

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 037**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/23</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/25</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/747</b>	(2015.01)
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/GB2012/051686**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13008039**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12737592 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2732023**

54 Título: **Cepas bacterianas aisladas de cerdos**

30 Prioridad:

**14.07.2011 GB 201112091**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2018**

73 Titular/es:

**4D PHARMA RESEARCH LIMITED (100.0%)  
Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road  
Aberdeen AB25 2ZS, GB**

72 Inventor/es:

**KELLY, DENISE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 656 037 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).

**Cepas bacterianas aisladas de cerdos****Descripción**

5 **[0001]** La presente invención se refiere a cepas bacterianas aisladas de cerdos. Más específicamente, la invención se refiere al aislamiento de bacterias de ácido láctico de cerdos criados orgánicamente. Las bacterias de ácido láctico reivindicadas tienen aplicaciones probióticas y terapéuticas útiles.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 **[0002]** La composición de la flora microbiana de los cerdos, su función inmune innata de intestino y la posible susceptibilidad a la infección está fuertemente influenciada por el entorno en el que se criaron durante la vida temprana (Mulder *et al*, 2009). Los cerdos criados al aire libre generalmente tienen un sistema inmune intestinal más desarrollado, funcionan mejor y son más saludables que sus homólogos criados en el interior. El ambiente al aire libre influye dramáticamente en la diversidad microbiana del intestino y se asocia con altos niveles de *Firmicutes*, en particular Bacterias de Ácido Láctico [LAB].

15 **[0003]** Los LAB comprenden un clado de bacterias gram-positivas, bajas en GC, tolerantes a los ácidos, generalmente no esporulantes, que no respiran, que están asociadas con ciertas características metabólicas y fisiológicas comunes. LAB son bacilos en forma de bastón o coccus que se caracterizan por una mayor tolerancia a un rango de pH inferior. LAB produce ácido láctico como el principal producto metabólico de la fermentación de carbohidratos y se encuentra entre los grupos más importantes de microorganismos utilizados en la industria alimentaria.

20 **[0004]** Los *lactobacilos* son predominantes en la flora intestinal de cerdos criados orgánicamente (al aire libre). En contraste, el número de estas bacterias es bajo en cerdos criados en interiores y los niveles de filotipos potencialmente patógenos son altos (Mulder *et al*, 2009). Además, se sabe que el desarrollo inmune y la función de los cerdos criados en interiores se desvían de lo normal. En particular, se sabe que está aumentada la expresión de los genes de interferón tipo 1, complejo mayor de histocompatibilidad clase I y varias quimiocinas (Mulder *et al*, 2009).

25 **[0005]** Las bacterias de ácido láctico pueden modificar la estructura y función de la flora y la tripa de varias maneras (Cotter *et al*, 2005; Ohashi y Ushida, 2009). Por ejemplo, pueden competir con bacterias dañinas por nutrientes clave o sitios de fijación en el intestino, lo que resulta en su exclusión. Alternativamente, pueden producir sustancias bioactivas que ayudan o promueven la colonización por bacterias beneficiosas o que matan/interfieren con el crecimiento de bacterias potencialmente dañinas o patógenas. Alternativamente, estos factores bioactivos pueden ser inmunomoduladores que promueven el desarrollo inmune y la integridad de la barrera del intestino.

30 **[0006]** Las cepas de LAB varían mucho en su actividad biológica. La presente invención busca proporcionar cepas de LAB que tengan propiedades terapéuticamente útiles. Más específicamente, la invención busca proporcionar cepas de LAB que sean capaces de promover el desarrollo y la salud del intestino y el sistema inmune, teniendo así un potencial terapéutico considerable como probióticos.

35 **[0007]** El documento WO 2002/070670 describe una cepa *L. reuteri* y pone a prueba su actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. Enteritidis* y su susceptibilidad a varios antibióticos.

**DECLARACIÓN DE LA INVENCION**

40 **[0008]** El presente solicitante ha demostrado que la microbiota de cerdos criados exteriores contienen cepas de LAB que producen factores bioactivos potentes y específicos anti-microbianos o de inmuno-moduladores/ moduladores de células.

45 **[0009]** Los aspectos de la invención, junto con las realizaciones preferidas, se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

50 **[0010]** Un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico porcino que se selecciona de:

- 55
- 60 (i) NCIMB 41846;
  - (ii) NCIMB 41847;
  - (iii) NCIMB 41848;
  - (iv) NCIMB 41849;
  - (v) NCIMB 41850;
  - (vi) NCIMB 42008;
  - 65 (vii) NCIMB 42009;
  - (viii) NCIMB 42010;

- (ix) NCIMB 42011;
- (x) NCIMB 42012; y cualquier combinación de dos o más de los mismos.

5 [0011] Un segundo aspecto se refiere a una composición que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente.

[0012] Un tercer aspecto se refiere a una composición probiótica que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

10 [0013] Un cuarto aspecto se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención para uso en la medicina.

[0014] Un quinto aspecto se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención para uso en el tratamiento de un trastorno intestinal en un sujeto.

15 [0015] Un sexto aspecto se refiere al uso de una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno intestinal en un sujeto.

20 [0016] Un octavo aspecto de la invención se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención para mejorar la microbiota intestinal.

[0017] Un décimo aspecto se refiere a un alimento que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

25 [0018] Un undécimo aspecto se refiere a un producto alimenticio que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

[0019] Un aspecto duodécimo refiere a un suplemento dietético que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

30 [0020] Un aspecto decimotercero se refiere a un aditivo alimentario que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

35 [0021] Un aspecto decimocuarto refiere a un procedimiento para la producción de un probiótico, comprendiendo dicho procedimiento el cultivo de una cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 [0022] Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico de la especie porcina. La cepa bacteriana de ácido láctico de la invención se puede caracterizar por una o más de las siguientes características:

- 45 (i) la capacidad de mostrar actividad antimicrobiana contra *E. coli*;
- (ii) la capacidad para exhibir la actividad antimicrobiana frente a *S. enteritidis*;
- (iii) la capacidad de suprimir la inflamación en células IPEC inducidas por 12-O-tetradecaboilforbol-13-acetato (PMA);
- (iv) la capacidad de bloquear la unión o la invasión de las células del IPEC por *S. enteritidis*;
- 50 (v) la capacidad de bloquear la unión o invasión de células IPEC por *E. coli*;
- (vi) la ausencia de resistencia a antibióticos a uno o más antibióticos seleccionados de los siguientes: ampicilina; cefotaxima; cloranfenicol; eritromicina; gentamicina; tetraciclina; vancomicina; ácido nalidíxico metronizado; y kanamicina; y
- (vii) la capacidad de exhibir estabilidad al calor cuando se somete a tres ciclos de calentamiento, comprendiendo cada ciclo de calentamiento a una temperatura de 70°C durante un período de 15 minutos.

55 [0023] Como se usa en el presente documento, el término "porcina" significa "de o referente a porcina", es decir, de o referente a cualquiera de varios mamíferos de la familia Suidae, especialmente el cerdo casero, *Sus scrofa domestica*, o *Sus domestica* cuando joven o de tamaño comparativamente pequeño.

60 [0024] Preferiblemente, el cerdo tiene menos de 3 meses de edad, preferiblemente, menos de 2 meses de edad.

[0025] Preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico porcino es de un cerdo criado orgánicamente. En este sentido, preferiblemente, los cerdos son criados al aire libre, afuera (con exposición al suelo) y en ausencia de antibióticos, promotores del crecimiento y/o potenciadores del crecimiento.

65 [0026] Preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico porcino es de un cerdo criado al aire libre.

Preferiblemente, los cerdos se crían en el exterior durante al menos el 60% de sus vidas. Más preferiblemente, los animales se crían en el exterior durante al menos el 80% de sus vidas, más preferiblemente, al menos el 90% de sus vidas, incluso más preferiblemente todavía, el 100% de sus vidas.

5 **[0027]** En otra realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico está en la forma de una población bacteriana viva, una población bacteriana liofilizada, una preparación bacteriana no viable, o los componentes celulares de los mismos. Preferiblemente, cuando la cepa bacteriana está en forma de una preparación bacteriana no viable, se selecciona entre bacterias muertas por calor, bacterias irradiadas y bacterias lisadas.

10 **[0028]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico es en forma de una bacteria viva, una bacteria muerta, o componentes celulares de los mismos.

**[0029]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico está en forma aislada. Como se usa en este documento, el término "aislado" significa aislado de su entorno nativo.

15 **[0030]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico es en forma biológicamente pura. Como se usa en el presente documento, el término "biológicamente puro" se refiere a una cepa bacteriana en forma de un cultivo de laboratorio que está sustancialmente libre de otras especies de organismos. Preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico está en forma de un cultivo de una única especie de organismo.

20 **[0031]** Tal como se utiliza aquí, el término "cepa bacteriana de ácido láctico" también abarca los mutantes de dicha cepa bacteriana de ácido láctico. Como se usa en este documento, el término "mutante" incluye cepas bacterianas derivadas que tienen al menos 93% de homología, preferiblemente al menos 96% de homología, más preferiblemente 98% de homología con la secuencia de polinucleótidos de una cepa referenciada, pero que comprenden mutaciones en otras secuencias en la genoma bacteriana. Los mutantes pueden obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética que infieren la alteración del material genético de las cepas de la invención o que infieren una recombinación del material genético de las cepas de la invención con otras moléculas. Típicamente, para obtener tales cepas mutantes, una persona experta en la técnica puede usar técnicas de mutagénesis estándar tales como radiación UV o exposición a productos químicos mutagénicos.

30 **[0032]** Tal como se utiliza aquí, el término "mutaciones" incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden al menos alteraciones de una sola base que incluyen deleciones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo modificación genética introducida en un nucleótido padre o secuencia de aminoácidos mientras que se mantiene al menos el 50% de homología con la secuencia original. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones tiene al menos 60%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente todavía 85% de homología con la secuencia parental. Como se usa en el presente documento, la secuencia "homología" puede determinarse usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la homología se puede determinar usando el programa "BLAST" del algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

40 **[0033]** Tal como se utiliza aquí, el término "cepa bacteriana de ácido láctico" también abarca homólogos de las cepas bacterianas de ácido láctico. Como se usa en este documento, el término "homólogo" se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la cepa bacteriana de ácido láctico parental (en lo sucesivo denominada "secuencia homóloga (s)"). Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con la secuencia de nucleótidos diana. Aquí, el término "homología" se puede equiparar con "identidad".

50 **[0034]** En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la cepa bacteriana de ácido láctico original (la secuencia de sujeto).

55 **[0035]** Las comparaciones de homología se pueden realizar a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias. El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto se llama una alineación "desacoplada". Típicamente, tales alineaciones no acumuladas se realizan solo en un número relativamente corto de residuos.

60 **[0036]** Aunque este es un método muy simple y consistente, falla al tomar en consideración que, por ejemplo, en un par por lo demás idéntico de secuencias, una inserción o deleción provocará que los siguientes restos de aminoácidos se coloquen fuera de la alineación, lo que potencialmente da como resultado una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineación global. El cálculo del máximo % de homología, por lo tanto, en primer lugar requiere la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos

de software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase Ausubel et al. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed - Capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174 (2) : 247 - 50; FEMS Microbiol Lett 1999 177 (1): 187 - 8), FASTA (Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 403 - 410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al. 1999, páginas 7-58 a 7-60).

**[0038]** Preferiblemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina sobre por lo menos 20 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 30 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 40 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente por encima de al menos 60 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 100 nucleótidos contiguos. Preferiblemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar a lo largo de toda la secuencia.

**[0039]** La identificación tradicional de bacterias sobre la base de características fenotípicas generalmente no es tan precisa como la identificación basada en métodos genotípicos. La comparación de la secuencia de gen 16S ARNr bacteriano ha surgido como una técnica genética preferida y permite identificar nuevas cepas mediante la comparación de secuencias con secuencias de ADN bacterianas conocidas mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia del gen 16S ARNr es universal en bacterias, por lo que las relaciones se pueden medir a través de muchas bacterias diferentes. En general, la comparación de la secuencia de 16S ARNr permite la diferenciación entre organismos a nivel de género en todos los principales phyla de bacterias, además de clasificar las cepas en múltiples niveles, incluido el nivel de especies y subespecies. La secuencia del gen 16S ARNr se ha determinado para una gran cantidad de cepas. GenBank, el mayor banco de datos de secuencias de nucleótidos, tiene más de 20 millones de secuencias depositadas, de las cuales más de 90,000 son de genes 16S ARNr. Esto significa que hay muchas secuencias previamente depositadas contra las cuales se compara la secuencia de una cepa desconocida.

**[0040]** La cepa bacteriana de ácido láctico tiene una secuencia de gen 16S ARNr seleccionada de SEQ ID NOS 1-87. Otra realización de la invención se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico que comprende una secuencia de gen 16S ARNr seleccionada de SEQ ID NOS 1-87 Usos/métodos preferidos se aplican a este aspecto *mutatis mutandis*.

**[0041]** El término "homólogo" es como se define anteriormente en esta memoria. Como se usa en este documento, el término "variante" incluye cualquier variación en la que: (a) uno o más nucleótidos están sustituidos por otro nucleótido o eliminados, (b) el orden de dos o más nucleótidos está invertido, (c) tanto (a) como (b) están presentes juntos. Preferiblemente, las variantes surgen de uno de (a), (b) o (c). Más preferiblemente, uno o dos nucleótidos están sustituidos o delecionados. Incluso más preferiblemente, un nucleótido se sustituye por otro.

**[0042]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad de mostrar actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. La actividad antimicrobiana observada es muy probablemente en virtud de sustancias antimicrobianas producidas por las cepas bacterianas de ácido láctico de la invención, aunque la naturaleza de estas sustancias antimicrobianas no ha sido determinada.

**[0043]** En el contexto de la presente invención, la capacidad de mostrar actividad antimicrobiana frente a *E. coli* puede ser determinada midiendo la inhibición del crecimiento de *E. coli* en un ensayo de difusión de pocillo *in vitro*. Detalles adicionales del ensayo de difusión del pocillo se exponen en los ejemplos adjuntos. El ensayo se lleva a cabo usando *Escherichia coli* K88 en agar MacConkey No 3, incubando las placas durante 16 horas a 37°C. Más específicamente, se agrega *Escherichia coli* K88 al agar (1 ml de una dilución 1: 1000 de un cultivo nocturno de *Escherichia coli* K88 en 200 ml de agar para dar el equivalente a 106 CFU/ml). El agar se vierte en placas de Petri y se deja fraguar. Las placas se marcan en cuadrantes y se recortan aproximadamente 5 mm en cada cuadrante. Se agrega una alícuota (60 µl) de medios acondicionados o caldo MRS a los pocillos. Las placas se cubren e incuban durante 16 horas a 37°C. Son fotografiados usando una cámara digital. Las imágenes se transfieren a Photoshop, y el diámetro del pocillo y la zona de inhibición se determinaron utilizando la herramienta de medición.

**[0044]** En el contexto de matar *E. coli* en el ensayo de difusión muy por encima, preferiblemente la cepa bacteriana de ácido láctico de la invención exhibe <20000 unidades de inhibición, más preferiblemente 20000-40000 unidades, incluso más preferiblemente 40000-60000 unidades, más preferiblemente 60000-80000 unidades, más preferiblemente 80000-100000 unidades de inhibición, incluso más preferiblemente aún > 100000 unidades de inhibición.

**[0045]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad de mostrar actividad antimicrobiana frente a *S. enteritidis*. De nuevo, la actividad antimicrobiana observada es muy probablemente en virtud de sustancias antimicrobianas producidas por las cepas bacterianas de ácido láctico de la invención, aunque no se ha determinado la naturaleza de estas sustancias antimicrobianas.

**[0046]** En el contexto de la presente invención, la capacidad de mostrar actividad antimicrobiana frente a *S. enteritidis* puede determinarse midiendo la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* en un ensayo de

difusión de pocillo *in vitro*. Detalles adicionales del ensayo de difusión del pocillo se exponen en los ejemplos adjuntos. El ensayo se lleva a cabo utilizando *Salmonella enteritidis* S1400 en agar XLD, incubando las placas durante 16 horas a 37°C. El agar XLD se prepara según las instrucciones del fabricante y se enfría a 45°C. Se agrega *Salmonella enteritidis* S1400 al agar XLD (1 ml de una dilución 1: 1000 de un cultivo nocturno de *Salmonella enteritidis* S1400 en 200 ml de agar para dar el equivalente a 106 UFC/ml). El agar XLD se vierte en placas de Petri y se deja fraguar. Las placas se marcan en cuadrantes y se recortan aproximadamente 5 mm en cada cuadrante. Se agrega una alícuota (60 ml) de medio acondicionado o caldo MRS a los pocillos. Las placas se cubren e incuban durante 16 horas a 37°C y los datos se analizan como se describió anteriormente para el ensayo de *E. coli*.

**[0047]** En el contexto de matar *Salmonella enteritidis* en el ensayo de difusión en pocillo anteriormente, preferiblemente la cepa bacteriana de ácido láctico de la invención exhibe <20000 unidades de inhibición, más preferiblemente 20000-40000 unidades, incluso más preferiblemente 40000-60000 unidades, más preferiblemente 60000-80000 unidades, más preferiblemente 80000-100000 unidades de inhibición, incluso más preferiblemente todavía >100000 unidades de inhibición.

**[0048]** En una realización alternativa, la capacidad de exhibir una actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis* se puede determinar mediante la medición de la capacidad de inhibir *S. enteritidis in vivo* en ratones C3H/HeN o C57Bl/6. Detalles adicionales de ensayos apropiados *in vivo* se exponen en los ejemplos adjuntos.

**[0049]** Específicamente, C3H/HeN y ratones C57Bl/6 se tratan con una cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la invención antes y después de la estimulación con *Salmonella enteritidis*. Los ratones se sacrifican y se disecan 6 (C57Bl/6) o 10 (C3H/HeN) días después de la infección y se detecta salmonela viable en tejidos sistémicos (p.ej., nódulo linfático mesentérico, hígado y bazo) en el intestino (por ejemplo, ciego, colon) y en las heces en comparación con los controles apropiados. La actividad *in vivo* de la cepa bacteriana de ácido láctico de la invención también se puede medir determinando el nivel de mieloperoxidasa [MPO], un marcador para neutrófilos, en el intestino de ratones C3H/HeN tratados con Salmonela o Salmonela más LAB. La MPO en el intestino aumenta mucho debido a la infección por salmonela, debido al reclutamiento de neutrófilos en el intestino, parte de la respuesta del huésped a la infección. El tratamiento conjunto con una cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la invención reduce la actividad de MPO en el intestino de ratones infectados con salmonela, lo que indica que las respuestas inflamatorias intestinales a la infección disminuyen en estos animales, en relación con los experimentos de control.

**[0050]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad para suprimir la inflamación en las células IPEC inducidas por 12-O-tetradecaboilforbol-13-acetato (PMA). En el contexto de la presente invención, esto se refiere a la capacidad de la cepa bacteriana de ácido láctico para bloquear la expresión génica de interleuquina-8 (ILO-8) desencadenada por PMA. Más específicamente, se puede determinar midiendo la supresión de la inflamación en células IPEC-J2 inducidas por PMA, cuando se incubaba durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Después del ARN y la transcripción inversa, la PCR en tiempo real se lleva a cabo en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7500 que funciona con el software 7500 Fast System v 1.4.0 Sequence Detection Software versión 1.4 (Applied Biosystem), utilizando cebadores para ILO-8 porcina y TNF- $\alpha$  (preparado por Sigma Aldrich). La mezcla de reacción es: 10  $\mu$ l de mezcla maestra Power Sybergreen, 2,5  $\mu$ l de cebador directo, 2,5  $\mu$ l de cebador inverso y 5  $\mu$ l de ADNc, la PCR en tiempo real se ejecuta según el protocolo estándar 7500 (95°C, 10 min, 1 ciclo, 95°C, 15 segundos, 40 ciclos, 60°C, 1 min, 40 ciclos, 95°C, 15 segundos, 1 ciclo, 60°C, 1 min, 1 ciclo, 95°C, 15 segundos, 1 ciclo, 60°C, 15 segundos, 1 ciclo). La expresión de los genes de ILO-8 y TNF- $\alpha$  se analiza y compara con el gen "de mantenimiento"  $\beta$ -actina. Para comparación, los valores se dan como la relación de ILO-8 y TNF- $\alpha$  por  $\beta$ -actina o cambio de pliegue. Detalles adicionales de este ensayo se exponen en los ejemplos adjuntos.

**[0051]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad de bloquear la unión o la invasión de las células del IPEC por *S. enteritidis*. Esto se puede medir mediante el ensayo expuesto en los ejemplos adjuntos. Específicamente, se cultivan monocapas de células IPEC-J2 hasta 3 días después de la confluencia en placas de 24 pocillos y se sincronizan mediante la adición de medio DTS 24 horas antes de su uso. Los cultivos nocturnos de LAB LABORATORIO (10 ml) se centrifugan y la bacteria se resuspende en solución salina tamponada con fosfato [PBS]. Se agrega una alícuota (50  $\mu$ l) de LAB a los pocillos. Las placas se incuban durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Un cultivo de una noche de *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* S1400 [*S. enteritidis* S1400] se subcultiva (0,5 ml en 10 ml) en medio Luria Bertani (LB) y se incubaba aeróbicamente durante 2-3 horas a 37°C hasta que alcanza una densidad óptica (560 nm) de 0,8 (una concentración equivalente a 1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml). El cultivo se centrifuga y la bacteria se resuspende en PBS. Se agrega una alícuota (50 ml) a los pocillos de las células IPEC-J2. Las placas se incuban durante otras 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Las monocapas de células IPEC-J2 se lavan con HBSS. Se agrega una solución (0,5 ml) de PBS que contiene Triton-X100 (10 ml/litro) a cada pocillo, la monocapa se raspa y se dispersa. La salmonela viable se estima en placas de agar XLD (incubadas durante 24 horas a 37°C) por el método Miles y Misra. Las bacterias del ácido láctico se determinan por el mismo procedimiento (incubadas anaeróbicamente durante 48 horas a 37°C).

**[0052]** Preferiblemente, en el contexto de la adhesión/invasión de células IPEC por *S. enteritidis*, la cepa bacteriana

de ácido láctico de la invención exhibe 0-20% de inhibición de adherencia/invasión, más preferiblemente 20-40%, incluso más preferiblemente 40-60%, más preferiblemente aún, 60-80%, incluso más preferiblemente aún, 80 -100% de inhibición de la adherencia/invasión medida por el ensayo anterior.

5 **[0053]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad de bloquear la unión o la invasión de las células del IPEC por *E. coli*. Esto se puede medir mediante un ensayo similar al descrito anteriormente para *S. Enteritidis*, y como se establece en los ejemplos adjuntos.

10 **[0054]** Preferiblemente, en el contexto de la adhesión/invasión de células IPEC por *E. coli* K88, la cepa bacteriana de ácido láctico de la invención exhibe 0-20% de inhibición de adherencia/invasión, más preferiblemente 20-40%, incluso más preferiblemente 40-60%, más preferiblemente todavía, 60-80%, incluso más preferiblemente aún, 80-100% de inhibición de la adherencia/invasión medida por el ensayo anterior.

15 **[0055]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la ausencia de resistencia a los antibióticos a uno o más antibióticos seleccionados entre los siguientes: ampicilina; cefotaxima; cloranfenicol; eritromicina; gentamicina; tetraciclina; vancomicina; ácido nalidíxico metronizado; y kanamicina. En el contexto de la presente invención, la resistencia a antibióticos puede determinarse midiendo el efecto de varios discos que contienen antibióticos en un cultivo de placa de agar MRS de la cepa bacteriana de ácido láctico, cuando se coloca en un recipiente anaeróbico y se incuba durante 24 horas a 37°C. Detalles adicionales del ensayo se exponen en los ejemplos adjuntos. Más específicamente, se extiende cerdo LAB [0,5 ml de una dilución 1: 100 de un cultivo de una noche] sobre la superficie de una placa de agar MRS y se seca. Las placas se marcan en 4 cuadrantes y en cada cuadrante se coloca un disco que contiene antibióticos [ampicilina, 10 µg. Cefotaxima, 30 µg. Cloranfenicol, 10 µg. Eritromicina, 15 µg. Gentamicina, 10 µg. Kanamicina, 30 µg. Metronizado, 50 µg. Ácido nalidíxico, 30 µg. Tetraciclina, 30 µg. Vancomicina, 30 µg]. Las placas se cubren, se colocan en un recipiente anaeróbico y se incuban durante 24 horas a 37°C. Las placas son fotografiadas usando una cámara digital. Las imágenes se transfieren a Photoshop, y el diámetro de la zona de inhibición se determina utilizando la herramienta de medida. Para cada antibiótico, se toma el área de exclusión para la cepa de prueba y se divide con el área máxima de exclusión obtenida para ese antibiótico.

20 **[0056]** Preferiblemente, el LAB de la invención se caracteriza por la ausencia de resistencia a los antibióticos ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, vancomicina, metronizadol, ácido nalidíxico y kanamicina. Más preferiblemente, el LAB de la invención se caracteriza por la ausencia de resistencia a los antibióticos ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, tetraciclina y vancomicina.

25 **[0057]** En una realización preferida de la invención, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por la capacidad de exhibir estabilidad al calor cuando se somete a tres ciclos de calentamiento, comprendiendo cada ciclo el calentamiento a una temperatura de 70°C durante un período de 15 minutos. Más detalles de los estudios de estabilidad térmica se exponen en los ejemplos adjuntos. Más específicamente, en el contexto de la presente invención, la estabilidad térmica se mide centrifugando un cultivo de una noche (10 ml) de LAB de cerdo aislado y resuspendiendo el sedimento en caldo MRS reciente (10 ml). Una alícuota (1 ml) se calienta a 70°C durante 15 minutos y luego se coloca en placa (0,5 ml) en agar MRS y se incuba en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C. Se detecta un pequeño número de colonias, se recogen, se siembran en tubos Hungate que contienen caldo MRS y se incuban durante 48 horas a 37°C. Este cultivo se centrifuga, se resuspende en caldo MRS, se calienta de nuevo a 70°C durante 15 min, se coloca en placas sobre agar MRS, se incuba en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C, se recoge y se siembra en tubos Hungate que contienen MRS caldo e incubado durante 48 horas a 37°C. Este cultivo se centrifuga, se resuspende en caldo MRS, se vuelve a calentar a 70°C durante 15 minutos, se coloca en placas (0,5 ml) en agar MRS, se incuba en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C, se elimina, se siembra en tubos Hungate que contienen caldo MRS y se incuban durante 48 horas a 37°C.

