se observó que las placas de fagos (zonas claras formadas en un cultivo de células en agar blando debido a la lisis producida por el fago) resultantes de la infección por el bacteriófago de acuerdo con la presente invención en SE, ST, SG y SP tenían el mismo tamaño y turbidez (véase la FIG. 2).

El bacteriófago de la presente divulgación tiene las propiedades bioquímicas de resistencia a ácido y al calor. Como resultado del examen de la estabilidad en un amplio espectro de pH y de temperatura, el bacteriófago de la presente invención puede sobrevivir durante un intervalo de pH de 3,0 a 11,0 (véase la FIG. 6) y un intervalo de temperatura de 37 a 70 °C (véase la FIG. 7). Además, el bacteriófago de la presente divulgación tiene resistencia a la desecación para mantener de manera estable su actividad incluso después de la desecación a alta temperatura (véase la FIG. 8). Tales propiedades de resistencia a ácidos, calor, y desecación permiten la aplicación del bacteriófago de la presente invención en diversas condiciones de temperatura y pH en la producción de composiciones profilácticas o terapéuticas para las enfermedades del ganado causadas por SE, ST, SG y SP o enfermedades humanas causadas por el ganado contaminado.

Además, el bacteriófago de la presente divulgación puede infectar las cepas de tipo salvaje SE, ST, SG y SP (véase la Tabla 3).

Cuando el bacteriófago de la presente divulgación se administra por vía oral, no se observaron cambios en el peso

corporal, la mortalidad, los síntomas generales y anomalías en órganos (véase la FIG. 9, las tablas 4 y 5).

Asimismo, cuando el bacteriófago de la presente divulgación se utiliza como aditivo en la alimentación de pollos de engorde, no muestra ningún efecto negativo sobre el crecimiento o el desarrollo de los órganos y músculos de pollos de engorde (véanse las tablas 6 y 7).

5 Los resultados de las pruebas de eficacia, el efecto de desinfección y la eficiencia en la limpieza mostraron que, cuando se usa en granjas de ganado, el bacteriófago de la presente divulgación puede controlar con eficacia la *Salmonella* (SE) mediante la inhibición de su propagación y eliminación fecal (véanse las Tablas 8 y 9) y tiene una excelente y constante actividad bactericida contra *Salmonella* en diversas condiciones, en comparación con los productos de limpieza convencionales como control positivo.

10 Estos datos implican que el bacteriófago de la presente invención tal como se define en la reivindicación 1 se puede aplicar a diversos productos para el control de bacterias de *Salmonella*.

15 El bacteriófago de la presente divulgación que tiene una actividad bactericida específica contra SE, ST, SG y SP y las características anteriores se ha designado ΦCJ8 y se ha depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea del Sur) el 14 de diciembre de 2010, con el número de acceso KCCM11148P.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención atañe a una composición para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, que comprenden el bacteriófago tal como se reivindica como principio activo.

20 Al tener actividad bactericida específica frente a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, el bacteriófago de la presente invención se puede usar con el fin de prevenir o tratar las enfermedades causadas por ellas. La composición puede comprender además un antibiótico.

25 Preferentemente, entre los ejemplos de las enfermedades infecciosas se incluyen salmonelosis e intoxicación alimentaria por *Salmonella* con *Salmonella enteritidis* o *Salmonella Typhimurium*, tifosis aviar con *Salmonella Gallinarum* y pullorosis con *Salmonella Pullorum* incluyen, pero no se limitan a los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "samonelosis" se refiere a los síntomas que aparecen después de la infección con *Salmonella*, tales como fiebre, dolor de cabeza, diarrea y vómitos. Es decir, la salmonelosis es una infección con bacterias del género *Salmonella*, que se acompaña de dos síntomas representativos: septicemia, tal como fiebre tifoidea; y gastroenteritis aguda, tal como intoxicación alimentaria, enteritis, y bacteriemia aguda.

30 Como se usa en el presente documento, el término "prevención" pretende incluir todas las acciones para contener o retrasar la evolución de la enfermedad a través de la administración de la composición. El término "tratamiento", en este contexto, incluye todas las acciones para mejorar o cambiar de forma beneficiosa el estado del paciente a través de la administración de la composición.

35 La composición de la presente invención puede comprender el bacteriófago de la presente invención tal como se reivindica como principio activo en una cantidad de 5×10^2 a 5×10^{12} ufp/ml, y, preferiblemente, en una cantidad de 1×10^6 a 1×10^{10} ufp/ml.

La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se puede formular junto con el vehículo en alimentos, medicamentos y aditivos alimentarios.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que ni causa irritación significativa a un organismo ni degrada la actividad biológica ni las propiedades del principio activo administrado. Para uso en la formulación de la composición en una preparación líquida, un vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para estabilización y biocompatibilidad. Los ejemplos incluyen solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina fisiológica tamponada, solución de infusión de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, y etanol. Se pueden usar solos o en cualquier combinación. Si fuera necesario, se puede añadir a la composición otro aditivo convencional, tal como antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, etc. Cuando se combinan adicionalmente con diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y/o lubricantes, la composición de la presente invención se puede formular en inyecciones tales como soluciones acuosas, suspensiones y emulsiones, o píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos.

50 Las composiciones profilácticas o terapéuticas de la presente divulgación se pueden aplicar por vía local a las zonas afectadas mediante recubrimiento o pulverización. Como alternativa, la composición de la presente invención se puede administrar a través de vías orales o parenterales. Las vías parenterales están disponibles para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica.

Dependiendo de diversos factores que incluyen formulaciones, el modo de administración, la edad, el peso, el sexo,

el estado y la dieta del paciente o animal que se esté tratando, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de la reacción, la dosificación adecuada de la composición de la presente invención variara cuando se aplica, pulveriza o administra. Para los expertos en la materia será evidente que cuando la composición farmacéutica se administra a pacientes, la dosis diaria total adecuada la puede determinar un médico o veterinario a cargo del tratamiento dentro del alcance del criterio médico sensato.

Las preparaciones de dosificación oral de la composición de la presente divulgación pueden tomar la forma de comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o en emulsión, polvos o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las formas de dosificación oral, tales como comprimidos y cápsulas, pueden comprender un aglutinante tal como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, celulosa o gelatina, un excipiente tal como fosfato dicálcico, un agente disgregante tal como almidón de maíz o almidón de patata dulce, un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato cálcico, estearilfumarato sódico, o cera de polietilenglicol. Para cápsulas, se puede usar adicionalmente un vehículo líquido tal como lípido.

Para administración no oral, la composición de la presente divulgación se puede formular en inyecciones mediante las vías subcutánea, intravenosa, o intramuscular, supositorios, o pulverizaciones inhalables a través del tracto respiratorio, tales como aerosoles. Las formas de inyección se pueden preparar por disolución o suspensión de la composición de la presente invención, junto con un estabilizante o un tampón, en agua y cargando la solución suspensión en formas unitarias de ampollas o viales. Para pulverizaciones, tales como aerosoles, se puede usar un agente propulsor para la pulverización de un concentrado dispersado en agua o polvo de humectación en combinación con un aditivo.

El término "antibiótico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia o compuesto que se pueden administrar a animales para destruir bacterias o inhibir su crecimiento y pretende incluir agentes antisépticos, bactericidas y antibacterianos. Los animales son mamíferos, incluidos seres humanos. Gracias a la ventaja de presentar una especificidad más elevada para *Salmonella* con respecto a otros antibióticos convencionales, el bacteriófago de la presente invención puede eliminar los agentes patógenos sin afectar a las bacterias beneficiosas. Además, el bacteriófago de la presente invención no induce resistencia a fármacos de modo que se puede proporcionar como un nuevo antibiótico con un ciclo de vida largo.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un alimento o agua de bebida para animales, que comprende el bacteriófago tal como se reivindica como principio activo.

Los antibióticos de aditivos alimentarios usados en la industria de pesca y ganadería están destinados a prevenir infecciones. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos de aditivos alimentarios disponibles en la actualidad son problemáticos porque son aptos para inducir la aparición de cepas resistentes y se pueden transferir a seres humanos ya que permanecen en productos de ganado. La absorción de tales antibióticos residuales puede hacer que los patógenos humanos sean resistentes a antibióticos, lo que da como resultado la propagación de enfermedades. Además, muchos tipos de antibióticos de aditivos alimentarios, usados normalmente en combinación en alimentos para animales, pueden causar la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. Por lo tanto, el bacteriófago de la presente invención se puede usar como un antibiótico de aditivo alimentario que es lo suficientemente ecológico como para ser una solución a los problemas.

El pienso para animales de acuerdo con la presente invención se puede preparar mediante la adición del bacteriófago directamente o en una forma de aditivo alimentario separada a un pienso para animales. En un pienso para animales, el bacteriófago de la presente invención puede adquirir una forma líquida o una forma seca, y existe preferentemente en forma de un polvo seco. En este sentido, el bacteriófago de la presente invención se puede secar mediante secado con aire, secado natural, secado por pulverización o liofilización, pero estos procedimientos de secado no limitan la presente invención. El bacteriófago de la presente invención se puede añadir en forma de polvo en una cantidad de un 0,05 % a un 10 % en peso, preferentemente en una cantidad de un 0,1 % a un número 2 % en peso, basándose en el peso total del pienso para animales. El pienso para animales puede comprender otros aditivos convencionales útiles para la conservación del mismo a largo plazo, además del bacteriófago de la presente invención.

Al aditivo alimentario de la presente invención se le puede añadir otro microorganismo no patógeno. El microorganismo adicional disponible se puede seleccionar entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* que puede producir proteasa, lipasa e invertasa, cepa de *Lactobacillus* sp. que puede ejercer actividad fisiológica y una función de descomposición en condiciones anaerobias, tales como en el estómago de ganado, hongos filamentosos que incluyen *Aspergillus oryzae* (J. Animal. Sci. 43: 910–926, 1976) que aumenta el peso de los animales domésticos, aumenta la producción de leche y ayuda a la digestión y capacidad de absorción de los piensos, y levaduras que, incluye *Saccharomyces cerevisiae* (J. Anim. Sci. 56: 735–739, 1983).

