

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 873**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23K 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06728131 .1**

96 Fecha de presentación: **06.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1874917**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Composición probiótica adecuada para animales**

30 Prioridad:  
**26.04.2005 IE 20050250**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.06.2012**

73 Titular/es:  
**TEAGASC, THE AGRICULTURE AND FOOD  
DEVELOPMENT AUTHORITY  
19 SANDYMOUNT AVENUE  
DUBLIN 4, IE y  
UNIVERSITY COLLEGE CORK-NATIONAL  
UNIVERSITY OF IRELAND, CORK**

72 Inventor/es:  
**STANTON, Catherine;  
HILL, Colin;  
FITZGERALD, Ger y  
ROSS, Paul**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 382 873 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

Composición probiótica adecuada para animales.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una composición probiótica para aliviar la infección por *Salmonella* en animales de granja. En particular la invención se refiere a una composición que comprende al menos una de *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* y *Lactobacillus pentosus*, para su uso en el control o la reducción de salmonella en animales de granja, en particular en cría de cerdos, como se define en las reivindicaciones.

**Antecedentes de la invención**

10 Los probióticos como se aplican a los seres humanos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cifras adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped. Las razones citadas con más frecuencia para esta actividad probiótica incluyen la producción de sustancias antimicrobianas tales como bacteriocinas y lactato e interferencia con la adhesión de la *Salmonella* a la pared intestinal.

15 La infección por *Salmonella* da como resultado millones de casos de enfermedad transmitida por los alimentos en los seres humanos cada año; la fuente de patógenos varía, pero muchos casos resultan del consumo de productos de carne de porcino contaminada (Swanenburg *et al.*, 2.001; Anonymous, 2.002a). La conciencia de los problemas de la seguridad alimentaria durante todas las etapas de la producción de carne de cerdo es así vital, en particular según cualquier reivindicación precedente las reducciones en los niveles de contaminación por *Salmonella*. Los probióticos, como se define normalmente, son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped" (FAO/WHO, 2.001). Las propiedades probióticas se han atribuido a muchas especies microbianas, pero las más comúnmente usadas son miembros del grupo de bacterias del ácido láctico (LAB), en particular las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Diversos estudios han investigado los efectos *anti-Salmonella* de probióticos potenciales usando procedimientos *in vitro*, en particular medio de crecimiento y cultivo de tejidos (Drago *et al.*, 1.997; Fernandez *et al.*, 2.003).

25 Una serie de autores ha relacionado la aplicación de los probióticos LAB con efectos beneficiosos en modelos de infección gastrointestinal usando animales pequeños. Ogawa *et al.* (2.001) indicaron que el uso de *Lb. Casei* Shirota reducía los niveles de colonización y disminuía la importancia de la diarrea en conejos bebés infectados por *E coli* O157:H7. Usando ratones, Johnson-Henry *et al.* (2.004) han observado que una mezcla de cepas de *Lactobacillus* reduce la inflamación gástrica y la colonización bacteriana en animales infectados por *Helicobacter pylori*. Se han indicado diversos resultados con el uso de modelos de infección por *Salmonella*. Pascual *et al.* (1.999) observó la exclusión completa por 21 días de *Salmonella enteritidis* usando *Lb. salivarius* en pollos. Recientemente, La Ragione *et al.* (2.004) no observaron una unión beneficiosa entre pretratamiento con *Lb. johnsonii* y las cifras de *Salmonella enteritidis* fecal o la colonización del intestino de los pollos. Los mismos autores observaron, sin embargo, que las cifras de *E. coli* se reducían en el intestino delgado, pero no en el colon, intestino ciego o heces. También reivindicaron que la cepa era muy eficaz contra *Clostridium perfringens*. Silva *et al.* (2.004) observaron una supervivencia mejorada para ratones pretratados con *Bif. longum* durante exposición a *Salmonella*, pero ningún efecto en las cifras del patógeno. Postularon que esto podía ser debido a una respuesta inflamatoria reducida mediada por el tratamiento probiótico, pero sin antagonismo de la población.

40 Muchos estudios que investigan el efecto de los probióticos LAB en la infección gastrointestinal en seres humanos se concentran en el antagonismo de la infección por rotavirus en bebés y la infección por *Clostridium difficile* en adultos. Diversos informes han reivindicado efectos beneficiosos para los probióticos (en particular *Lb. rhamnosus* GG) en infección rotavírica de niños; mucho de éstos se examinan en Alvarez-Olmos y Oberhelman (2.001). Entre las publicaciones iniciales en este área estaba el informe por Isolauri *et al.* (1.991) que demostraba que el tratamiento con *Lb. rhamnosus* GG reducía la duración de la diarrea por rotavirus en los niños. Reid *et al.* (2.003) han examinado los datos que reivindican una reducción de los casos de diarrea por *Clostridium difficile* en seres humanos debido a tratamiento probiótico con *Lb. rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii*.

45 Según cualquier reivindicación precedente otros trastornos intestinales, Hilton *et al.* (1.997) reivindicaron que *Lb. rhamnosus* GG disminuía el riesgo de la diarrea del viajero y Felley *et al.* (2.001) indicaron que la leche para alimentar seres humanos fermentada por *Lb. johnsonii* presentaba una densidad significativamente reducida de *H. pylori* e intensidad de inflamación gástrica. El tratamiento con una combinación de *Lb. acidophilus* y *Bif. infantis* beneficiaba a los neonatos con enterocolitis necronizante según Hoyos *et al.* (1.999), que reivindicaron una reducción del 60% en la mortalidad debido al tratamiento.

55 Los informes de la eficacia del tratamiento probiótico en el alivio de la infección intestinal en animales grandes siguen siendo escasos. Zhao *et al.* (1.998) reivindicaron que la aplicación de *E coli* probiótico (no LAB) reducía la propagación de *E coli* O157:H7 en el ganado. Lema *et al.* (2.001) observaron que los corderos infectados por *E coli* O157:H7 y a los que se administró después *Lb. acidophilus* no mostraban efectos beneficiosos. Sin embargo, alimentando a los corderos con una mezcla de *Lb. acidophilus* y *Streptococcus faecium* o la cepa *Streptococcus* sola, disminuía significativamente las cifras de la cepa patógena. La mayor reducción en las cifras se observó con el

uso de una mezcla de *Lb. acidophilus*, *St. faecium*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum*. Genovese *et al.* indicaron en 2.000 que un cultivo de exclusión competitivo no definido reducía la mortalidad y liberaba de *E coli* enterotoxigénica en los cerdos neonatos. El mismo grupo (Genovese *et al.*, 2.003) también observaron que los cerdos neonatos tratados con una diseminación de cultivos no definida similar disminuía significativamente las cifras de patógenos después de exponerse a *Salmonella choleraesuis*, y también presentaba recuentos reducidos en el intestino delgado. No se describe si se aliviaban o no los síntomas de infección. Fedorka-Cray *et al.* (1.999) indicaron que la aplicación a lechones expuestos a *Salmonella choleraesuis* de un cultivo de exclusión competitivo de origen porcino conducía a recuentos de *Salmonella* reducidos en sus contenidos fecales y en la unión ileocólica, así como cifras reducidas de muestras de tejido del intestino positivas en *Salmonella*. No se observaron síntomas clínicos de infección en ningún animal, incluyendo los controles.