30 **[0058]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene dos cualquiera de los rasgos característicos seleccionados del grupo que consiste en (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) expuesto más arriba.

35 **[0059]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene tres cualesquiera de los rasgos característicos seleccionados del grupo que consiste en (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) expuesto más arriba.

40 **[0060]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene cualquier cuatro de los rasgos característicos seleccionados del grupo que consiste en (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) expuesto más arriba.

45 **[0061]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene cualquier cinco de los rasgos característicos seleccionados del grupo que consiste en (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) expuesto más arriba.

50 **[0062]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene cualquier seis de los rasgos característicos seleccionados del grupo que consiste en (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) expuesto más arriba.

55 **[0063]** En una realización preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico tiene los siete de los rasgos caracterizadores (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) y (vii) antes expuestos.

**[0064]** En una realización particularmente preferida, (A), la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por las características (i) y (ii) anterior.

**[0065]** En una realización particularmente preferida, (B), la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por las características (iv) y (v) anteriores.

**[0066]** En una realización particularmente preferida, (C), la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por las características (iv) y (v) anteriores.

**[0067]** En una realización particularmente preferida, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza por las características indicadas (D) a (G) del siguiente modo:

(D)(i) y (iv); o

(E)(i) y (v); o

(F)(ii) y (iv); o

(G)(ii) y (v);

**[0068]** Más preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza además por la característica (vi) además de las características mencionadas en cualquiera de las realizaciones (A) a (G) anteriormente.

**[0069]** Aún más preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza además por la característica (iii), además de aquellas características mencionadas en cualquiera de las realizaciones (A) a (G) anteriores. Aún más preferiblemente, la cepa bacteriana de ácido láctico se caracteriza adicionalmente por la característica (vii) además de las características enumeradas en cualquiera de las realizaciones (A) a (G) anteriores.

## 5 Depósitos biológicos

**[0070]** Una realización de la invención se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico aislado de las heces de los cerdos criados ecológicamente y seleccionados del grupo que consiste en cepas depositadas el 27 de junio de 2011 bajo los términos del Tratado de Budapest en la National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB) en NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, UK, AB21 9YA, bajo los siguientes números de acceso:

NCIMB 41846: *Lactobacillus reuteri* GGDK31;

NCIMB 41847: *Lactobacillus plantarum/pentosus/paraplantarum* GGDK161;

NCIMB 41848: *Lactobacillus johnsonii/taiwanensis/acidophilus/gasseri* GGDK255;

NCIMB 41849: *Lactobacillus plantarum/pentosus/helveticus/paraplantarum* GGDK258;

NCIMB 41850: *Lactobacillus johnsonii* GGDK266.

**[0071]** Los depósitos superiores NCIMB 41846, NCIMB 41847, NCIMB 41848, NCIMB 41849 y NCIMB 41850, fueron hechos por el Dr. George Grant del Instituto Rowett de Nutrición y Salud de la Universidad de Aberdeen, Greenburn Road, Aberdeen, AB21 9SB en nombre del solicitante, GT Biologies Limited.

**[0072]** Estudios posteriores por el solicitante revelan que la cepa depositada como NCIMB 41847 fue una mezcla de *Lactobacillus paraplantarum* y *Lactobacillus reuteri*. Estudios posteriores por el solicitante revelan que la cepa depositada como NCIMB 41850 fue una mezcla de *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus reuteri*. Estudios posteriores por el solicitante revelaron que la cepa depositada como NCIMB 41848 fue *Lactobacillus reuteri*. Cepas aisladas para los componentes respectivos de las cepas NCIMB 41847 y NCIMB 41850 se depositaron posteriormente (véase abajo).

**[0073]** Otra realización de la invención se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico aislado de las heces de los cerdos criados ecológicamente y seleccionado del grupo que consiste en cepas depositadas el 12 de julio de 2012 bajo los términos del Tratado de Budapest en la National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB) en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Reino Unido, AB21 9YA, bajo los siguientes números de acceso:

NCIMB 42008 *Lactobacillus johnsonii*;

NCIMB 42009 *Lactobacillus reuteri*;

NCIMB 42010 *Lactobacillus plantarum*;

NCIMB 42011 *Lactobacillus reuteri*;

NCIMB 42012 *Lactobacillus reuteri*

**[0074]** Los depósitos anteriores NCIMB 42008, NCIMB 42009, NCIMB 42010 y NCIMB 42011 y NCIMB 42012, fueron hechos por el profesor Denise Kelly de GT Biologics Limited, c/o Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire, AB25 2ZD, Reino Unido, en nombre de la solicitante, GT Biologies Limited.

**[0075]** También se describe en la presente invención cepas mutantes, que se pueden obtener a partir de dichas cepas, y las cepas que muestran una homología del ADN-ADN de al menos 70% y/o una identidad de 16S ARN de

al menos 99,5% con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores.

**[0076]** Tal como se utiliza aquí, el término "identidad 16S ARNr" se refiere al porcentaje de identidad con una cepa bacteriana conocida. Una cepa bacteriana de ácido láctico puede tener una identidad de 16S ARNr de al menos 85% o al menos 90%, o al menos 95, 96, 97, 98 o 99% con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores.

Una cepa bacteriana de ácido láctico puede tener una identidad de 16S ARNr de al menos 99,5% con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores.

**[0077]** En el contexto de la presente descripción, el término "homología de ADN-ADN" se refiere a lo estrechamente relacionadas que están dos o más hebras separadas de ADN la una a la otra, en base a su secuencia de nucleótidos. Típicamente, esto se mide en términos de su identidad de %. Una cepa bacteriana de ácido láctico puede tener una homología de ADN-ADN de al menos 70% con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores, más preferiblemente, al menos el 80%, o al menos 85%, aún más preferiblemente, al menos 90, 95, 97, 98 o 99% de homología con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores.

**[0078]** Una cepa bacteriana de ácido láctico puede tener una homología de ADN-ADN de al menos 70% y una identidad de 16S ARNr de al menos 99,5% con una cepa seleccionada de los depositados bajo los números de acceso anteriores.

### Composiciones

**[0079]** Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico tal como se describe anteriormente y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente. Los excipientes adecuados, diluyentes, portadores se describen a continuación.

**[0080]** La composición puede ser cualquier composición, pero es preferiblemente una composición para ser administrada por vía oral, por vía enteral o por vía rectal. Por ejemplo, la composición puede ser una composición comestible. "Comestible" significa un material que está aprobado para el consumo humano o animal.

**[0081]** Otro aspecto de la invención se refiere a una composición probiótica que comprende una cepa bacteriana de ácido láctico como se describe anteriormente.

**[0082]** Otro aspecto de la invención se refiere a combinaciones de dos más cepas bacterianas del ácido láctico tal como se describe en el presente documento. En una realización particularmente preferida, tales combinaciones exhiben una funcionalidad sinérgica, por ejemplo, la combinación es sinérgica, es decir, el efecto resultante es mayor que los efectos aditivos simples atribuibles a los componentes bacterianos de ácido láctico individuales en la combinación.

**[0083]** Una realización preferida de la invención se refiere a una combinación de dos, tres, cuatro o cinco diferentes bacterias del ácido láctico, más preferiblemente, dos, tres o cuatro diferentes bacterias del ácido láctico, más preferiblemente, dos o tres bacterias del ácido láctico diferentes. Cuando la invención se refiere a una combinación de más de una cepa bacteriana de ácido láctico, los componentes individuales de la combinación pueden estar presentes en cualquier proporción.

**[0084]** Más preferentemente todavía, la invención se refiere a una combinación de dos bacterias del ácido láctico diferentes. Preferiblemente, las dos bacterias del ácido láctico diferentes están presentes en una relación de 1/99,9 a 99,9/1 en peso, por ejemplo, 1/99 a 99/1 o 10/90 a 90/10, o 20/80 a 80/20, o 30/70 a 70/30 y similares.

**[0085]** En una realización altamente preferida, la combinación es una mezcla de *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus reuteri*. Incluso más preferiblemente, la combinación es NCIMB 41850: *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus reuteri* GGDK266 como se describe anteriormente. Sorprendentemente, esta combinación particular de bacterias de ácido láctico da lugar inesperadamente a respuestas *in vivo* beneficiosas en cerdos destetados tempranamente (véase ejemplos).

**[0086]** En otra forma de realización altamente preferida, la combinación es una mezcla de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*. Incluso más preferiblemente, la combinación es NCIMB 41847: *Lactobacillus plantarum/pentosus/paraplantarum* y *Lactobacillus reuteri* GGDK161 como se describe anteriormente.

**[0087]** Tal como se utiliza aquí, el término "probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al "Probiotics: How should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107-10).

**[0088]** Preferiblemente, la composición probiótica es una composición administrable por vía oral de bacterias

probióticas metabólicamente activas, es decir, vivas y/o o liofilizadas, o no viables, irradiadas o lisadas muertas por calor. La composición probiótica puede contener otros ingredientes. La composición probiótica de la invención se puede administrar por vía oral, es decir, en la forma de un comprimido, cápsula o polvo. Alternativamente, la composición probiótica de la invención se puede administrar por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, tal como leche o producto lácteo fermentado basado en suero de leche, o como un producto farmacéutico.

**[0089]** Una dosis diaria adecuada de las bacterias probióticas es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias (CFU), más preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU, más preferiblemente, aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU.

En una realización preferida, la composición contiene cepas bacterianas y/o sus componentes celulares, como ingredientes activos, en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  CFU/g, respecto al peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU/g. La dosis puede ser de 1 g, 3 g, 5 g, y 10 g, a modo de ejemplo.

**[0090]** Típicamente, un probiótico se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un prebiótico es normalmente un carbohidrato no digerible tal como un oligo- o polisacárido, o un alcohol de azúcar que no se degrada o se absorbe en el tracto digestivo superior. Prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como la inulina y transgalacto-oligosacáridos.

**[0091]** Preferiblemente, la composición de la presente invención incluye un prebiótico en una cantidad de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 30% en peso, respecto al peso de la composición total, preferiblemente de 5 a 20% en peso. Los carbohidratos preferidos se seleccionan de: fructo-oligosacáridos (o FOS), de cadena corta fructo-oligosacáridos, inulina, isomaltoligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, goma de cultivo modificado y almidones resistentes, povidex, D-tagatosa, fibras de acacia, de algarroba, la avena y fibras de cítricos. Particularmente prebióticos preferidos son los de cadena corta fructo-oligosacáridos (por simplicidad se muestran en lo que sigue como FOS-c.c); dichos FOS-c.c no son glúcidos digeribles, obtenidos generalmente mediante la conversión del azúcar de remolacha y que incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

### **Preparación de bacterias del ácido láctico**

**[0092]** Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un probiótico, comprendiendo dicho procedimiento el cultivo de una cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la invención. La persona experta en la técnica estará familiarizada con las técnicas y condiciones estándar adecuadas para el cultivo de una cepa bacteriana de acuerdo con la invención.

**[0093]** Un método de preparación de una o más cepas bacterianas de acuerdo con la invención comprende las etapas de:

- (i) la obtención de las heces de un cerdo orgánicamente criado;
- (ii) la congelación de las heces y de dispersión en un diluyente adecuado;
- (iii) la aplicación de las heces dispersas obtenidas en la etapa (ii) a un agar adecuado, opcionalmente en presencia de hidratos de carbono de calostro de cerdo suplementarios, y la incubación bajo condiciones anaeróbicas;
- (v) la selección de distintas colonias de bacterias formadas durante la etapa (iv) y la siembra en un caldo adecuado, opcionalmente en presencia de hidratos de carbono de calostro de cerdo suplementarios;
- (vi) incubar las colonias sin semillas obtenidas en la etapa (v).

**[0094]** Agares adecuados incluyen, por ejemplo, placas de agar de MRS o LAMVAB. Sin embargo, otros agares adecuados también se pueden utilizar, y serían familiares para la persona experta.

**[0095]** Caldos adecuados incluyen, por ejemplo, caldo MRS. Sin embargo, otros caldos adecuados también se pueden utilizar, y serían familiares para la persona experta.

**[0096]** La etapa (iii) puede implicar la incubación del agar durante al menos 72 horas a una temperatura de alrededor de 37°C.

**[0097]** La etapa (vi) puede implicar la incubación de las colonias sembradas durante al menos 48 horas a una temperatura de alrededor de 37°C.

**[0098]** La descripción se refiere a un procedimiento para la obtención de una cepa bacteriana de ácido láctico porcino, comprendiendo dicho proceso la obtención de las heces de un cerdo orgánicamente criado y la extracción de una o más cepas bacterianas del ácido láctico de la especie porcina de dicho heces.

**[0099]** El procedimiento comprende las etapas de:

- (i) la obtención de las heces de un cerdo orgánicamente criado;  
 (ii) la congelación de las heces y de dispersión en un diluyente adecuado;  
 (iii) la aplicación de las heces dispersas obtenidas en la etapa (ii) a un agar adecuado, opcionalmente en presencia de hidratos de carbono de calostro de cerdo suplementarios, y la incubación bajo condiciones anaeróbicas;  
 (v) la selección de distintas colonias de bacterias formadas durante la etapa (iv) y la siembra en un caldo adecuado, opcionalmente en presencia de hidratos de carbono de calostro de cerdo suplementarios;  
 (vi) la incubación de las colonias sin semillas obtenidas en la etapa (v).

10 **[0100]** La descripción se refiere a una cepa bacteriana de ácido láctico porcino obtenida por, o que puede obtenerse por el proceso descrito anteriormente.

#### Aplicaciones terapéuticas

15 **[0101]** Otro aspecto de la invención se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico tal como se define anteriormente para su uso en medicina.

**[0102]** Otro aspecto de la invención se refiere a una o más cepas bacterianas del ácido láctico tal como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno intestinal.

20 **[0103]** Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una o más cepas bacterianas de ácido láctico o una composición como se define anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno intestinal.

25 **[0104]** El término "medicamento", como se usa en este documento abarca medicamentos para uso tanto humano como animal en medicina humana y veterinaria. Además, el término "medicamento", como se usa en este documento significa cualquier sustancia que proporciona un efecto terapéutico y/o beneficioso. El término "medicamento", como se usa en el presente documento no se limita necesariamente a las sustancias que necesitan la aprobación de comercialización, pero puede incluir sustancias que pueden ser utilizadas en cosméticos, nutracéuticos, alimentos (incluyendo alimentos y bebidas, por ejemplo), cultivos probióticos y remedios naturales. Además, el término "medicamento", como se usa en este documento abarca un producto diseñado para su incorporación en la alimentación animal, por ejemplo de alimentación de ganado y/o alimentos para mascotas.

35 **[0105]** Otro aspecto de la descripción se refiere a un método de tratamiento de un trastorno intestinal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una o más cepas bacterianas de ácido láctico o una composición farmacéutica o una composición probiótica como se describe encima.

40 **[0106]** Preferiblemente, el trastorno intestinal se selecciona de entre el síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), dispepsia funcional, estreñimiento funcional, diarrea funcional (incluyendo la diarrea asociada a antibióticos, diarrea del viajero y diarrea pediátrica), dolor abdominal funcional, hinchazón funcional, síndrome de dolor epigástrico, síndrome de dificultad postprandial, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de reflujo gastrointestinal (ERGE), alergias, enfermedades atópicas, por ejemplo, dermatitis atópica, enterocolitis necrotizante, otras infecciones, y combinaciones de los mismos.

45 **[0107]** En una realización preferida, el trastorno intestinal es IBS. La fisiopatología precisa de IBS que queda por esclarecer. Estudios recientes han descrito inflamación de la mucosa y alteraciones en la microbiota intestinal en pacientes con SII y una correlación de la enfermedad con infecciones intestinales.

50 **[0108]** En una realización altamente preferida, el trastorno es la salmonelosis. La salmonelosis es una enfermedad causada por varias cepas de salmonela que se caracteriza por fiebre y trastornos intestinales.

**[0109]** Otro aspecto de la invención se refiere a una o más cepas bacterianas de ácido láctico como se define anteriormente para mejorar la microbiota intestinal.

55 **[0110]** Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para mejorar la microbiota intestinal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende una o más cepas bacterianas de ácido láctico o una composición farmacéutica o una composición probiótica de acuerdo con la invención.

60 **[0111]** Las cepas bacterianas de ácido láctico de acuerdo con la invención también se pueden usar en aplicaciones profilácticas. En aplicaciones profilácticas, las composiciones de acuerdo con la invención se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo en riesgo de una enfermedad particular en una cantidad que es suficiente para al menos parcialmente reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad. Tal cantidad se define para ser "una dosis efectiva profiláctica". Las cantidades precisas dependen de un número de factores específicos del paciente, tales como estado de salud y el peso del paciente.

65 **[0112]** Las cepas bacterianas de ácido láctico y composiciones probióticas según la invención también se pueden

usar en la alimentación animal (por ejemplo en la nutrición de cerdo), en particular en el período de destete temprano y creciente período de engorde. Se espera que los probióticos mejoren la función inmune para reducir y prevenir enfermedades infecciosas, beneficiosamente alterar la composición de la microbiota, y mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales, por ejemplo, mediante una mayor eficiencia de conversión del pienso.

5 El término "animal" incluye todos los animales incluyendo seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, ovejas, cabras, y ganado, por ejemplo, vaca como el ganado vacuno y vacas lecheras. En una realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen los animales de compañía, por ejemplo, caballos, gatos y perros; por ejemplo cerdos o puercos monogástricos (incluyendo pero no limitado a cerdos lechones y cerdos de crecimiento); aves de corral tales como

10 pavos, patos y pollos (incluyendo pero no limitado a pollos de engorde, capas); peces (incluyendo pero no limitado a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas); y crustáceos (incluyendo pero no limitado a los camarones y gambas).

### Piensos/productos

15 **[0113]** Un aspecto adicional de la invención se refiere a productos alimenticios, piensos, suplementos dietéticos, aditivos alimentarios, probióticos y los medicamentos que contienen una o más cepas bacterianas de acuerdo con la invención.

20 **[0114]** En una realización preferida, la composición comprende adicionalmente al menos otro tipo de otra bacteria de calidad alimentaria, en el que la bacteria de grado alimentario se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, bacterias propiónicas o mezclas de los mismos.

25 **[0115]** Un aspecto de la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con la invención. El término "producto alimenticio" se destina a cubrir todos los productos consumibles que pueden ser sólidos, gelatinosos o líquidos. Productos alimenticios adecuados pueden incluir, por ejemplo, productos funcionales de alimentos, composiciones de alimentos, alimentos para mascotas, alimento para ganado, alimentos saludables, alimentos para animales y similares. En una realización preferida, el producto alimenticio es un alimento saludable.

30 **[0116]** Tal como se utiliza aquí, el término "producto alimenticio funcional" significa comida que es capaz de proporcionar no sólo un efecto nutricional, sino también es capaz de suministrar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Por consiguiente, los alimentos funcionales son alimentos ordinarios que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en el presente documento) incorporados a los que imparten a la comida un beneficio funcional específico - médico o fisiológico, por ejemplo - con excepción de un efecto puramente nutritivo.

35 **[0117]** Ejemplos de productos específicos de alimentos que son aplicables a la presente invención incluyen productos a base de leche, listos para comer postres, polvos para reconstitución con, por ejemplo, leche o agua, bebidas de leche de chocolate, bebidas de malta, platos listos para comer, platos instantáneos o bebidas para seres humanos o composiciones alimenticias que representan una dieta completa o parcial destinada a animales domésticos o ganado.

40 **[0118]** En una realización preferida, la composición de acuerdo con la presente invención es un producto alimenticio destinado a seres humanos, animales domésticos o ganado. La composición puede estar destinada a animales seleccionados del grupo que consiste en perros, gatos, cerdos, ganado, caballos, cabras, ovejas o aves de corral.

45 En una realización preferida, la composición es un producto alimenticio destinado a especies de adultos, en particular los humanos adultos.

50 **[0119]** En la presente invención, "producto a base de leche" significa cualquier producto a base de leche o suero de leche líquida o semi-sólida que tiene un contenido de grasa variable. El producto a base de leche puede ser, leche por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, desnatada, leche entera, leche recombinada a partir de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado, tales como yogur, leche cuajada, requesón, leche agria, leche entera agria, suero de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye bebidas de leche, tales como bebidas de suero de leche, leches fermentadas, leches condensadas, infantiles o leches para bebés; leches aromatizadas, helado; alimentos como los dulces que contienen

55 leche.

**[0120]** Un aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la invención.

60 **[0121]** Piensos pueden ser un aditivo alimentario, una premezcla de pienso o un alimento para animales. Los ejemplos particulares de alimentos de acuerdo con la invención incluyen los siguientes: aditivo para la alimentación animal, que comprende (a) las bacterias del ácido láctico de la especie porcina de acuerdo con la presente invención (b) la vitamina soluble al menos una grasa (c) vitamina soluble en al menos uno de agua (d) a menos una traza mineral y/o al menos un mineral macro; una composición de pienso animal que comprende bacterias porcinas del ácido láctico según la presente invención y un contenido de proteína cruda de 50-88g/kg de alimento. Las llamadas

65 premezclas son ejemplos de aditivos de alimentos para animales de la invención. Una premezcla designa una

mezcla preferiblemente uniforme de uno o más micro-ingredientes con diluyente y/o vehículo. Premezclas se utilizan para facilitar la dispersión uniforme de micro-ingredientes en una mezcla más grande.

5 **[0122]** Otros agentes, ingredientes opcionales, alimentación de aditivos son colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; compuestos de aroma; estabilizantes; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; oxígeno reactivo generador de especie; y/o al menos una enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o  
10 beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

**[0123]** Los ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

15 **[0124]** Ejemplos de especies que generan oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

**[0125]** Por lo general, la grasa y las vitaminas solubles en agua, así como oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al alimento, mientras que los macrominerales normalmente se añaden por separado a la alimentación. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con bacterias porcinas del ácido láctico según la presente invención, es un aditivo para la alimentación animal.

20

**[0126]** Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes: Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3. Ejemplos de vitaminas solubles en agua son la vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato. Ejemplos de minerales traza son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto. Ejemplos de macrominerales son el calcio, fósforo y sodio.

25

**[0127]** Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A de WO 01/58275. El requerimiento nutricional significa que estos componentes deben estar provistos en la dieta en las concentraciones indicadas. En la alternativa, el aditivo para piensos para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. Al menos un medio cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro etcétera hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual está incluido en el aditivo de la invención en una cantidad tal como para proporcionar una concentración en el alimento dentro de la gama indicada en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de la tabla A de WO 01/58275.

30  
35

**[0128]** Composiciones de alimentación animal o dietas típicamente tienen un contenido relativamente alto de proteína. Avícolas y porcinas dietas pueden ser caracterizadas como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Dietas de peces pueden ser caracterizadas como se indica en la columna 4 de esta Tabla B.

40

**[0129]** Además, tales dietas de peces normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg. WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

45 **[0130]** Una composición de pienso según la invención tiene típicamente un contenido de proteína cruda de 50-800 g/kg, y comprende además bacterias porcinas del ácido láctico según la presente invención del mismo como se describe en este documento.

**[0131]** Además, o en la alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición de alimento para animales de la invención puede tener un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

50

**[0132]** En ciertas realizaciones preferidas, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de las gamas 2, 3, 4 o 5 en la Tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5). La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (AOAC, 1984, Métodos Oficiales de Análisis 14<sup>a</sup> ed., Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, Washington DC). Energía metabolizable puede calcularse sobre la base de los requisitos de publicación de NRC en el ganado porcino, novena edición revisada 1988, subcomisión sobre la nutrición porcina, comité sobre nutrición animal, tablero de la agricultura, Consejo Nacional de Investigación. National Academy Press, Washington, DC, pp. 2-6, y la mesa europea de valores de energía para aves de corral, piensos, centro Spelderholt para la investigación de aves de corral y extensión, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch Bedrijf Ponsen y Looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

55  
60  
65

**[0133]** El contenido dietético de calcio, fósforo y aminoácidos disponibles en dietas para animales completas se calcula sobre la base de tablas de alimentación tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

**[0134]** En una realización preferida, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal o fuente de proteína. También puede contener proteína animal, como carne y hueso, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. El término proteínas vegetales como se utiliza aquí se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de o procedente de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivadas de proteína. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

**[0135]** Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes de proteínas vegetales, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferae, Chenopodiaceae, y Poaceae, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de colza. En una realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo semilla de soja, altramuz, guisante, o frijol. Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y repollo. Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz (maíz), arroz, triticale y sorgo.

**[0136]** Las dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricadas como alimentación en puré (no granulada) o pienso granulado. Típicamente, los productos alimenticios molidos se mezclan y se agregan cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones para las especies en cuestión. Una bacteria del ácido láctico de la especie porcina de acuerdo con la presente invención de los mismos se pueden añadir como formulaciones sólidas o líquidas.

Las composiciones de la presente invención pueden ser - o se puede añadir a - suplementos alimenticios, también denominados aquí como suplementos dietéticos o aditivos alimentarios. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un suplemento o aditivo alimentario dietético que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la invención.

**[0137]** Otra realización de la invención se refiere al uso de un pienso como se describe anteriormente para mejorar el rendimiento del crecimiento animal, medido por el aumento de peso diario y/o la relación de conversión de alimento.

**[0138]** En una realización preferida, la invención se refiere a métodos para el uso de un pienso que comprende una o más bacterias del ácido láctico de la especie porcina de acuerdo con la presente invención en la alimentación animal para mejorar la ganancia diaria de peso, la mejora de la tasa de conversión alimenticia (FCR) y/o para la modulación de la microflora intestinal.

**[0139]** En realizaciones preferidas alternativas, el pienso que comprende una o más bacterias del ácido láctico de la especie porcina de acuerdo con la presente invención mejora la digestibilidad del alimento de animales, y/o mantiene la salud de los animales, ayudando en la digestión apropiada y/o el apoyo a la función del sistema inmunológico.

**[0140]** El FCR se puede determinar sobre la base de una prueba de crecimiento de los lechones que comprende un primer tratamiento en el que el pienso que comprende bacterias porcinas de ácido láctico según se añade la presente invención a la alimentación animal en una concentración adecuada por kg de pienso, y un segundo tratamiento (control) sin adición de bacterias porcinas del ácido láctico según la presente invención a la alimentación animal. En el presente contexto, el término Relación de Conversión de Pienso, o FCR, se utiliza como sinónimo del pienso de conversión de la alimentación. El FCR se calcula como el consumo de pienso en g/animal en relación con el aumento de peso en g/animal. Como se sabe en general, una mejor FCR es menor que la FCR control. En realizaciones particulares, la FCR se mejora (es decir, reducida) en comparación con el control por parte de al menos 1,0%, preferiblemente al menos 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, o al menos 2,5%.