El pienso para animales que comprende el bacteriófago de acuerdo con la presente invención puede incluir piensos basados en plantas, tales como granos, nueces, subproductos alimenticios, algas, fibra, subproductos farmacológicos, aceite, almidones, harina, subproductos de grano, y piensos de origen animal tales como proteínas, minerales, grasa, proteínas de células individuales, zooplancton, y desechos de alimentos, pero no se limita a los mismos.

El aditivo alimentario que comprende el bacteriófago de acuerdo con la presente invención puede incluir aditivos para prevenir el deterioro de la calidad, tales como aglutinantes, emulgentes y conservantes, y aditivos para aumentar la utilidad, tales como aminoácidos, vitaminas, enzimas, probióticos, aromatizantes, nitrógeno no proteico, silicatos, agentes de tamponamiento, agentes colorantes, extractos, y oligosacáridos, pero no se limita a los mismos.

- 5 Cuando se proporciona con agua de bebida que contiene el bacteriófago de la presente invención, la población de bacterias de *Salmonella* en el intestino del ganado se puede reducir continuamente en el mismo ganado. Como resultado, se puede producir ganado sin *Salmonella*.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un agente de limpieza o un desinfectante, que comprende el bacteriófago como principio activo.

- 10 El agente desinfectante que comprende el bacteriófago de la presente invención como principio activo es muy útil para la higiene de alimentos frente a, por ejemplo, intoxicación alimentaria. Con detalle, el agente desinfectante se puede usar, no solo como un agente o un aditivo alimentario para prevenir la contaminación con *Salmonella*, sino también en la producción de ganado sin *Salmonella*. Para eliminar la *Salmonella*, el agente desinfectante también se puede pulverizar sobre aguas residuales domésticas y se puede aplicar a granjas avícolas, mataderos, lugares en los que murió el ganado, espacios de cocina e instalaciones de cocina.

Además, el agente de limpieza que comprende el bacteriófago de la presente invención como principio activo se puede usar en una zona corporal de animales vivos, tales como la piel, las plumas y similares, que ya está contaminada o potencialmente contaminada con bacterias de *Salmonella*.

- 20 La composición de la presente invención se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica en animales o se puede ingerir en forma de una mezcla con alimentos o agua potable para animales y, preferentemente, en forma de una mezcla con pienso para animales. En la presente invención, los animales incluyen ganado, cerdos, pollos, aves de corral y seres humanos, pero no se limitan a los mismos.

- 25 Siempre y cuando alcance los tejidos diana, se puede tomar cualquier vía, ya sea oral o parenteral, para la administración de la composición de la presente invención. Con detalle, la composición de la presente invención se puede administrar a través de las vías oral, rectal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, transdérmica, intranasal, e inhalación.

Modo de la invención

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención mediante los ejemplos siguientes que se exponen para ilustrar pero que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

30 Ejemplo 1: Aislamiento de bacteriófago de *Salmonella*

1-1. Identificación sistemática de bacteriófago y aislamiento de bacteriófago individual

- De un matadero de pollos, localizado en Muan, Jeollanam-do, Corea del Sur, y de una planta de eliminación de aguas residuales cercana, se transfirieron 50 ml de cada muestra a un tubo de centrifuga, y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, seguido de filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm. Se mezclaron 18 ml del filtrado de muestra con 150 µl de un medio de cultivo en agitación de *Salmonella Enteritidis* (denominada "SE" en lo sucesivo en el presente documento) (DO₆₀₀ = 2) y 2 ml de medio de Luria-Bertani (LB), (10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 10 g de NaCl; en un volumen final de 1 l). La mezcla se cultivó a 37 °C durante 18 horas y a continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, tras lo cual el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Por separado, una mezcla de 3 ml de agar al 0,7 % (p/v) y 150 µl de del medio de cultivo en agitación de SE (DO₆₀₀ = 2) se vertió a través de una placa de LB y se permitió que solidificara. Sobre esta placa se extendieron 10 µl del filtrado de cultivo, seguido de incubación durante 18 horas a 37 °C (como "agar de cobertura" se usó agar al 0,7 % y la valoración del lisado del fago se realizó en la cobertura de agar, denominada técnica de superposición de agar blando).

- El medio de cultivo de la muestra que contenía el lisado del fago se diluyó adecuadamente, se mezcló con 150 µl de un medio de cultivo en agitación de SEE (DO₆₀₀ = 2) y después se sometió a ensayo de superposición de agar blando para producir placas individuales. Dado que una placa individual consistía en el mismo bacteriófago, se tomó una placa y se disolvió en 400 µl de una solución de SM (5,8 g de NaCl; 2 g de MgSO₄·7H₂O; 50 ml de Tris-Cl 1 M (pH 7,5); H₂O, en un volumen final de 1 l), y se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente para aislar un solo bacteriófago. Para amplificar el bacteriófago aislado, se tomaron 100 µl del sobrenadante de la solución de bacteriófago individual, mezclados con 5 ml de agar al 0,7 % y 100 µl de un medio de cultivo en agitación de SE, y se sometió a un ensayo de superposición de agar blando en una placa de LB (90 mm de diámetro). Se vertieron 5 ml de una solución de SM en una placa en la que se había completado la lisis, tras lo cual la placa se agitó cuidadosamente durante 4 horas a temperatura ambiente para eluir los bacteriófagos del agar de cobertura. La solución de SM que contenía los bacteriófagos eluidos se recuperó y se añadió cloroformo a la misma en una cantidad que corresponde a un 1 % del volumen final, y se mezcló bien durante 10 minutos. Después de centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, y

se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

1-2. Cultivo a gran escala del bacteriófago

El bacteriófago seleccionado se cultivó a gran escala usando SE. SE se cultivó con agitación. Después de centrifugar una alícuota de $1,5 \times 10^{10}$ ufc (unidades formadoras de colonias) a 4.000 rpm durante 10 minutos, el sedimento se volvió a suspender en 4 ml de una solución de SM. En la suspensión se inocularon $1,5 \times 10^6$ ufp (unidades formadoras de placas) del bacteriófago a una MOI (multiplicidad de infección) de 0,0001, seguido de incubación a 37 °C durante 20 minutos. Esta solución se inóculo en 150 ml de un medio de LB en un matraz, y se cultivó a 37 °C durante 5 horas. Al mismo se añadió cloroformo en una cantidad correspondiente a 1 % del volumen final antes de agitar la solución de cultivo durante 20 minutos. Se añadieron DNasa I y RNasa A hasta una concentración final de 1 µg/ml, respectivamente. La solución se dejó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron NaCl y PEG (polietilenglicol) hasta una concentración final de 1 M y un 10 % (p/v), respectivamente y se dejó a 4 °C durante un periodo adicional de 3 horas. La solución se centrifugó a 4 °C y 12.000 rpm durante 20 minutos para descartar el sobrenadante. El sedimento obtenido de este modo se resuspendió en 5 ml de la solución de SM y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A la suspensión se añadieron 4 ml de cloroformo y se mezclaron bien. Después de centrifugación a 4 °C y 4000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y, a continuación, se sometió a ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de glicerol para purificar un bacteriófago (densidad: 40 %, glicerol al 5 % a 35.000 rpm y 4 °C durante 1 hora). El bacteriófago purificado se denominó ΦCJ8. El bacteriófago ΦCJ8 se volvió a suspender en 300 µl de una solución de SM, seguido de valoración. El bacteriófago ΦCJ8 se depositó en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos 361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea del Sur) el 14 de diciembre de 2010 con el número de acceso KCCCM11148P.

Ejemplo 2: Examen sobre Infección de ΦCJ8 de salmonella

Para analizar la actividad lítica del bacteriófago seleccionado en especies de *Salmonella* distintas de SE, se realizaron intentos de infección cruzada con otras especies de *Salmonella*. Como resultado, ΦCJ8 no infectó a SC (*Salmonella choleraesuis*), SD (*Salmonella derby*), SA (*Salmonella arizonae*) y SB (*Salmonella bongori*), pero sí infectó a SE (*Salmonella enteritidis*), ST (*Salmonella typhimurium*), SG (*Salmonella gallinarum*) y SP (*Salmonella pullorum*). Los resultados se resumen en la tabla 1 y se muestran en la FIG. 1.

Tabla 1

Infección de ΦCJ8 de <i>Salmonella</i>					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placa	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placa
SE	SGSC 038	O	SA	ATCC 12398	X
ST	SGSC 14028	O	SB	ATCC 12397	X
SG	SGSC 2293	O	SC	ATCC 10708	X
SP	SGSC 2295	O	SD	ATCC 2466	O
* ATCC: Centro de recursos biológicos globales * SGSC: Centro de reserva genética de <i>Salmonella</i>					

30 Ejemplo 3: Análisis morfológico de ΦCJ8

El ΦCJ8 purificado se diluyó en una solución de gelatina al 0,01 %, y a continuación se fijó en una solución de glutaraldehído al 2,5 %. La muestra se depositó sobre una placa de mica revestida con carbono (aproximadamente 2,5 × 2,5 mm), se adaptó durante 10 minutos y se lavó con agua destilada estéril. Se montó una película de carbono en una rejilla de cobre, se tiñó con acetato de uranilo al 2 % durante 3-5 segundos, y se secó. El examen con un microscopio electrónico de transmisión (LIBRA 120, microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss a 80 kV, aumento de X 120.000 ~ x 200.000), mostró que el ΦCJ8 purificado consistía morfológicamente en una cápside isométrica y una cola no contráctil larga, lo que indica que pertenece a un grupo de morfotipo de la familia Siphoviridae.

Ejemplo 4: Análisis del patrón proteico de ΦCJ8

40 Se mezclaron 15 µl de una solución purificada de ΦCJ8 a una titulación de 10^{12} ufp/ml con 3 µl de una solución de muestra de SDS 5X, y se calentó durante 5 minutos. La proteína total de ΦCJ8 se pasó por un SDS-PAGE al 15 %. A continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas principales se detectaron a aproximadamente 41, 80, 15,5, 60 y 43 kDa, como se muestra en la FIG. 3.