Muchos estudios han referido el aislamiento y la selección de cepas probióticas para uso en cerdos (Chang *et al.*, 2.001; Gusils *et al.* 2.002; Nemcova *et al.*, 1.997) pero los resultados de pruebas de alimentación *in vivo* de animales pueden ser variables (Simon *et al.*, 2.003). Esto se puede explicar en parte por la complejidad del intestino, que conduce a una variación entre animales individuales. Aunque los cultivos no definidos usados en productos de exclusión competitivos pueden ser eficaces en los cerdos, la incertidumbre teniendo en cuenta su composición exacta ha llevado a preocupaciones que pueden dar como resultado una transmisión de patógenos. Por lo tanto, hay una necesidad de caracterización de selección racional de cepas destinadas a uso como aditivos de alimentación probiótica.

Aunque los cerdos que albergan *Salmonella* no presentan en general síntomas clínicos, la propagación de este patógeno en el tubo digestivo puede llevar a contaminación de las carcasas en el sacrificio. Esto puede llevar, a su vez, a la contaminación de productos de carne porcina. El consumo de productos del cerdo que contienen *Salmonella* lleva a muchos casos de enfermedad transmitida por los alimentos en los seres humanos cada año. No obstante, ciertas medidas han demostrado que reducen el número de casos de *Salmonellosis* humana debido al cerdo. El coste económico asociado a las infecciones por *Salmonella* sigue siendo alto, estimándose en cientos de millones de dólares anualmente para la economía americana sólo.

En esta investigación, se refiere el pre-tratamiento de cerdos destetados con una mezcla de cultivos LAB definida dando como resultado tanto cifras reducidas de *Salmonella* excretada como un alivio de los síntomas clínicos. El análisis molecular de los cultivos excretados indica que los efectos probióticos observados se puede atribuir a dos de los cinco cultivos en la mezcla.

### **Objeto de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la reducción de enteropatógenos en animales de granja, en particular en cerdos. Un objeto más es reducir la contaminación de carcasas con enteropatógenos en el momento del sacrificio para reducir la transmisión de patógenos a los seres humanos por la cadena alimentaria. Es un objeto más de la invención proporcionar una alternativa a los antibióticos en el tratamiento de animales portadores y también proporcionar una alternativa al uso de antibióticos en la producción de animales, para activar el crecimiento y el tratamiento o la prevención de enfermedad para reducir el riesgo de la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos.

Cuando se usan como aditivos de alimentación microbianos, la composición de la invención ofrece el potencial como una alternativa a los antibióticos, tanto en el control de la propagación de patógenos como en la mejora de la velocidad de crecimiento y la conversión de la alimentación.

En particular, es un objeto de la invención proporcionar un probiótico para uso en la industria porcina como un medio de mejora de la realización y la salud, en particular debido a que la cría de cerdos ha llegado a ser más intensiva en los últimos años. Un objeto más aún es reducir la propagación de patógenos en cerdos, ya que los cerdos son los principales portadores de *Salmonella*. Los cultivos de bacterias que se ha identificado que tienen actividad inhibidora contra los patógenos deben poseer ciertas propiedades si tienen que ejercer su efecto en el intestino delgado o grueso. De principal importancia es la capacidad para superar el pH extremadamente bajo del ácido gástrico y el efecto detergente de las sales de la bilis y llegar al sitio de acción en un estado fisiológico viable. Si se tienen que usar como probióticos, los cultivos deben presentar estado "considerado en general como seguro" y también satisfacer una serie de criterios tecnológicos, por ejemplo, facilidad de propagación e incorporación en y supervivencia a largo plazo en productos alimenticios.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición probiótica y/o de alimentación animal que comprende uno o más cultivos microbianos de al menos uno del grupo que consiste en: *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* y *Pediococcus pentosaceus*. En realizaciones favorables de la invención, la composición comprende una combinación de dos o más cepas cualesquiera seleccionadas del grupo que consiste en: DPC6002, DPC6003, DPC6004, DPC6005 y DPC6006. Los cultivos se han depositado en la Colección Nacional de Bacterias de la Industria y la Marina, Aberdeen, Escocia el 25 de abril de 2.005 con los Números de Acceso:

NCIMB 41207 *Lactobacillus murinus* DPC 6002

NCIMB 41271 *Lactobacillus murinus* DPC 6003

NCIMB 41272 *Lactobacillus pentosus* DPC 6004

NCIMB 41273 *Lactobacillus salivarius* DPC 6005

5 NCIMB 41274 *Pediococcus pentosaceus* DPC 6006.

En una realización particularmente preferida, la composición comprende estas cinco cepas. Las especies o cepas bacterianas idealmente se liofilizan o se congelan secas en el caso de que la invención se refiera a una composición de alimentación animal, el cultivo microbiano se puede adaptar para proporcionar una dosis total de  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia por día al animal que se está alimentando. En algunas realizaciones, esta dosis puede depender del peso del animal. La presente invención se define por las reivindicaciones.

#### Materiales y procedimientos

##### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se seleccionaron *Lactobacillus murinus* DPC6002 y DPC6003, *Lactobacillus pentosus* DPC6004, *Lactobacillus salivarius* DPC6005 y *Pediococcus pentosaceus* DPC6006, aislados previamente de contenidos fecales de cerdos, de un banco de aislados intestinales porcinos sobre la base de tipificación molecular y propiedades tales como actividad antimicrobiana, tolerancia a la bilis y crecimiento en leche (Casey *et al.*, 2.004b). La selección de variantes resistentes a rifampicina espontáneas (Rif) de estos aislados porcinos para facilitar la enumeración posterior en el cerdo GIT se describe en Gardiner *et al.* (2.004). Las dos cepas, precursora y variante, se cultivaron de manera rutinaria a 37°C en caldo MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) en recipientes anaerobios con estuches de generación de CO<sub>2</sub> (Anaerocult A; Merck, Darmstadt, Alemania). Se tomó *Salmonella typhimurium* PT12 de la colección del Laboratorio de Investigación Veterinaria Central (CVRL) y se cultivó de manera rutinaria en caldo de soja triptico (TSB, Merck, Darmstadt, Alemania). Esta cepa es resistente al ácido nalidíxico, una característica explotada en su enumeración fecal.

##### Preparación de tratamientos del fermentado y suspensión probióticos

Se cultivaron cultivos probióticos individuales en leche y se mezclaron para formar el tratamiento del fermentado como se describió previamente (Gardiner *et al.*, 2.004). Para la suspensión, se inocularon volúmenes de 90 ml de caldo MRS con el cultivo apropiado al 1% (v/v) y se cultivó durante la noche en caldo MRS a 37°C. Después de incubación, se recogieron las bacterias por centrifugación, se volvieron a suspender en 900 ml de RSM al 10% y se mezclaron. Se formaron alícuotas después de esta suspensión en volúmenes de 100 ml, se almacenaron a 4°C y se usaron dentro de ocho días.

##### Prueba de exposición de animales

La prueba de alimentación de cerdos cumplía con la Directiva del Consejo EU 91/630/EEC que establece los estándares mínimos para la protección de los cerdos y la Directiva del Consejo EU 98/58/EC que se refiere a la protección de los animales criados para fines ganaderos. Un total de 15 cerdos híbridos (Large White x Landrace) fueron destetados a los 24-28 días y bloqueados por sexo y peso; después se transportaron los animales desde la instalación de producción de cerdos Moorepark al Laboratorio de Investigación Veterinaria Central, Abbotstown, Dublín. Se asignaron los cerdos en cada bloque de manera aleatoria a uno de tres grupos de tratamiento (n = 5), como sigue: (A) control, (B) fermentado y (C) suspensión. Cada animal fue encerrado individualmente para evitar contaminación cruzada. Además de los cultivos o leche desnatada administrada durante toda la prueba como se indica más adelante, todos los animales tenían acceso no restringido al agua y alimentación suplementaria no medicada.