**[0141]** El término "intestino" como se utiliza aquí designa el tracto gastrointestinal o digestivo (también denominado el canal alimentario) y se refiere al sistema de órganos dentro de los animales multicelulares que absorbe alimentos, los digiere para extraer energía y nutrientes, y expulsa los residuos restantes.

**[0142]** El término "microflora" intestinal tal como se utiliza aquí se refiere a los cultivos microbianos naturales que residen en el intestino y mantenimiento de la salud por ayudar en la digestión apropiada y/o el apoyo a la función del sistema inmunológico.

**[0143]** El término "modular" tal como se utiliza aquí en relación con la microflora intestinal generalmente significa cambiar, manipular, alterar o ajustar la función o el estado de la misma en un animal sano y que funcione

normalmente, es decir, un uso no terapéutico.

### Diluyentes, excipientes y portadores

5 [0144] Como se mencionó anteriormente, la invención también se refiere a composiciones, más preferiblemente composiciones farmacéuticas, que comprende una cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la invención. Las cepas bacterianas de ácido láctico de la presente invención se administran generalmente en mezcla con un portador, excipiente o diluyente, en particular para la terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

10 [0145] Los ejemplos de tales excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden encontrar en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

15 [0146] Los vehículos aceptables o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (AR Gennaro edit. 1985).

[0147] Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

20 [0148] La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el portador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante.

25 [0149] Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo de libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

30 [0150] Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares.

[0151] Los conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Los antioxidantes y agentes de suspensión también pueden usarse.

### Administración

40 [0152] Las composiciones de la presente invención pueden adaptarse para administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, o rutas de administración sublingual. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención están adaptadas para administración oral, rectal, vaginal, parenteral, nasal, bucal o sublingual de administración.

45 [0153] Para la administración oral, se hace uso particular de tabletas comprimidas, píldoras, tabletas, píldoras, gotas y cápsulas.

50 [0154] Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que se pueden inyectar por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, pomadas, cremas, geles, pulverizaciones, soluciones o polvos de espolvoreo.

55 [0155] Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche cutáneo. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede incorporar en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. La cepa bacteriana de ácido láctico también se puede incorporar en un ungüento que consiste en una cera blanca o base de parafina blanda blanca junto con los estabilizantes y conservantes que puedan ser necesarios.

60 [0156] Las composiciones pueden formularse en forma de dosificación unitaria, es decir, en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o una unidad múltiple o subunidad de una dosis unitaria.

### Dosificación

65 [0157] Una persona de experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas para administración a un sujeto sin experimentación excesiva. Típicamente, un

médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad de la cepa bacteriana específica empleada, la estabilidad metabólica y la duración de acción de esa cepa, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia individual. Las dosis descritas en este documento son ejemplares del caso medio. No puede, por supuesto, haber casos individuales donde se requieran intervalos de dosificación superiores o inferiores.

[0158] La dosis diaria efectiva habitual en los seres humanos o en animales es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$ , más preferiblemente, de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$ , incluso más preferiblemente, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CFU.

### Combinaciones

[0159] En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran en cualquier combinación, por ejemplo, dos o más de las bacterias del ácido láctico se pueden administrar en cualquier combinación o proporción.

[0160] En otra realización particularmente preferida, las composiciones de la invención se administran en combinación con uno o más de otros agentes activos. En tales casos, las composiciones de la invención pueden administrarse consecutivamente, simultáneamente o secuencialmente con uno o más de otros agentes activos.

### Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas

[0161] Las cepas de laboratorio aislado (total de 436 picos de colonias individuales) a partir de heces de los cerdos criados orgánicamente fueron predominantemente *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. pentosus*, cepas con un pequeño número de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. vaginalis*, un solo *L. mucosae* y varias cepas no cultivadas.

[0162] La mayor parte del LAB produce sustancias que podrían inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* y/o *E. coli* K88 *in vitro*. La potencia de estos efectos anti-patógenos varió mucho entre las cepas bacterianas individuales.

[0163] Se seleccionaron ciertas cepas sobre la base de la potencia antimicrobiana tal como se determina *in vitro*. Estas bacterias se seleccionaron adicionalmente para determinar su capacidad para bloquear la adhesión/invasión de las células epiteliales de cerdo intestinal (IPEC) por patógenos *in vitro* y su susceptibilidad a los antibióticos.

[0164] Ciertas cepas se sometieron a ensayo para la gama de sustrato y especificidad y su capacidad para suprimir la inflamación en las células IPEC *in vitro*. De estos, se identificaron catorce de laboratorio (5 *L. johnsonii*, 6 *L. reuteri* y 3 de *L. plantarum*) con propiedades favorables. Dos de estas cepas [GGDK266 y GGDK31] se prepararon en el bulto para evaluación *in vivo* en lechones destetados de nueva emisión. Otros candidatos potencialmente importantes estaban presentes entre este conjunto de 14 LAB.

[0165] Las pequeñas pérdidas en la viabilidad fueron evidentes en el secado y el almacenamiento de LAB se seca en la leche desnatada en polvo de congelación. Una combinación de leche desnatada en polvo y azúcares simples fue ligeramente más eficaz, pero difícil de mantener. Preparativos a granel de GGDK266 y GGDK31 se liofilizaron y se almacenan en este medio.

[0166] Se obtuvieron cinco cultivos acondicionados de calor de LAB. Sin embargo, las propiedades biológicas *in vitro* y el potencial probiótico de tres cepas se vieron afectados adversamente por el tratamiento térmico. Sin embargo, dos de las bacterias retuvieron las propiedades biológicas de las formas no tratadas por calor nativas.

[0167] El tratamiento oral de ratones con LAB cerdo (*L. reuteri* o *L. mucosae*) redujo en gran medida la patogenicidad de *S. enteritidis* en formas agudas (ratón C57Bl/6) y crónicas (ratón C3H/HeN) de salmonelosis.

[0168] Los datos indican que LAB de cerdos criados orgánicamente tienen un potencial considerable como fuente de probióticos novelos y potentes.

[0169] Los estudios realizados por el solicitante implicaron aislar un gran número de LAB de cerdos criados orgánicamente y la detección de cepas de LAB probióticas potentes mediante la evaluación de su potencia biológica y modo de acción, tanto *in vitro* como *in vivo*.

[0170] Más específicamente, se llevaron a cabo experimentos para establecer cultivos de LAB derivados de heces de cerdos orgánicamente criados. Las cepas de LAB fueron seleccionados para la actividad anti-microbiana contra un número de patógenos *in vitro*. Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las cepas de LAB podrían bloquear la unión de patógenos a las células epiteliales de cerdo *in vitro*. También se realizaron estudios para evaluar la capacidad de LAB para bloquear las respuestas inflamatorias en las células epiteliales de cerdo *in vitro*. Las cepas que muestran un buen perfil bioactivo *in vitro* se seleccionaron y se cultivaron en grandes cantidades para un estudio a gran escala *in vivo*.

**[0171]** Se describen más detalles sobre las técnicas experimentales en la sección de ejemplos que se acompañan. En resumen, las cepas de LAB se aislaron y cultivaron a partir de heces de cerdos utilizando medios microbiológicos selectivos. Colonias bacterianas individuales se aislaron y se analizaron las secuencias de genes de ARNr 16S para permitir la identificación genotípica de cepas bacterianas. La característica fenotípica de probióticos potenciales se determinó aún más tras la medición de la adherencia, las actividades anti-bacterianas y anti-inflamatorias, la susceptibilidad a los antibióticos y, finalmente, calentar la estabilidad. La actividad anti-bacteriana de medios acondicionados derivados de LAB se evaluó usando ensayos bien de difusión para determinar la actividad de matar contra los patógenos entéricos *Salmonella enteritidis* y *E. coli* K88. También se evaluó la capacidad de cepas LAB para bloquear o interferir con adherencia/invasión *S. enteritidis* y *E. coli* K88 de cerdo epitelial (IPEC), como era su capacidad para suprimir la inflamación en las células IPEC inducidas por 12-O-Tetradecaboilforbol-13-acetato [PMA]. Además, las propiedades metabólicas de cepas de laboratorio (API CH 50 kit) y su susceptibilidad a los antibióticos, se determinó. Se estableció un sistema de clasificación, basado en anotar las propiedades biológicas de LAB y se utiliza para la selección de cepas de LAB candidatos para la evaluación probiótica in vivo.

**[0172]** Se describen más detalles sobre los resultados de los experimentos anteriores en los ejemplos adjuntos.

**[0173]** El LAB (436 selecciones de colonias individuales) aislado de heces de los cerdos criados orgánicamente eran predominantemente *L. johnsonii* o relacionados con *L. johnsonii* y *L. reuteri* o *L. reuteri*- relacionados con pequeños números de *L. relacionados con plantarum* y cepas no cultivadas. Esto representó una gama mucho más estrecha de LAB porcina asociada a la reportada por otros (Martin *et al*, 2009; Yun *et al*, 2009; Lähäinen *et al*, 2010; Yao *et al*, 2011). Sin embargo, en comparación con cerdos criados convencionalmente/intensivamente, cerdos criados orgánicamente en el exterior tenían altos niveles de LAB y función inmune más desarrollada intestinal (Mulder *et al*, 2009). Los datos actuales indican que cepas bacterianas *L. johnsonii* y *L. reuteri* son de particular importancia en el desarrollo adecuado del intestino y el sistema inmune en los cerdos jóvenes. Además, la inclusión de otras bacterias de ácido láctico derivadas de la tripa o heces de cerdos criados orgánicamente, en particular, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus amylovorus* puede mejorar las propiedades homeostáticas inmunes de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus johnsonii*.

**[0174]** Todas las sustancias aisladas producidas de cerdo LAB que podrían matar o interferir con el crecimiento de *S. enteritidis* en un ensayo de difusión de pocillo y la mayoría mataron o suprimieron el crecimiento de *E. coli* K88. La potencia de las actividades anti-microbianas variaron enormemente entre las colonias individuales, independientemente de si eran *L. reuteri*, *L. johnsonii* o *L. plantarum*. No hubo correlación general entre la potencia anti-salmonela y anti-*E. coli* K88 de cada uno de los LAB. LAB son conocidos para producir una gama de factores activos, incluyendo ácidos orgánicos, pequeños compuestos anti-microbianos y péptidos anti-bacterianos (Cintas *et al*, 2001). La naturaleza de estas sustancias anti-microbianas producidas por LAB de cerdos criados orgánicamente no se ha establecido.

**[0175]** Treinta y tres cepas de LAB de cerdo, seleccionadas sobre la base de la actividad anti-patógena, se ensayaron para la capacidad de bloquear la unión/invasión de células IPEC por *S. enteritidis* y *E. coli* K88. Todos ellos fueron capaces de reducir drásticamente la fijación/invasión de células IPEC por salmonela. La mayoría también podría bloquear *E. coli* K88. Al igual que matar patógenos, no hubo correlación general entre las habilidades del LAB para bloquear la Salmonela y *E. coli* K88. Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que el LAB puede limitar el acceso de patógenos a la capa epitelial mediante la ocupación de sitios de unión en la monocapa de células o por producción de factores que interfieren con la unión del patógeno a las células epiteliales, tales como el bloqueo de sitios de unión de adhesinas de superficie (Ljungh y Wadström, 2006; Blandino *et al*, 2008; Williams, 2010).

LAB de cerdo también puede bloquear o suprimir expresión de genes inflamatorios (interleucina-8, ILO-8) activada en células IPEC por PMA. Cultivos individuales variaron en gran medida en su capacidad de afectar a la inflamación, pero cinco cepas (RINH vial 29, 30, 31 86 y 266) tenían propiedades antiinflamatorias potentes. Se sabe que ciertas cepas de LAB tienen inmuno-moduladores o propiedades anti-inflamatorias (Cotter *et al*, 2005; Blandino *et al*, 2008; Ohashi y Ushida, 2009; Elmadfa *et al*, 2010; Liu *et al*, 2010). Los mecanismos implicados siguen sin estar claros, pero es probable que implican la modulación de los sistemas de señalización molecular por factores bioactivos producidos por el LAB.

**[0176]** La resistencia a antibióticos es un problema creciente y puede extenderse entre las bacterias por la transferencia de genes (Korhonen *et al*, 2007; Gousia *et al*, 2011; Nicolau, 2011). Idealmente, los probióticos candidatos deben tener poca o ninguna resistencia a los antibióticos para reducir al mínimo el riesgo de transferencia de genes de resistencia a la flora de acogida. LAB de cerdo (33 cepas) fueron seleccionados para la resistencia a 10 antibióticos individuales. Una cepa (RINH vial 266) era susceptible a todos los antibióticos ensayados. La mayoría eran susceptibles a la ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, tetraciclina y vancomicina. Sin embargo, la mayoría exhibieron resistencia a metronizadol, ácido nalidixico y en un grado menor a la kanamicina. Esta relativamente baja incidencia de resistencia a los antibióticos entre estos aislados LAB puede estar vinculada con el medio ambiente en el que los lechones de origen se criaron [criados orgánicamente fuera de la puerta] (Mulder *et al*, 2009).

**[0177]** *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. plantarum*, como se esperaba, mostraron perfiles de reacción de sustrato general

de la cepa específica, cuando se ensayaron usando un kit CH API 50. Sin embargo, la mayoría de las cepas de genotipo mostraron diferencias finas en su reactividad de sustrato. Esto indicó que eran cepas individuales únicas del genotipo.

5 **[0178]** Sobre la base de sus actividades biológicas *in vitro*, catorce LAB [relacionado con 4 *L. plantarum*, relacionado con 3 *L. johnsonii* y 1 *L. reuteri*] fueron identificados por tener potencial para las pruebas *in vivo*. Dos de estas cepas de LAB [GGDK266 y GGDK31] se prepararon a granel. Curiosamente, 7 de los catorce LAB (viales RINH 85, 86, 10 131, 230, 255, 266) se habían aislado a partir de agares selectivos de LAB suplementados con fracciones de carbohidratos del calostro porcino. El perfil de crecimiento y bioactividad de LAB es, en parte, dependiente del sustrato de hidrato de carbono en el que se cultiva (Gopal *et al*, 2001; Tzortzis *et al*, 2004), los presentes datos pueden indicar que algunos de los LAB están adaptado por huésped y requieren ciertos hidratos de carbo asociados por cerdo para el crecimiento o la bioactividad óptima. Es ventajoso si el LAB puede soportar liofilización para permitir su manipulación y procesamiento como probióticos. Sin embargo, su viabilidad se puede reducir en gran medida durante la congelación y el secado (Tomas *et al*, 2009; Strasser *et al*, 2009; Reddy *et al*, 2009). Leche desnatada en polvo, solo o en combinación con azúcares simples, se utiliza a menudo como un crioprotector para preservar la viabilidad de las bacterias (Tomas *et al*, 2009; Strasser *et al*, 2009). En el presente estudio, pequeñas pérdidas en la viabilidad fueron evidentes en el secado y el almacenamiento de LAB de cerdo solo en polvo de leche desnatada. La sacarosa o lactosa en combinación con leche desnatada en polvo fue ligeramente más protectora. Sin embargo, el producto era higroscópico y difícil de almacenar o manejar. Por ello se decidió secar y almacenar LAB de cerdo en la leche desnatada en polvo.

25 **[0179]** Piensos suplementarios para animales se dan a menudo en forma de gránulos, cuya producción implica altas temperaturas (De Angelis *et al*, 2006). LAB que se añaden a los alimentos para animales, por lo tanto deben tener un grado significativo de estabilidad térmica para minimizar la pérdida de viabilidad durante el procesamiento. En el presente estudio, cinco LAB fueron objeto de calentamiento tres veces durante 15 minutos a 70°C. Todas las bacterias que se recuperaron después del tercer tratamiento térmico eran viables y en la mayoría de los casos crecieron a tasas similares a las formas nativas de las bacterias. Dos de las bacterias retuvieron las propiedades biológicas de las formas nativas no tratadas por calor. Sin embargo, una de las cepas tratadas con calor habían perdido la capacidad de bloquear la unión del patógeno a las células epiteliales *in vitro* y otra había reducido en gran medida la actividad de bloqueo. Una cepa adicional era incapaz de bloquear la inflamación inducida por PMA en células epiteliales *in vitro*, aunque la forma nativa era un potente supresor de la inflamación. El tratamiento térmico puede pues afectar diferencialmente las propiedades biológicas de LAB individual. Esto necesita ser tenido en cuenta cuando se considera la inclusión de LAB en alimentos para animales granulados.

35 **[0180]** Los experimentos demostraron que la patogenicidad de *S. enteritidis* fue atenuada si los ratones fueron co-tratados con LAB derivado de cerdos criados orgánicamente. El vial RINH 323 (*L. Mucosae*) reduce en gran medida la capacidad de *S. enteritidis* para invadir, extender y proliferar en los tejidos sistémicos en salmonelosis aguda (ratón C57Bl/6) y crónica (ratón C3H/Hen). Además, vial RINH 31 [GGDK31], vial RINH 32, vial RINH 46 o vial RINH 47 (todo el *L. reuteri*) redujo la colonización del intestino grueso, invasión y propagación sistémica y proliferación en ratones C3H/HeN por *S. enteritidis*. En general, vial RINH 31 [GGDK31] y vial RINH 32 fueron los más eficaces en este modelo crónico de la salmonelosis. Estos LAB tiene potencial como nuevos probióticos para promover la salud intestinal o aumentar la resistencia a la infección *in vivo*.

45 **[0181]** La infección por salmonela es un proceso multifactorial (Naughton y Grant, 2005). *S. enteritidis* coloniza todo el tracto gastro-intestinal, mueve a través de la capa de moco y se adhiere a la mucosa. El intestino grueso actúa como un depósito para el patógeno, pero la invasión es principalmente a través de las células M, presentes en los parches del íleon de Peyer. La mayoría de salmonela invadida diseminó a los ganglios linfáticos mesentéricos y luego hacia el hígado y el bazo (Naughton y Grant, 2005). Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que LAB podría estar bloqueando la salmonela en las diversas etapas de la infección (Cintas *et al*, 2001; Cotter *et al*, 2005; Ohashi y Ushida, 2009). Al competir por los nutrientes, causando la muerte del agente patógeno o el bloqueo de sitios de unión, LAB podría limitar el número de la salmonela en el gran depósito delgado. LAB también puede impedir la adhesión a células de la mucosa del íleon, de una manera similar a la observada aquí con células IPEC-J2 y con células Caco-2 (Neeser *et al*, 2000) y de este modo limitar la invasión. Alternativamente, LAB puede modular directamente las respuestas del huésped a la infección, en particular, la supresión de la inflamación. Al limitar el daño intestinal y preservar la integridad de barrera (Smith *et al*, 2008; Schreiber *et al*, 2009), se reduciría en gran medida la capacidad de la salmonela de invadir y diseminar.

60 **[0182]** La presente invención se describe adicionalmente a modo de ejemplo no limitativo, y con referencia a las figuras siguientes no limitantes, en las que:

La Figura 1 muestra un ensayo de actividad antibacteriana de medio acondicionado a partir de bacterias de ácido láctico.

65 Las Figuras 2a y b muestran actividad inhibitora frente a *S. enteritidis* S1400 (expresado como área de la inhibición en un ensayo de difusión en pocillo) de medio condicionado de las LAB individuales cultivadas a partir de heces de los cerdos criados orgánicamente.

- 5 Las Figuras 3a y b muestran actividad inhibidora frente a *E. coli* K88 (expresado como área de la inhibición en un ensayo de difusión en pocillo) de medio condicionado de LAB individuales cultivados a partir de heces de los cerdos criados orgánicamente.
- 10 Las Figuras 3c y d muestran la actividad inhibidora (expresada como zona de inhibición en un ensayo de difusión en pocillo) de medio condicionado de LAB individuales cultivados a partir de heces de los cerdos criados orgánicamente.
- 15 La Figura 5 muestra un ensayo de la susceptibilidad a los antibióticos de bacterias de ácido láctico utilizando discos impregnados con una cantidad definida de un antibiótico.
- 20 La Figura 6 muestra una evaluación de perfil de sustrato de LAB utilizando un API CH 50 kit [49 sustratos, color pálido indicó que la reacción positiva, excepto 25, donde la reacción positiva es de color negro, color oscuro no indica reacción].
- 25 La Figura 7 muestra la  $\Delta C_t$  (a), relación (b) y cambio de veces (c) para expresión génica IL-8 en células IPEC tratadas con PMA y LAB de cerdo.
- 30 La Figura 8 muestra la estabilidad de LAB de cerdo después de la liofilización en la leche desnatada en polvo (SKP, (100 g/l), SKP + lactosa (ambos 100 g/l), SKP + sacarosa (ambos 100 g/l) o SKP (200 g/l).
- 35 La Figura 9 muestra la estabilidad de LAB aislado a tratamiento térmico (a), la relación (b) y cambio de veces (c) para expresión génica IL-8 en células IPEC tratadas con PMA y LAB de cerdo ingenuo o tratados con calor; (d) la susceptibilidad a los antibióticos de vial RINH 31 nativo y tratado con calor.
- 40 La Figura 10 muestra un protocolo para el estudio de ratones C3H/HeN para evaluar la eficacia de vial 323 (*L. mucosae*) para contrarrestar infección por salmonela *in vivo*.
- 45 Las Figuras 11a-c muestran la distribución de *S. enteritidis* S1400 en los tejidos a los 10 días post-infección en ratones C3H/HeN que habían o no habían sido co-tratados con 323 (*L. mucosae*, LM).
- 50 Las Figuras 12a-b muestran el peso del bazo (mg/100 g BW) y mieloperoxidasa intestinal (ileal) ( $\mu\text{g}$ ) a los 10 días post-infección en ratones C3H/HeN que habían o no habían sido co-tratados con vial 323 (*L. mucosae*).
- 55 La Figura 13 muestra un protocolo para el estudio de ratón C57 Bl/6 para evaluar la eficacia de vial 323 (*L. mucosae*) para contrarrestar infección por salmonela aguda *in vivo*.
- 60 Las Figuras 14a-c muestran la distribución de *S. enteritidis* S1400 en los tejidos a los 6 días post-infección en ratones C57Bl/6 que habían o no habían sido co-tratados con vial RINH 323.
- 65 La Figura 15 muestra el peso del bazo (mg/100 g BW) a los 6 días post-infección en ratones C57Bl/6 que habían o no habían sido co-tratados con vial 323 (*L. mucosae*).
- La Figura 16 muestra un protocolo para el estudio de ratones C3H/HeN para evaluar la eficacia de LAB seleccionado de heces de cerdos criados orgánicamente para contrarrestar la infección por Salmonela *in vivo*.
- Las Figuras 17a y b muestran excreción de *S. enteritidis* en las heces a los 7-8 días después de la infección por los ratones C3H/HeN que habían o no habían sido co-tratados con LAB seleccionado.
- Las Figuras 18a-b muestran la distribución de *S. enteritidis* (Log<sub>10</sub> CFU/g) en el íleon (a), ciego (b) y colon (c) a los 10 días después de la infección de los ratones C3H/HeN que habían o no habían sido co-tratados con LAB seleccionado.
- Las Figuras 19a-c muestran la distribución de *S. enteritidis* (Log<sub>10</sub> CFU/g) en los ganglios linfáticos mesentéricos (a), el hígado (b) y el bazo (c) a los 10 días después de la infección de los ratones C3H/HeN que habían o no habían sido co-tratados con LAB seleccionado.
- La Figura 20 muestra el rendimiento de los cerdos alimentados con GGDK266 y GGDK31 frente a un control (aumento de peso diario, DWG, en g/día) para los días 0-7, 7-14 y 0-14.
- La Figura 21 muestra el análisis de la diversidad microbiana utilizando electroforesis desnaturalizante en

gradiente de gel (DGGE; Ensayo 1). DGGE utilizando cebadores universales no reveló diferencias en la diversidad microbiana general entre los tratamientos y el placebo. Bandas en el gel se visualizaron mediante tinción con plata.

5 La Figura 22 muestra el análisis de la diversidad microbiana mediante DGGE. DGGE utilizando cebadores específicos a bacterias de ácido láctico (LAB) reveló diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con GGDK266 y placebo en ambas muestras cecales y ileales. Bandas en el gel se visualizaron mediante tinción con plata.

10 La Figura 23 muestra el análisis de la diversidad microbiana mediante DGGE. DGGE utilizando cebadores específicos a bacterias de ácido láctico (LAB) reveló diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con GGDK266 y placebo en muestras ileales. Bandas en el gel se visualizaron mediante tinción con plata.

15 La Figura 24 muestra el análisis de la diversidad microbiana mediante DGGE. DGGE utilizando cebadores específicos a bacterias de ácido láctico (LAB) reveló diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con GGDK266 y placebo en muestras cecales. Bandas en el gel se visualizaron mediante tinción con plata.

20 La Figura 25 muestra los procesos biológicos de ontología de genes significativamente regulados hacia abajo por la administración oral de GGDK266.

25 La Figura 26 muestra los cambios en la respuesta y la respuesta inmune a los estímulos en animales tratados con GGDK266 frente a los animales tratados con placebo (por ciento de genes frente a una gama de diferentes anotaciones GO).

La Figura 27 muestra los procesos biológicos de genes de ontología enriquecidos significativamente por la administración oral de GGDK266.

## 30 EJEMPLOS

### Materiales y métodos

35 **[0183] Materiales:** Muestras de heces de cerdo recogidas durante el curso del estudio de cerdos criados en el exterior e interior (Mulder *et al*, 2009) se utilizaron en estos estudios. La colección de cultivo se basa principalmente en LAB recogidas a partir de muestras congeladas 411, 412 y 416, que eran de cerdos criados al aire libre con niveles particularmente altos de LAB en sus heces. Premezcla de caldo MRS, agar y vancomicina, los paquetes de gas anaerobio y el indicador y discos de antibióticos se adquirieron de Oxoid, catalizador anaerobio de Fisher Scientific y cisteína-HCL, verde de bromocresol y leche desnatada en polvo de Sigma-Aldrich. Fracciones de carbohidratos de calostro de cerdo se prepararon como parte del programa de SMART 163 de D. Kelly. Kits de extracción de ADN se adquirieron de MP Biomedicals y reactivos de PCR y kits de limpieza de Promega. Kits de API CH 50 fueron adquiridos de Biomerieux UK Ltd.