Ejemplo 5: Tamaño del ADN genómico total de ΦCJ8

El ADN genómico de ΦCJ8 se aisló usando ultracentrifugación. En este sentido, a una solución de cultivo de ΦCJ8 purificado se añadieron EDTA (ácido etilendiaminotetraacético (pH 8,0)), proteinasa K y SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración final de 20 mM, 50 ug/ml, y 0,5 % (p/v), respectivamente, seguido de incubación a 50 °C durante 1 hora. Se añadió un volumen igual de fenol (pH 8,0) y se mezcló bien. Después de centrifugación a 12.000 rpm y a temperatura ambiente durante 10 minutos, el sobrenadante se mezcló bien con un volumen igual de PCI (fenol:cloroformo=1:1). Otra centrifugación a 12.000 rpm y a temperatura ambiente durante 10 minutos produjo un sobrenadante que se mezcló a continuación con un volumen a 1/10 de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol frío al 95 %, y se dejó a -20 °C durante 1 hora. Después de ello, la mezcla resultante se sometió a centrifugación a 0 °C, 12.000 rpm durante 10 minutos, para retirar completamente un sobrenadante. El ADN resultante se disolvió en 50 µl de TE (Tris- EDTA (pH 8,0)). El ADN extraído se diluyó 10 veces y la absorbancia se midió a DO₂₆₀ para determinar su concentración. Se cargó 1 µg del ADN genómico total sobre gel de agarosa PFGE al 1 % (electroforesis en gel de campo pulsado) y se sometió a electroforesis a temperatura ambiente durante 20 horas con la ayuda de un programa de sistema de PFGE de BIO RAD (intervalo de tamaño de 25-100 kpb; rampa del tiempo de desplazamiento 0,4-2,0 segundos, forma lineal; tensión directa 180 V; tensión inversa 120 V). Como se muestra en la FIG. 4, el ADN genómico de ΦCJ8 tenía una longitud en el intervalo de aproximadamente 44,1 a 49 kpb.

Ejemplo 6: Análisis genético de ΦCJ8

El análisis genético del ΦCJ8 purificado comenzó con doble digestión de 5 µg del ADN genómico de ΦCJ8 con tres combinaciones de enzimas de restricción: Sall y XhoI, EcoRV y NruI, HincII y PvuII. Por otra parte, un vector pBluescript II SK(+) se digirió con EcoRV y se trató con CIP (fosfatasa alcalina intestinal de ternera). El ADN genómico digerido se mezcló en una proporción de 3:1 con el vector y se ligó a 16 °C durante 2 horas. El vector recombinante resultante se transformó en *E. coli* DH5α, que después se sembró en una placa de LB que contenía ampicilina y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) para la selección de colonias de color azul/blanco. Las colonias seleccionadas se cultivaron durante 16 horas en medio LB que contenía ampicilina con agitación. A continuación, los plásmidos se extrajeron usando un kit de purificación de plásmidos (Promega).

La clonación de los plásmidos se confirmó por PCR usando un conjunto de cebadores de M13 directos e inversos (SEQ ID NO: 16 y 17) y solamente seleccionaron fragmentos de inserto con un tamaño de 1 kb o superior. Los plásmidos seleccionados de este modo se sometieron a análisis de secuencia usando los conjuntos de cebador. Las secuencias de bases obtenidas de este modo se proporcionaron en las SEQ ID NO: 1 a 5, teniendo cada una un tamaño de aproximadamente 1 a 4 kb, y se analizó la similitud de secuencias con la ayuda de los programas blastx y blastn del NCBI. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Similitud de Secuencias entre ΦCJ8 y otros bacteriófagos						
N.º	Organismo	Proteína	Blastx			
			Consulta	Sujeto	Identidad	Valor e
1	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	1 – 672	6 – 516	183/224 (81 %)	1e – 97
	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	1 – 675	6 – 230	181/225 (80 %)	3e – 96
	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural	651 – 211	345 – 491	116/147 (78 %)	2e – 57
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural putativa	651 – 235	345 – 481	92/139 (66 %)	1e – 47
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	amidasa	1 – 171	159 – 215	55/57 (96 %)	6e – 24
	Fago E1 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	1 – 171	160 – 216	53/57 (92 %)	1e – 22
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	ADN polimerasa	524 – 3	258 – 431	141/174 (81 %)	3e – 73
2	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	524 – 3	258 – 431	141/174 (81 %)	3e – 73
	Fago SSL–2009a de Enterobacterias	ADN polimerasa I	524 – 48	259 – 438	104/195 (53 %)	2e – 48
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	3 – 440	36 – 181	144/146 (98 %)	9e – 69

(continuación)

Similitud de Secuencias entre ΦCJ8 y otros bacteriófagos						
N.º	Organismo	Proteína	Blastx			
3	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	3 – 440	23 – 168	144/146 (98 %)	1e – 68
	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	555 – 1	180 – 364	175/185 (94 %)	4e – 95
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	558 – 1	179 – 364	172/186 (92 %)	2e – 94
4	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural	3 – 917	162 – 466	300/305 (98 %)	3e – 174
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural putativa	3 – 194	162 – 465	285/304 (93 %)	2e – 174
	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural	915 – 253	272 – 491	189/221 (85 %)	3e – 94
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	Proteína estructural putativa	915 – 277	272 – 481	164/213 (76 %)	4e – 83
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	Helicasa putativa	2 – 811	384 – 653	258/270 (95 %)	1e – 131
5	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	2 – 811	37 – 306	259/270 (95 %)	2e – 130
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	Helicasa putativa	904 – 197	588 – 821	216/236 (91 %)	6e – 109
	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	904 – 197	241 – 474	213/236 (90 %)	8e – 108

Ejemplo 7: Análisis por PCR usando cebadores específicos de ΦCJ8

5 Para identificar a ΦCJ8, se diseñaron cebadores específicos de ΦCJ8 basándose en las SEQ ID NO: 1 a 5. La PCR se realizó usando cada conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 6 y 7, SEQ ID NO: 8 y 9, SEQ ID NO: 10 y 11, SEQ ID NO: 12 y 13, y SEQ ID NO: 14 y 15. Se añadieron 0,1 µg del ADN genómico de bacteriófago y 0,5 pmol de cada cebador a una mezcla previa (Bioneer) y el volumen final se ajustó a 20 µl. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización; 94 °C durante 1 minuto, hibridación; 60 °C durante 1 minuto y polimerización; 72 °C durante 1 minuto después de la desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguido de la amplificación final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR obtenidos de este modo tenían una longitud de aproximadamente 3,5, 2,1, 1,6, 1,2 y 1,4 kpb, respectivamente. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

Ejemplo 8: Estabilidad al pH de ΦCJ8

15 Para determinar si ΦCJ8 sobrevive al ambiente de pH bajo el estómago del ganado, su estabilidad se evaluó en un intervalo de pH amplio (pH 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,2, 9,0, 9,8, 11,0). Se prepararon varias soluciones de pH (tampón de acetato sódico (pH 2,1, 4,0, 5,5 y 6,4), tampón de citrato sódico (pH 2,5, 3,0 y 3,5), tampón de fosfato sódico (pH 6,9 y 7,4) y Tris-HCl (pH 8,2, 9,0, 9,8 y 11,0)) para que tuvieran una concentración de 2 M. Se mezclaron 180 µl de cada solución de pH con 20 µl de una solución de bacteriófago ($1,1 \times 10^{11}$ ufp/ml) seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó en serie y se cultivaron 10 µl de cada dilución a 37 °C durante 18 horas de acuerdo con un procedimiento de superposición de agar blando para determinar las titulaciones de los lisados de fago. Los cambios de la titulación de acuerdo con la diferencia de pH se compararon para examinar la estabilidad relativa. Los resultados mostraron que el bacteriófago no perdía su actividad y permanecía estable hasta un pH de 3,0. Sin embargo, perdía su actividad a pH 2,5 o inferior. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

Ejemplo 9: Estabilidad al calor de ΦCJ8

25 Para analizar la estabilidad de un bacteriófago al calor generado durante el procedimiento de formulación cuando se usó como aditivo para piensos, se realizó el siguiente experimento. Se incubaron 200 µl de una solución de ΦCJ8 con una titulación $1,0 \times 10^{11}$ ufp/ml a 37, 45, 53, 60, 70 y 80 °C, durante 10, 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. La solución se diluyó en serie y se cultivaron 10 µl de cada dilución a 37 °C durante 18 horas de acuerdo con un procedimiento de superposición de agar blando para determinar las titulaciones de los lisados de fago. Los cambios de la titulación de acuerdo con la temperatura y el tiempo de exposición se compararon para examinar la estabilidad relativa. Los resultados mostraron que el bacteriófago conservaba su actividad tras una incubación a 60 °C hasta 2 horas. Sin embargo, el bacteriófago perdió rápidamente su actividad tras la incubación a 80 °C durante 10 minutos o más. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

Ejemplo 10: Tolerancia a la desecación de ΦCJ8

Para analizar la estabilidad del bacteriófago en condiciones de desecación durante el procedimiento de formulación cuando se usó como aditivo para piensos, se realizó el siguiente experimento. Basándose en los resultados obtenidos a partir del ensayo de estabilidad al calor, el experimento se realizó en condiciones de desecación a temperatura ambiente (a 60 °C durante 120 minutos). Se secaron 200 µl de una solución de ΦCJ8 ($6,0 \times 10^{11}$ ufp/ml) usando un Speed vacuum (Speed–Vacuum Concentrator 5301, Eppendorf). El sedimento obtenido se resuspendió completamente en 200 µl de la solución SM a 4 °C durante un día. La solución se diluyó en serie y se cultivaron 10 µl de cada muestra diluida se cultivó a 37 °C durante 18 horas de acuerdo con un procedimiento de superposición de agar blando para determinar las titulaciones de los lisados de fago. Los cambios de la titulación antes y después de la desecación se compararon para examinar la estabilidad relativa. Los resultados mostraron que su actividad se reducía en aproximadamente 50 veces. Los resultados se muestran en la FIG. 8.