La prueba duró 30 días en total, tiempo durante el cual los animales se alimentaron con cultivo probiótico o leche desnatada. Los cerdos que recibieron cultivo probiótico fueron alimentados con 100 ml diarios de la mezcla apropiada, proporcionando una dosis total de  $\sim 3 \times 10^{10}$  CFU/día (fermentado) o  $\sim 3 \times 10^9$  CFU/día (suspensión). Los animales de control recibieron 100 ml de leche desnatada diarios. Después de 6 días de administración probiótica se expusieron los animales por vía oral a  $1 \times 10^8$  CFU *S. Typhimurium* diario durante tres días consecutivos. Se recogieron muestras de excrementos frescos recién defecados de los cerdos cuatro días antes de la exposición a *Salmonella* (día 4) y los días 2, 4, 8, 15 y 23 después de la primera exposición. Se determinaron recuentos probióticos los días 4, 2, 8, 15 y 23; se enumeró *Salmonella* los días 4, 8, 15 y 23 post infección.

##### Análisis microbiológico de muestras fecales y cecales de los cerdos

Se almacenaron muestras fecales a 4°C y se analizaron dentro de 24 h de recogida; se homogeneizaron muestras en diluyente de máxima recuperación (MRD, Lab M, R.U.) como diluciones de 10 veces usando un stomacher (Lab-Blender 4; Seward Medical, Londres, R.U.), diluido además en MRD y diluciones apropiadas para la técnica de

vertido en placa. Las cepas administradas se enumeraron después de incubación anaerobia durante cinco días a 37°C en agar selectivo de *Lactobacillus* con rifampicina, es decir, agar LBS (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) que contenía 150 µg/ml de rifampicina como agente selectivo y 50 U/ml de nistatina (Sigma) para inhibir levaduras y mohos. Además, se cultivaron en caldo MRS hasta veinte colonias seleccionadas de manera aleatoria de placas LBS-RIF de cada animal el día 8 y el día 23 p.i. y se analizaron por RAPD PCR como se indica en líneas generales a continuación.

Los experimentos preliminares sugirieron que las cifras de *Salmonella* recuperadas de las heces de los cerdos serían muy bajas y no adecuadas para el recuento por cultivo directo en placas. Las cifras de *Salmonella* fecal se enumeraron, por lo tanto, por el procedimiento del número más probable (MPN) de tres tubos. Se añadieron 10 g de heces a 90 ml de agua de peptona tamponada (BPW, Lab M) y se homogeneizaron durante cuatro minutos. El homogenado se dividió después en tres alícuotas de 50 ml, tres de 5 ml y tres de 0,5 ml; las alícuotas de 0,5 ml se diluyeron además por la adición de 1 ml de BPW. Se incubaron los tubos durante la noche a 37°C, después de lo cual se añadieron 0,1 ml de cada tubo a 9,9 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Lab M) y se incubaron durante 18 - 24 h a 42°C. Se realizó aislamiento en agar ver de brillante (BG, Lab M) que contenía 100 µg / ml de cada uno de ácido nalidíxico y novobiocina (Sigma). El número de *Salmonella* presente en cada muestra se calculó usando la tabla MPN de de Man (1.983).

#### Huella genética por RAPD PCR

Se cultivaron en placas muestras de animales de alimentación probiótica en medio selectivo para los cultivos probióticos marcados de rif y se seleccionaron hasta 20 de las colonias resultantes de cada uno de los cinco animales por grupo y se inocularon en medio MRS. Se aisló ADN genómico de 1,5 ml de los cultivos durante la noche según el procedimiento indicado en líneas generales por Coakley *et al.* (1.996). Después se usó el AND extraído como patrón en multiplicaciones PCR, que se realizaron usando la matriz aleatoria R2 (5' GTGATGTGCTGGTGTATGTTA 3'; MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) como se indicó en líneas generales previamente (Gardiner *et al.*, 1.998), con las siguientes modificaciones; se realizaron multiplicaciones PCR en un volumen total de 50 µl en un termociclador de ADN de Eppendorf (Eppendorf Scientific Inc, Westbury, NY) añadiendo 1,25 U de ADN polimerasa Taq (Bioline, Londres, R.U.) a la mezcla de reacción. Los productos PCR (10 µl de cada reacción) se analizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1,5% (p/vol), usando un *ladder* 100 bp (New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, R.U.) como patrón de peso molecular. Los patrones de bandas obtenidos de aislados fecales se compararon con los de ADN de control de cada uno de los cultivos presentes en la mezcla probiótica, permitiendo la identificación de cultivos porcinos individuales en cada muestra fecal.

#### Indicadores físicos de enfermedad

Inicialmente se pesaron cerdos en Moorepark antes de su transporte a Abbottstown y de nuevo al final del periodo de alimentación previo a su sacrificio. Sus aumentos de peso y porcentaje se determinaron individualmente y colectivamente, haciéndose comparaciones entre los tratamientos de control y probiótico. Se examinaron muestras fecales recogidas del corral de cada animal entre tres y siete días post-infección y se observó la presencia o ausencia de diarrea. Las observaciones de la importancia de la diarrea y la actitud de los animales se combinaron para formar un sistema de puntuación clínica (detallado en la Tabla 3). Estas puntuaciones se registraron a diario durante los primeros nueve días post-infección e indican la importancia de la enfermedad asociada con cada animal durante este periodo.

#### Análisis estadístico

Se estudiaron los datos que se refieren a peso del animal, temperatura, presencia o ausencia de diarrea o puntuación clínica en una de dos maneras. Para investigación de datos considerando grupos probióticos individuales, se usó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para analizar los datos distribuidos de manera normal. Los datos que presentan un patrón no normal de distribución se analizaron por el ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis no paramétrico en ensayos de rangos, con comparación retrospectiva por el procedimiento de Dunnett. En el caso de que se consideren los datos sobre la base de una sola agrupación probiótica (es decir, suspensión y fermentado combinados), se usó el ensayo t de Student para los datos que satisfacían supuestos de normalidad; en el caso de que no se requiriera análisis no paramétrico, se usó la prueba U de Mann-Whitney. Se transformaron recuentos de *Salmonella typhimurium* a log base n antes de análisis estadístico. Después se analizaron estos datos por ANOVA con procedimientos de comparación múltiple retrospectiva realizados usando el procedimiento Holm-Sidak. Para justificar los pequeños tamaños de muestra, se realizó el ensayo de Kolmogorov-Smirnov usando un valor P límite de 0,01. Las diferencias se consideraron significativas si  $P < 0,05$ .

### **Ejemplos**

#### Peso de los cerdos

Los pesos de los animales en el grupo de control aumentaron por una media de 246% durante el periodo bajo investigación, mientras los animales cuya dieta incorporaba tratamiento probiótico (tratamientos de suspensión probiótica y fermentado combinados) presentaron un aumento de peso significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) durante

el periodo de prueba. Individualmente, se observaron aumentos de peso medios inferiores tanto para la suspensión como el fermentado, aunque estas diferencias no fueron significativas a  $p < 0,05$ . No se observaron diferencias significativas entre los pesos de los cerdos alimentados o de los tratamientos prebióticos (Tabla 1).