45 **[0184] Medios estándares:** caldo MRS y agar MRS se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Agar LAMVAB se preparó de acuerdo con el método de Jackson *et al*. (2002). Las placas de agar se prepararon inmediatamente antes del uso. El caldo MRS se decantó (10 ml por tubo) en tubos de Hungate estériles en condiciones anaeróbicas y se almacenó a temperatura ambiente.

50 **[0185] Medios de carbohidratos suplementados:** Precipitado de sulfato de amonio SMART 163 de calostro de cerdo: precipitado a 0, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 55 o 65% de saturación o soluble a 65% de saturación se pesaron en proporción a las cantidades recuperadas a partir de 15 ml o 50 ml de calostro. Fracciones de carbohidratos fueron dispersadas en 15 ml de MRS o agar LAMVAB, celebrada en 45°C, y luego las placas individuales se vertieron para cada fracción. También se dispersaron en caldo MRS (50 ml) y el caldo suplementado decantado a ocho (6 ml/tubo) tubos de Hungate estériles en condiciones anaeróbicas.

55 **[0186] Animales:** Ratones hembra C3H/HeN y C57Bl/6 (5-6 semanas de edad) fueron adquiridos de Harlan UK. Se alojaron como grupos o pares en jaulas estándar dentro de aisladores flexifilm con filtros HEPA situados en una instalación de contención de clase 2. Tenían acceso libre a un pienso para roedores de alta calidad y agua desionizada estéril en todo momento y se les permitió aclimatarse durante 7 a 10 días antes del comienzo de los experimentos. El Instituto Rowett de Nutrición y Salud (RINH) está sujeto a la Ley de Animales del Reino Unido (Procedimientos Científicos) de 1986. Estudios en el presente documento se llevaron a cabo bajo los auspicios de una Licencia de Proyecto del Ministerio del Interior aprobada por personal con la necesaria Licencia Personal del Ministerio del Interior (como se define y se establece en la Ley de Animales del Reino Unido (Procedimientos Científicos) de 1986), y fueron revisados y aprobados por el Comité de Revisión Ética RINH.

### 65 Métodos

**[0187] Cultivo de LAB:** En estudios iniciales, una pequeña cantidad de heces congeladas (100 mg) se dispersó en 1 ml de diluyente de recuperación máxima (MRD). Se hicieron otras dos diluciones de diez veces secuenciales. Las tres suspensiones se sembraron en estrías sobre MRS o placas de agar LAMVAB. En estudios posteriores, la muestra de heces se dispersó en 5 ml de MRD, diluido adicionalmente (1:40) en MRD y 0,5 ml de esta dilución distribuido por la superficie de MRS o placas de agar LAMVAB con o sin hidratos de carbono de calostro de cerdo suplementarios. En todos los casos, las placas se incubaron en un recipiente anaeróbico durante 72 horas a 37°C. Distintas colonias se recogieron (al menos 8 por placa) de las placas de agar y se sembraron en tubos de Hungate que contienen caldo MRS o donde caldo MRS apropiado que contiene hidratos de carbono de cerdos de calostro. Los tubos se incubaron durante 48 horas a 37°C.

**[0188] Depósito congelado:** Una alícuota (0,7 ml) de cada cultivo se extrajo con una jeringa y aguja estériles y se dispensan en un tubo de plástico que se purgó con CO<sub>2</sub> y contenía 0,3 ml de glicerol y 2 mg de L-cisteína. El tubo se cerró herméticamente con un tapón de plástico, con la etiqueta, el contenido se mezclaron, se congelaron y se almacenaron a -80°C.

**[0189] Medio acondicionado:** El cultivo restante se transfirió a un tubo de centrifuga Corning de 15 ml, se centrifugaron a 1000 g x 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó, se dividió en alícuotas y se congeló. Los gránulos se extrajeron inmediatamente para el análisis de genes 16S ARNr o se congelaron.

**[0190] Análisis del gen 16S ARNr** (Clarridge, 2004): El ADN bacteriano se extrajo utilizando un kit de Spin FastDNA® para suelo en conjunción con un sistema de cordón de batidor Fastprep 120, de acuerdo con el protocolo suministrado con el kit. PCR se llevó a cabo (mezcla de reacción: tampón, 10 µl. dNTPs (2 mM), 5 µl. 27F cebador (20 pmol/ µl), 2 µl. 1492R cebador (20 pmol/ µl) 2 µl polimerasa Go Taq Flexi, 0,5 µl. MgCl<sub>2</sub>, 5 µl. H<sub>2</sub>O, 23,5 µl y 2 µl de ADN extraído) usando MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler se ejecutan a través de 35 ciclos de 95°C durante 3 minutos, 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante dos minutos. Cebador: 27F (F01) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R (RP2) ACGGCTACCTTGTTACGACTT. El producto de limpieza PCR se realiza con un Gel Wizard®SV y kit de limpieza PCR (Promega), que se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Productos 16S de PCR se secuenciaron utilizando analizadores genéticos totalmente automatizados basados en tecnología de electroforesis capilar (Sección Genómica, RINH, UoA) usando los cebadores inversos y delanteros 519R y 926F. Las cepas bacterianas fueron identificadas por comparación de secuencias con secuencias conocidas de ADN bacteriano utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**[0191] Actividad antibacteriana:** Agar XLD se preparó según las instrucciones del fabricante y se enfrió a 45°C. *Salmonella enteritidis* S1400 se añadió a agar XLD [1 ml de una dilución 1: 1000 de un cultivo nocturno de Salmonela en 200 ml de agar XLD para dar el equivalente de 106 CFU/ml]. El agar se vierte en placas de petri y se deja fraguar. Las placas fueron marcadas en 4 cuadrantes y un pocillo de aproximadamente 5 mm cortado en cada cuadrante. Una parte alícuota (60 µl) de medios acondicionados o caldo MRS se añadió a los pocillos. Las placas se cubrieron y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Fueron fotografiados con una cámara digital. Las imágenes transferidas a Photoshop, y el diámetro del pocillo y zona de inhibición se determinaron usando la herramienta de medición. Los valores se calcularon y se almacenaron en una hoja de cálculo de Excel. El mismo procedimiento se utilizó con *Escherichia coli* K88, excepto que se usó agar MacConkey No 3.

**[0192] Susceptibilidad a los antibióticos:** LAB de cerdo [0,5 ml de una dilución 1: 100 de un cultivo de una noche] se extendió sobre la superficie de una placa de agar MRS [90mm] y se secó. Las placas fueron marcadas en 4 cuadrantes y en cada cuadrante se colocó un disco que contiene antibiótico [ampicilina, 10 µg. Cefotaxima, 30 µg. Cloranfenicol, 10 µg. Eritromicina, 15 µg. Gentamicina, 10 µg. Kanamicina, 30 µg. Metronizadol, 50 µg. Ácido nalidíxico, 30 µg. Tetraciclina, 30 µg. Vancomicina, 30 µg]. Las placas se cubrieron, se colocaron en un frasco anaeróbico y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Fueron fotografiados con una cámara digital. Las imágenes se transfirieron a Photoshop, y se determinó el diámetro de la zona de inhibición usando la herramienta de medida. Los valores se calcularon y se almacenaron en una hoja de cálculo de Excel.

**[0193] Prevención de la adhesión/invasión por salmonela *in vitro*:** Monocapas de células IPEC-J2 se cultivaron a 3 días post-confluencia en placas de 24 pocillos y se sincronizaron por la adición de medios DTS 24 horas antes de uso. Se centrifugaron cultivos de una noche de LAB de cerdo (10 ml) [1000g x 5 min a temperatura ambiente] y las bacterias se resuspendieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato [PBS]. Una parte alícuota (50 µl) de LAB se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Un cultivo de una noche de *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* S1400 [*S. enteritidis* S1400] fue sub-cultivado (0,5 ml en 10 ml) en un medio de Luria Bertani (LB) y se incubaron aeróbicamente durante 23 horas a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica (560 nm) de 0,8. Esto dio una concentración equivalente a 1x10<sup>8</sup> CFU/ml. El cultivo se centrifugó [1000g x 5 min a temperatura ambiente], las bacterias se resuspendieron en 10 ml de PBS. Una parte alícuota (50 µl) a los pocillos de células IPEC-J2. Pocillos tratados con PBS se utilizaron como controles. Las placas se incubaron durante otras 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Las monocapas de células IPEC-J2 se lavaron 5 veces con HBSS. Se añadió una solución (0,5 ml) de PBS que contenía Triton-X100 (10 ml/litro) a cada pocillo, la monocapa se raspó y se dispersó. Salmonela viable se estimó en placas de agar XLD [incubada durante 24 horas a 37°C] por el método de Miles y Misra [Robertson *et al*, 2003]. LAB se determinaron por el mismo

procedimiento [incubados anaeróbicamente durante 48 horas a 37°C].

**[0194]** Inhibición de las respuestas inflamatorias: Monocapas de células IPEC-J2 se cultivaron a 3 días post-confluencia en placas de 24 pocillos y se sincronizaron por la adición de medios DTS 24 horas antes de uso. Se centrifugaron cultivos de una noche de LAB de cerdo (10 ml) [1000g x 5 min a temperatura ambiente] y las bacterias se resuspendieron en 1 ml de PBS. Una parte alícuota (50 µl) se añadió de LAB a cada pocillo [3 pocillos para cada muestra] junto con 220 ng de 12-O-Tetradecaboilforbol-13-acetato [PMA] por pocillo. PMA o PBS solo sirvieron como controles. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Los medios de cultivo se retiraron de los platos y las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadió tampón RLT (0,5 ml) que contiene mercaptoetanol a cada pocillo, las células se rasparon y se transfirieron a un tubo eppendorf [por cada raspado de muestra se combinaron 3 pocillos]. La extracción de ARN se realizó utilizando RNeasy® Mini kit de acuerdo con los protocolos del fabricante y la transcripción inversa con una alta capacidad de cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCR de tiempo real se realizó en un sistema de PCR de tiempo real 7500 Fast operativo con el sistema 7500 Fast v 1.4.0 versión de software de detección de secuencia 1.4 (Applied Biosystems). Los cebadores para IL-8 y TNF-α porcinos [IPEC-J2, SY100604186-096 IL-8-2 inversa, SY100604186-090 TNF1 a inversa, SY100604186-095 IL-8 2 delante, SY100604186-089 TNFa1 delante, y SY100604186-093] se prepararon por Sigma Aldrich. La mezcla de reacción fue: 10 µl Power Sybergreen Master mix, 2,5 µl de cebador directo, 2,5 µl de cebador inverso y 5 µl de ADNc, el PCR de tiempo real fue se ejecutó a continuación de acuerdo con el protocolo estándar 7500 [95°C, 10 min, 1 ciclo. 95°C, 15 seg, 40 ciclos. 60°C, 1 min, 40 ciclos. 95°C, 15 seg, 1 ciclo. 60°C, 1 min, 1 ciclo. 95°C, 15 seg, 1 ciclo. 60°C, 15 seg, 1 ciclo]. La expresión de IL-8 y genes TNF-α se analizaron y se compararon con el gen "de mantenimiento" β-actina. Para la comparación, los valores se dan como la relación de IL-8 y TNF-α por β-actina o factor de cambio.

**[0195]** Por ejemplo:

- a. Calcular ΔCt (2H) para IL-8 [Ct IL-8 menos Ct β-acción]
- b. Calcular ΔCt (2H) para PMA [Ct PMA menos Ct β-actina]
- c. Dividir ΔCt (IL-8) con ΔCt (PMA)
- d. Redondear valor al número entero

**[0196] Reactividad de sustrato:** Se determinó la reactividad de carbohidratos de LAB individual usando un kit API CH 50 (Biomérieux UK Ltd). Los ensayos se realizaron según las instrucciones y las reacciones del fabricante se registraron después de la incubación durante 24 y 48 horas a 37°C. Hay 50 cápsulas en una placa API CH 50. Éstas contienen diversos sustratos potenciales y controles negativos. La gama de sustratos es la siguiente: monosacáridos 16" Monosacaridosalcoholes 4, disacáridos 8, trisacáridos 2, polisacáridos 3, alcoholes 6, Otros 7. Para cada grupo de sustrato, se cuenta el número de reacciones positivas. Esto se divide por el máximo posible para dar el rango para ese grupo de sustrato. La suma de todas las puntuaciones de sustrato da la clasificación general para la bacteria. Alta clasificación indica el amplio espectro de reactividad de sustrato **tratamiento térmico de LAB:** Una pequeña cantidad de heces congeladas (100 mg) se dispersó en 5 ml de diluyente de recuperación máxima (MRD). El sedimento se dejó sedimentar y la capa superior se decantó en tubos eppendorf (1 ml/tubo). Los tubos se calentaron a 50°C, 60°C o 70°C durante 10 min. Una alícuota (0,4 ml) de cada uno se sembró en agar MRS y se incubaron en un recipiente anaeróbico durante 72 horas a 37°C. Se detectaron un pequeño número de colonias después de calentarse a 70°C. Distintas colonias se seleccionaron, se sembraron en tubos de Hungate que contienen caldo MRS y se incubaron durante 48 horas a 37°C.

**[0197]** En un segundo estudio, una pequeña cantidad de heces congeladas (100 mg) se dispersó en 5 ml de diluyente de recuperación máxima (MRD). El sedimento se dejó sedimentar y la capa superior se decantó en tubos eppendorf (1 ml/tubo). Los tubos se calentaron a 50°C durante 20 min, 50°C durante 20 min más 60°C durante 20 min o 50°C durante 20 min más 60°C durante 20 min más 70°C durante 20 min. Una alícuota (0,5 ml) de cada uno se sembró en agar MRS y se incubaron en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C. Se detectaron un pequeño número de colonias, interceptado, se sembraron en tubos de Hungate que contienen caldo MRS y se incubaron durante 48 horas a 37°C.

**[0198]** En el tercer estudio, se centrifugó un cultivo de una noche (10 ml) de LAB de cerdo aislado (1000g x 5 min a temperatura ambiente), el sedimento se resuspendió en caldo MRS fresco (10 ml)). Una alícuota (1 ml) se calentó a 70°C durante 15 min y después se sembró (0,5 ml) en MRS agar y se incubó en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C. Se detectó un pequeño número de colonias, interceptado, se sembraron en tubos de Hungate que contienen caldo MRS y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Este cultivo se centrifugó, se volvió a suspender en caldo MRS, se calentó de nuevo a 70°C durante 15 min, se sembraron en agar MRS, se incubaron en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C, se seleccionaron, se sembraron en tubos de Hungate que contienen MRS caldo y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Como antes, este cultivo se centrifugó, se resuspendió en caldo MRS, se recalentó a 70°C durante 15 min, se plaqueó (0,5 ml) en agar MRS, se incubó en un recipiente anaeróbico durante 48 horas a 37°C, se interceptó, se sembró en tubos de Hungate que contienen caldo MRS y se incubó durante 48 horas a 37°C.

**[0199] Estabilidad de las bacterias liofilizadas:** Se centrifugaron cultivos de una noche de LAB (1000 gx 5 min a

temperatura ambiente. Los sedimentos se resuspendieron en 2 ml de PBS estéril y se volvieron a centrifugar. Los sedimentos posteriores fueron luego resuspendidos en 5 ml de solución de congelación [leche desgrasada desnatada en polvo (SKP), 100 g/l; SKP + lactosa, ambos 100 g/l; SKP + sacarosa, ambos 100 g/l; o SKP, 200 g/l]. Las muestras se congelaron a -20°C (2-3 horas) y después se almacenaron a -80°C durante la noche. Se liofilizaron durante 48 horas y el material seco se almacenó a temperatura ambiente. Bacterias viables en las muestras se determinaron a 0 y aproximadamente 40 y 80 días después de finalización de liofilización. Se sembraron en agar MRS y se incubaron anaeróbicamente durante 48 horas a 37°C.

**[0200] Preparación a granel de GGDK31 y GGDK266:** Dos lotes de 500 ml de caldo MRS se prepararon en botellas con tapa de rosca de vidrio de 500 ml, se autoclavaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (en la proximidad de la llama de gas), mientras que se lavaron con CO<sub>2</sub>. Se añadieron cuatro ml de un cultivo de 24 horas de GGDK31 o GGDK266 a cada una de botellas de MRS y las tapas ligeramente cerradas. Las botellas se colocaron en un frasco anaeróbico y se incubaron a 37°C durante 24 horas. El cultivo se centrifugó [1000g x 5 min a temperatura ambiente] en 6 tubos de 50 ml de centrifuga estériles. El sobrenadante se descartó, los tubos se rellenaron con el cultivo y se recentrifugaron hasta que todas las bacterias habían sido recuperadas. Cada uno de los 6 tubos contenían cantidades casi iguales de las bacterias. Las bacterias en cada tubo se resuspendieron en 40 ml de PBS estéril, se volvió a centrifugar y el sobrenadante se descartó. Bacterias en cada tubo se resuspendieron en 20 ml de SKM (100 g/l), se congelaron a -20°C (2-3 horas) y luego durante la noche a -80°C, se liofilizaron durante 48-72 horas y se almacenaron a 4°C. Para evaluar bacterias viables en la muestra, un tubo de material liofilizado se resuspendió en 20 ml de caldo MRS, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluyeron, se plaquearon en agar MRS y se incubaron anaeróbicamente durante 48 horas a 37°C.

**[0201] *L. mucosae* in vivo Estudio 1:** Dieciséis (6 semanas) ratones C3H/HeN hembra viejos se dosificaron con un cultivo de una noche de vial 323 (*L. mucosae*; 50 µl; >109 CFU) en el día -7, -4, -2 y 0 y después diariamente hasta el día 9. A otros 16 ratones (de control) se les dio medios. En el día 0, a ocho ratones (tratados con *L. mucosae*) y ocho ratones de control, se les dio, mediante sonda nasogástrica, una dosis única de *Salmonella enteritidis* S1400 (50 µl; ≥ 108 CFU). Además, a ocho ratones (tratados con *L. mucosae*) y a ocho ratones de control se les dio una dosis única de medio de cultivo. El peso corporal y la puntuación de la salud fueron monitorizados post-infección por salmonela dos veces al día. Los ratones fueron sacrificados (sobredosis de isoflurano y exanguinación) y se diseccionaron a los 10 días después de la infección de salmonela. Estómago, porciones representativas de yeyuno e íleon, ciego, más contenidos, colon además de contenidos, el bazo y el hígado y un riñón y el ganglio linfático mesentérico se recogieron bajo condiciones casi asépticas para microbiología. Porciones representativas de yeyuno superior, yeyuno medio, íleon, ciego y colon ascendente y descendente se colocaron en formalina tamponada neutra o ARN-más tarde y se almacenaron para el análisis futuro.

**[0202] *L. mucosae* in vivo Estudio 2:** Cinco ratones C57Bl/6 (de 6 semanas de edad) se dosificaron con un cultivo de una noche de vial 323 (*L. mucosae*; 50 µl; >109 CFU) en el día -7, -4, -2 y 0 y después diariamente hasta el día 5. Otros 5 ratones recibieron medios. En el día 0, se les dio a los diez ratones, mediante alimentación forzada, una sola dosis de *Salmonella enteritidis* S1400 (50 µl; ≥ 107CFU). Los ratones fueron sacrificados y disecados en el día 6, de acuerdo con el procedimiento para el estudio 1.

**[0203] Cerdo novelo de LAB in vivo:** Cuatro ratones C3H/HeN hembra (de 6 semanas de edad) se dosificaron con un cultivo durante la noche de vial RINH 31 (*L. reuteri*; 50 µl; >109 CFU), cuatro con vial RINH 32 (*L. reuteri*). Cuatro con vial 323 (*L. mucosae*), cuatro con vial RINH 46 (*L. reuteri*), cuatro con vial RINH 47 (*L. reuteri*) y ocho con MRS. Esto se hizo en el día -6, -4, -2 y 0 y diariamente a partir de entonces hasta el día 9. En el día 0, se les dio a todos los ratones tratados con lactobacilos y cuatro ratones de control, mediante sonda nasogástrica, una dosis única de *Salmonella enteritidis* S1400 (50 µl; ≥ 108 CFU). Además, a los cuatro ratones de control restantes se les dio una dosis única de medio de cultivo. Los ratones se sacrificaron y se diseccionaron el día 10, de acuerdo con el procedimiento para el estudio 1. Microbiología: Los tejidos se homogeneizaron [1: 100 p/v] en MRD usando un homogeneizador de tejido Janke-Kunkel Ultra-Turrax T25 a 20.000 rpm durante 30 segundos, como eran contenidos yeyuno e íleon. Hasta ocho diluciones secuenciales (1:10 v/v) de los homogeneizados primarios se hicieron, se plaquearon sobre agar XLD y MacConkey N° 3 agar y se incubaron durante la noche a 37°C. Los recuentos viables se calcularon como antes [Robertson et al, 2003].

**[0204] Análisis estadístico:** Cuando los datos apropiados se evaluaron inicialmente mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con respecto a los resultados del tratamiento. Si ANOVA indicó que no había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre todos los grupos, los datos se analizaron por prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer o la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis según sea apropiado. Esto se realizó mediante el paquete estadístico InStat (GraphPad Software Inc, San Diego, EE.UU.).

**[0205]** Sobre la base de las salidas de las pruebas de comparación múltiple, promedios en tablas o gráficos fueron marcados con letras en superíndice. Medios que diferían significativamente entre sí ( $p < 0,05$ ) se asignaron letras de superíndice distintas. Medios que no difirieron significativamente entre sí se asignaron superíndices comunes.

## Resultados

## 1. Aislamiento de LAB

[0206] Las heces de los lechones criados orgánicamente se sembraron sobre agares selectivos y se incubaron en condiciones anaerobias. De todos los estudios, un total de 436 colonias individuales de bacterias de ácido láctico [LAB] fueron seleccionadas, sembradas en caldo MRS y se incubaron en condiciones anaerobias. A cada cultivo se le da un número vial RINH único y una parte alícuota se congeló en medios MRS que contenían 30% de glicerol y L-cisteína (~ 2 mg/ml) y se almacenó a -80°C. El análisis de genes 16S ARNr estaba hecho y cepas bacterianas fueron identificadas por comparación de secuencias con las secuencias de ADN bacterianas conocidas (Tabla 1).

[0207] La mayoría de las colonias de LAB cultivadas fueron *L. johnsonii* y cepas relacionadas con *L. johnsonii* [*L. johnsonii*, *L. johnsonii/gasseri*, *L. johnsonii/taiwanensis*] (240/436) y *L. reuteri* o relacionados con *L. reuteri* [*L. reuteri*, *L. reuteri/pontis*, *L. reuteri/vaginalis*, *L. reuteri/acidophilus* (169/436)]. Hubo 7 colonias *L. plantarum/pentosus*, otras 19 especies y 5 cepas no cultivadas.

## 2. Actividad anti-salmonela *in vitro*

[0208] Los medios acondicionados a partir de LAB aislado se cribaron para la actividad anti-bacteriana contra *Salmonella enteritidis* S1400 usando un ensayo de difusión de pocillos (Figura 1).

Los medios acondicionados a partir de colonias individuales de LAB variaron en gran medida en su actividad frente a *S. enteritidis* (Figuras 2a). Esto no fue dependiente de la cepa. La gama de actividades anti-salmonela entre *L. johnsonii* fue similar a la entre *L. reuteri*. Sobre una base arbitraria, los cultivos se separaron en grupos sobre la base de su capacidad para inhibir la salmonela *in vitro* (Figura 2b). El Grupo 1 tenía <20000 unidades de inhibición, el Grupo 2 20.000-40.000 unidades de inhibición, un Grupo 3 4-60000 unidades de inhibición, Grupo 4 6-80000 unidades de inhibición, Grupo 5 80000-100000 unidades de inhibición y Grupo 6 >>100000 unidades de inhibición (Figura 2b). Grupo 1 compuesto de 14 cepas (3,4% del total), el grupo 2 de 95 cepas (22,8%), Grupo 3 de 99 cepas (23,7%), Grupo 4 de 99 cepas (23,7%), Grupo 5 de 86 cepas (20,6 %) y el Grupo 6 de 24 cepas (5,8%). El último grupo compuesto por diecisiete *L. johnsonii* y relacionados con *L. johnsonii*, seis *L. reuteri* o cepas relacionadas con *L. reuteri* y una cepa no cultivada.

## 3. Actividad K88 anti-*E. coli* *in vitro*

[0209] Los medios acondicionados a partir de LAB también fueron seleccionados para actividad K88 anti-*Escherichia coli* por el ensayo de difusión en pocillo. Actividad contra *E. coli* K88, como con salmonela, variaba en gran medida entre las colonias individuales de LAB (Figura 3a). La gama y la variación en la actividad fue similar entre el *L. johnsonii* y cepas *L. reuteri*. En general, no hubo correlación directa entre actividades anti-salmonela y anti *E. coli* K88 para cualquier LAB individual (Figura 3c, 3d). Sin embargo una de las diez cepas de *E. coli* K88 grupo 5 (Figura 3b), siete tenían actividades relativamente altas contra ambos patógenos, dos tenían alta actividad contra *E. coli* K88 pero la actividad moderada contra la salmonela y era activa principalmente contra *E. coli* K88.

## 4. Selección inicial del candidato LAB

[0210] Se identificaron treinta y tres cepas de realizar más pruebas *in vitro* (Tabla 2). Estas comprendían 18 *L. johnsonii* y cepas relacionadas con *L. johnsonii*, 11 *L. reuteri* o relacionados con *L. reuteri* la y 4 *L. plantarum* y cepas relacionadas con *L. plantarum* (Tabla 2a).

## 5. Adjunto/invasión de células epiteliales de intestino de cerdo [IPEC-J2]

[0211] La capacidad de LAB para bloquear la adhesión/invasión de células IPEC por *S. enteritidis* y *E. coli* se evaluó K88 (Figura 4a, 4b, 4c). El LAB candidato redujo en gran medida unión e invasión de células IPEC por la salmonela. La mayoría eran también muy eficaces contra *E. coli* K88. Sin embargo, 3 de las cepas tenían solamente efectos limitados sobre la adhesión/invasión de células IPEC por *E. coli* K88.

## 6. Susceptibilidad de LAB a los antibióticos.

[0212] La susceptibilidad del candidato LAB a un rango de antibióticos se evaluó (Tabla 4, Figura 5). Todas menos una cepa (vial RINH 266) mostraron algún grado de resistencia a los antibióticos individuales. Todos eran susceptibles a la ampicilina (10 µg), cefotaxima (30 µg) y cloranfenicol (10 µg). La mayoría eran susceptibles a la eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y vancomicina (30 µg). La mayoría de las cepas fueron resistentes a metronizadol (50 µg) y ácido nalidíxico (30 µg) y en menor medida a la kanamicina (30 µg). 23

## 7. Selección refinada de candidato LAB

[0213] Se identificaron veintitrés altas cepas de clasificación para la prueba adicional *in vitro*.