Ejemplo 11: Examen del espectro de infección de ΦCJ8 en cepas de salmonella de tipo silvestre

Además de SE (SCSG SE2282), ST (ATCC ST14028), SG (SGSC SG2293) y SP (SGSC SP2295), la actividad lítica de ΦCJ8 se analizó para la SE de tipo silvestre coreana (49 cepas), ST (25 cepas), SG (53 cepas), SP (19 cepas), SC (7 cepas) y SD (3 cepas), obtenidas del laboratorio de enfermedades aviares, del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Seúl, y Servicio Nacional de Investigación Veterinaria y de Cuarentena y los Centros de Corea para el control y Prevención de Enfermedades.

Se mezclaron 150 µl de cada cepa en medio de cultivo con agitación ($DO_{600} = 2$) y se cultivaron 10 µl de solución ΦCJ8 (10^{10} ufp/ml) a 37 °C durante 18 horas de acuerdo con un procedimiento de superposición de agar blando, y se examinó la formación de placas. Se encontró que el bacteriófago ΦCJ8 mostraba actividad lítica de 95 % contra SE, ST, SG y SP. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Actividad lítica de ΦCJ8 contra las cepas de tipo silvestre coreanas SE, ST, SG y SP					
Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8	Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8
		Formación de placas			Formación de placas
SG	SNU SG1	O		SGSC SE2282	O
	SNU SG2	O		SGSC SE2377	O
	SNU SG3	O		PT4 S1400194	O
	SNU SG4	O		PT4 LA52	O
	SNU SG5	O		NVRQS SE004	O
	SNU SG6	O		NVRQS SE005	O
	SNU SG7	O		KCDC SE008	O
	SNU SG8	O		KCDC SE009	O
	SNU SG9	O		KCDC SE010	O
	SNU SG10	O		KCDC SE011	O
	SNU SG11	X		KCDC SE012	O
	SNU SG12	O	SE	KCDC SE013	O
	SNU SG13	O		KCDC SE014	O
	SNU SG14	O		KCDC SE015	O
	SNU SG15	O		KCDC SE016	O
	SNU SG16	O		KCDC SE017	O
	SNU SG17	O		KCDC SE018	O
	SNU SG18	O		KCDC SE019	O
	SNU SG19	O		KCDC SE020	O
	SNU SG20	O		KCDC SE021	O
	SNU SG21	O		KCDC SE022	O
	SNU SG22	O		KCDC SE023	O
	SNU SG23	O		KCDC SE024	O

ES 2 593 467 T3

(continuación)

Actividad lítica de ΦCJ8 contra las cepas de tipo silvestre coreanas SE, ST, SG y SP					
Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8	Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8
		Formación de placas			Formación de placas
	SNU SG24	O		KCDC SE025	O
	SNU SG25	O		KCDC SE026	O
	SNU SG26	O		KCDC SE027	O
	SNU SG27	O		KCDC SE028	O
	SNU SG28	O		KCDC SE029	O
	SNU SG30	O		KCDC SE030	O
	SNU SG31	O		KCDC SE031	O
	SNU SG32	O		KCDC SE032	O
	SNU SG33	O		KCDC SE033	O
	SNU SG34	O		KCDC SE034	O
	SNU SG36	O		KCDC SE035	O
	SNU SG37	O		KCDC SE036	O
	SNU SG38	O		KCDC SE037	O
	SNU SG39	O		KCDC SE038	O
	SNU SG40	O		KCDC SE039	O
	SNU SG41	O		KCDC SE040	O
	SNU SG42	O		KCDC SE041	O
	SNU SG43	X		KCDC SE042	O
	SNU SG44	O		KCDC SE043	O
	SNU SG45	X		KCDC SE044	O
	SNU SG46	O		KCDC SE045	O
	SNU SG47	X		KCDC SE046	O
	SNU SG48	O		KCDC SE047	O
	SNU SG49	O		KCDC SE048	O
	SNU SG50	O		KCDC SE049	O
	SGSC SG9184	O		KCDC SE050	O
SGSC SG2292	O	ST	SNU ST1	O	
	SGSC SG2293	O		SNU ST2	O
	SGSC SG2744	O		SNU ST3	O
	SGSC SG2296	O		SNU ST4	O
SP	SNU SP1	O		SNU ST7	O
	SNU SP4	O		SNU ST8	O
	SNU SP5	O		SNU ST11	O
	SNU SP8	O		SNU ST12	O
	SNU SP11	O		SNU ST13	O
	SGSC SP2294	O		SNU ST14	O
	SGSC SP2295	O		SNU ST17	O
	SGSC SP2737	X		SNU ST18	X

(continuación)

Actividad lítica de ΦCJ8 contra las cepas de tipo silvestre coreanas SE, ST, SG y SP					
Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8	Serotipo	Nombre de la cepa	ΦCJ8
		Formación de placas			Formación de placas
	SGSC SP2739	O		SNU ST19	X
	SGSC SP2742	O		SNU ST20	O
	SGSC SP2743	O		SNU ST25	O
	SGSC SP2745	O		SNU ST26	O
	SGSC SP2751	O		SNU ST37	O
	SGSC SP4663	O		SNU ST38	O
	SGSC SP4664	O		SNU ST41	O
	SGSC SP4665	O		SNU ST42	O
	SGSC SP4666	O		ATCC UK1	O
	SGSC SP4667	O		ATCC 14028S	O
	SGSC SA1684	O		SGSC STM1412	O
SC	ATCC SC10708	X		SGSC STM260	O
	ATCC SC2929	X		SGSC STM SA2197	O
	ATCC SC2930	O		ATCC SD2466	O
	ATCC SC2931	X	SD	ATCC SD2467	X
	ATCC SC2932	O		ATCC SD2468	O
	ATCC SC2933	O	SA	ATCC 12398	X
	ATCC SC2425	O	SB	ATCC 12397	X

* SNU: Laboratorio de enfermedades aviares, del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Seúl
 * SGSC: Centro de reserva genética de *Salmonella*
 * ATCC: Centro de recursos biológicos globales
 * NVRQS: Servicio Nacional de Investigación Veterinaria y Cuarentena
 * KCDC: Centros coreanos para el control y prevención de enfermedades

Ejemplo 12: Ensayo de Toxicidad de ΦCJ8

Para uso seguro en la prevención de la salmonelosis, la intoxicación alimentaria por *Salmonella*, la tifosis aviar y la pullorosis, el bacteriófago se sometió a un análisis de la toxicidad *in vivo*. El ensayo de toxicidad se realizó con dosis orales individuales. En este ensayo, se administró a las ratas por vía oral una sola dosis de ΦCJ8 y se controló la toxicidad aguda para determinar las concentraciones letales aproximadas de ΦCJ8. Las ratas macho y hembra (10 ratas de cada uno) sin patógeno específico (SPE) de 7 semanas de edad se mantuvieron en ayunas antes de la administración de ΦCJ8. El día de la administración, se administró a los machos y las hembras (5 ratas de cada uno) 1×10^{13} ufp de ΦCJ8 por vía oral y una solución mixta de Tris-HCl 20 mM y MgCl₂ 2mM a 5 ratas como grupo control tras 4 horas, para comenzar la realimentación. El día de la administración, las ratas se examinaron 30 minutos después de la administración, y cada 4 horas. Durante 14 días, los signos clínicos se examinaron y se registraron una vez al día. Como resultado, no hubo ninguna muerte animal y no se observaron signos clínicos debido a la toxicidad de ΦCJ8. Los resultados se muestran en las Tablas 4 a 6. Los cambios en el peso corporal se midieron y se registraron antes de la administración, y 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración. Como se muestra en la figura. 9, no se produjeron cambios significativos en el peso corporal, en comparación con el grupo control. Los resultados indican que ΦCJ8 no induce ninguna reacción tóxica que cause pérdida de apetito o cambios en el peso corporal. Además, no se encontraron anomalías notables en ningún órgano, tal como se analizó en la autopsia y a simple vista. Por lo tanto, el nuevo bacteriófago ΦCJ8 no es tóxico.

Tabla 4

Incidencia de muerte después de la administración oral de ΦCJ8																
Sexo	Realizado (ufp)	Días después del tratamiento														Nº de muertos/n.º animales tratados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
																0/5
Varones	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	10 ¹³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Mujeres	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	10 ¹³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Tabla 5

Signos clínicos después de la administración oral de ΦCJ8					
Sexo	Realizado (ufp)	Mortalidad final		Signos clínicos	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras
Machos	Control	0/5	0/5	0/5	0/5
	10 ¹³	0/5	0/5	0/5	0/5
Hembras	Control	0/5	0/5	0/5	0/5
	10 ¹³	0/5	0/5	0/5	0/5

5

Tabla 6

Anomalia orgánica después de la administración oral de ΦCJ8			
Sexo	Realizado (ufp)	Hallazgo macroscópico	Frecuencia ^A
Machos	Control	Ausencia de hallazgos macroscópicos	5/5
	10 ¹³	Ausencia de hallazgos macroscópicos	5/5
Hembras	Control	Ausencia de hallazgos macroscópicos	5/5
	10 ¹³	Ausencia de hallazgos macroscópicos	5/5

^A Número de animales con el signo/número de animales examinados.

Ejemplo 13: Eficiencia de ΦCJ8 como aditivo alimentario

Con el fin de examinar la seguridad y el efecto preventivo de ΦCJ8 en *Salmonella* para su uso como aditivo alimentario, se midieron el crecimiento y los pesos relativos de los órganos y músculos. En este experimento, se utilizó un total de 320 pollos de engorde machos, pollos Ross de 2 días de edad (peso corporal promedio de 41,4 g) durante 5 semanas del ensayo de alimentación. Se asignaron a 4 tratamientos (control: dieta basal, BP-1: dieta basal + ΦCJ8 0,05 %, BP-2: dieta basal + ΦCJ8 0,10 %, BP-3: dieta basal + ΦCJ8 0,20 %) con 8 repeticiones y 10 pollos por corral en diseño de bloques completos aleatorios (RCB). En este momento, ΦCJ8 tenía un título de 10⁹ ufp/g. El siguiente experimento se llevó a cabo con una dieta basada en maíz-soja y se usaron programas de alimentación de dos fases. En la fase I, se suministró una dieta que contiene 23,0 % de proteína cruda y 1,19 % de lisina durante 2 semanas. En la fase II, se suministró una dieta que contiene 21,0 % de proteína cruda y 1,05 % de lisina durante las últimas 3 semanas. Todos los otros nutrientes cumplieron o excedieron los requisitos de Corea del estándar de alimentación de aves de corral (2007).