#### Diarrea

- 5 Entre los animales alimentados con leche de control, trece muestras individuales (de un total de 25) fueron positivas por la presencia de diarrea (Tabla 2). Esto comparado con sólo seis muestras positivas (de 50 en total) recogidas de animales alimentados con probióticos; cada tres de los animales alimentados con el probiótico como suspensión y fermentado (Tabla 2). El análisis estadístico indicó que la alimentación de probiótico a animales estaba asociada con un riesgo de diarrea significativamente menor. De los cinco cerdos en la agrupación de control, cuatro presentaron diarrea durante el periodo de cinco días. De los animales alimentados con probiótico, dos de los alimentados con suspensión probiótica proporcionaron muestras de deposición positiva en diarrea, dando sólo un animal alimentado con fermentado deposiciones positivas.

#### Puntuaciones clínicas

- 15 El análisis estadístico de la puntuación media de animales en la agrupación de control (7.0) y animales alimentados con probióticos cuando se toman como un solo grupo (puntuaciones de suspensión y fermentado combinados) (2.1) dio como resultado una puntuación significativamente inferior para los animales alimentados con probióticos. Cuando se comparan los tratamientos de probiótico por separado (suspensión frente a control; fermentado frente a control) frente al grupo de control, sus puntuaciones clínicas medias, aunque inferiores, no lo eran significativamente tanto (Tabla 3).

#### Excreción fecal de cultivos administrados

- 20 Los números totales de cultivos probióticos excretados se elevaron en todos los animales tratados a un máximo de entre  $7 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  CFU / g a los 15 días después de la primera administración (ocho días post-infección). Comparado con animales tratados con suspensión, se observaron recuentos totales superiores en todos los casos de cerdos alimentados con el fermentado (Fig. 1); esto es según cualquier reivindicación precedente las cifras de inóculo iniciales mayores de la mezcla fermentada.

#### Efectos anti-Salmonella

- 30 Las cifras de *Salmonella* (cfu/g) en muestras fecales de grupos de control y de tratamiento se enumeraron por la técnica MPN a intervalos regulares post-infección. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de control y de tratamiento probiótico a los cuatro días post-infección (Fig. 2). A los ocho días post-infección, las cifras medias de *Salmonella* de los grupos de suspensión y de fermentado ( $2,53 \times 10^3$  y  $3,8 \times 10^3$  cfu/g de heces, respectivamente) eran inferiores a la de la muestra de control ( $1,33 \times 10^4$  cfu/g), aunque esta diferencia no se mostraba que fuera estadísticamente significativa. A los 15 días post-infección, las cifras de *Salmonella* detectada en las muestras de control eran significativamente mayores que las de la agrupación probiótica; analizadas individualmente, los valores medios de los grupos de tratamiento de suspensión y fermentado (48 y 76 cfu/g de heces, respectivamente) también se demostró que era estadísticamente significativamente diferente del de control ( $4,47 \times 10^5$  cfu/g) (Fig. 2). El análisis de las muestras fecales finales de los animales, tomadas los 23 días después de la infección inicial por *Salmonella*, no indicó diferencia significativa en las cifras de *Salmonella* entre las agrupaciones de control y probiótica, aunque las cifras fueron muy bajas en todos los casos (Fig 2).

#### Análisis RAPD de cultivos excretados

- 40 Las muestras fecales tomadas el día ocho y 23 post-infección de animales alimentados con probiótico como suspensión o fermentado se analizaron por RAPD PCR y se identificó la distribución de los cultivos porcinos individuales dentro de la mezcla. (Fig 3). Los días ocho y 23 post-infección, *Lb. Murinus* 46 (DPC 6003) fue con diferencia el cultivo más común recuperado de animales que recibieron el tratamiento de fermentado, justificando el 60% de las colonias analizadas el día 8 y el 67% el día 23. También se recuperaron cifras relativamente grandes de *Lb. murinus* DPC 6002, justificando el 24% de las colonias el día 8 y aprox. el 28% el día 23. A los ocho días post-infección, se identificaron 12,5% de las colonias tomadas de muestras de fermentado como *Lb. pentosus* DPC 6004, mientras que este cultivo sólo justificaba el 3% de las colonias de los mismos animales el día 23 post-infección. El dos por ciento de las colonias tomadas de muestras de fermentado tanto los días 8 como 23 post-infección se identificó como *Lb. Salivarius* DPC 6005. Sólo se recuperó 1 colonia de *Pediococcus pentosaceus* DPC 6006 el día 8 pi, mientras que no se justificaba ninguno de los aislados el día 23 (Fig 3).

- 55 Las proporciones de las colonias recuperadas de las muestras fecales de animales a los que se administró el tratamiento de suspensión varió considerablemente de las observadas en animales alimentados con fermentado. *Lb salivarius* DPC 6005 justificó el 72% y el 77% de las colonias recuperadas el día 8 y el día 23 pi, respectivamente. El 28% restante de las colonias el día 8 se identificaron todas como *Lb pentosus* DPC 6004; este probiótico representaba el 19% del total el día 23. Las bajas cifras de tanto *Lb. Murinus* DPC 6002 (2,5%) como *Lb. murinus* DPC 6003 (1%) se identificaron también el día 23. No se identificaron colonias de *P. pentosaceus* DPC 6006 en cualquier caso (Fig 3).

Quando se enumeraron las cifras totales de colonias probióticas resistentes a Rif se observó que las cifras totales recuperadas de muestras de fermentado eran varios órdenes de magnitud mayores que las de muestras de suspensión; esto es según cualquier reivindicación precedente las cifras iniciales superiores en la alimentación de fermentado. Las cifras el día 23 fueron ligeramente inferiores a las del día 8. El análisis de las cifras totales de cultivos probióticos individuales en estos instantes del tiempo proporcionó un resultado interesante. Mientras que se recuperaban de manera natural grandes cifras de cepas de *Lb. murinus* DPC 6002 y 6003 de muestras de fermentado pero no de muestras de suspensión, las cifras combinadas (cfu/g) de DPC 6005 y DPC 6004 eran muy similares tanto en las muestras de fermentado como de suspensión tanto el día 8 ( $8,0 \times 10^6$  cfu/g y  $8,08 \times 10^6$  cfu/g, respectivamente) como el día 23 ( $1,9 \times 10^6$  cfu/g y  $1,0 \times 10^6$  cfu/g, respectivamente) (Fig 3).