## 8. Especificidad de sustrato de LAB

[0214] Los LAB candidatos se cribaron para la reactividad del sustrato usando un kit API CH 50 (Tabla 5, 6, Figura 6). *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. plantarum* exhibieron perfiles de reacción de sustrato general de la cepa específica. Además, la mayoría de las cepas de cada genotipo mostraron diferencias finas en su reactividad de sustrato, indicativo de que eran cepas individuales únicas.

5

## 9. Supresión de la inflamación en células epiteliales intestinales de cerdo [IPEC-J2]

[0215] La capacidad de LAB candidato para bloquear o suprimir las respuestas inflamatorias desencadenadas en células IPEC por 12-O-Tetradecaboilforbol-13-acetato [PMA] fue probado (Figura 7; Tabla 7). Las cepas candidatas variaron en gran medida en su capacidad para bloquear la interleucina-8 (IL-8) de expresión génica provocada por PMA. Cinco cepas (vial RINH 29, 30, 31 86 y 266) tenían efectos antiinflamatorios potentes.

10

## 10. Selección final del candidato LAB

[0216] Se identificaron catorce cepas que tienen matanza y actividades contra *Salmonella* y el bloqueo de *E. coli* K88, susceptibilidad a la reactividad de hidratos de carbono antibióticos y la capacidad para suprimir la inflamación *in vitro*. Siete de estos eran particularmente preferidos. El último conjunto comprendió 4 relacionados con *L. plantarum*, 3 relacionados con *L. johnsonii* y uno de *L. reuteri*. Dos de estas cepas de LAB [GGDK266 y GGDK31] se prepararon a granel para la evaluación en un ensayo con lechones recién destetados (Tabla 8).

15

20

## 11. Liofilización y almacenamiento de LAB

[0217] La supervivencia y viabilidad de laboratorio después de liofilización en leche desnatada en polvo [SKP], SKP plus lactosa o SKP más sacarosa fue evaluado (Figura 8). Las pequeñas pérdidas en la viabilidad fueron evidentes en el almacenamiento durante 42 y 84 días a temperatura ambiente de las muestras secas en SKP. Esto fue menos marcado cuando la leche en polvo desnatada y azúcares se utilizan en combinación. Sin embargo, las 24 últimas preparaciones tendían a ser higroscópicas y difíciles de mantener. Por lo tanto, preparaciones a granel del GGDK266 y GGDK31 se prepararon por secado de las bacterias en la leche desnatada en polvo [100 g/l] (Tabla 8).

25

## 12. Estudios de termotratamiento

[0218] Las suspensiones de heces de los cerdos criados ecológicamente fueron tratados durante períodos variables de tiempo a 50-70°C térmico, se plaquearon en agar MRS, las colonias se seleccionaron y se cultivaron en caldo MRS [vial RINH 417-506]. Los tipos de cepas recuperadas fueron variables y especies de *Clostridium* formaron una alta proporción, las cepas aisladas se mantuvieron sensibles al calor.

30

35

[0219] Cultivos aislados de LAB fueron objeto de calentamiento tres veces durante 15 minutos a 70°C (Figura 9). Bacterias viables se disminuyeron en 3-4 órdenes de registro después del tratamiento térmico la primera vez. Sin embargo, las bacterias sobrevivientes tenían un grado de resistencia al calor. Con una excepción, las pérdidas de bacterias viables eran bajas cuando las bacterias fueron recultivadas y reaclimatizadas otras dos veces.

40

[0220] El tratamiento térmico tres veces a 70°C alteró las actividades biológicas de las cepas de la Figura 9. El vial RINH 521 (vial 255 tratado térmicamente) no fue capaz de bloquear la unión de patógenos a las células IPEC y la capacidad de vial RINH 520 (vial 230 tratado térmicamente) para impedir la adhesión se redujo. La capacidad de vial RINH 517 (vial 31 tratado térmicamente) para abolir respuestas inflamatorias desencadenadas en células IPEC fue abolida. En contraste, las propiedades biológicas de vial RINH 518 (vial 85 tratado térmicamente) y vial RINH 519 (vial 86 tratado térmicamente) eran similares a las de las cepas nativas.

45

## 13. Estudios de infección de ratones

50

### 13.1 *L. mucosae* (vial RINH 323)

[0221] Ratones C3H/HeN desarrollan una infección persistente pero no letal, intestinal y sistémica, que tiene muchas características de la forma principal de la salmonelosis humana, cuando fueron estimulados con altos niveles de *Salmonella enteritidis* S1400. En contraste, los ratones C57BL/6 desarrollan una infección severa principalmente sistémica, una reminiscencia de la infección aguda en los seres humanos, cuando fueron estimulados con el mismo patógeno. Para evaluar la capacidad de *L. mucosae* (vial 323) para mejorar la salmonelosis, C3H/HeN y ratones C57BL/6 fueron tratados con *L. mucosae* antes y después de la estimulación con *Salmonella enteritidis* (Figuras 10, 13). Los ratones se sacrificaron y se diseccionaron 6 (C57BL/6) o 10 (C3H/HeN) días después de la infección.

60

[0222] **Tejidos sistémicos:** El tratamiento oral con *L. mucosae* limitó la capacidad de *S. enteritidis* para causar la infección sistémica tanto en ratones C3H/HeN como C57BL/6 (Figura 11a-c; 14a-c). Se detectaron altos números de salmonela viable en el nódulo linfático mesentérico, el hígado y el bazo de los ratones. En contraste, los números presentes en estos tejidos se redujeron en gran medida si los ratones habían sido co-tratados con vial RINH 323 (*L. Mucosae*). Infección por salmonela causó agrandamiento del bazo (Figura 12a; 15). Esta respuesta de los tejidos se

65

redujo significativamente en los ratones tratados con tanto vial RINH 323 (*L. mucosae*) como salmonela.

**[0223] Intestino:** Mieloperoxidasa intestinal [MPO], un marcador para los neutrófilos, se determinó en ratones C3H/HeN tratados con salmonela o salmonela más vial RINH 323 (*L. Mucosae*). MPO en el intestino se incrementó en gran medida por la infección por salmonela, debido al reclutamiento de neutrófilos a la parte de intestino de la respuesta del huésped a la infección (Figura 12b), Co-tratamiento con vial RINH 323 (*L. mucosae*) redujo la actividad MPO en el intestino de ratones de salmonela infectados, lo que indica que las respuestas inflamatorias intestinales a la infección se redujeron en estos animales.

### 13.2 LAB de cerdo novelo

**[0224]** Se seleccionaron cuatro LAB: vial RINH 31, vial RINH 32, vial RINH 46 y vial RINH 47 (Todo el *L. reuteri*; LR31, LR 32, LR 36 y LR47 respectivamente). Para evaluar su eficacia para mejorar una infección por patógenos, ratones C3H/HeN fueron tratados con estos LAB o vial RINH 323 (*L. mucosae*, LM) antes y después de la estimulación con *Salmonella enteritidis* (Figura 16). Los ratones se sacrificaron y se diseccionaron 10 días después de la infección. Se redujo la excreción fecal de *S. enteritidis*, si los ratones habían sido co-tratados con LAB (Figura 17a, b). LR31 y LR32 tendían a tener los mayores efectos en las salidas de salmonela fecal.

**[0225] Intestino:** El tratamiento con LR31, LR32, LM, LR46 o LR47 redujo significativamente el número de salmonella en el ciego (Figura 18a). Además, LR31, LR32, LR47 y LR46 pero no LM rebajó números de salmonela en el colon (Figura 18b). Las reducciones tendieron a ser mayores con LR31 y LR32. En contraste con el intestino grueso, el laboratorio no tuvo efectos significativos sobre los números de la salmonela en el intestino delgado.

**[0226] Tejidos sistémicos:** El tratamiento con LR31, LR32, LM, LR46 o LR47 redujo en gran medida los números de salmonela detectados en el bazo y el hígado (Figuras 19a-c). Las reducciones fueron más marcadas con LR31 y LR32 con LM, LR46 o LR47. Números de salmonela en el nódulo linfático mesentérico se redujeron después del tratamiento con LR31, LR32 y LR46 pero no con LM o LR47.

### Discusión

**[0227]** Las cepas de LAB aisladas (total de 436 selecciones de colonias individuales) a partir de heces de los cerdos criados orgánicamente fueron predominantemente *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. pentosus*, cepas con un pequeño número de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. vaginalis*, un solo *L. mucosae* y varias cepas no cultivadas. La mayoría de las sustancias LAB producidas que podrían inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* y/o *E. coli* K88 *in vitro*. La potencia de estos efectos anti-patógenos varió mucho entre las cepas bacterianas individuales. Una proporción de LAB tenía alta actividad contra *S. enteritidis* pero baja actividad frente a *E. coli* K88 y viceversa, pero la mayoría tenía actividades similares contra ambos patógenos.

**[0228]** Se seleccionaron treinta y tres cepas sobre la base de la potencia antimicrobiana tal como se determina *in vitro*. Estas bacterias se seleccionaron adicionalmente para determinar su capacidad para bloquear la adhesión/invasión de las células epiteliales de cerdo intestinal (IPEC) por patógenos *in vitro* y su susceptibilidad a los antibióticos.

**[0229]** Veinte y tres cepas se sometieron a ensayo para la gama de sustrato y especificidad y su capacidad para suprimir inflamación en células IPEC *in vitro*. De estos, se identificaron catorce LAB (5 *L. johnsonii*, 6 *L. reuteri* y 3 *L. plantarum*) con propiedades particularmente favorables.

**[0230]** Dos cepas de LAB [GGDK266 y GGDK31 se prepararon a granel para evaluación *in vivo* en lechones recién destetados. Otras cepas candidatos potencialmente importantes estaban presentes en este conjunto de 14 LAB.

**[0231]** También se evaluó la supervivencia y viabilidad de laboratorio después de la liofilización en varias soluciones. Las pequeñas pérdidas en la viabilidad fueron evidentes en el almacenamiento prolongado de las muestras secas con leche desnatada en polvo. Esto fue menos marcado cuando se utilizaron leche en polvo desnatada y azúcares. Sin embargo, las últimas preparaciones eran higroscópicas y eran difíciles de mantener. Por lo tanto, se decidió utilizar una suspensión de leche desnatada en polvo para el liofilización y el almacenamiento de LAB. Las preparaciones a granel del GGDK266 y GGDK31 se liofilizaron en este medio.

**[0232]** La estabilidad de calor es una característica útil para LAB para ser utilizado en alimentos de origen animal sedimentados. Se obtuvieron cinco cepas viables acondicionadas de calor de aislado LAB de cerdo. Sin embargo, las propiedades biológicas *in vitro* y el potencial probiótico de tres de las cepas se vieron afectadas adversamente por el tratamiento térmico. Sin embargo, dos de las bacterias retuvieron las propiedades biológicas de sus formas no tratadas por calor nativas.

**[0233]** Cinco LAB de cerdo (*L. Reuteri* [4] o *L. mucosae* [1]) se ensayaron para la capacidad de mejorar la salmonelosis *in vivo*. El tratamiento de ratones con estos LAB reduce en gran medida la patogenicidad de *S. enteritidis*.

**14. Evaluación de la administración oral de cepas probióticas orgánicas de lactobacilos en la modulación de la microbiota intestinal y el rendimiento de los cebadores lechones destetados**

5 **[0234]** Ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en lechones destetados tempranamente para probar el efecto de dos cepas probióticas de acuerdo con la invención, Cepas de lactobacilos GGDK266 y GGDK31.

**Diseño del ensayo**

10 **Animales:**

**[0235]**

- 15 • 24 lechones grandes - blancos x redon
- Recién destetados (21 días de edad, ≈ 7 - 8 kg), nacidos en una granja local
- Ponderados luego distribuidos por igual entre los diferentes grupos
- 20 • 3 tratamientos experimentales (n = 8):
  - A - Dieta basal + Placebo
  - 25 B - Dieta basal + GDDK probiótico 266 - dosis  $10 \times 10^{12}$
  - C - Dieta basal + GDDK probiótico 31- dosis  $10 \times 10^{12}$
- Período de observación: 14 días

30 **Dieta:**

**[0236]** Las dietas basadas en la cebada, el trigo y la harina de soja

• Composición de pienso (%):

35	Cebada	36,5
	Trigo	21
	SBM 48	19
	Maíz	10
	Aceite de soja	4
40	Azucar	4
	Proteína de Patata	2
	Premezcla	3,5

• pienso *ad libitum* en forma de granulado

45

**Muestras de tejido y medidas**

**[0237]**

50

55

60

5	<b>Muestreo:</b>	Día 0	Masacre de 6 lechones "naïve" para la recolección de la recolección individual de ciego de heces (si es posible)										
		Día 7	Colección individual de heces durante medición de peso										
		Día 14	Masacre de 24 lechones para colección de:										
10			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left;">Contenido (5g):</th> <th style="text-align: left;">Tejidos (10 cm):</th> </tr> <tr> <td>- Gástrico</td> <td>- Yeyuno</td> </tr> <tr> <td>- Yeyuno</td> <td>- Íleon</td> </tr> <tr> <td>- Íleon</td> <td>- Ciego</td> </tr> <tr> <td>- Ciego</td> <td>- Nodos linfáticos (nivel de íleon distal)</td> </tr> </table>	Contenido (5g):	Tejidos (10 cm):	- Gástrico	- Yeyuno	- Yeyuno	- Íleon	- Íleon	- Ciego	- Ciego	- Nodos linfáticos (nivel de íleon distal)
Contenido (5g):	Tejidos (10 cm):												
- Gástrico	- Yeyuno												
- Yeyuno	- Íleon												
- Íleon	- Ciego												
- Ciego	- Nodos linfáticos (nivel de íleon distal)												
15	<b>Almacenamiento:</b>		Todas las muestras se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.										
20	<b>Rendimiento: (1<sup>er</sup> paso)</b>		Ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (FI) y la tasa de conversión alimenticia (FCR)										
25	<b>Análisis: (2<sup>o</sup> paso)</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinación del perfil de la microbiota en las diferentes muestras de contenido intestinal por la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante de técnica molecular de microbiología (DGGE).</li> <li>• El análisis molecular del gen de datos de expresión utilizando ensayos de expresión génica de affymetrix de cerdo para determinar los patrones de modulación de genes.</li> <li>• Determinación de marcadores de inmunidad en los tejidos intestinales</li> </ul>										

**[0238] Análisis microbiano mediante desnaturización en gel de gradiente de electroforesis DGGE (Ensayo 1)**

**Metodología DGGE**

**[0239]** Se extrae el ADN de muestras fecales o de tejidos que utilizan el kit de giro MP Bio FastDNA™ para muestra de suelo - 116560000. El ADN se amplifica entonces usando cebadores Muyzer, ya que es imprescindible el uso de cebadores con una abrazadera GC a ejecutarse en la gel. Para las muestras de lactobacilos, se utilizaron cebadores de lactobacilos especializados con una abrazadera de GC.

Grupo diana	Cebador	Secuencia de cebador (5'-3')	Amplicon Tamaño (pb)	Temperatura de recocido (°C)	Gradiente DGGE (%)
Todas las Bacterias	MF MR-GC <sup>a</sup>	ATTACCGCGGCTGCTGG GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	233	55	35-70
LAB	Lac1	AGCAGTAGGGAATCTTCC A			
	Lac2-GC <sup>a</sup>	Abrazadera GC-ATTYCACCGCTACACATG <sup>c</sup>	327	55	30-50
Anotaciones: <sup>a</sup> La abrazadera GC es el siguiente: CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGGCACGGGGG <sup>c</sup> Y = C o T					

**[0240] Programa de PCR:**

Hora	Temperatura	Ciclos
5 minutos	94°C	1
30 segundos	94°C	35
30 segundos	55°C	
2 minutos	72°C	
10 minutos	72°C	1

**[0241]** DGGE es una técnica de análisis genético en el que productos de PCR amplificados se separan por los desnaturizantes de formamida y urea dentro del gel, basado en la secuencia genética por tan poco como una única diferencia de base. DGGE se puede utilizar para visualizar las diferencias en la diversidad microbiana entre muestras. ADN obtenido a partir de una gama de muestras se puede utilizar en DGGE por ejemplo, tejido y

muestras fecales. Bandas en el gel se visualizaron mediante tinción con plata.

### **Análisis molecular y perfiles de expresión de genes de los tejidos del cerdo**

#### **5 Extracción de ARN y análisis de microensayos affymetrix**

[0242] Se aisló ARN de los dos tejidos animales y las células cultivadas para su uso en GeneChips de Affymetrix. Para el tejido animal, aproximadamente 200 mg de muestra de tejido fue eliminado de RNAlater (Ambion) y se lisó en Trizol (Invitrogen) usando un homogeneizador Polytron. El tejido se homogeneizó adicionalmente haciendo pasar el lisado a través de una jeringa equipada con una aguja 19G 3-5 veces. Las muestras se incubaron durante 5 min a TA para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Entonces, cloroformo, isopropanol y pasos de etanol se realizaron según instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió 0,2 ml de cloroformo por 1 ml de Trizol, se agitó en vórtex y se incubó a TA durante 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo fresco, y el ARN se precipitó por la adición de 0,5 ml de isopropanol por 1 ml de Trizol. Los tubos se agitaron vigorosamente a mano durante 10 s, se incubaron a 4°C durante 10 min y se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 min a 4°C. El precipitado de ARN se lavó con etanol helado al 75%, la adición de al menos 1 ml de etanol al 75% por 1 ml de Trizol. Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 7400 xg durante 5 min a 4°C. Después de secarse por aire el sedimento de ARN resultante, el ARN se resuspendió en hasta 100 µL de agua libre de RNasa L. El ARN total se extrajo adicionalmente con el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo una etapa de digestión de RNasa I libre de ADNasa (Qiagen).

[0243] Las células cultivadas se homogeneizaron mediante la adición de 350 µl de tampón RLT + 1% β-mercaptoetanol. Las células se rasparon de las placas de cultivo con una punta de filtro y se homogeneizaron más pasando el lisado a través de una jeringa equipada con una aguja 19G 3-5 veces. El lisado de células se procesa adicionalmente usando el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo una etapa de digestión de ADNasa libre de RNasa I (Qiagen).

[0244] La concentración de ARN y la integridad se comprobó usando un instrumento Nanodrop y/o Agilent Bioanalyzer, y el ARN purificado se almacenó a -70°C.

[0245] 250 ng de ARN se procesó para Affymetrix GeneChips utilizando el GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix) según las instrucciones del fabricante. La calidad de ARN se determina por Agilent 2100 Bioanalyzer. La hibridación con la genoma del ratón GeneChip 430 2.0 y GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) en una estación de fluidos 450 GeneChip (Affymetrix) se llevó a cabo en el Institute of Medical Sciences Microarray Core Facility (Universidad de Aberdeen, Reino Unido). Fichas fueron escaneadas con un escáner Affymetrix GeneChip 3000 (Affymetrix). Análisis de la calidad de imágenes se realizó usando Gene Chip de software operativo (GCOS) (Affymetrix). Un análisis más detallado de la calidad, la normalización (gcRMA), análisis estadístico y generación de mapa de calor se realizó con los paquetes de software disponibles libremente R (<http://www.r-project.org>) y Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Microensayos de datos se presentaron al National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

### **Resultados**

#### **45 Rendimiento de los cerdos alimentados con GGDK266 y GGDK31 probióticos**

[0246] Los resultados para los cerdos alimentados con GGDK266 y GGDK31 probióticos se muestran en la Figura 20.

[0247] DWG (ganancia diaria de peso), FI (ingesta de alimentos) y FCR (relación de conversión del pienso) se muestran a continuación:

GGDK266	DWG	FI	FCR
D0-D7	+++ (*)	+	+
D7-D14	=	+	+
D0-D14	+	+	+

[0248] Los lechones alimentados con GGDK266 exhibieron ganancia de peso diaria mejorada significativamente (DWG) durante el post-destete de la primera semana en relación con GGDK31 y lechones alimentados con placebo.

#### **Análisis de la diversidad microbiana mediante DGGE (Ensayo 1)**

[0249] DGGE utilizando cebadores universales no reveló diferencias en la diversidad microbiana general entre los tratamientos y el placebo (véase la Figura 21).

[0250] DGGE utilizando cebadores específicos a bacterias de ácido láctico (LAB) reveló diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con GGDK 266 y placebo en ambas muestras cecales e íleon (véase Figura 22).

5 [0251] DGGE utilizando cebadores específicos a LAB revelaron diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con GGDK266 y placebo en muestras de íleon (véase Figura 23).

[0252] DGGE utilizando cebadores específicos a LAB revelaron diferencias significativas en la diversidad LAB entre el tratamiento con 266 y placebo en muestras cecales (véase Figura 24).

10 [0253] En general, el análisis de la diversidad microbiana reveló la agrupación significativa de la población LAB en los lechones alimentados GGDK266 que indican que las poblaciones de animales individuales en este tratamiento tiene una microbiota similar y estable.

15 **Análisis molecular de muestras de tejido ileal: Ensayos de cerdo Affymetrix**

**Regulado hacia abajo en GDK266 versus placebo**

20 [0254] Análisis de ontología de gen de gen expresado diferencialmente reveló que una reducción significativa en los procesos del sistema inmune y la activación pro-inflamatoria en respuesta a la alimentación de lechones jóvenes con GGDK266 probiótico en relación con el placebo (véase la Figura 25).

[0255] Los resultados revelan que GGDK266 tenía un efecto muy específico en el sistema inmune y los grupos funcionales asociados con la respuesta a los estímulos (véase la Figura 26).

25 **Regulado hacia arriba en GGDK266 versus placebo**

[0256] En contraste con los efectos sobre el sistema inmune, GGDK266 promovió procesos metabólicos particularmente en relación con nitrógeno (véase la Figura 27). Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que estos efectos podrían explicar la mejor DWG en los animales alimentados con GGDK266.

30 **Principales genes expresados diferencialmente entre GGDK266 y placebo**

35

40

45

50

55

60

65

[0257]

affy.id	Nombre del gen	Producto	FC	Valor p
Ssc.645.1.S1_at	CSTA	Cistatina A	44,06	0,00000
Ssc.11608.1.A1_at	TIP_HUMAN	Precursor de proteína inmunomoduladora de células T	28,92	0,00030
Ssc.10837.1.A1_at	ROBO1	Precursor de homología 1 indirecto	13,35	0,00178
Ssc.8960.1.A1_at	BPI	Permeabilidad de bactericida-incremento de precursor de proteína	11,65	0,00476
Ssc.16234.1.S1_at	TCN1	Precursor de transcobalamina I	11,48	0,00023
Ssc.1411.1.S1_at	THBS4	Precursor de tromboesporadina 4	8,92	0,00198
Ssc.837.1.A1_at	BPI	Permeabilidad de bactericida-incremento de precursor de proteína	4,55	0,00573
Ssc.30008.1.A1_at	ESR1	Receptor de estrógenos	4,48	0,00053
Ssc.13539.1.A1_at	PLAGL1	Proteína de dedo zinc PLAGL1	4,42	0,00881
Ssc.26324.1.S1_at	NP_981932	Proteína de deshalogenasa de yodotirosina 1	4,26	0,00200
Ssc.29413.1.A1_at	B3GALT2	UDP-Gal: betaGlcNAc beta 1,3 galactosiltransferasa 2	4,00	0,00046
Ssc.27410.1.S1_at	MYCN	Proteína n-myc proto-oncogén	3,80	0,00261
Ssc.25176.1.A1_at	GOLPH4	Golgi fosfoproteína 4	3,80	0,00009
Ssc.15890.1.S1_at	VNN1	Precursor de panteteinasa	3,61	0,00271
Ssc.23427.1.A1_at	Citocromo b561	Citocromo b561	3,29	0,01512
Ssc.16186.1.S1_at	CD3e	Superficie de células T CD3 glicoproteína precursor de la cadena epsilon	-2,62	0,00764
Ssc.22676.1.S1_at	CXCR6	C-X-C de quimiocinas receptor de tipo 6	-2,63	0,01652
Ssc.15565.1.S1_at	LCP2	Proteína citosólica de linfocitos 2	-2,76	0,00024
Ssc.18652.1.S1_at	IL16	Precursor de interleucina-16	-2,97	0,01132
Ssc.181.1.S1_at	TRGV9	Receptor de células T de cadena gamma región V de precursor 1/2 PT-gamma	-3,04	0,01615
Ssc.23489.1.S1_at	CD8A	Superficie de células T glicoproteína precursor de la cadena alfa CD8	-3,08	0,00071
Ssc.428.6.S1_a_at	TCA_HUMAN	Región C de cadena alfa de receptor de células T	-3,15	0,00027
affy.id	Nombre del gen	Producto	FC	Valor p
Ssc.10357.1.A1_at	FMN2	Formina 2	-3,46	0,00308
Ssc.27354.1.S1_at	STXBP5	Tomosina	-3,88	0,02438
Ssc.28909.3.A1_at	TPH2	Triptófano 5-hidroxilasa 2	-4,36	0,00717
Ssc.25976.1.S1_at	GZMH	Precursor de granzima H	-5,46	0,00179
Ssc.11070.1.S1_at	IGHM	Región C de cadena Ig alfa-1	-9,07	0,00115
Ssc.16566.1.S1_at	LCT	Precursor de hidrolasa lactasa-florizina	-11,31	0,00328
Ssc.13273.1.A1_at	GCNT3	Glucosaminilo (N-acetilo) transferasa 3, tipo mucina	-19,75	0,00016
Ssc.11098.1.S1_at	IFITM3	Proteína de membrana inducida por interferón 3	-51,36	0,00044

[0258] Los datos de expresión génica revelaron que un número de genes se incrementaron significativamente incluyendo péptidos antimicrobianos (por ejemplo, CSTA, BP1) y genes inmunorreguladores (TIP). En contraste GGDK266 redujo la expresión de un panel diverso de genes implicados en la inmunidad pro-inflamatoria (IFITM3, IL-16).

### Conclusiones

[0259]

- Procesos celulares y metabólicos, en particular en relación con nitrógeno, se incrementan en los animales tratados con GGDK266 en relación con el placebo.
- Procesos del sistema inmunológico se regulan hacia abajo en animales tratados con GGDK266 en relación con el placebo. Ejemplos incluyen marcadores de células T CD3 y CD8, cadenas de receptor de células T, quimioquinas/citoquinas y genes relacionados con IFN.