Como resultado, suplementación con ΦCJ8 en los piensos para pollos de engorde durante 5 semanas del ensayo de

5 alimentación no causó ningún efecto negativo sobre el rendimiento del crecimiento en pollos de engorde (Tabla 7). No hubo diferencias significativas en los pesos relativos de los órganos, tales como el hígado, el bazo, la grasa abdominal, el músculo de la pechuga, y el músculo de la pata y los músculos entre tratamientos (Tabla 8). Estos resultados indican que la suplementación de ΦCJ8 no indujo ningún efecto negativo sobre el crecimiento o el desarrollo de órganos y músculos de pollos de engorde a una concentración de 0,05 a 0,2 %. El suplemento continuo de ΦCJ8 durante 5 semanas desde la cría hasta el envío de pollos de engorde no mostró ningún efecto negativo sobre el crecimiento o el desarrollo de los órganos y músculos de pollos de engorde, lo que confirma la seguridad de ΦCJ8. Estos resultados sugieren que la intoxicación alimentaria causada por *Salmonella enteritidis* se puede prevenir en los consumidores de los pollos alimentados con el suplemento ΦCJ8 debido a su actividad bactericida específica contra el patógeno.

10

Tabla 7

Efecto del pienso suplementado con ΦCJ8 sobre los rendimientos de crecimiento en pollos de engorde					
Criterios	Tratamiento ^A				SEM ^B
	CON	BP-1	BP-2	BP-3	
Peso del hígado (g/ave)					
Inicial	41,4	41,4	41,4	41,4	0,03
2 semanas	382,1	369,6	379,6	375,6	2,68
5 semanas	1.988,40	1.959,00	1.999,90	1.991,10	10,64
Ganancia de PC (g/ave)					
0-2 semanas	340,7	328,2	338,4	334,3	2,69
2-5 semanas	1.606,30	1.589,50	1.620,30	1.615,50	9,28
0-5 semanas	1.947,00	1.917,70	1.958,60	1.949,70	10,64
Ingesta del pienso (g/ave)					
0-2 semanas	483,7	471,7	476,4	481,9	2,73
2-5 semanas	2.727,30	2.740,70	2.789,60	2.728,90	20,35
0-5 semanas	3.210,90	3.212,40	3.266,00	3.210,70	21,69
FCR(relación F/G)					
0-2 semanas	1,42	1,44	1,41	1,45	0,01
2-5 semanas	1,7	1,73	1,72	1,69	0,01
0-5 semanas	1,65	1,68	1,67	1,65	0,01

^A Control (dieta basal), BP-1 (dieta basal + ΦCJ8 0,05 %), BP-2 (dieta basal + ΦCJ8 0,10 %), BP-3 (dieta basal + ΦCJ8 0,20 %).

^B Error estándar de la media

Tabla 8

Efecto de los piensos suplementados con ΦCJ8 en los pesos relativos de los órganos y músculos de pollos de engorde					
Criterios	Tratamiento A				SEM ^B
	CON	BP-1	BP-2	BP-3	
Hígado, g/100 g de PC	1,88	1,93	1,77	1,79	0,16

(continuación)

Efecto de los piensos suplementados con Φ CJ8 en los pesos relativos de los órganos y músculos de pollos de engorde					
Criterios	Tratamiento A				SEM ^B
	CON	BP-1	BP-2	BP-3	
Grasa abdominal, g/100 g de PC	2,23	2,22	2,31	2,15	0,14
Músculo de la pechuga, g/100 g de PC	7,8	7,64	7,57	7	0,23
Músculo de la pata, g/100 g de PC	9,31	9,43	9,44	9,47	0,09
^A Control (dieta basal), BP-1 (dieta basal + Φ CJ8 0,05 %), BP-2 (dieta basal + Φ CJ8 0,10 %), BP-3 (dieta basal + Φ CJ8 0,20 %). ^B Error estándar de la media					

Ejemplo 14: Efectos inhibidores de Φ CJ8 en la propagación y eliminación fecal de SE

5 Con el fin de examinar el potencial de Φ CJ8 para prevenir o tratar *Salmonella*, se evaluaron sus efectos inhibitorios en los pollos. El ensayo de eficacia se realizó en 270 poblaciones parentales en una granja avícola bajo un estricto control de *Salmonella*. Las ponedoras de 270 días de edad se dividieron en tres grupos de tratamiento y un grupo control positivo (60 pollos jóvenes), y un grupo de control negativo (30 pollos jóvenes) y cada grupo se crió por separado.

10 A los tres grupos de tratamiento con Φ CJ8 se administró pienso que contenía Φ CJ8 a una concentración de 10^5 , 10^7 y 10^9 ufp/kg, respectivamente, y se alimentó a los grupos positivos y negativos con pienso normal. Entre 60 pollos jóvenes de cada grupo de tratamiento, se expuso a 30 pollos jóvenes por vía oral a SE (*Salmonella enteritidis*: 5×10^7 UFC/ave)("grupo de exposición"), y se crió a los 30 pollos jóvenes restantes con el grupo the tratamiento expuesto a SE ("grupo infectado por contacto"). A los 7, 14 y 21 días de la exposición a SE, se aisló SE de las heces fecales de cada 10 pollos jóvenes del grupo de exposición y el grupo infectado infectadas por contacto y se realizó un análisis cuantitativo. A los 7, 14 y 21 días de la exposición a SE, se recogieron muestras se de la puerta de entrada, el suelo y el filtro de ventilación en las instalaciones de los grupos de tratamiento y control de los pollos jóvenes, y se comparó el aislamiento cuantitativo de *Salmonella*.

20 A los 7, 14 y 21 días de la exposición a SE se observó la reducción de la *Salmonella* intestinal en los grupos de exposición a los que se administró Φ CJ8 de 10^7 y 10^9 ufp/kg y sus grupos infectados por contacto, en comparación con el grupo control positivo. Los grupos de tratamiento a los que se administró Φ CJ8 de 10^7 y 10^9 ufp/kg mostraron una reducción de la contaminación ambiental por SE, en comparación con los grupos no tratados, lo que implica que el bacteriófago Φ CJ8 de la presente invención inhibe la excreción de SE al medio ambiente. La administración de Φ CJ8 también inhibió la proliferación de SE en los intestinos del grupo de exposición, lo que da como resultado una disminución de la excreción de SE al medio ambiente, lo que, en consecuencia, conduce al bloqueo de la propagación de SE en el grupo infectado por contacto criado con ellos. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9

Efecto inhibitorio de Φ CJ8 aditivo en el pienso sobre la propagación de SE					
	Exposición	N.º	Análisis cuantitativo de SE aislada de heces fecales tras la exposición oral a SE (UFC/g) ^A		
			7dpc ^B	14dpc	21dpc
Tratamiento (10^9 ufp/kg) ^C	Grupo de exposición ^D	30	3,41E + 05	3,06E + 05	2,68E + 04
	Grupo infectado por contacto ^E	30	3,00E + 04	2,90E + 04	1,41E + 04
Tratamiento (10^7 ufp/kg)	Grupo de exposición	30	5,03E + 05	1,58E + 06	7,21E + 04
	Grupo infectado por contacto	30	1,68E + 04	8,19E + 05	4,73E + 04

(continuación)

Efecto inhibitorio de ΦCJ8 aditivo en el pienso sobre la propagación de SE					
	Exposición	N.º	Análisis cuantitativo de SE aislada de heces fecales tras la exposición oral a SE (UFC/g) ^A		
			7dpc ^B	14dpc	21dpc
Tratamiento (10 ⁵ ufp/kg)	Grupo de exposición	30	3,58E + 05	3,18E + 06	1,27E + 05
	Grupo infectado por contacto	30	1,41E + 05	1,47E + 06	5,08E + 05
Sin tratamiento F	Grupo de exposición	30	2,48E + 06	3,55E + 06	6,23E + 05
	Grupo infectado por contacto	30	1,62E + 05	1,75E + 06	5,01E + 05
Control negativo ^G		30	0	0	0

^A Aislamiento cuantitativo de *Salmonella* de heces fecales durante 3 semanas después de la exposición oral a SE
^B Día después de la exposición
^C Grupo al que se le ha administrado ΦCJ8 como aditivo para piensos
^D Grupo de exposición expuesto por vía oral a SE
^E Grupo infectado por contacto criado con el grupo expuesto a SE
^F grupo no tratado alimentado con pienso normal SIN suplementar con ΦCJ8
^G Grupo control negativo no expuesto a SE después de criado con pienso normal sin suplementar con ΦCJ8

Tabla 10

Efecto inhibitorio de ΦCJ8 sobre la excreción de SE				
Análisis cuantitativo de SE en muestras ambientales después de la exposición oral a SE				
	7 dpc ^E			
	Puerta de entrada	Suelo	Filtro de ventilación	Total
Tratamiento (10 ⁹ ufp/kg) ^C	2/2	1/2	0/2	3/6 (50)
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	0/2	0/2	2/6 (33)
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	1/2	1/2	4/6 (66)
Sin tratamiento ^D	2/2	2/2	1/2	5/6 (33)
Control negativo ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)
	14 dpc			
	Puerta de entrada	Suelo	Filtro de ventilación	Total
Tratamiento (10 ⁹ ufp/kg) ^C	1/2	2/2	0/2	3/6 (50)
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	1/2	0/2	3/6 (50)
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	2/2	1/2	5/6 (33)
Sin tratamiento ^D	2/2	2/2	1/2	5/6 (33)
Control negativo ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)
Tratamiento (10 ⁹ ufp/kg) ^C	1/2	0/2	0/2	1/6 (16)
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	0/2	1/2	3/6 (50)

(continuación)

Efecto inhibitor de ΦCJ8 sobre la excreción de SE				
Análisis cuantitativo de SE en muestras ambientales después de la exposición oral a SE				
7 dpc ^E				
Tratamiento (10 ⁷ ufp/kg)	2/2	1/2	1/2	4/6 (66)
Sin tratamiento ^D	2/2	2/2	2/2	5/6 (33)
Control negativo ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)
^A Aislamiento de <i>Salmonella</i> de muestras ambientales tras 1, 2, y 3 semanas de la exposición a SE ^B Día después de la exposición ^C Grupo al que se le ha administrado ΦCJ8 como aditivo para piensos ^D Grupo no tratado alimentado con pienso normal sin suplementar con ΦCJ8 ^E Grupo control negativo no expuesto a SE después de criado con pienso normal sin suplementar con ΦCJ8				

Aplicabilidad industrial

5 El bacteriófago de la presente invención tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* sin afectar a las bacterias beneficiosas, y una resistencia excelente a ácidos, al calor y a la deshidratación, y, por lo tanto, se puede aplicar a las composiciones que pueden usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, en particular, salmonelosis, intoxicación alimentaria por salmonela, tifosis aviar y pullorosis, y se aplica a la terapéutica, a antibióticos, a la
 10 alimentación, al agua de bebida para animales, a desinfectantes y a productos de limpieza.