## 10 Discusión

La infección por *Salmonella* sigue siendo una causa principal de gastroenteritis transmitida por los alimentos, con unos 160.000 casos estimados de salmonelosis humana referida anualmente en la Unión Europea, a un coste económico de hasta 28 billones de euros (Anonymous, 2002a; Anonymous, 2002b). *S typhimurium* y *S enteritidis* son las causas más comunes de enfermedad en los seres humanos (Anonymous, 2002a). En los Estados Unidos, el programa FoodNet ha observado que la frecuencia estimada de infección por *Salmonella* no cambió significativamente en los años 1.996 a 2.002, en contraste con otros diversos agentes principales de enfermedad transmitida por los alimentos (Anonymous, 2.003). La propagación por los cerdos de *Salmonella* en el tubo digestivo (GIT) puede llevar a contaminación de las carcasas en el sacrificio que puede llevar, a su vez, a la contaminación de productos de carne porcina. Dicha contaminación se demostró recientemente por un estudio que muestra que hasta el 6% de las salchichas de cerdo en los puntos de venta en Irlanda daban positivo en *Salmonella* (Boughton *et al.*, 2.004). El consumo de productos del cerdo que contienen *Salmonella* lleva a muchos casos de enfermedad transmitida por los alimentos cada año (Swanenburg *et al.*, 2.001; Anonymous, 2.003); *S. typhimurium* sigue siendo el serovar más comúnmente aislado de los cerdos en Irlanda y cualquier otra parte (Davies *et al.*, 2.000; Quirke *et al.*, 2.001, Casey *et al.*, 2.004a).

La selección del intestino del cerdo y la caracterización de las bacterias probióticas usadas en este estudio se ha descrito previamente (Casey *et al.*, 2.004b). La capacidad de las cinco cepas para sobrevivir al tránsito por el cerdo GIT en animales no infectados también se ha examinado (Gardiner *et al.*, 2.004). La presente invención examinó la eficacia de las cinco cepas en la mejora del resultado de infección por *Salmonella* en cerdos destetados.

Una combinación de dos cualesquiera de las cepas, en cualquier relación adecuada, es posible para algunas realizaciones y más realizaciones pueden comprender combinaciones, en cualquier proporción adecuada, de tres o cuatro de las especies. Además, en una realización favorable, la invención comprende una combinación de las cinco cepas: DPC6002, DPC6003, DPC6004, DPC6005 y DPC6006.

En los ejemplos descritos, la administración de cualquier forma de mezcla probiótica de la invención lleva claramente a la mejora de los síntomas físicos en los animales, aunque no siempre significativamente así. En todos los casos, no se observaron diferencias significativas entre resultados para las agrupaciones de fermentado y de suspensión. Quizá el síntoma más obvio de infección gastrointestinal es la presencia de diarrea (diarrea). Mientras que por encima del 50% de las muestras de deposición de animales de control eran positivas en diarrea, la figura correspondiente para cerdos tratados con probióticos era significativamente inferior al 12% en todos los casos. El desarrollo de la diarrea por los cerdos en instalaciones de producción normalmente tratados con antibióticos; las menores frecuencias de diarrea pueden llevar a calidad mejorada de los alimentos por el uso reducido de antibiótico. Ogawa *et al.* (2.001) han demostrado una importancia reducida de la diarrea en conejos infectados por *E coli* O157:H7; no se conocen informes de reducción mediada por probióticos en frecuencia de diarrea en cualquier modelo de infección por *Salmonella* hasta el momento.

Se ideó un sistema de puntuación clínica para indicar la importancia de la enfermedad en cada animal, indicando las mayores puntuaciones enfermedad más grave. Mientras que los dos grupos de tratamiento probióticos de los ejemplos proporcionaron puntuaciones medias inferiores a la agrupación de control, éstas no fueron significativamente menores. Sin embargo, la investigación de los animales alimentados con cultivo como un solo grupo (basado en resultados detallados más adelante) no condujo a puntuaciones clínicas significativamente inferiores. Las puntuaciones inferiores señalan a un animal "menos enfermo" en conjunto. Quizá vale la pena observar que el veterinario responsable del bienestar de los animales durante la prueba observó lo que denominó una "diferencia masiva" entre animales de control y de tratamiento. Así como el uso de antibióticos mencionado anteriormente, un animal "feliz" requiere menos atención de su propietario así como intervención veterinaria reducida, dando como resultado una carga financiera reducida para el propietario.

El atributo físico de importancia quizá mayor para los productores de cerdos es la velocidad de ganancia de peso de los animales. Como con las puntuaciones clínicas detalladas anteriormente, la ganancia de peso por el periodo de prueba de los animales en los grupos probióticos individuales, al tiempo que mayor que la de los animales de control, no fue significativamente así usando  $P < 0,05$ . La clasificación de animales tratados con probióticos como un grupo proporcionó de nuevo una ganancia de peso significativamente mayor. Esto es probable que sea de particular importancia para productores de cerdos, ya que los animales más pesados atraen un precio exorbitado. Aunque la realización de crecimiento mejorada en cerdos debido a la administración de probióticos se ha demostrado

previamente (Chang, *et al.*, 2.001), no ha habido, según nuestro conocimiento, examen de los efectos de los probióticos en la ganancia de peso en cerdos durante la infección gastrointestinal.

Aunque los resultados ya detallados son quizá de mayor importancia para los productores de cerdos, los efectos de tratamiento probiótico en el nivel de propagación de *Salmonella* son de la mayor importancia para los consumidores. La aplicación de cualquiera de los tratamientos probióticos en este estudio dio como resultado una mejora en las cifras de *Salmonella* fecal, que presenta un potencial positivo para la seguridad de los productos de carne porcina. Aunque se observaron recuentos medios inferiores para animales tratados con probióticos en un número de puntos de muestreo, estas diferencias fueron significativas a los 15 días post-infección, presentando los animales de control un recuento medio de *Salmonella* de aproximadamente 10.000 veces mayor que el de los grupos probióticos. Debido a la naturaleza especulativa de las diluciones usadas para la técnica MPN, no se obtuvieron recuentos para algunas muestras; esto hizo difícil la comparación el día 4 p.i., ya que se obtuvieron sólo dos recuentos para animales de control. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, la ausencia de efecto probiótico observado en este punto puede ser debido a altas cifras de *Salmonella* "lavada" poco después de inoculación. Los recuentos de *Salmonella* se elevaron bruscamente para animales de control a los 15 días p.i. y los cerdos en el grupo de suspensión a los 23 días p.i. Una posibilidad es que esto pueda ser debido a reinfección de los animales desde sus alrededores. Dicha infección medioambiental se ha demostrado que es un factor importante en la propagación de *Salmonella* en cerdos (Hurd *et al.*, 2.001; Gebreyes *et al.*, 2.004). Se ha publicado una serie de informes que describen la reducción mediada por probióticos en las cifras de *Salmonella* intestinal (Fedorka-Cray *et al.*, 1.999; Genovese *et al.*, 2.003); estos estudios han utilizado, sin embargo, el serovar *scholeraesuis*, que no ha sido implicado como fuente principal de enfermedad en seres humanos. Estos dos grupos usan cultivos de exclusión competitivos no definidos; es posible que la composición desconocida de los cultivos de este tipo pueda llevar a la transmisión de patógenos. Estos estudios también han usado cerdos neonatos que aún no han establecido una flora intestinal estable, al contrario que nuestro uso de animales destetados, mayores.