- Animales administrados con GGDK266 exhibieron una población estable de bacterias del ácido láctico reveladas por la agrupación del perfil bacteriano del individuo inducida por la administración de GGDK266 probiótico.
- FCR y el rendimiento se han mejorado significativamente durante las primeras semanas de vida post-destete.
- Esta mejora en el rendimiento del crecimiento correlacionado con la disminución de la respuesta inmune inflamatoria y el incremento en el procesamiento metabólico específico.

**Tabla 1: Resumen de las colonias de bacterias seleccionadas a partir de cultivos de heces de cerdos criados orgánicamente.**

15	Número total de selecciones de colonias cultivadas	443
		<u>Medios:</u>
	Agar <u>LAMVAB</u>	55
	Agar <u>LAMVAB</u> + carbohidratos de calostro de cerdo	88
20	Agar MRS	29
	Agar MRS + carbohidrato de calostro de cerdo	176
	Agar MRS libre de glucosa + carbohidrato	57
	Agar MRS después del tratamiento térmico de hasta 70°C	38
25	<u>Cepas principales identificadas:</u>	
	Lactobacillus reuteri	
	Lactobacillus johnsonii	
	Lactobacillus plantarum	

- 30 **[0260]** Cinco LAB aislados se calentaron una vez, dos veces o tres veces a 70°C durante 15 min.  
**[0261]** Bacterias supervivientes se recultivaron.

En existencia

35 **[0262]**

- 5 LAB calentados una vez a 70°C
- 5 LAB calentados dos veces a 70°C
- 40 5 LAB calentados tres veces a 70°C

**Tabla 2: cepas de LAB candidatos para el estudio adicional seleccionado sobre la base de matar a la actividad en ensayos de difusión pocillos (cuenta 266 y 161 contienen LR)**

Matanza de patógenos (unidades) Ensayo de difusión de pocillos			
Nº de vial RINH		anti-SE	anti-KSS
85	LR	129886	60168
255	LJ	101477	64390
266	LJ	101335	60168
436	LJ	81656	85010
161	LP	77894	103346
12	LJ	162709	42977
16	LJ	117621	41365
29	LR	174471	45720
31	LR	116867	46907
86	LR	98520	75147
230	LJ	95705	64340
256	LJ	94012	77459
314	LJ	103497	48936
361	LJ	100770	40254
17	LJ	144765	23072
30	LR	125463	36050
32	LR	168892	32572
258	LP	70724	68612
260	LP	78197	68562
320	LJ	66350	78044
364	LJ	99137	55123
433	LJ	95083	51461
15	LP	77459	58669
218	LJ	62329	50416
220	LJ	68612	53834
356	LJ	72986	55302
363	LJ	79125	45555
131	LR	42223	44108
434	LR	10000	81656
166	LJ	17064	79621
431	LR	48657	31674
47	LR	20722	34633
46	LR	19867	34633

LJ. *L. johnsonii*. LR. *L. reuteri*. LP. *L. Plantarum*

**Tabla 2a: Identificación de las cepas candidato de LAB (secuencia del gen 16S ARNr) seleccionado sobre la base de matar a la actividad en ensayos de difusión de pocillo (nota 266 y 161 contienen LR)**

Nº de vial RINH	Secuencia delantera	Secuencia inversa
85	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
255	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>taiwanensis</i> , <i>acidophilus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>gasseri</i>
266	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
436	<i>lactobacillus johnsonii</i> str. 466	<i>lactobacillus johnsonii</i> F19785
161	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>pentosus</i> , <i>paraplantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>pentosus</i>
12	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>gasseri</i> , <i>taiwanensis</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>gasseri</i>

(continuación)

Nº de vial RINH	Secuencia delantera	Secuencia inversa
16	Lactobacillus johnsonii, gasseri, taiwanensis	Lactobacillus johnsonii
29	Lactobacillus reuteri, pontis, vaginalis, frumenti	Lactobacillus reuteri
31	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
86	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
230	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii
256	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii
314	lactobacillus johnsonii BR0315	uncultured bacterium
361	lactobacillus johnsonii str. NCC2822	lactobacillus johnsonii F19785
17	Lactobacillus johnsonii, gasseri, taiwanensis	Lactobacillus johnsonii
30	Lactobacillus reuteri, pontis	Lactobacillus reuteri
32	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
258	Lactobacillus plantarum, pentosus, helveticus	Lactobacillus plantarum, pentosus, paraplantarum
260	Lactobacillus plantarum, pentosus, paraplantarum	Lactobacillus pentosus, plantarum, paraplantarum
320	lactobacillus johnsonii NCC2822	Lactobacillus johnsonii F19785
364	lactobacillus johnsonii 466	lactobacillus johnsonii F10785
433	lactobacillus johnsonii str. CECT 289	lactobacillus johnsonii F19785
15	Lactobacillus plantarum, pentosus	Lactobacillus plantarum, pentosus
218	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis	uncultured Firmicutes, Lactobacillus johnsonii
220	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis	uncultured Firmicutes, Lactobacillus johnsonii
356	lactobacillus johnsonii NCC2822	lactobacillus johnsonii F19785
363	lactobacillus johnsonii 466	lactobacillus johnsonii F10785
131	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
434	Lactobacillus reuteri NM99-1	lactobacillus reuteri
166	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii
431	lactobacillus reuteri str.Probio-16	lactobacillus reuteri JCM 1112
47	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
46	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri

**Tabla 3: Cepas candidato LAB para estudio adicional seleccionado sobre la base de matar actividad en ensayos de difusión en pocillo y la capacidad para bloquear la adhesión de patógenos a las células IPEC**

Nº de vial RINH	Inhibición de adherencia (%)	
	SE	KSS
85	88.31	87.93
255	82.37	99.93
266	88.03	98.09
161	98.32	96.94
12	96.89	99.92
29	93.7	99.91
31	98.64	99.75

ES 2 656 037 T3

(continuación)

RINH	Inhibición de adherencia (%)	
86	81	99.98
256	82.47	99.92
361	85.07	99.44
17	84.56	99.66
30	96.44	99.91
32	87.74	99.86
230	78.89	82.45
258	96.37	86.5
260	90.22	88.79
314	79.68	94.2
433	99.99	96.23
16	87.68	45.38
218	91.53	86.49
363	85.61	99.93
364	82.13	78.12
15	79.19	99.52
131	95.5	96.03
220	91.04	78.6
320	92.7	44.17
356	82.15	78.4
434	94.78	98.85
436	99.97	1
166	91.45	95.97
431	96.35	86.47
47	90.47	99.47
46	83.51	99.7

**Tabla 4: Area de inhibición de LAB por cantidades definidas de antibiótico (unidades arbitrarias)**

	ampicilina	cefotaxima	cloranfenicol	eritromicina	gentamicina	kanamicina	metronizadol	nal. ácido de tetraciclina	vancomicina	
12	244011	340402	186699	13151	0	0	0	0	37668	22581
15	277117	311725	204282	214008	0	0	0	0	0	0
16	266033	294166	187805	64681	17000	7157	0	0	0	105209
17	387224	400570	235430	277145	9193	0	0	0	50328	117741
29	410335	444193	190293	114511	0	0	0	0	252497	11483
30	292728	335927	77133	208117	31261	0	0	0	187805	31402
31	334789	410966	165904	262226	38221	0	0	0	214037	24901
32	404496	402291	247436	350238	71608	23786	0	0	261979	10691
46	359232	402588	210421	251461	29550	0	0	0	21382	25069
47	328283	410579	185515	270105	30342	0	0	0	211556	22231
85	356114	369916	204992	309439	0	0	0	0	276800	3971
86	250812	381270	183399	250805	41858	0	31264	0	16643	13355
131	349955	473065	248521	123562	82466	14932	0	0	19354	7479
161	338497	412977	258724	261133	51991	4536	29126	0	20435	5542
166	268783	417393	185508	251607	61136	17671	0	0	24606	0
218	209117	271547	148617	0	0	0	0	0	88668	122870
220	209371	319970	165815	34230	58814	32572	0	0	34636	111666
230	254614	335143	164405	51078	65717	45705	0	0	36644	41991

(continuación)

ampicilina cefotaxima cloranfenicol eritromicina gentamicina kanamicina metronizadol nal. ácido de tetraciclina vancomicina										
255	330364	392169	217758	59224	56563	8486	0	0	29872	0
256	456892	502325	228531	71258	93058	0	0	0	20955	42203
258	401257	271932	195909	233326	28608	0	0	0	223143	0
260	286400	364573	203796	33393	78821	78364	0	0	21757	62792
266	287070	322869	198614	247085	54008	3079	6437	2737	48286	107882
314	297057	332853	154830	44115	0	0	0	0		90259
356	291920	339895	203692	62656	10472	5890	0	0	24194	8202
361	320695	323713	201886	234140	0	0	0	0		91863
363	275304	308159	193271	44491	86683	0	0	0	28212	18146
364	288514	341651	194320	143978	45880	0	0	0	18322	103995
431	339016	380459	226484	311725	74991	0	0	0	0	26302
433	241710	203588	174124	63381	19139	0	0	0	19965	79034
434	198112	261065	172223	68052	6049	0	0	0	60344	45863
436	290458	287331	185812	142842	0	0	0	0	52279	61810

Ácido Nal., ácido de naladixie

**Tabla 5: Sustratos en cápsulas de Kit API CH 50**  
Sustratos en cápsulas de kit API CH 50

1	glicerol	poliol
2	eritritol	poliol
3	D-arabinosa	monosacárido
4	L-arabinosa	monosacárido
5	D-ribosa	monosacárido
6	D-xilosa	monosacárido
7	L-xilosa	monosacárido
8	D-adonotol	alcohol
9	Metilo- βD-xilopiranosido	cíclico
10	D-galactosa	monosacárido
11	D-glucosa	monosacárido
12	D-fructosa	monosacárido
13	D-Mamose	monosacárido
14	L-sorbosa	monosacárido
15	L-ramosa	monosacárido
16	dulcitol	monosacárido/alcohol
17	inositol	poliol
18	D-mamitol	poliol
19	D-sorbitol	azúcar/alcohol
20	Metilo-αD-manopiranosido	cíclico
21	Metilo-αD-glucopiranosido	cíclico
22	N-acetilglucosamina	monosacárido
23	amigdalina	glicósido
24	arbutina	glicósido
25	esculina citrato férrico	
26	salicina	glucósido
27	D-celobiosa	disacárido
28	D-maltosa	disacárido
29	D-lactosa (bovina)	disacárido
30	D-melibiosa	disacárido
31	D-SACCH se levantó	disacárido
32	D-trehalosa	disacárido
33	inulina	polisacárido
34	D-melecitosa	trisacárido
35	D-rafinosa	trisacárido
36	Amidon (almidón)	polisacárido
37	glucógeno	polisacárido

# ES 2 656 037 T3

(continuación)  
Sustratos en cápsulas de kit API CH 50

38	xilitol	monosacárido/alcohol
39	gentiobiosa	disacárido
40	D-turanosa	disacárido
41	D-lixosa	monosacárido
42	D-tagatosa	monosacárido
43	D-fucosa	monosacárido
44	L-fucosa	monosacárido
45	D-arabitol	monosacárido/alcohol
46	L-arabitol	monosacárido/alcohol
47	gluconato de potasio	secuestrante
48	2-cetogluconato de potasio	secuestrante
49	5-cetogluconato de potasio	secuestrante

Tabla 6: Perfil del sustrato de LAB usando un kit API CH 50

	monosacáridos	alcohol/microsacáridos	disacáridos	trisacáridos	polisacáridos	alcoholes	otros
17	0.4	0.0	0.8	0.5	0.3	0.0	0.4
30	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
31	0.3	0.0	0.6	0.5	0.0	0.0	0.6
32	0.3	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.3
46	0.2	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.4
47	0.2	0.3	0.5	0.5	0.0	0.0	0.4
85	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.4
86	0.3	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.4
131	0.4	0.0	1.0	1.0	0.3	0.3	0.9
161	0.7	0.3	0.9	1.0	0.0	0.3	0.9
166	0.4	0.0	0.6	0.0	0.7	0.0	0.3
220	0.1	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.4
230	0.3	0.0	0.8	0.5	0.0	0.0	0.4
255	0.1	0.0	0.6	1.0	0.3	0.0	0.4
256	0.2	0.0	0.5	1.0	0.0	0.2	0.6
258	0.6	0.3	1.0	1.0	0.7	0.7	0.9
260	0.4	0.3	0.9	1.0	1.0	0.0	0.6
266	0.3	0.0	0.9	0.5	0.3	0.0	0.4
320	0.3	0.0	0.5	0.5	0.3	0.0	0.3
363	0.4	0.0	0.8	1.0	0.3	0.0	0.4
364	0.4	0.0	0.8	0.5	0.3	0.0	0.4
433	0.2	0.0	0.5	0.0	0.0	0.2	0.3

**Tabla 7: Cepas de LAB candidato seleccionadas sobre la base de la actividad de matar, la capacidad para bloquear la adhesión de patógenos a las células IPEC, susceptibilidad a los antibióticos, la reactividad del sustrato y su capacidad para suprimir la inflamación (nota 266 y 161 contiene LR)**

5  
10  
15  
20  
25  
30

Nº de Vial RINH	Secuencia delantera	Secuencia inversa
266	Lactobacillus johnsonii	Lactobacillus johnsonii
31	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
258	Lactobacillus plantarum, pentosus, helveticus	Lactobacillus plantarum, pentosus, paraplantarum
260	Lactobacillus plantarum, pentosus, paraplantarum	Lactobacillus pentosus, plantarum, paraplantarum
255	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii, gasseri
161	Lactobacillus plantarum, pentosus, paraplantarum	Lactobacillus plantarum, pentosus
256	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii
86	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
85	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
32	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
230	Lactobacillus johnsonii, taiwanensis, acidophilus	Lactobacillus johnsonii
131	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus reuteri
30	Lactobacillus reuteri, pontis	Lactobacillus reuteri
364	lactobacillus johnsonii 466	lactobacillus johnsonii F10785

**Tabla 8: Identidad para las cepas de LAB de cerdo seleccionadas para preparación a granel (nota 266 y 161 contienen LR)**

35  
40  
45

GGDK266				
Nº de vial RINH	Cebador de código Seq 926F	Bacterias identificadas por BLAST	Cebador de código Seq 519R	Bacterias identificadas por BLAST
266	S10CM218	Lactobacillus johnsonii	S10CM171	Lactobacillus johnsonii
GGDK31				
Nº de vial RINH	Cebador de código Seq 926F	Bacterias identificadas por BLAST	Cebador de código Seq 519R	Bacterias identificadas por BLAST
31	S10BL123	Lactobacillus reuteri	S10BL141	Lactobacillus reuteri

50  
55  
60  
65

SEQ ID NO: 1  
31 S10BL123 con 926F

GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGCTAACCTTAGAGATAAG  
 CGGTTCCCTTCGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
 AACGAGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG  
 GTGGGGACGAGCTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAOAGGTACAACGAGTCGCAA  
 GCTCCGAGAGTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT  
 CGCTAGTAATCGGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTT  
 TGTAAACGCCAAAGTCGGTGGCCTAACATTATGGAGGGAGCCGCTAAGTCCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTA  
 ACAAGGTAGCCTGTATTTCTTGGGTTGTTCCCCCCCCGGCGGACTGCCTTACTCCTTTACCCNCCCGGCCCTGG  
 AGGGGGCCGGAACCCCTCCCAACCCCTAACCCACCTCCTTCTTTAACCCNGCT

SEQ ID NO: 2  
31 S10BL141 con 519R

5  
GACTTTCTAGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGC  
CGAAACCCCTTCTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT  
10  
AGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTGGGTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCG  
TTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGTCCATCCAGAGTGATAGCCAAGCCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTG  
15  
GACTTTCTTGTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCA  
CCCGTCCGCCACTCACTGGTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCTACGACTTGC  
ATGATTAGGCACACCGCCGGCTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTANGCGTCAGTTTTACGGTCTCGGCTCGTTTC  
20  
TCTGTTNTCTGACATCAACGTGCGTTACATTTGCGGTTTACGCATTGATTGTACTCCCTCCACATAGGTGGCGGCATACC  
CTTCGTGCTCCTCTACTCATCTCGTTTACATAACTCGCTTGTACCTTCCCGGTGGGGTTCTCTACCTCCTTGGTTTT  
CTCTCACCTCATTCTCTCTCCCATCCTCTCNCTTTCCTCTTGCTC

25  
SEQ ID NO: 3  
161 S10BL282 con 926F

30  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG  
ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGTTGTAGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
35  
AACGAGCGCAACCCCTTGTATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG  
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTGATGACCTGGGCTAGACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG  
AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTACGGATGTGTAGGCTGCAACTCGCCATACATGAAGTCG  
40  
GAATCGCTAGTAATCGCGGATACAGCATGCCGCGGTGAATACTGTTCCCGGGCCTATGTGACACACCGCCCGTCACACCA  
TGAGCAGTTTGAATCACCCACACAGTCGGTGGGGTAACCTTTATAGGAACCGCCCTACAGTGCGGGACCGATGATT  
45  
ATGGGTGCACTCGTATCACTGTAACCTTAAACCCCTTGGCGCCGTACTCCCAGGCGGAATGCTTAATACGTTACCTGCAAC  
CCTGAAGGGCGGAATCCCTCCAACGATTATCAAT

50  
SEQ ID NO: 4  
161 S10BL300 con 519R

55

60

65

5 GTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTTACGAG  
 CCGAAACCCCTTCTCACTCAGCGCGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG  
 TAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCC  
 10 GTTACCCACCATCTAGCTAATACGCCCGCGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTGGACCATGC  
 GGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTC  
 ACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGAAGCAACCAATCAATACCAAGTTCGTTCCGACTTGCATGTATTA  
 15 GGCACGCCGCCAGCGTTGTCGCTGAGCCATGATCAAATACTAAAGGCCCCCNATGCCTCCACCCCGCTTTGTTGCCGG  
 GGCCCCCGTTCCATACCCCTTTTGGACGTTTCCAGCCCTTGGCGGGCCCTGTACCTCCCCCAGGGCGGGGAATGC  
 CTTAATTGGGTTNACCTTGCACCCCTGAAGGGCGGAATCCCTCCAACGATTACCT

20

SEQ ID NO: 5  
255 S10BL504 con 926F

25

GGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTCGCATAACCTAAGAGATT  
 AGGTGTTCCCTTCGGGACCGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCACATGTTGGGTTAAGTCCC  
 30 GCAACGACGCCAACCCCTTGTATTAGTTGCCATCATTAACTTGGCCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
 AGGTGGGGATGACGTCAAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAGAATGGACGGTACAACGAGATA  
 35 GCGAACCTGCGAAGAGCTAAGCGGATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGC  
 TTGGAATCGTAGTAAATCGCGGATCAGCACTGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCA  
 TGAGAGTCTGTAACCTCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTCTATAGCGAGTGAGTCCGTTCCGATGGGTAGGGACAAGATGAA  
 40 TGAGCGGTGAAAGGTGTTAAACCAAGGTAAGCAAGTAAGGATCCCTTTGGGGTTTTATCTCCACGGGGGGGTGTTTC  
 TTTTCTGTCTTA

45 SEQ ID NO: 6  
255 S10BL530 con 519R

50 ACTTTCTAGAGTTAGATGATACCGTTCAACATGACAGATGGCCACGTTTACTTACTCTCACTGACTACTGTTCTTTTCATC  
 TCACACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCACTCAGCCGCGGTTGCTCCATCAGAGCTTTCGGTCCCATTGTG  
 GAACATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGCCGTGTCTCAGTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCAACTCGG  
 55 CTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCCGAGGTCCATCCAAGAGTGATAGCCGAA  
 CCATCTTTCACAACTCTAAACATGCTTGTAGTGTGTTATTCCGGTATTAACATTCTGTTTCCAGGTTGTTATCCGAGC  
 TGATCTGGGGCAGGTTTACCCCAACGTTGGTTTACCTTACCCCGGTTNCGGCCCGGCTTCGNCCTGGGTTAGTAC  
 60 TNACGATTCTGCTATTATATACGATGGGCTAGACGACCAGCCTAACACAATTTCAATTCGTNAAGTGTGAGAGGNCCT  
 ACGGTCGTCGGTTAACGTGTAGNCNATTTGGCTTATTTGTTAAGTTGTCCANCGGGCCACCGACCCCGGGCCCGGTT  
 65 GGTCCGGGTTTCCCCATTGCAACGTCGCCAAAGTGGGAAATTTGAAAATACCCCTTAACCAATGAAAAAACATA

SEQ ID NO: 7  
258 S10BL414 con 926F

5

GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG  
10 ACGTTCOCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCT  
CAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACGGAGGAA  
15 GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCOCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG  
AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAA  
20 TCGCTAGTAATCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGT  
TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTAGGAAACCAGCCCGCCTAAAGGGTGGGGAACAAGAATGAATTAA  
GGGGGTTGAAAAGTTCGGTAAACCAAAGGGGTTAGCCCCNGTNNGANNNNNNNNGAC

25

SEQ ID NO: 8  
258 S10BL438 con 519R

30

GCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTGTCTCTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCC  
GAAACCCCTTCTCACTCACGGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
35 GGAGTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAAGCGT  
TACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTCAAGCTCGGACCATGCGG  
TCCAAGTTGTTATCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGGTGTATTCCCCGCTTCGTGGGCAGGGTTTCCACGTGTTAC  
40 TCACCAGTTCGCCACTCAATGTAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTGACTTGATGAT  
TAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTNGA

45 NCIMB 41846 GGDK31- Lactobacillus reuteri

SEQ ID NO: 10  
S12KG200 GGDK 31-1 27F

50

TGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGA  
GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCAT  
55 AACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAG  
TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGACG  
GTCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGA  
60 AGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGCCGTGAGAGTAACTGTTACGCAAGTACCGGTATCCA  
ACCGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGT  
AAAGCGAGCGCAGGCGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGAC  
65 TTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCT

**SEQ ID NO: 11**  
**S12KG201 GGDK 31-1519F**

5

TCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGCGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC  
ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA  
GCACTCCGCCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCG  
GGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
CCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  
TCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA

10

15

20

**SEQ ID NO: 12**  
**S12KG202 GGDK 31-1926F**

25

GAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGT  
TCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
GGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTC  
GCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCT  
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGT  
ACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCATATGGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG  
GTAGCCGTA

30

35

40

**SEQ ID NO: 13**  
**S12KG203 GGDK 31-1926R**

45

CTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTAC  
GGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGACAGACCAGACAGCCG  
CCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTTCTGCACTCAA

50

55

60

65

GTCGCCCGGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTGCGCTCGCTTT  
ACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGGT  
TGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCCTCT  
TCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGAC  
CGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAA  
CTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGT  
TATGC

**SEQ ID NO: 14**  
**S12KG204 GGDK 31-1519R**

5

TTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAA  
ACCCITCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
GTATGGACCGTGTCTCAGTTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTAAGCCGTTAC  
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTT  
TTGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCG  
TCCGCCACTCACTGGTATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTACGACTTGCATGT  
ATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAAC

10

15

**SEQ ID NO: 15**  
**RP2 S12KG205 GGDK 31-1**

20

CCGCCTTAGGCGGCTCCCTCCATAATGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTAAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGC  
AGCCTACAGTCCGAACTGAGAACCGGCTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCAGCTCGTTGTACCGTCCATTGT  
AGCACGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTC  
TCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAAGATG  
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTT  
GAGTTTCCACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCT  
CCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGG

25

30

35

**NCIMB 41847 GGDK161 - contiene tanto Lactobacillus plantarum como Lactobacillus reuteri**

**Lactobacillus plantarum**

**[0263]**

**SEQ ID NO: 16**  
**S12KG218 GGDK 161-1 27F**

45

GTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAA  
CTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT  
GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAG  
GTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC  
TCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGT  
TTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTGAGGATTGACGGTATTTAACAGAA  
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTATTGGGCGTAAAGCGA

50

55

60

GCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAGCTTGAGTG  
CAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT

65

**SEQ ID NO: 17**  
**S12KG219 GGDK 161-1519F**

5

CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC  
ATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAA  
GCATTCGCTGGGAGTACGCGCCGAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTG  
GTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGG  
GGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTTATTACAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA

10

15

**SEQ ID NO: 18**  
**S12KG220 GGDK 161-1 926F**

20

TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGAC  
GTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGTTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
CGAGCGCAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAAC  
TCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTGCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTGGGAATCG  
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGITTTG  
TAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAAC  
AAGGTAGCCCGTA

25

30

35

**SEQ ID NO: 19**  
**S12KG221 GGDK 161-1 926R**

40

ACTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCAACACTTAGCATTTCATCGTTTA  
CGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACCTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCC  
GCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGITCCACTGTCTCTTCTGCACTCA  
AGTTTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTT  
TACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG  
TAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCCTTC  
TTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCTGTCATTGTGGAAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGCTACGTATCATTGCCATGGTGAAGCGTTACCCACCA  
TCTAGCTAATACGCCGCGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTG  
T

45

50

55

60

65

**SEQ ID NO: 20**  
**S12KG222 GGDK 161-1 519R**

5  
GCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCG  
AAACCCTTCTCACTCACGCGCGGCTTCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG  
10  
GAGTTTGGGCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTT  
ACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGT  
15  
CCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCAC  
CAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAAAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAG  
GCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGATCAAACCTAA

**SEQ ID NO: 21**  
**RP2 S12KG223 GGDK 161-1**

25  
CCACCTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTCATGTAGGCGAGTTGC  
AGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGT  
30  
AGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTC  
TCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATG  
35  
TCAAGACCTGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTGAATTAACCACATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTCT  
TTGAGTTTCAGCTTTCGCGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTC  
CAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTA

**NCIMB 41847 GGDK161-contiene tanto Lactobacillus plantarum como Lactobacillus reuteri Lactobacillus reuteri**

[0264]

**SEQ ID NO: 22**  
**S12KG309 cGGDK 161-1 27F**

50  
ATGCTAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGAT  
GGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGAT  
55  
GCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCG  
GTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATG  
GAACTGAGACACGGTCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAAC  
60  
ACCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGCA  
GTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG  
ATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCG  
65  
GAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC

**SEQ ID NO: 23**  
**S12KG310 cGGDK 161-1 519F**

5

TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTG  
CATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAT  
ACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTA  
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTCCCTTCG  
GGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
CCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG

10

15

20

TCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAG

25

**SEQ ID NO: 24**  
**S12KG311 cGGDK 161-1 926F**

30

GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCG  
TTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG  
GGGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCT  
CGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGC  
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGT  
AACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA  
GGTAGCCGTA