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende el mismo

<130> OPA10134/PCT

15 <150> US61/425.553

<151> 21-12-2010

<160> 17

<170> KopatentIn 1.71

20

<210> 1

<211> 687

<212> ADN

<213> Bacteriófago KCCM11148P

25

<400> 1

ES 2 593 467 T3

acagctacgg gaccgcaggg cgcgttcctt aatctgcatt gtaagttccc ggccttcgtc 60
gctggcttcg gcacaggtaa atcgggaagtc atgtgcaact ccgcccctgtt agacagcatg 120
gaaggtggta gtgattcaact tctcgtcttg tatgaaccga catacgaacct ggtgcgcctt 180
atcctcgcgcc cgcgtatgga agaaaagttg tctgattggg gtattcgtta caagtacaat 240
aatcaaaaca acatagtcta tacatcatcc gggcaattcg gggattttgt cctgcgtaca 300
ttggataacc cggcgcgaat cgtgggttac gaatcttttc gcgcaaaaat agacgaattg 360
gacacgttaa ataaagacca ccccgagcac gcctggaaca aagctatcgc ccgtaaccgt 420
cagttgccgc gcacatatcg ttggaatacc ccaaagcctg ctaatacaga ttcggatattt 480
aatacacgtc acggcttctg ttttgtggtc catggatggg ttgacaaaaa gaatcgtggt 540
tgtgagatcc atcacgcccc gataacttct aaatcatttc taccggacga tcatgtccag 600
gctttgcgaa atacgaatcc tcttcccttg aaatgtgctc tatctgtccg cgaatttgtt 660
gtcttaaagt ccggctacaa ttcatta 687

5 <210> 2
<211> 525
<212> ADN
<213> Bacteriófago KCCM11148P
<400> 2

tcgggggtcca tgccaaacat cttacctgcg gttacgcagt aaatatccag cccggcgcgg 60
aacgtatcaa gcgcggttcc ttcgcccgcc agccatgcaa gcccaaggcc ttcgacgtta 120
gagtaatccg caacaacaaa cttacgcccg gcttccggga taatgcagct tcggacggtta 180
gacgctgtta gcttggccac atcaaaaacgg cgggtgtgcac ggcctttaag taacgcggca 240
atacccctat ccagttcatc gtcgtgataa taccgcgcgc ccaggttttg cggctgaaaa 300
ccttccccg cccaccgcat tgttcgcttc tctcctccgt attgcgggca accacggcgg 360
cggtcacctg aaaaacggcc taacagcaac ggcgcgcaatt tcttcaatgt ggaaaaaaca 420
accaccacc gtctcactac aatagtgcgg acaaaaacaa gtaaatccac atccttcac 480
aaatatttaa tgatgacttt tgtgcatttg tgaattcggg gcgct 525

10 <210> 3
<211> 650
<212> ADN
<213> Bacteriófago KCCM11148P
15 <400> 3

ES 2 593 467 T3

acgcaaaccg tcgccgtaaa cgtccgcgtg gtaaacaag cctgtatcag tcatccagac 60
 attccgcgga actatgggac coggactatt gcgacgaatt aatccggttc ttcgaccgca 120
 cgtcatggga actcgtacc cagtctaaag gcgacgaacg cccgcttacc caggataaac 180
 cgccatcaact ggcccgtttc gcactacaca taggcgtaac cgttccgatt atcaagctgt 240
 ggctgcgaga ggttcctgcc ttogctgaag catacgaaac ggcgaggcc ctggaagagg 300
 cgtatttcac tgagaccggt gctgccggga tatctgctac gttcgcgca gcaaaaacttg 360
 ggcttaataa aactgttgtg gaagaagcgc gcgacgaacc aattagcgaa gtaactatta 420
 aggtggtgtc cgggtaacgt tgatatcaca gctacgggac cgcaggcgc gttccttaat 480
 ctgcattgta agttcccggc cttcgtcgtt ggcttcggac caggtaaatc tgaacgaatg 540
 cgcaaccocg ccctgctaca cagcgtggaa ggaggtagtg cttcccttct cttcgtctct 600
 caacctacct attatctttt tccccctccc tttttctccc ataatggaag 650

<210> 4
 <211> 931
 <212> ADN
 <213> Bacteriófago KCCM11148P
 <400> 4

5

actggcgact cacgcgcgta ggttctgtaa accgggtaac tatggttgtg ctgcgtgaga 60
 catgggagta ccacgaacct ggaaacgagt tcgaaactaa atacggcgag cagtaccgag 120
 tgctggacat tgacaccgat ggtaattacc gtcagcgact gttccgtttc gatgcggaag 180
 gcggagctca ggaagaggtt gtggagattt acccagattt aggggagtcg ttacgtggcg 240
 taattccggt tacctttacc ggagctacca ataacgacgc caccattgac gacgctcctt 300
 tgttgccatt ggccgagctt aatatcgggc actaccgaa cagtgctgat aacgaggaat 360
 caagttttgt agttggccag cctacgctgt ttatctacc cggggataac cttacaccac 420
 agtcgttcaa ggaagccaac cccaacggca tcaaatttg cagtcggtgc gggcataacc 480
 ttggttatgg tggtagcgt caacttattc agggggcga aaacaacctg gcccgccaga 540
 atatggtgga caaagaacaa caggctatcc agattggcgc acagcttatt accccaacct 600
 agcaaattac cgcggaatcg gcgcgatcc aacgcggcgc ggatacgtcc gttatgtcca 660
 caatcgcccg taacgtaagt caggcgtata ctgatgcttt acgatgggtt gctatgatgt 720
 tgggtaagcc agaagattct gaagtcgagt tocagcttat catggatttc ttctgcaac 780
 ctatgacagc acaggacagg gctgcgtgca tggcagacat taatgccgga ttactgcccg 840
 ccaactgctta ttacgctgcg ttgcgtaagg cgggggtgac tgactgaacc gacgaggata 900
 ttctgaacgc tattgagatg cacctttgcc g 931

10

ES 2 593 467 T3

<210> 5
 <211> 988
 <212> ADN
 <213> Bacteriófago KCCM11148P

5 <400> 5

```

gacaatgtgg gtgcttagcc gcctgtttcg caacgggcag ctaacagaag aagaccgggt      60
attaatcctc gccccgttgc gtgttgcgtc gggtagctgg cccgcggaac aaactaagtg      120
ggggttccct tgccttcgtg tcatcgatgc aaccggttcg gagaagcgcc gcatagcggc      180
gctggagtcg gacgctaata tgggtgtgcac taactacgaa gttatcgagt ggctgattga      240
ttactacggc aaagacgact ggccttttac tgttatcggt gccgatgaga gcacgaaact      300
gaaatctttc cgcagccggt caggcggtag caagcgggca aaggcgctta gtaagggtggc      360
gttcggtaaa gttaaagcgtt tcattaacct gaccggtaca ccatcaccaa acggcctcaa      420
agacttgtgg ggtcagaact ggttcatcga cgcgggtgaa cgccttgggt cttcatacac      480
ggcctttacc gatagatggt ttaactcggg acagaaaggc aaatctgcca tggcgcggga      540
gtaccatgct cgccaggcgg cggataacga gattcaccag aagatgaagg atatcagcct      600
taccattgat gccgccgagt ggttcgggtg tgaagcaccg gttattgtac cggttgagat      660
tgacctgccg aagaaagcgc gtcaagccta catcgatatg gaggaggagt tattcgcgga      720
actggagagc ggagaagttg aagcggctaa cgcgccgctt aaaacggcta agtgcttgca      780
gattgcttcc ggtgccgtgt atgtgttcgg ggcgggatgg tgaagcaacg aaagactggg      840
ataaagtgca ctacgctaaa cctcgatgct ttagagtcca ttgtcgagga gttgaagggtg      900
cgccgctgct ggttgacctc tctctttagc actaacttag aactgcagtc ctcagggcca      960
tcctcttac gcagcagatc ctttcgcc      988
    
```

10 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 6
 cgttcctaa tctgcattg 19

20 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 7
 gctatggtga cgttgttg 18

<210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 atgccaaaca tcttacc 17
 10 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 9
 gtattcgag tagtgtcg 18
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 ggtaaacaaa gctgtatc 19
 25 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 11
 gattttgcac gtatctcg 18
 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 40 gttcgaaact aaatacggc 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 gcgataaaag agtctatag 19
 50 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

<400> 14
5 cagctaacag aagaagac 18

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 15
gatacgtttt atttctcgc 19

15 <210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 16
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 17
<211> 16
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