El análisis RAPD PCR de cultivos probióticos excretados mostró las dos cepas de *Lb. murinus* que dominan en los animales a los que se ha administrado el fermentado probiótico. Esto es de acuerdo con nuestro estudio previo (Gardiner *et al.*, 2.004), durante el cual los animales fueron alimentados también con leche probiótica-fermentada. Sin embargo, el examen de colonias aisladas de los animales tratados con las mismas cepas en la forma de una suspensión de leche demostró que las dos cepas de *Lb. murinus* sólo comprendían una pequeña proporción de probióticos excretados. Un examen de la composición del fermentado de leche mostró que los cultivos estaban presentes en aproximadamente las mismas proporciones a la que se inocularon (datos no mostrados), es así probable que el proceso de fermentación de la leche proporcione a las cepas *Lb. murinus* una ventaja selectiva en condiciones intestinales posteriores. La investigación de las cifras de cultivos individuales excretados (Fig. 3) reveló niveles combinados similares de *Lb. pentosus* DPC6004 y *Lb. salivarius* subesp *salivarius* DPC 6005 tanto en animales alimentados con fermentado como con suspensión el día 8 p.i. y el día 23 p.i. Debido a la ausencia de diferencias observadas en los resultados para ambas agrupaciones probióticas, creemos que cualquier efecto probiótico puede atribuirse al "factor común" en los dos tratamientos, es decir, *Lb. pentosus* DPC6004 y *Lb. salivarius* subesp *salivarius* DPC 6005. Esto está soportado por nuestros resultados anteriores (Gardiner *et al.*, 2.004) que no muestran disminución en las cifras de *Enterobacteriaceae* aislado de las heces de cerdos alimentados de las cepas *Lb. murinus* pero grandes reducciones en animales alimentados con cualquiera de las cepas DPC6004, DPC6005 o DPC6006 o una mezcla de las cinco cepas. También es obvio que las cepas predominantes devueltas de los animales a los que se administraron mezclas probióticas puede no ser la causa real de cualquier efecto positivo observado. También hemos observado, sin embargo, que *Lb. salivarius* subesp *salivarius* DPC6005 produce un principio activo de bacteriocina contra *Lb. delbruekii* subesp *bulgaricus* (datos no mostrados). La observación de un "ingrediente activo" similar en ambos grupos probióticos ensayados nos lleva a combinar los datos de ambos grupos en algunos ensayos estadísticos, como se describió anteriormente.

Los datos presentados en la presente memoria muestran que las mezclas probióticas de la invención llevan a una mejora de los síntomas clínicos en cerdos infectados con *S. typhimurium* de manera temprana durante la infección y recuentos de patógenos reducidos durante una base de tiempo mayor. Los probióticos examinados son, así, de interés para los implicados en la industria de producción porcina y los de un interés en la seguridad alimentaria. Los resultados obtenidos también demuestran la validez de los procedimientos *in vitro* e *in vivo* usados para aislar y seleccionar las bacterias (Casey *et al.*, 2.004b; Gardiner *et al.*, 2.004). Las similitudes entre los tubos digestivos del cerdo y de los seres humanos sugieren que los probióticos examinados en este estudio también pueden tener potencial en casos de salmonelosis humana. Esto marca, según nuestro conocimiento, el primer ejemplo de un tratamiento probiótico definido con efectos beneficiosos sobre los síntomas tanto clínicos como microbiológicos de cerdos expuestos a *S. typhimurium*.

Como conclusión, se administró a cerdos destetados una mezcla de cinco cepas probióticas como un fermentado de leche o una suspensión de leche y se investigaron los efectos en la infección por *Salmonella typhimurium*. La mezcla probiótica consistió en dos cepas de *Lactobacillus murinus* y una cepa de cada uno de *Lb. salivarius* subesp *salivarius*, *Lb. pentosus* y *Pediococcus pentosaceus*. Los animales tratados con probiótico presentaban morbilidad reducida y una frecuencia disminuida de diarrea. Estos animales también ganaron peso a una mayor velocidad que los cerdos de control a los que se administró leche desnatada. Las cifras fecales medias de *Salmonella* se redujeron significativamente en animales tratados con probióticos a los 15 días post-infección. El análisis RAPD PCR de

cultivos de probióticos excretados sugirió que los efectos de los probióticos observados se pueden atribuir a dos de los cinco cepas, *Lb. salivarius* subesp *salivarius* y *Lb. pentosus*. Estas cepas ofrecen en particular un potencial significativo para uso en la industria de producción porcina.

#### Referencias

- 5 Alvarez-Olmos, M.I. y Oberhelman, R.A. 2.001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis.* 32 (11): 1.567-76.
- Anonymous 2.002a. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2.000. Disponible en [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/mr/mr08\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/mr/mr08_en.pdf).
- 10 Anonymous 2.002b. Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la vigilancia de la zoonosis y los agentes zoonóticos, que enmienda la Decisión del Consejo 90/424/EEC y que revoca la Directiva del Consejo 92/117/EEC. Disponible en [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/lip/latest/doc/2002/com2002\\_0684en01.doc](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/lip/latest/doc/2002/com2002_0684en01.doc).
- Anonymous. 2.003. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illnesses - Selected Sites, United States, 2.002. Informe Semanal sobre Morbilidad y Mortalidad 52: 340-3.
- 15 Boughton, C., Leonard, F.C., Egan, J., Kelly, G., O'Mahony, P., Markey, B.K. y Griffin, M. 2.004. Prevalence and number of Salmonella in Irish retail pork sausages. *J Food Protect.* 67: 1.834-39.
- Casey, P.G., Butler, D., Gardiner, G.E., Tangney, M., Simpson, P., Lawlor, P.G., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C. y Fitzgerald, G.F. 2.004a. Salmonella carriage in an Irish pig herd: correlation between serological and bacteriological detection methods. *J. Food Protect* 67 (12): 2.797-800.
- 20 Casey, P.G., Casey, G.D., Gardiner, G.E., Tangney, M., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C. y Fitzgerald, G.F. 2.004b. Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* 39 (5): 431-8.
- Chang, Y. H., J. K. Kim, H. J. Kim, W. Y. Kim, Y. B. Kim, y Y. H. Park. 2.001. Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80:193-9.
- 25 Coakley, M., R. P. Ross, y D. Donnelly. 1.996. Application of the polymerase chain reaction to the rapid analysis of brewery yeast strains. *J. Inst. Brew.* 102: 349-354. Davies, R., G. Paiba, S. Evans, y B. Dalziel. 2.000. Surveys for Salmonella in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Vet. Rec.* 147: 695.
- Drago, L., Gismondo, M.R., Lombardi, A., de Haen, C. y Gozzini, L. 1.997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters* 153: 455-463.
- 30 FAO/WHO. 2.001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria - joint FAO/WHO expert consultation. Córdoba, Argentina, 1-4 de octubre de 2.001. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/)
- Fedorka-Cray, P.J., Bailey, J.S., Stern, N.J., Cox, N.A., Ladely, S.R. y Musgrove, M. 1.999. Mucosal competitive exclusion to reduce Salmonella in swine. *J Food Prot.* 62 (12): 1.376-80.
- 35 Felley, C.P., Corthesy-Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L. y Michetti, P. 2.001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on Helicobacter pylori gastritis in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13 (1): 25-9.
- Fernandez, M.F., Boris, S. y Barbes, C. 2.003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94: 449-455.
- 40 Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Stanton, C. 1.998. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived Lactobacillus paracasei strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2.192-9.
- Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey, G., Lynch, P.B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. y Ross, R.P. 2.004. Relative ability of orally administered Lactobacillus murinus to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 70 (4): 1.895-906.
- 45 Gebreyes, W.A., P.R. Davies, P.-K. Turkson, W.E. Morgan Morrow, J.A. Funk y C. Altier. 2.004. Salmonella enterica serovars from pigs on farms and after slaughter and validity of using bacteriologic data to define herd Salmonella status. *J Food Protect.* 67: 691-697.
- Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Callaway, T.R., Poole, T.L., Edrington, T.S., Fedorka-Cray, P.J. y Nisbet, D.J. 2.003. Competitive exclusion of Salmonella from the gut of neonatal and weaned pigs. *J Food Prot.* 66 (8): 1.353-9.

- Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B. y Nisbet, D.J. 2.000. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and faecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.* 64: 204-7.
- 5 Hilton, E., Kolakowski, P., Singer, C. y Smith, M. 1.997. Efficacy of *Lactobacillus GG* as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med.* 4 (1): 41-43.
- Hoyos, A.B. 1.999. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 3 (4): 197-202.
- 10 Hurd, H.S., J.K. Gailey, J.D. McKean y M.H. Rostagno. 2.001. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella typhimurium*-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1.194-1.197.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P. y Koivula, T. 1.991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Paediatrics.* 88 (1): 90-7.
- Johnson-Henry, K.C., Mitchell, D.J., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N.L. y Sherman, P.M. 2.004. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig. Dis. Sci.* 49: 1.095-102.
- 15 La Ragione, R.M., Narbad, A., Gasson, M.J. y Woodward, M.J. 2.004. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett Appl Microbiol.* 38 (3): 197-205.
- Lema, M., Williams, L. y Rao, D.R. 2.001. Reduction of faecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin. Res.* 39 (1): 31-39.
- 20 de Man, J.C. (1.983). MPN tables, corrected. *Eur J Appl Microbiol.* 17: 301-5. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. y Takeda, Y. 2.001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* 69: 1.101-8.
- 25 Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Monfort, J.M. y Garriga, M. 1.999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol.* 65 (11): 4.981-6.
- Quirke, A.-M., N. Leonard, G. Kelly, J. Egan, P.B. Lynch, T. Rowe y n. 2.001. Prevalence of *Salmonella* serotypes on pig carcasses from high- and low-risk herds slaughtered in three abattoirs. *Berl. Munch. Tierarztl.* 114: 360-2.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. y McCormick, J.K. 2.003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658-72.
- 30 Silva, A.M., Barbosa, F.H., Duarte, R., Vieira, L.Q., Arantes, R.M. y Nicoli, J.R. 2.004. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *J Appl Microbiol.* 97 (1): 29-37.
- Swanenburg, M., H.A. Urlings, J.M. Snijders, D.A. Keuzenkamp y F van Knapen. 2.001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 243-254.
- 35 Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Mueller, P.O. y Parks, A.H. 1.998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol.* 36 (3): 641-7.

**Tabla 1.** Porcentaje de aumento de peso de cerdos por un periodo de prueba de 30 días. Los animales se pesaron previamente a la administración de cultivo inicial y con posterioridad al tratamiento final.

Cerdo n°	% aumento en peso		
	Control	Fermentado	Suspensión
1	227	318	317
2	254	316	253
3	271	250	272
4	272	256	268
5	205	287	379

(continúa)

Cerdo n°	Control	Fermentado	Suspensión
Media	246	285	298

5 **Tabla 2.** Presencia o ausencia de diarrea en muestras fecales de cerdos infectados por *Salmonella* Typhimurium en los números de días indicados post-infección inicial. Y = positivo en diarrea; N = negativo en diarrea (a) animales de control (b) animales a los que se administra fermentado probiótico. (c) animales a los que se administra suspensión probiótica.

(a)

Cerdo	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	Y	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y	N
3	N	N	N	N	N
4	N	Y	Y	Y	N
5	N	N	Y	Y	Y

(b)

Cerdo	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	Y	N	N	N	N
4	Y	Y	N	N	N
5	N	N	N	N	N

(c)

Cerdo	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	N	N	N	N	N
2	Y	Y	Y	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N

**Tabla 3.** Puntuación clínica para cerdos incluidos en los diferentes grupos de tratamiento durante los primeros nueve días post-infección. Sistema de puntuación: Actitud: 0 = normal; 1 = debe ser estimulado para levantarse; 2 = se levanta con ayuda; 3 = no se puede levantar. Heces: 0 = normal 1 = blanda. 2 = diarrea leve. 3 = diarrea acuosa, grave.

Cerdo n°	Puntuación clínica total		
	Control	Fermentado	Suspensión
1	15	1	2
2	7	7	2
3	0	0	3
4	4	0	6
5	9	0	2
<b>Media</b>	7,0	1,6	3,0

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición probiótica que comprende uno o más cultivos microbianos seleccionados del grupo que consiste en los cultivos depositados en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen, Escocia el 25 de abril de 2.005 con los Números de Acceso:

- 5            NCIMB 41270 Lactobacillus murinus DPC 6002  
              NCIMB 41271 Lactobacillus murinus DPC 6003  
              NCIMB 41272 Lactobacillus pentosus DPC 6004  
              NCIMB 41273 Lactobacillus salivarius DPC 6005  
              NCIMB 41274 Pediococcus pentosaceus DPC 6006,

10        para su uso en la reducción y/o control de la propagación de Salmonella en animales de granja.

2. Una composición probiótica que comprende todas las cepas reivindicadas en la reivindicación 1.

3. Una composición probiótica reivindicada en cualquier reivindicación precedente, en la que el cultivo microbiano se liofiliza o congela seco.

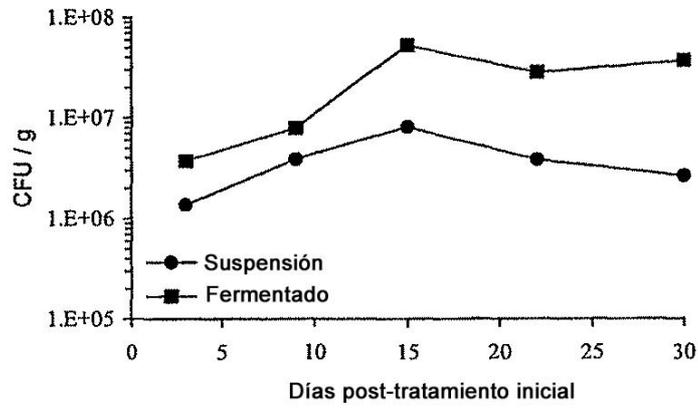
15        4. Una composición probiótica reivindicada en cualquier reivindicación precedente, formulada como una composición alimento animal.

5. Composición reivindicada en la reivindicación 4, en la que el nivel del cultivo microbiano se adapta para proporcionar una dosis total de al menos  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por día al animal que se está alimentando.