35

40

**SEQ ID NO: 25**  
**S12KG312 cGGDK 161-1 926R**

50

TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACG  
GCATGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCGAGACCAGACAGCCGC  
CTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCTCTTCTGCACTCAAG  
TCGCCCCGTTTCCGATGCACTTCTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTGCGCTCGCTTTA  
CGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTT  
GGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCTTCTT  
CACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGTGCTCCCGTAGGAGTATGGACC  
GTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAAC  
TAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTT

55

60

65

**SEQ ID NO: 26**  
S12KG313 cGGDK 161-1 519R

5

TTTCTGGTTGGATAACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAA  
ACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
GTATGGACCGTGTCTCAGTTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTAAGCCGTTAC  
CTTACCAACTAGCTAATGCACCCGAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTT  
TTGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCG  
TCCGCCACTCACTGGTAATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTACGACTTGCATG  
TATTAGGCACACCCGCCGGCTTCATCCTGAGCCATGATCAAAC

10

15

20

**SEQ ID NO: 27**  
RP2 S12KG314 cGGDK 161-1

25

GCGGCTCCCTCCATAAAGGTTAGCGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGCG  
GTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGGGAG  
TTGCAGCCTACAGTCCGAAGTGAAGACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCAGCTCGTTGTACCGTCCA  
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGC  
AGTCTCACTAGAGTGCCCACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC

30

35

ACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCCTGTGATTGCGTCCCCGAAGGGAAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAA  
GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA  
ATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAA  
ACCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT

40

**NCIMB 41848 GGDK255 - Lactobacillus reuteri**

**[0265]**

45

**SEQ ID NO: 28**  
S12KG237 GGDK 255-1 27F

50

GTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTCTTGCACCTGATTGACGATGGATACCAG  
TGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCG  
CATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGC  
TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGC  
ACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCCGCTGAG  
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGCACTGACGGTAT  
CCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGG  
CGTAAAGCGAGCGCAGGGCGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGC  
GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGT

55

60

65

**SEQ ID NO: 29**  
S12KG238 GGDK 255-1 519F

5

TCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC  
ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA  
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG  
GTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTCCCTTCGG  
GGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCGTCAGCTGTCGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGACGCGCAACC  
CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  
TCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC

10

15

20

**SEQ ID NO: 30**  
S12KG239 GGDK 255-1 926F

25

TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGC  
GTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAA  
CGAGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGC  
TCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCG  
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTTG  
TAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA  
AGGTAGCCGTA

30

35

40

45

**SEQ ID NO: 31**  
512KG240 GGDK 255-1 926R

50

TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTT  
ACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGC  
CGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTC  
AAGTCGCCCGGTTCCGATGCACCTTCTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCTCGCTCGCT  
TTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTCCACCTACGTAATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTG  
GTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCAGCAGCTTCTTCTCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTT  
CTTCACTCAGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTCCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGG  
ACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCTTGGTAAAGCCGTACCTTACC  
AACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTG

55

60

65

**SEQ ID NO: 32**  
**S12KG241 GGDK 255-1519R**

5  
10  
15  
20  
TTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAA  
ACCCCTTCTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
GTATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTAAGCCGTTAC  
CTTACCAACTAGCTAATGCACCCGAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAAGCCATTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCT  
TTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACC  
CGTCCGCCACTACTGTTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTACGACTTGCAT  
GTATTAGGCACACCGCCGGCGTCCATCCTGAGCCATGATCAAAC

**SEQ ID NO: 33**  
**RP2 512KG242 GGDK 255-1**

25  
30  
35  
40  
CCGCCTTAGGCGGCTCCCTCCATAAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGC  
AGCCTACAGTCCGAACCTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCAGTTCGTTGTACCGTCCATTGT  
AGCAGGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTC  
TCACTAGAGTGCCCAACTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTCCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAAGATG  
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCT  
TTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAA  
CACCTAGCACTCATCGTT

**NCIMB 41849 GGDK 258 - Lactobacillus plantarum**

**[0266]**

**SEQ ID NO: 34**  
**S12KG267 GGDK 258-3 27F**

50  
55  
60  
65  
GTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAA  
CTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT  
GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCATTGTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAG  
GTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAC  
TCCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGT  
TTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTGAGGTAATTGACGGTATTTAACCAGAAA  
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAG  
CGCAGGGCGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGC  
AGAAGAGGACAGTGGAATC

**SEQ ID NO: 35**  
**S12KG268 GGDK 258-3 519F**

5

GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT  
CGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCGAGCTAACGCATTAAGC  
ATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGG  
ACATGGATACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTT  
TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC

10

15

20

**SEQ ID NO: 36**  
**S12KG269 GGDK 258-3 926F**

25

GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGA  
CGTTCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAA  
CTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATC  
GCTAGTAATCGGGATCAGCATGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTT  
GTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAA  
CAAGGTAGCCCGTA

30

35

40

**SEQ ID NO: 37**  
**S12KG270 GGDK 258-3 926R**

45

ACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTA  
CGGTATGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAAGTTACAGACCAGACAGCC  
GCCCTCGCCACTGGTGTCTTCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCA  
AGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTCGCTCGCTT  
TACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG  
TTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCTTC  
TCACTCACGCGGCGTGTCTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTACCA  
TCTAGCTAATACGCCGCGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAAGTTG  
TTATGCGGTATTAGCATCTGTTTC

50

55

60

65

**SEQ ID NO: 38**  
S12KG271 GGDK 258-3 519R

5  
TTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAAACAGAGTTTTACGAGCCGAA  
ACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
10 GTTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTAC  
CTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCC  
AAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCACCAG  
15 TTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCAC  
GCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAAC

**SEQ ID NO: 39**  
RP2 512KG272 GGDK 258-3

20  
CCACCTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGT  
GTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTATGTAGCGGAGTTGC  
25 AGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGT  
AGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTC  
30 TCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTAGATTTGCATAGTATG  
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT  
35 TTGAGTTTCAGCCTTTCGCGCCGACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTC  
CAACACTTAGCATTATCATGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGC  
GTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCT  
40

**NCIMB 41850 GGDK 266 - contiene tanto Lactobacillus johnsonii como Lactobacillus reuteri Lactobacillus johnsonii**

**[0267]**

**SEQ ID NO: 40**  
S12KG273 GGDK 266-127F - repetición

50  
GTGCCAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGCTTGCACTAAATGAACTAGATACAAGCGAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAA  
55 CAACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTG  
GTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA  
60 AAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTT  
AGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAA  
AGCGAGTGCAGGCGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAAT  
65

**SEQ ID NO: 41**  
**S12KG274 GGDK 266-1 519F**

5

TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTG  
CATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAT

10

ACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTCCGCCTCTCAGTCTGCAGCTAACGCATTA  
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTGTCCCTTC  
GGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCGTGT

15

20

**SEQ ID NO: 42**  
**S12KG275 GGDK 266-1 926F - repetición**

25

GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTG  
TGTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
CGAGCGCAACCTTGTATTAGTTCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGCAAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAAC  
CTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACAGGACTGGAATCG  
CTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGAGAG  
TCTGTA

30

35

40

**SEQ ID NO: 43**  
**S12KG276 GGDK 266-1926R**

45

ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAGAGGCGGAAACCTCCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA  
CGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGAGAGCC  
GCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTCTCTCTTCTGCACTCA  
AGTTCAACAGTTTCTGATGCAATTCTCCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTATTGAACCGCCTGCACTCGCTT  
TACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTAA  
GTAATTACCGTCAAATAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCTTCTTCACTACCAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCTTC  
TTCACTCACGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCA  
ACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAAGAGTGATAGCAGAACCATCTTCAAACCTAGACATGCGTCTAGTGTGT

50

55

60

65

**SEQ ID NO: 44**  
**S12KG277 GGDK 266-1 519R**

5  
ACTTTCTAAGTAATTACCGTCAAATAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCTTTCTTCACTACCAACAGAGCTTTACGAGCCG  
AAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG  
10 GAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCCTTGGTAAGCCGTT  
ACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAAGAGTGATAGCAGAACCATCTTCAAACCTAGACATGCGTCT  
AGTGTGTTATCCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCAGTCTCTTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCC  
15 GTCCGCCGCTCGCTTGTATCTAGTTTCATTTAGTGCAAGCACTAAAATCATCTAGGCAAGCTCGCTCGACTTGCATGTAT  
TAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAAAC

**SEQ ID NO: 45**  
**RP2 S12KG278 GGDK 266-1**

20  
CTACCTTAGACGGCTGACTCCTATAAAGGTTATCCCACCGGCTTTGGGTGTTACAGACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTG  
25 TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGTAGGCGAGTTG  
CAGCCTACAGTCCGAAGTGAAGACGGCTTTAAGAGATCCGCTTCCTTCGAGGTTGCTTCTCGTTGTACCGTCCATTG  
30 TAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT  
CTCATTAGAGTGCCCAACTAATGATGGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACG  
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACTGTCTCAGCGTCCCCGAAGGGAACACCTAATCTCTTAGGTTTGCCTGGAT  
35 GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTTGTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCC  
TTTGAGTTTCAACCTTGGGTCGTA TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAGAGCGGAAACCTC  
CCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAAGGATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCA  
40 GCGTCAGTTGCAGACCAGAGAGCCGCT

**NCIMB 41850 GGDK 266-contiene tanto Lactobacillus johnsonii y Lactobacillus reuteri**

**Lactobacillus reuteri**

**[0268]**

**SEQ ID NO: 46**  
**S12KG279 GGDK-266-2 27F**

50  
GTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAG  
55 TGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCC  
CATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGC  
TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTACGAG  
60 ACGGTCACATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTACG  
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAGAAGCAGTGCCTGAGAGTAAGTGTTCACGCACTGACGGTAT  
CCAACCAAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGG  
65 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGC  
GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCCTA

**SEQ ID NO: 47**

S12KG280 GGDK-266-2 519F - repetición

5  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCA  
TCGGAAACCGGGCGACTTGTAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  
10 ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAG  
CACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
15 GTTTAATTCG

**SEQ ID NO: 48**

S12KG281 GGDK-266-2 926F - repetición

20 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGT  
TCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGG  
25 GGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCT  
CGCGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGC  
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACC

**SEQ ID NO: 49**

S12KG282 GGDK-266-2 926R - repetición

35 ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTA  
CGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCC  
40 GCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATCCACCCTACACATGGAGTTCCTACTGCTCTTCTGCACTCA  
AGTCGCCCCGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTGCGCTCGCTT  
TACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTCTG  
45 TTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTC  
TTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCGTAGGAGTATGGA  
CCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGAAGCCGTTACCTTACCA  
50 ACTAGCTAATGCACCGCAGGT

**SEQ ID NO: 50**

S12KG283 GGDK-266-2 519R

55 TTTCGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAA  
ACCCCTTCTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA  
GTATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC  
60 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTT  
TTGTTGTATTGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCG  
TCGCCACTCACTGGTATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTACGACTTGCATGT  
ATTAGGCACACCGCCGGCTTCATCCTGAGCCATGATCAAATCT

**SEQ ID NO: 51**  
**S12KG284 GGDK-266-2 RP2**

5

TCCCGCCTTAGGCGGCTCCCTCCATAATGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT  
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAATCCGACTTCGTGTAGGCGAGTT  
GCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATT  
GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAG  
TCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  
GACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAAGA  
TGTC AAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC  
CTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA CTCCCGAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCC  
TCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTC  
AGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTG

10

15

20

**NCIMB 41850 GGDK 266-contiene tanto Lactobacillus johnsonii como Lactobacillus reuteri**

**Lactobacillus reuteri**

25

**[0269]**

**SEQ ID NO: 52**  
**S12KG381 27F**

30

GTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACG  
GGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTT  
TGTTTGAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCAT  
AGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGGACACGGTCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGC

35

40

GCAAGCCTGATGGAGCAACACCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACCTG  
TCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTAT  
TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAG  
TGC

45

50

**SEQ ID NO: 53**  
**S12KG382 519F**

55

TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC  
CGGGCAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG  
CTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGT  
AGGTGTTGGAGGTTTCCGCCCTTCACTGCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCTTGGCTAACCTT  
AGAGATAAGGCGTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTGCCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA

60

65

**SEQ ID NO: 54**  
**S12KG383 926F**

5

GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGG  
GACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCTCAGCTCGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTACTAGTTG  
CCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGG  
CTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTC  
ACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCAAAGTCGGTGGCCTAACATTATGGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT  
AACAAGGTAGCCGTA

10

15

20

**SEQ ID NO: 55**  
**S12KG384 926R**

25

TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTGAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTA  
CCAGGGTATCTAATCTGTTCCGCTACCCATGCTTTCCGAGCCTCAGCGTCAGTTGACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT  
ATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCGCCCCGTTTCCGATGCACTTCTCGGTTAAGCCGAAGG  
CTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGGGCTGCTGGCA  
CGTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCAACAACAGAGCTTACGAGCCGA  
AACCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGT  
TCAGTTCCATTGTGGCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTC  
CATCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCC

30

35

40

45

**SEQ ID NO: 56**  
**S12KG385 519R**

50

GTGACTTCTGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTGCTTCTCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCTTCTTC  
ACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTCCATT  
GTGGCCGATCAGTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAGT  
GATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGC  
AGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCCGCCACTCACTGGTATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGCCAGTGCCTAC  
GACTTGATGTATTAGGCACACCGCCGGGTTTCTCTGAGCCATGATCAAAC

55

60

65

**SEQ ID NO: 57**  
**S12KG386 RP2**

5

TCCCGCACTTAGGCGGCTCCCTCCATAATGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
CGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGCGGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAAC  
GGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCAGCTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA  
10 TCTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCAATTGCGTCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAG  
GTTAGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCT  
15 TTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACCTAGCACT  
CATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCC

20

**NCIMB 42008 GGDK266a - L. johnsonii (muestra 4a)**

**[0270]**

25

**SEQ ID NO: 58**  
**S12KG399 27F**

30

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCCTAGATGATTTTGTGCTTGCACTAAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGT  
GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAAGAGACTGGGATAACACCTGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAG  
TTTGAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCC  
35 GAGTTGAGAGACTGATCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAA  
GTCTGATGGAGCAACCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTT  
TATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGG  
40 CGTAAAGCGAGTGCAGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTA

45

**SEQ ID NO: 59**  
**S12KG400 519F**

50

TGTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACT  
GTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC  
TCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTA  
55 AGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAACTCAAGGAAT  
TGACGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCCAGTGCAAACTTAA  
GAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
60 GCGCAACCTTGTCAATTAGTGGCATTAAGTTGGGCACTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT

65

**SEQ ID NO: 60**  
**S12KG401 926F**

ES 2 656 037 T3

5 GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGAITAGGTGTCCCTCGG  
GGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCCTGTCATTAGTT  
10 GCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAG  
GCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCG  
15 TCACACCATGAGAGTCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAGGGTGAAGTC  
GTAACAAGGTAG

20 **SEQ ID NO: 61**  
**S12KG402 926R**

25 TACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAGAGGCGGAAACCTCCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTAC  
CAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATA  
TCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCAACAGTTTCTGATGCAATTCTCCGGTTGAGCCGAAGGCT  
TTCACATCAGACTTATTGAACCGCTGCACTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG  
30 TAGTTAGCCGTGACTTCTAAGTAATTACCGTCAATAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCTTCTTCACTACCAACAGAGCTTACGAGCCGAAA  
CCCTTCTCACTACGCGGCGTGTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTTGGCCGTGTCTC  
AGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCCTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCA  
35 TCCAAGAGTGATAGCAGANCCATCTTCAAACCTCTAGACATGCGTCTAGTG

40 **SEQ ID NO: 62**  
**S12KG403 519R**

40 GTGACTTTCTAAGTAATTACCGTCAATAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCTTCTTCACTACCAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCA  
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATG  
45 TGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGCCCTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAAGAGTG  
ATAGCAGAACCATCTTCAAACCTAGACATGCGTCTAGTGTGTTATCCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCAGTCTCTTGGCGAG  
GTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCCGCTCGCTGTATCTAGTTTCAATTTAGTGAAGCACTAAAATCATCTAGGCAAGCTCGCTCGACTTG  
50 CATGTATTAGGCACGCCCGCAGCGTTCGTCCTGAGCCA

55 **SEQ ID NO: 63**  
**S12KG404 RP2**

60 TCCTACACTTAGACGGCTGACTCCTATAAAGGTTATCCACCGGCTTGGGTTTACAGACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
CGGGAACGTATTACCGCGCGTGTGATCCGCGATTAAGCGATTACAGCTTCCGTTAGGCGAGTTGACGCTACAGTCCGAACTGAGAAC  
GGCTTAAAGAGATCCGCTTCCCTCCGAGGTTCCGCTTCTGTTGACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTGATAAGGGGCATGATGA  
CTTGACGCTATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTAATGATGGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCACACCTGTCTCAGCGTCCCGAAGGGAACCACTAATCTCTTAG  
GTTTGCACCTGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTAATCTCTT  
65 TGAGTTTCAACCTTGGGTCGTAATCCAGCGGAGTCTAATGCGTTAGCTGACGCACTGAGAGCGGAAACCTCCCAACACTTAGCACTC  
ATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCGCTACCCATGC

**SEQ ID NO: 64**  
**NCIMB 42009 GGDK266b - L. reuteri (muestra 6a)**  
**S12KG411 27F**

5

GTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACG  
GGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTT  
TGTTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCAT  
AGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCAATGGAAGTGGAGACCGGTCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGC  
GCAAGCTGATGGAGCAACCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGT  
TCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT

10

15

20

**SEQ ID NO: 65**  
**S12KG412 519F**

TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACC  
GGGCGACTTGAGTGCGAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGGC  
TGCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTA  
GGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAG  
AGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTGCCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA

25

30

35

**SEQ ID NO: 66**  
**S12KG413 926F**

GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGG  
ACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGC  
CAGCATTAAAGTTGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGC  
TGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGACACACCGCCCGTC  
ACACCATGGGAGTTTGTAAAGCCAAAGTCGGTGGCCTAACCATTTGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT

40

45

50

55

**SEQ ID NO: 67**  
**S12KG414 926R**

60

65

5 TACTCCCCAGGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTAC  
CAGGGTATCTAATCCTGTTCCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATA  
TCTACGCATTCCACCCTACACATGGAGTTCACCTGTCTCTCTGCACTCAAGTCGCCCGGTTTCCGATGCACCTCTTCGGTTAAGCCGAAGGC  
TTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC  
10 GTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAA  
ACCCCTTCTCACTCACGCGGTGTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCT  
CAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCC

15 **SEQ ID NO: 68**  
**S12KG415 519R**

20 GTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTCTTC  
ACTCACGCGGTGTGTGCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTCATT  
GTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCCGAGGTCCATCCCAGAGT  
25 GATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGC  
AGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCGCCACTCACTGGTATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGCCAGTGCGTAC  
30 GACTTGATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCAT

35 **SEQ ID NO: 69**  
**S12KG416 RP2**

TCCCGCTTAGCGGGCTCCCTCCATAATGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
GGGAACGTATTACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACCTGAGAACG  
40 GCTTAAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCAGCTGTTGTACCGTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTACATAAGGGCATGATGAT  
CTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGTCTGT  
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTATTGCGTCCCGAAGGGAAACGCCCTTATCTCTAAGG  
45 TTAGCGCAAGATGCAAGACCTGTAAGGTTCTTGCCTAGCTTGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTT  
GAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCC

50 **SEQ ID NO: 70**  
**NCIMB 42010 GGDK161a - L.plantarum (muestra 7a)**  
**S12KG417 27F**

GTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTGTTGATTGTTGGTCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGCGGAACCTGGTGAAGTAACAC  
55 GTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGA  
TGGCTTCCGCTACACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACCGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGA  
GAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAAGTGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT  
60 GGAGCAACCGCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGAC  
GGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGC  
GAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGA  
65 CAGTGGAACCTCATGTGT

**SEQ ID NO: 71**  
**S12KG418 519F**

5  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGG  
GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTG  
10 TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAG  
TGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAG  
15 ATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGITGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT  
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC

20

**SEQ ID NO: 72**  
**S12KG419 926F**

25  
GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGG  
GACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTATCAGTTG  
30 CCAGCATTAAAGTTGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGG  
35 CTGCAACTCGCTACATGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC  
ACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTGAAGAACAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTACGGTGAAGTCGTA  
ACAAGGTAGCCCGTA

40

**SEQ ID NO: 73**  
**S12KG420 926R**

45  
GTACTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCGTTTACGGTATGGACTA  
50 CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACTCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCATAT  
ATCTACGATTTACCGCTACACATGGAGTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCGGTTGAGCCGAAGGC  
TTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGGGCTGCTGGCAC  
55 GTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTACTCTCAGATAATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAA  
ACCTTCTTCACTCACGCGGGTGTCCATCAGACTTTCGTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGCCGTGTCT  
CAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGAC  
60 CATCCAAAAGTGATA

60

**SEQ ID NO: 74**  
**S12KG421 519R**

65

5

TGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCAC  
TCACGCGGGGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGT  
GGCCGATTACCTCTCAGGTGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCTAAAAGTG  
ATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCA  
GGTTTCCCACGTGTTACTACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGT  
ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTCA

10

15

**SEQ ID NO: 75**  
**S12KG422 RP2**

20

ACTTAGCGGGCTGGTTCTAAAAGTTACCCACCGACTTTGGGTGTACAACTCTCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAA  
CGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAATGGCTTTA  
AGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACG  
TCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCAACTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG  
GACTTAACCCAACATCTCAGCACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTGCG  
ATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTAATTCCTTTGAGTT  
TCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCA

25

30

**NCIMB 42011 GGDK161b-L. reuteri (muestra 11a)**

**[0271]**

**SEQ ID NO: 76**  
**S12KG441 27F**

40

TAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCAACTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAAGTGGCGGACGGGTGAGT  
AACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGA  
AAGATGGCTTTGGTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAG  
TTGAGAGACTGATCGCCACAATGGAACCTGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCC  
TGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCA  
GTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGATCCGGATTTATTGGGCG  
TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAGACGGGCGACTTGAGTGCA

45

50

**SEQ ID NO: 77**  
**S12KG442 519F**

55

TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC  
CGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG  
CTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGAGTGCT  
AGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACGCAAAAGGA  
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTT  
ANAAGGCGTCCCTTCGGGGACTCAATGACAGGTGGTGCATGGTT

60

65

**SEQ ID NO: 78**  
**S12KG443 926F**

5 GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGG  
GACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGCCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTGTACTAGTTG  
CCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTGATCATCATGCCCTTATGACCTG  
10 GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGG  
CTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCGTC  
ACACCATGGGAGTTGTAAACGCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT  
AACAAGGTAG

15

**SEQ ID NO: 79**  
**S12KG444 926R**  
Sin resultado  
**SEQ ID NO: 80**  
**S12KG445 519R**

20

25 GTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCACGCAGTTCCTCTCCAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCTTCTTC  
ACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAAGGATGAGGACCGTGTCTCAGTTCCATT  
GTGGCCGATCAGTCTCTCACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGT  
GATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCCGCTCCGGGGC  
30 AGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCGCCCACTACTGGAATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTAC  
GACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGGCTTCCTCTGAGCCA

35 **SEQ ID NO: 81**  
**S12KG446 RP2**

40 CTCCTCCATAAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGCCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACC  
GCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAAGTGAAGGCTTTAAGAGATTAG  
CTTACTCTCGCGAGCTTGGGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCTCCA  
45 CCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCTCACTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCAATTGCGTCCCGAAGGGAAACGCTTATCTTAAGGTTAGCGCAAGATGT  
CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCAATTAACCAACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG  
50 GCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAA

50

NCIMB 42012 GGDK266c-L. reuteri (muestra 1a)

**[0272]**

55

**SEQ ID NO: 82**  
**S12KG381 27F**

60

65

5 GTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGTCTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACG  
GGTGAGTAAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTT  
10 TGTTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCAT  
AGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGGAGACACGTCATACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAAATGGGC  
GCAAGCCTGATGGAGCAACCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGT  
15 TCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCAAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTAT  
TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAG  
TGC

**SEQ ID NO: 83**  
**S12KG382 519F**

20 TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC  
CGGGCAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGG  
25 CTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGT  
AGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCTTGCCTAACCTT  
30 AGAGATAAAGCGCTCCCTTCGGGGACCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA

**SEQ ID NO: 84**  
**S12KG383 926F**

35 GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGCGCTTCCCTTCGGG  
GACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTACTAGTTG  
40 CCAGCATTAAAGTTGGGCACCTAGTGAGACTGCCGGTGACAACCCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTTCTAGTTCCGACTGTAGG  
CTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGCTC  
45 ACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCAAAGTCGGTGGCCTAACATTATGGAGGGAGCCGCTAAGGGCGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT  
AACAAGGTAGCCGTA

**SEQ ID NO: 85**  
**S12KG384 926R**

50 TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTGAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTA  
CCAGGGTATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT  
55 ATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGCTCTCTCTGCACTCAAGTCGCCCGGTTCCGATGCATCTTTCGGTTAAGCCGAAGG  
CTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCTGCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTAATTACCGCGGCTGCTGGCA  
CGTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCAGCAGGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGA  
60 AACCTTCTTCACTACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGGTGC  
TCAGTTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTG  
CATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCC

**SEQ ID NO: 86**  
**S12KG385 519R**

65

5 GTGACTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCGTGAACAGTACTCTCACGCACGTGCTTCTCCAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCTTCTTC  
 ACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTCATT  
 GTGGCCGATCAGTCTCTCAAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGTAATGCACCCGAGGTCCATCCAGAGT  
 10 GATAGCCAAAGCCATCTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGC  
 AGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCGCCACTCACTGGTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTAC  
 GACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAAC

**SEQ ID NO: 87**  
**S12KG386 RP2**

15 TCCCGCACTTAGGCGGCTCCCTCCATAATGGTTAGGCCACCGACTTTGGGGCGTTACAAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
 CGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAAC  
 GGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA  
 20 TCTGACGTGCTCCCACTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGTTGCGCTCG  
 TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTATTGCGTCCCGAAGGGGAACGCCTTATCTCTAAG  
 GTTAGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCT  
 25 TTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCAAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACCTAGCACT  
 CATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGCC

**REFERENCIAS**

30 **[0273]**

Blandino, G., Fazio, D., Di Marco, R. Probiotics: Overview of microbiological and immunological characteristics (2008). *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6 (4), pp. 497-508.

35 Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria (2001). *Food Sci Technol Int.* 7(4):281-305.