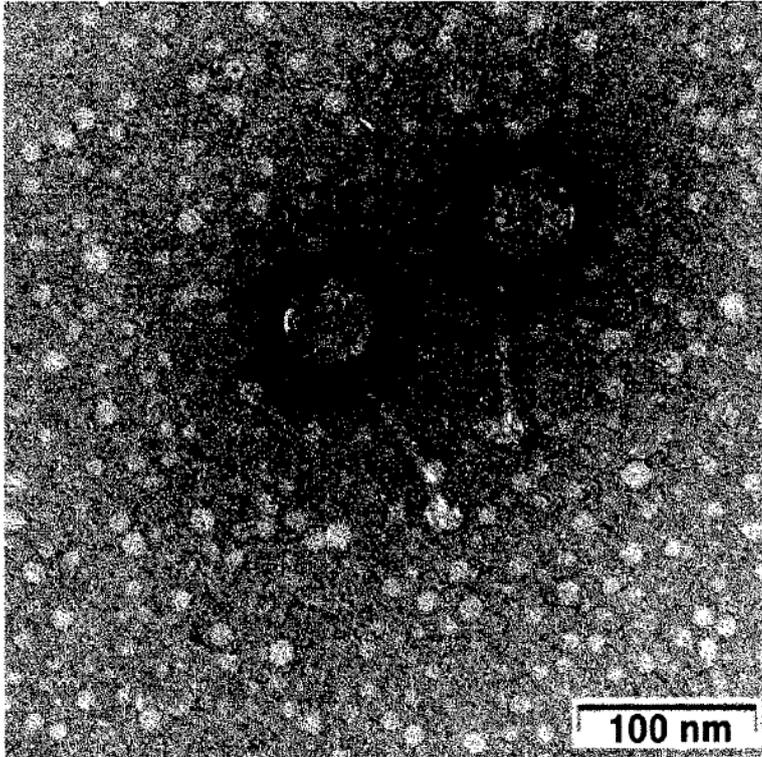
<400> 17
aacagctatg accatg 16

30

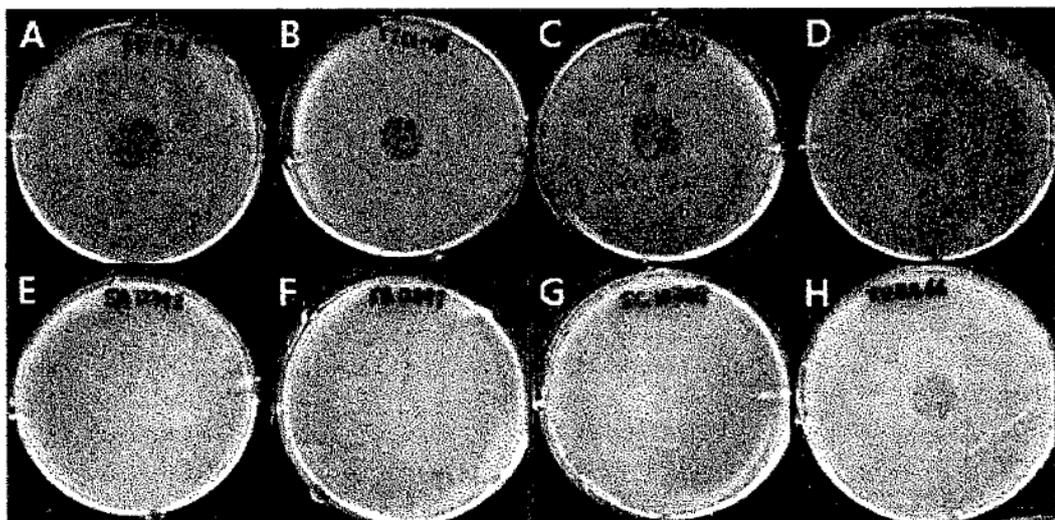
REIVINDICACIONES

1. Un bacteriófago aislado, que tiene una actividad bactericida específica frente a una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, que está identificado con el número de acceso KCCM11148P.
- 5 2. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más cepas de *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, que comprende el bacteriófago tal como se define en la reivindicación 1 como principio activo.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium* son salmonelosis o intoxicación alimentaria por *Salmonella*, la enfermedad infecciosa causada por *Salmonella gallinarum* es la tifosis aviar y la enfermedad infecciosa causada por *Salmonella pullorum* es la pullorosis.
- 15 4. Una composición antibiótica para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más cepas de *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, que comprende el bacteriófago tal como se define en la reivindicación 1 como principio activo.
5. Un pienso o agua de bebida para animales, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como principio activo.
- 20 6. Un agente desinfectante o de limpieza, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como principio activo.

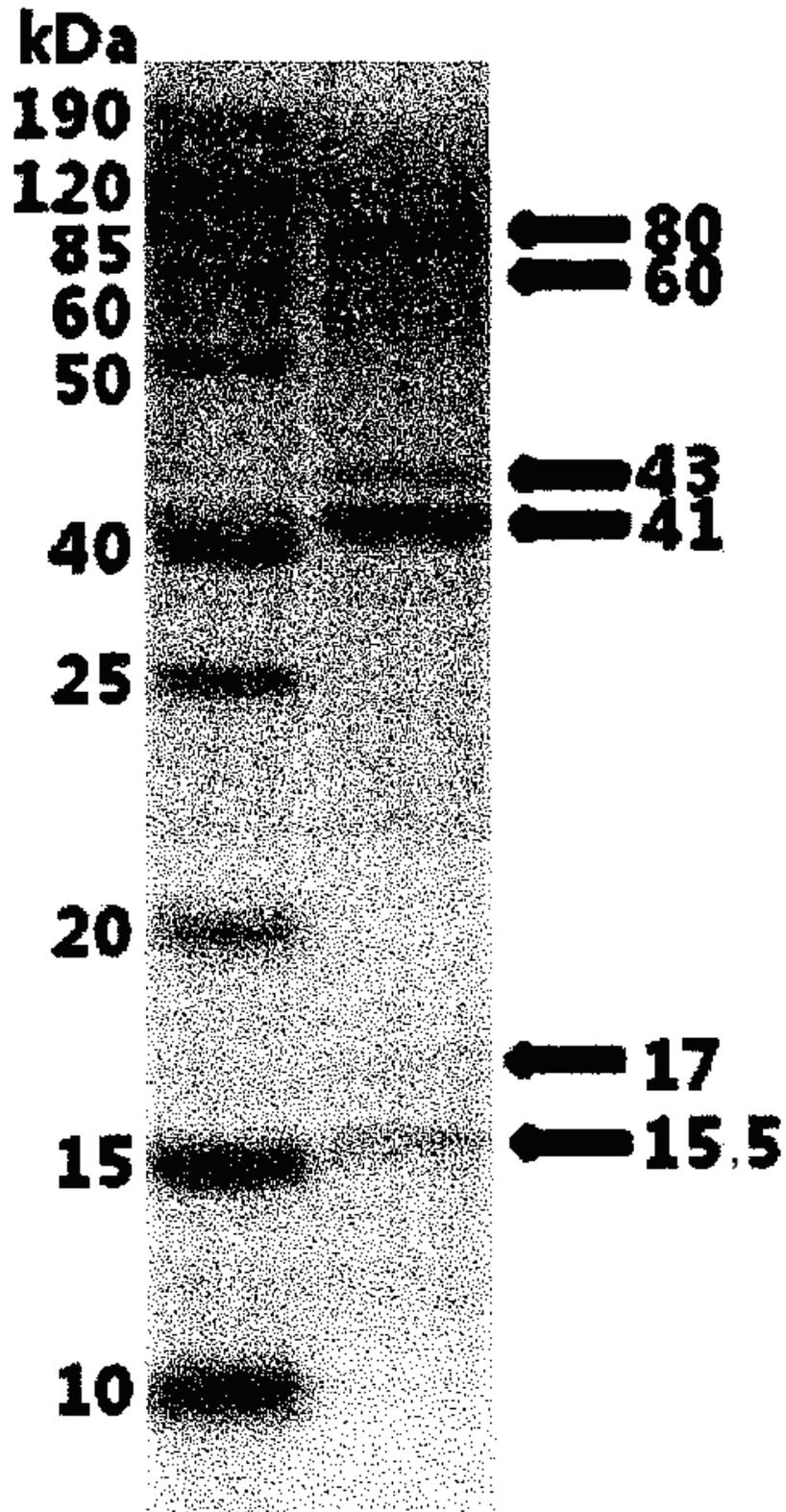
[Figura 1]