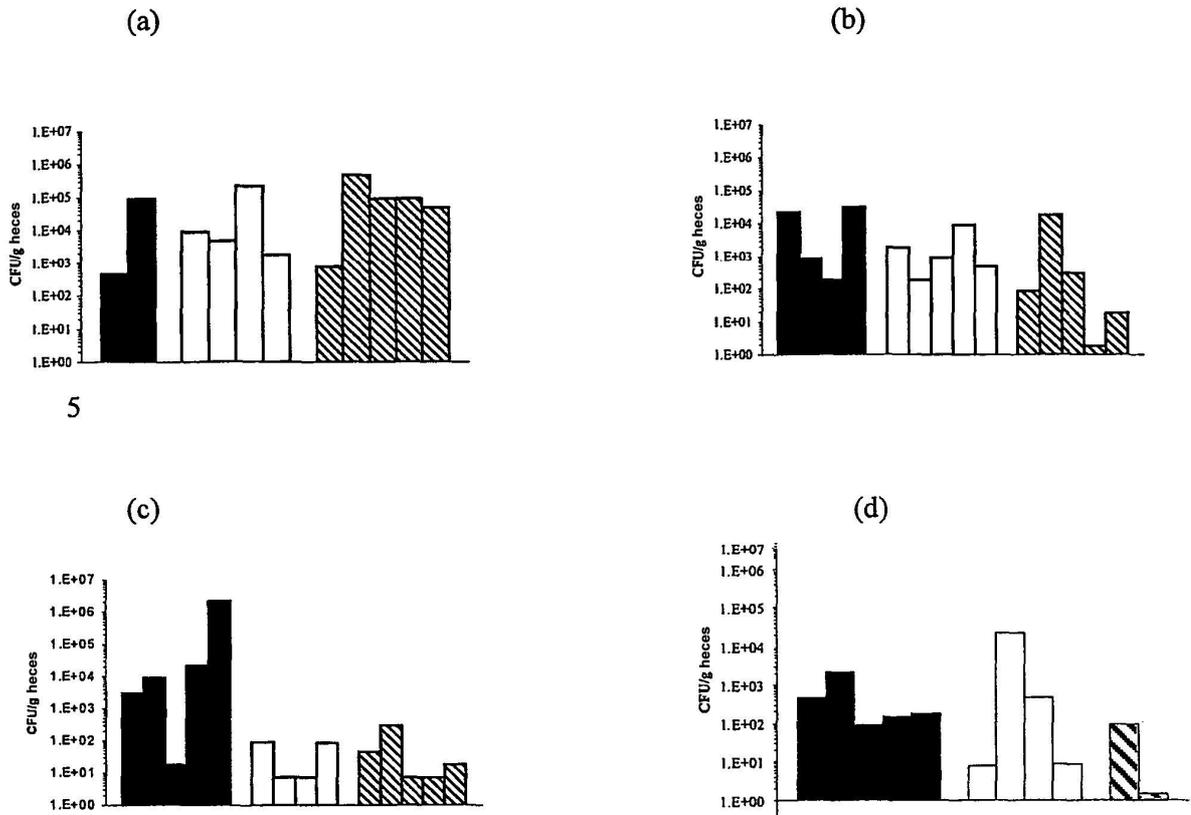
20        6. Uno o más cultivos microbianos seleccionados del grupo que consiste en los cultivos depositados en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen, Escocia el 25 de abril de 2.005 con los Números de Acceso:

- NCIMB 41270 Lactobacillus murinus DPC 6002  
              NCIMB 41271 Lactobacillus murinus DPC 6003  
              NCIMB 41272 Lactobacillus pentosus DPC 6004  
              NCIMB 41273 Lactobacillus salivarius DPC 6005  
25        NCIMB 41274 Pediococcus pentosaceus DPC 6006,

para su uso en la reducción y/o control de la propagación de Salmonella en animales de granja.

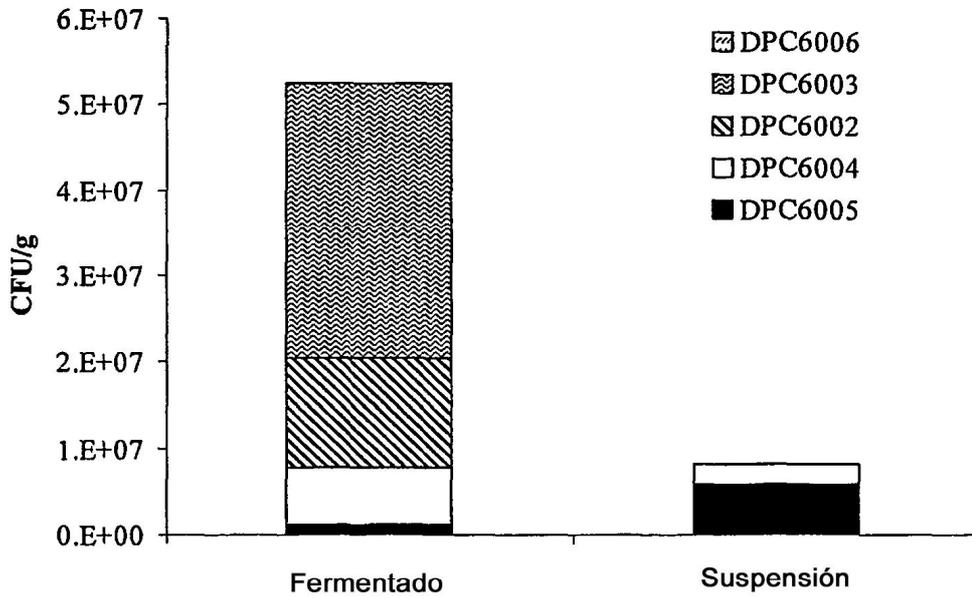


**Fig.1.** Número total de colonias resistentes a la rifampicina aisladas de muestras fecales de cerdos a los que se ha administrado una mezcla probiótica como fermentado o suspensión.

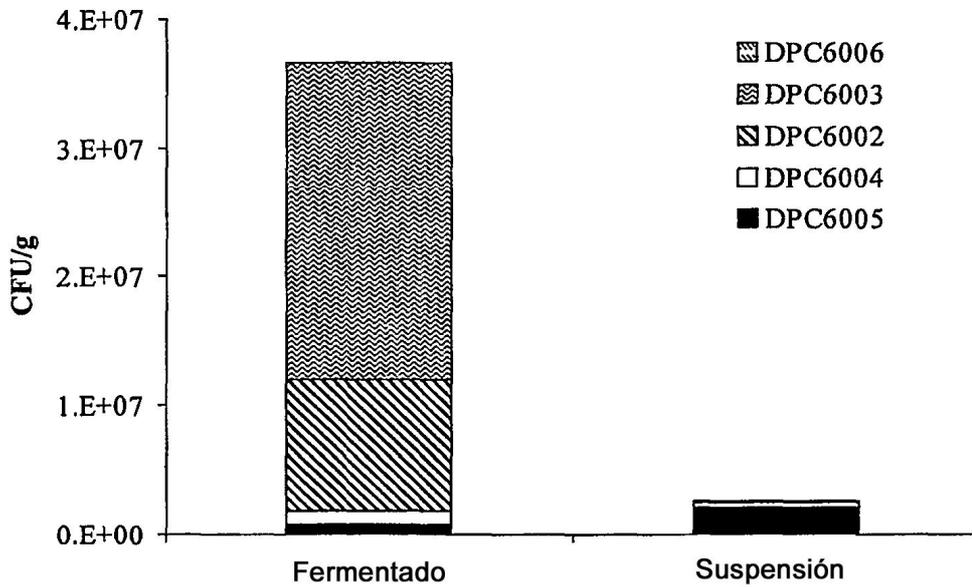


**Fig 2.** Número de *Salmonella* enumeradas por MPN de heces de cerdos expuestos a *Salmonella Typhimurium* PT12. Controles: barras negras. Suspensión: barras blancas. Fermentado: barras a rayas. (a) cuatro días post-infección inicial. (b) ocho días p.i. (c). 15 días p.i. (d) 23 días p.i.

(a)



(b)



**Fig 3.** Número y distribución de cultivos probióticos individuales aislados de muestras fecales de cerdos a los que se ha administrado una mezcla probiótica como un fermentado o una suspensión. (a) ocho días post-infección inicial. (b) 23 días p.i.

spec1 492