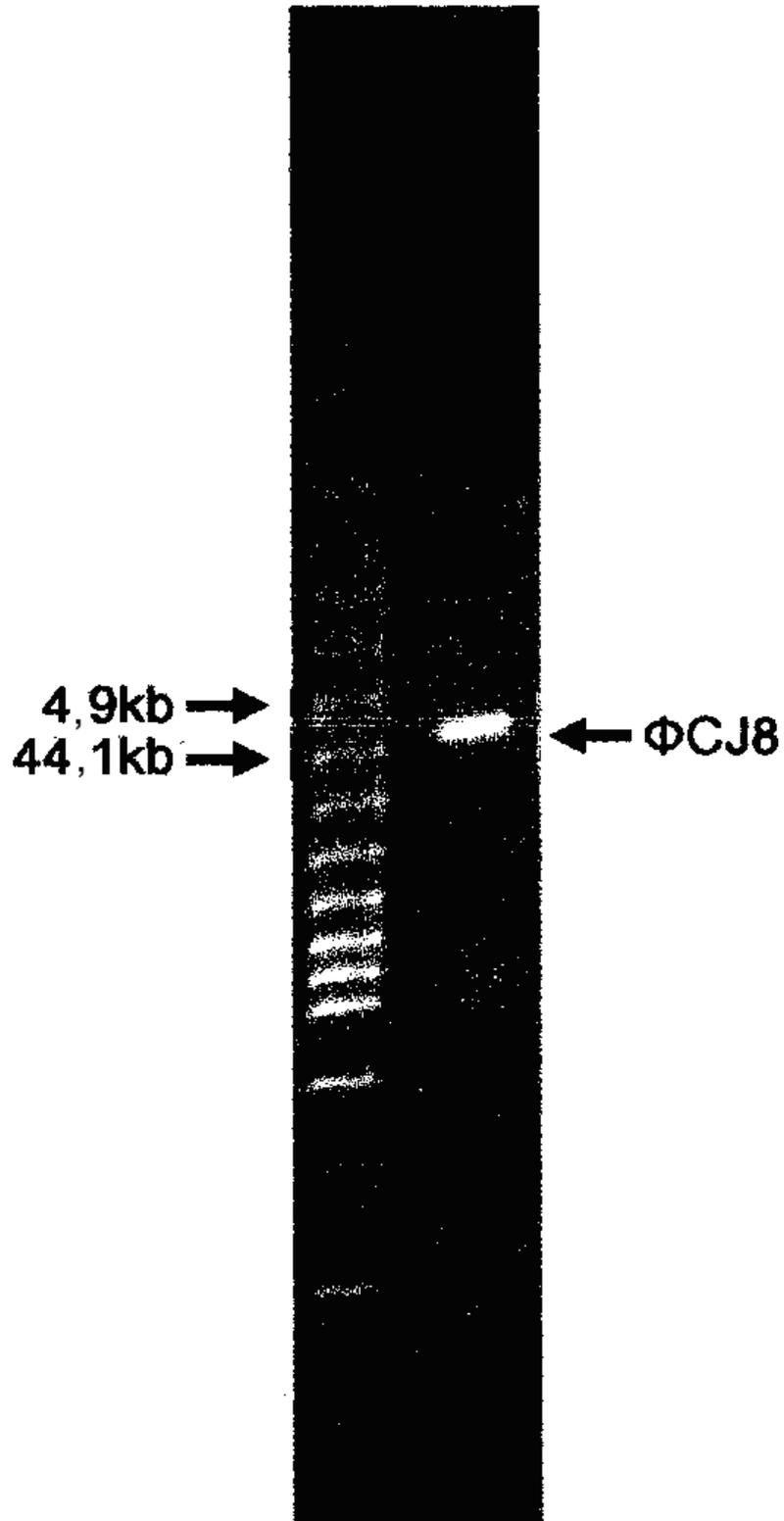
[Figura 2]



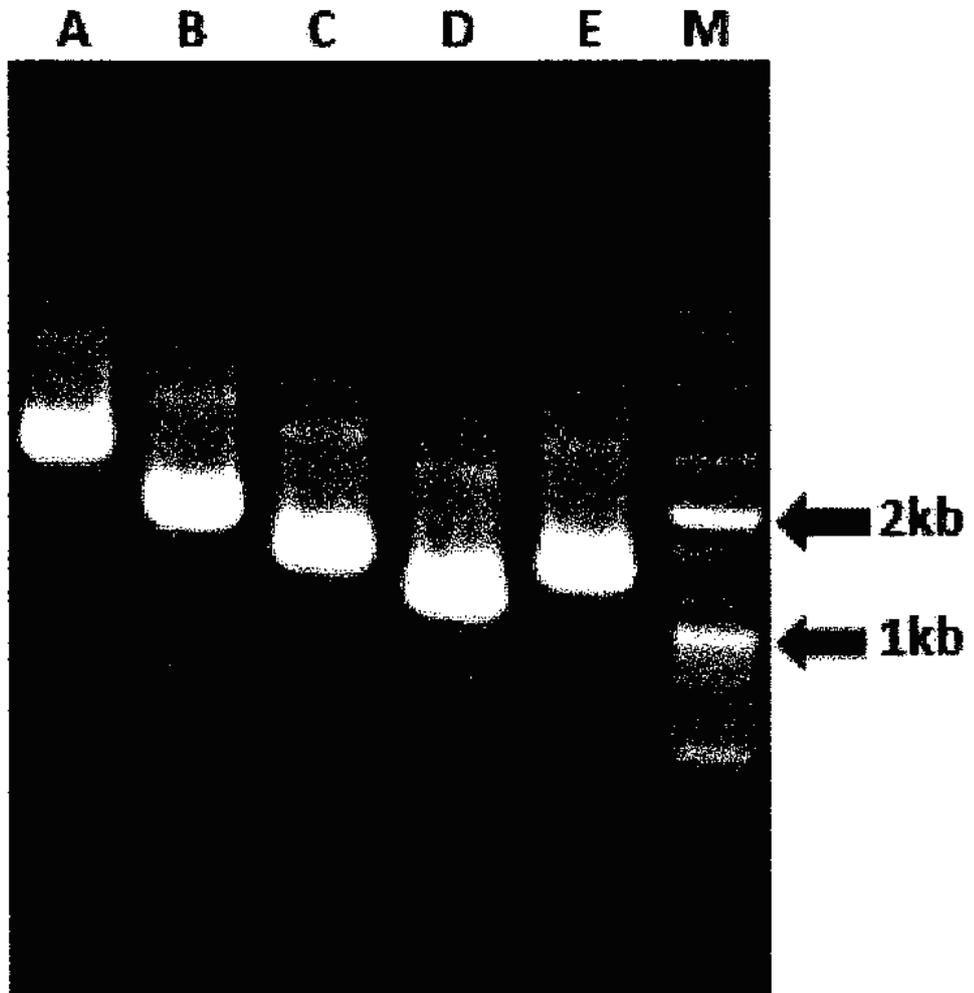
[Figura 3]

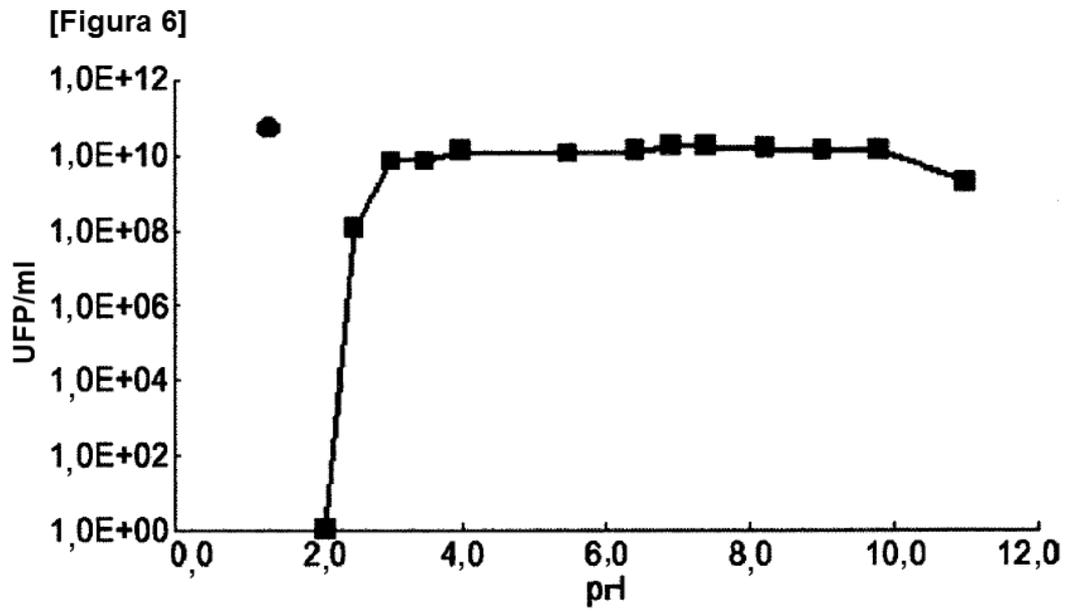


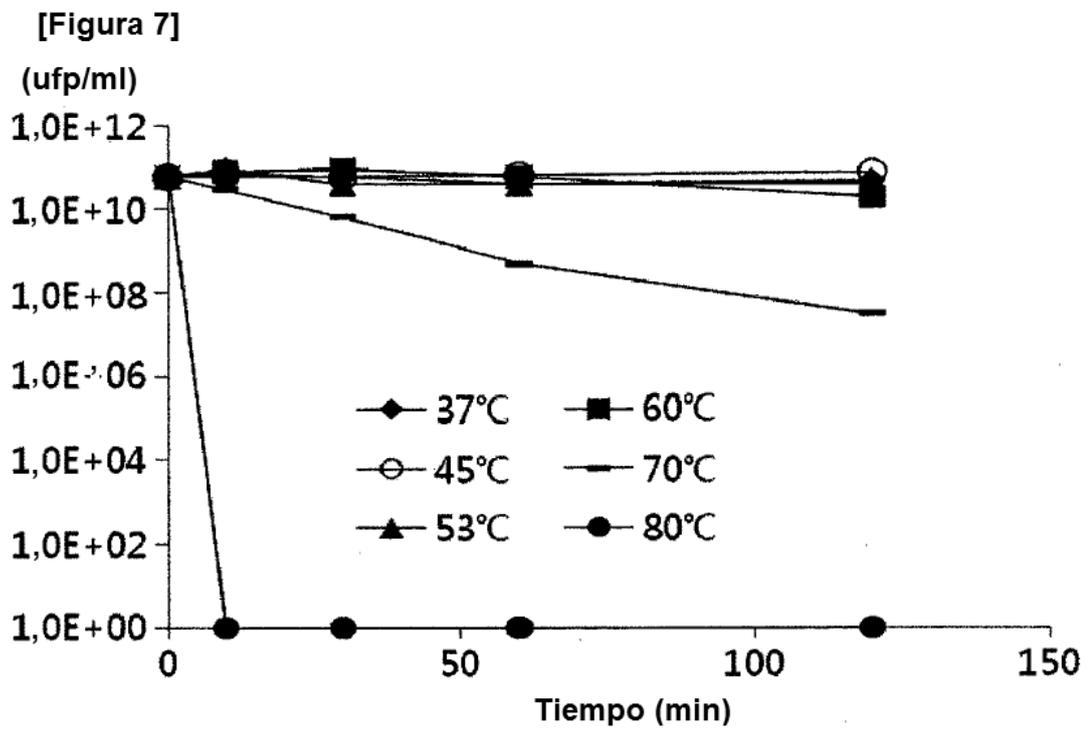
[Figura 4]



[Figura 5]







[Figura 8]