Clarridge III, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases (2004). *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (4), pp. 840-862.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food (2005). *Nature Reviews Microbiology*, 3 (10), pp. 777-788.

40 De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., Gobbetti, M. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding (2006). *Research in Microbiology*, 157 (8), pp. 792-801

Elmadfa, I., Klein, P., Meyer, A.L. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro (2010). *Proceedings of the Nutrition Society*, 69 (3), pp. 416-420.

45 Gopal, P.K., Sullivan, P.A., Smart, J.B. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20 (2001). *International Dairy Journal*, 11 (1-2), pp. 19-25.

Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Leveidiotou, S., Papadopoulou, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products (2011). *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (1), pp. 27-38.

50 Jackson MS, Bird AR, McOrist AL. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of Lacto- bacilli in human faeces (2002). *J Microbiol Methods.* 51 (3):313-21. 65

Korhonen, J.M., Scivagnotis, Y., Wright, A.V. Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets (2007). *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), pp. 2496-2503.

55 Lähteinen, T., Malinen, E., Koort, J.M.K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpää, H., Söderholm, H., Palva, A. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces (2010). *Anaerobe*, 16 (3), pp. 293-300

Liu, Y., Fatheree, N.Y., Mangalat, N., Rhoads, J.M. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation (2010). *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299 (5), pp. G1087-G1096.

60 Ljungh, A., Wadström, T. Lactic acid bacteria as probiotics (2006). *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7 (2), pp. 73-90.

Martin, R, Delgado, S, Maldonado, A, Jiménez, E, Olivares, M, Fernández, L, Sobrino, OJ, Rodriguez, JM. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential (2009). *Journal of Dairy Research*, 76 (4), pp. 418-425.

Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, Lewis M, Bailey M, Aminov RI, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Mayer CD, Musk CC, Kelly D. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces (2009). *BMC Biol.* 7:79.

Naughton PJ; Grant G. (2005) Modelling of salmonellosis In: *Microbial Ecology of the Growing Animal* Holzappel WH, Naughton PJ. (Eds). London, Elsevier. pp. 235-257 Neeser, J.-R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., Karlsson, K.-A. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria (2000). *Glycobiology*, 10 (11), pp. 1193-1199.

Nicolau, D.P. Current challenges in the management of the infected patient (2011). *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24 (Suppl 1), pp. S1-S10.

Ohashi, Y., Ushida, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action (2009). *Animal Science Journal*, 80 (4), pp. 361-371.

Reddy, K.B.P.K., Awasthi, S.P., Madhu, A.N., Prapulla, S.G. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying (2009). *Food Biotechnology*, 23 (3), pp. 243-265.

Robertson, J.M.C., McKenzie, N.H., Duncan, M., Allen-Vercoe, E., Woodward, M.J., Flint, H.J., Grant, G. Lack of flagella disadvantages *Salmonella enterica* serovar Enteritidis during the early stages of infection in the rat (2003). *Journal of Medical Microbiology*, 52 (1), pp. 91-99.

Schreiber, O., Petersson, J., Phillipson, M., Perry, M., Roos, S., Holm, L. *Lactobacillus reuteri* prevents colitis by reducing P-selectin-associated leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions (2009). *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296 (3), pp. G534-G542.

Smith, C.L., Geier, M.S., Yazbeck, R., Torres, D.M., Butler, R.N., Howarth, G.S. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats (2008). *Nutrition and Cancer*, 60 (6), pp. 757-767.

Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., Danner, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria (2009). *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1), pp. 167-177.

Tomás, M.S.J., Bru, E., Martos, G., Nader-Macias, M.E. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors (2009). *Canadian Journal of Microbiology*, 55 (5), pp. 544-552.

Tzortzis, G., Baillon, M.-L.A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate (2004). *Journal of Applied Microbiology*, 96 (3), pp. 552-559.

Williams, N.T. Probiotics (2010). *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67 (6), pp. 449-458.

Yao, W., Zhu Wei-yun, W.-Y., Smidt, H., Verstegen, M.W.A. Cultivation-Independent Analysis of the Development of the *Lactobacillus* spp. Community in the Intestinal Tract of Newborn Piglets (2011) *Agricultural Sciences in China*, 10 (3), pp. 438-447.

Yun, J.H., Lee, K.B., Sung, Y.K., Kim, E.B., Lee, H.-G., Choi, Y.J. Isolation and characterization of potential probiotic lactobacilli from pig feces (2009). *Journal of Basic Microbiology*, 49 (2), pp. 220-226.

**Reivindicaciones**

1. Una cepa bacteriana de ácido láctico porcino que se selecciona de:

- 5 (i) NCIMB 41846;
- (ii) NCIMB 41847;
- (iii) NCIMB 41848;
- (iv) NCIMB 41849;
- (v) NCIMB 41850;
- 10 (vi) NCIMB 42008;
- (vii) NCIMB 42009;
- (viii) NCIMB 42010;
- (ix) NCIMB 42011;
- (x) NCIMB 42012;

15 y cualquier combinación de dos o más de los mismos.

2. Una composición que comprende uno o más de ácido láctico las cepas bacterianas según la reivindicación 1 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente.

20 3. Una composición probiótica que comprende una o más cepas bacterianas de ácido láctico según la reivindicación 1.

25 4. Una o más cepas bacterianas del ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en medicina.

5. Una o más cepas bacterianas de ácido láctico para su uso según la reivindicación 4, en que una o más cepas bacterianas de ácido láctico son para su uso en la mejora de la microbiota intestinal, y en que una o más cepas bacterianas de ácido láctico exhiben actividad antimicrobiana contra E. coli y/o S. enteritidis.

30 6. Una o más cepas bacterianas de ácido láctico según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno intestinal en un sujeto.

35 7. Una o más cepas bacterianas de ácido láctico para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

40 8. Una o más cepas bacterianas del ácido láctico para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que el trastorno intestinal es la salmonelosis, síndrome del intestino irritable (IBS), trastorno intestinal inflamatorio (IBD), dispepsia funcional, estreñimiento funcional, diarrea funcional (incluyendo diarrea asociada a antibióticos, diarrea de viajero y diarrea pediátrica), dolor abdominal funcional, distensión funcional, síndrome de dolor epigástrico, síndrome de dificultad postprandial, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enterocolitis necrotizante, y combinaciones de los mismos.

45 9. Un pienso que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Un producto alimenticio que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1.

11. Un suplemento dietético que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1.

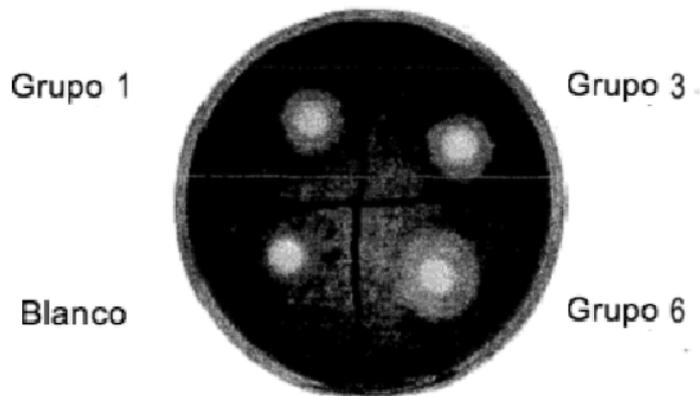
50 12. Un aditivo alimentario que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1.

13. Un proceso para producir un probiótico, comprendiendo dicho proceso el cultivo de una cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1

55

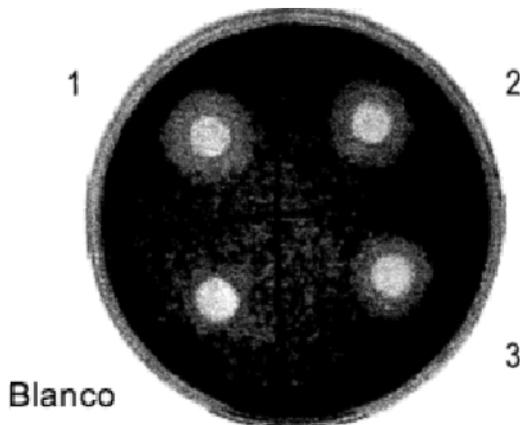
60

65

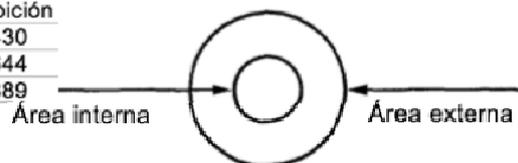


Agar XLD que contiene *S. enteritidis* S1400 [ $10^6$  ufc/ml].  
 Aproximadamente pocillos de 5 mm cortados en agar  
 Una alícuota (60µl) de medios condicionales o caldo de MRS añadidos a los pocillos.  
 Placas incubadas aeróbicamente durante 16 horas a 37°C.  
 Imagen capturada y área de inhibición medida

Grupo 1	<20.000 unidades de inhibición
Grupo 2	20.000-40.000 unidades de inhibición
Grupo 3	40.000-60.000 unidades de inhibición
Grupo 4	60.000-80.000 unidades de inhibición
Grupo 5	80.000-100.000 unidades de inhibición
Grupo 6	>>100.000 unidades de inhibición



Muestra bacteriana	Diámetro de círculo interno	Diámetro de círculo externo	Área de inhibición
1	174	366	81.430
2	174	354	74.644
3	174	336	64.889



$$\text{Área de inhibición} = [(\pi R^2) - (\pi r^2)]$$

FIG. 1

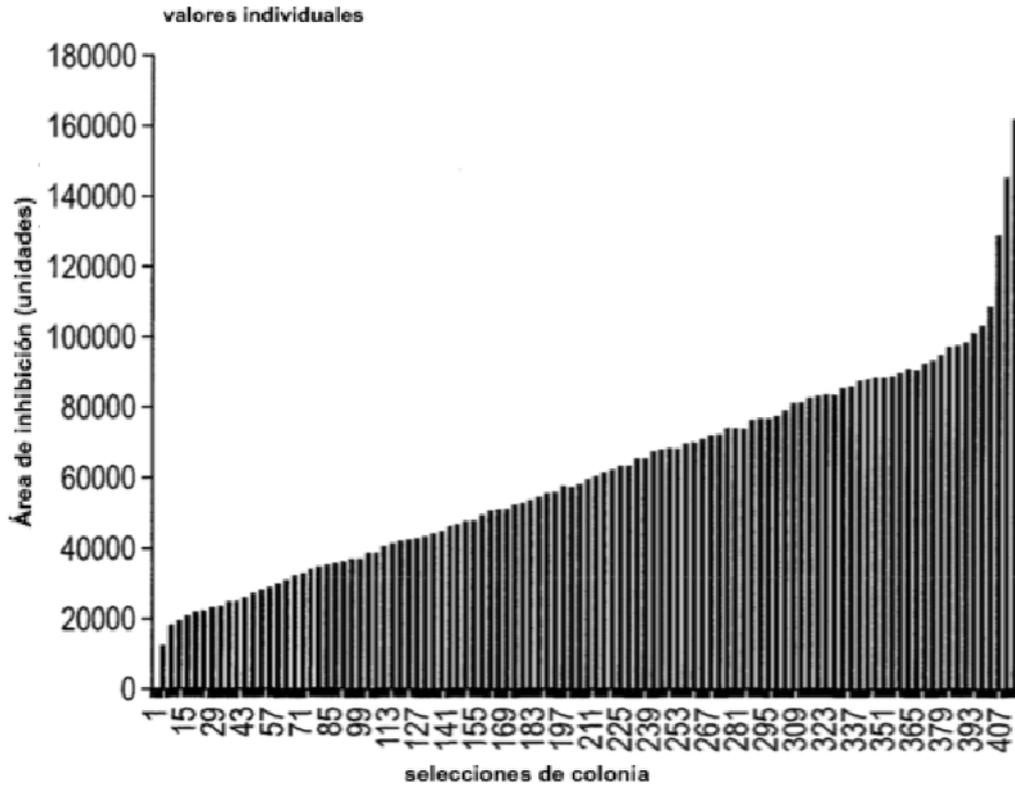


FIG. 2a

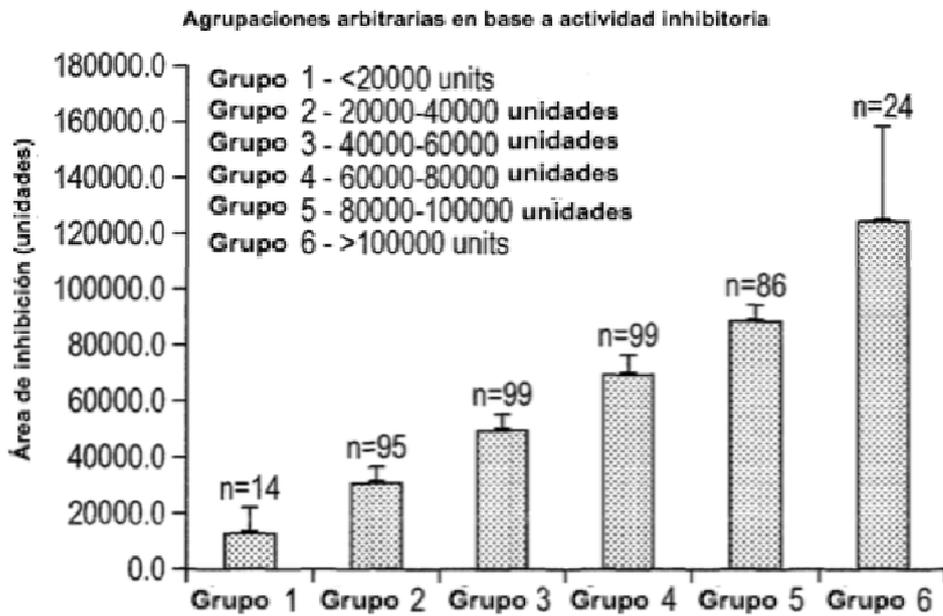


FIG. 2b

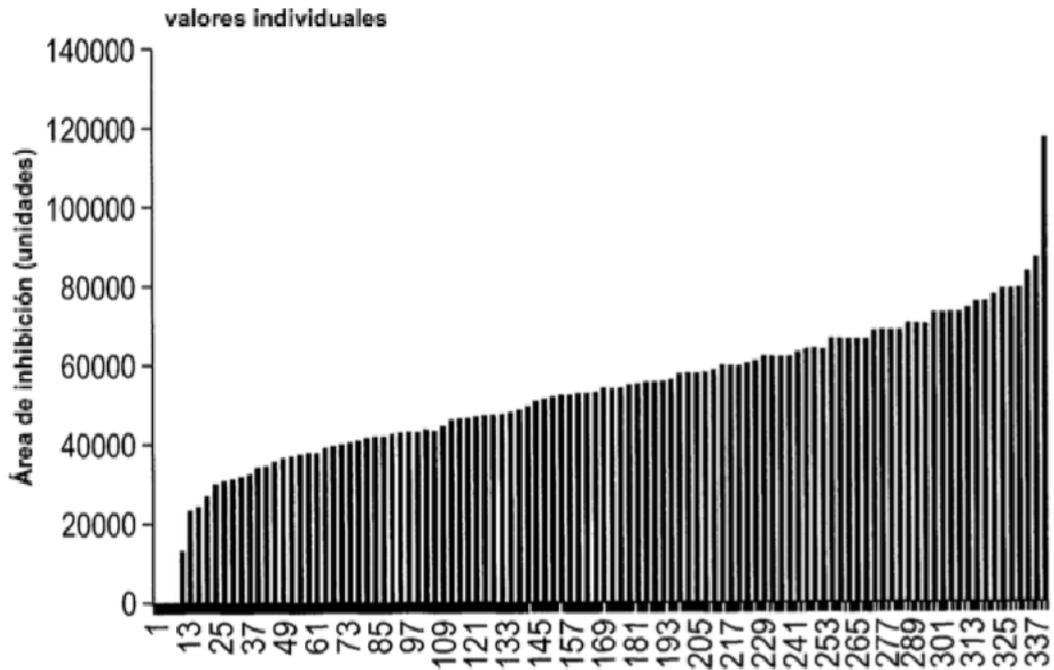


FIG. 3a

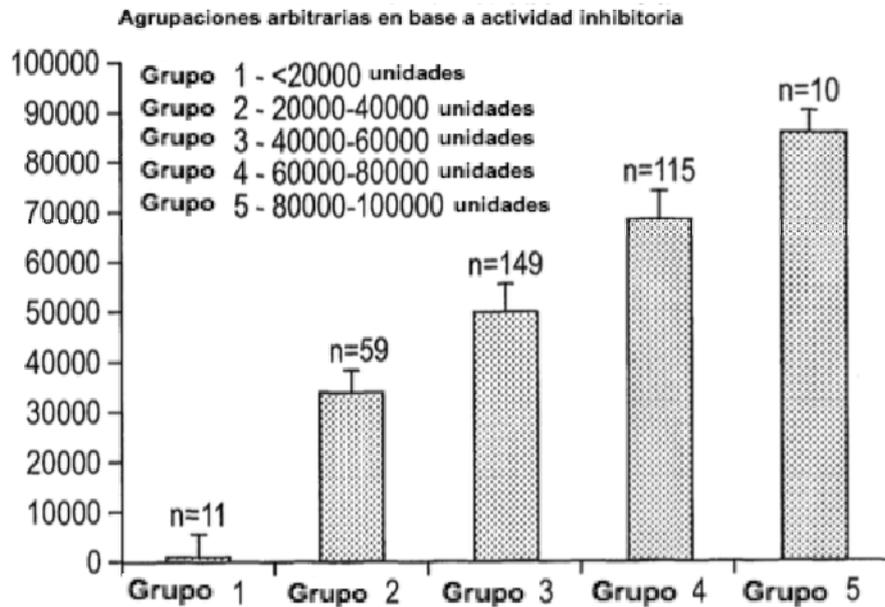


FIG. 3b

Actividad contra *S. enteritidis*

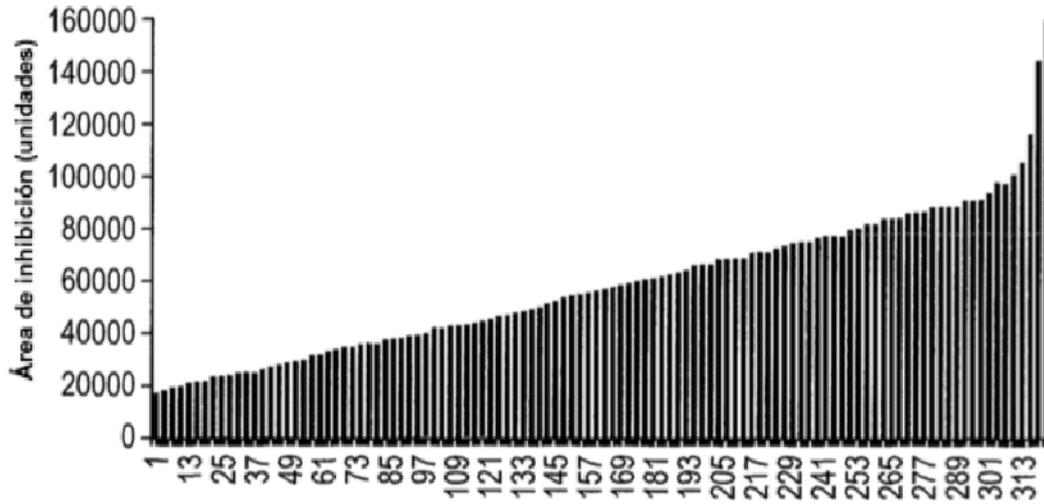


FIG. 3c

Actividad contra *E. Coli* K88 (cepa ajustada con perfil para *S. enteritidis*)

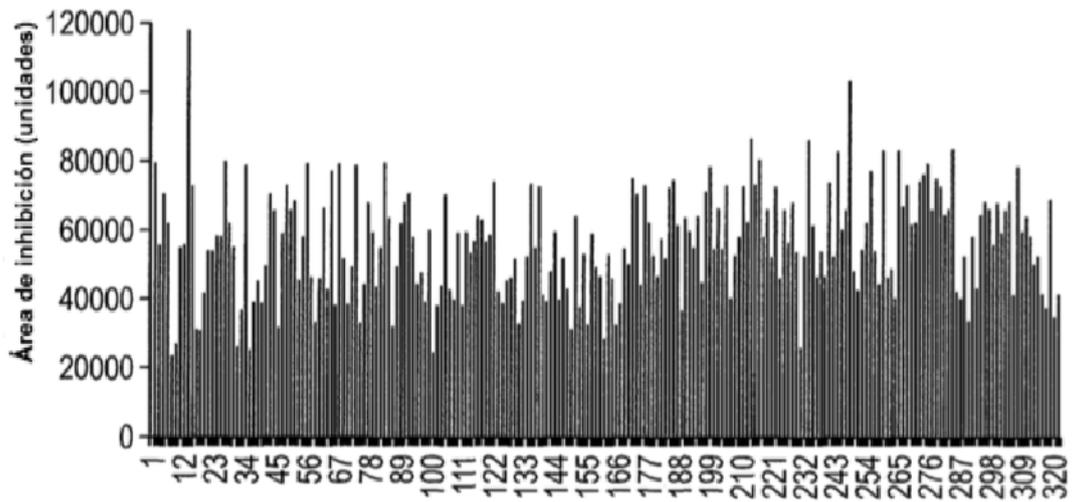


FIG. 3d

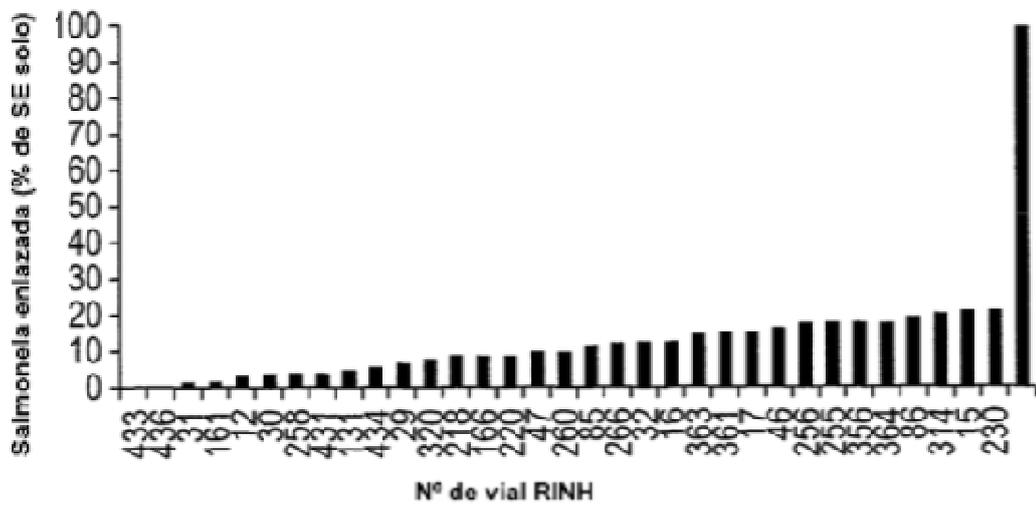


FIG. 4a

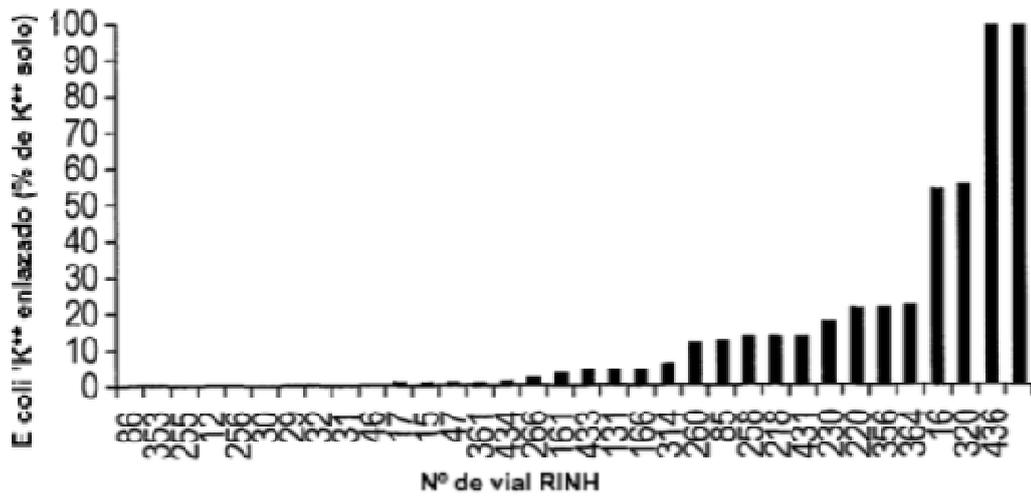


FIG. 4b

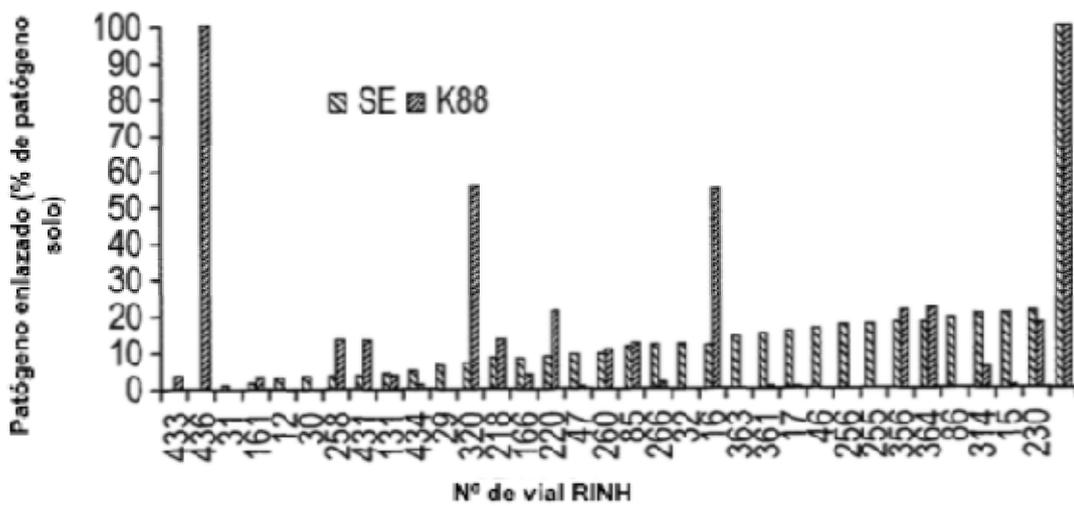
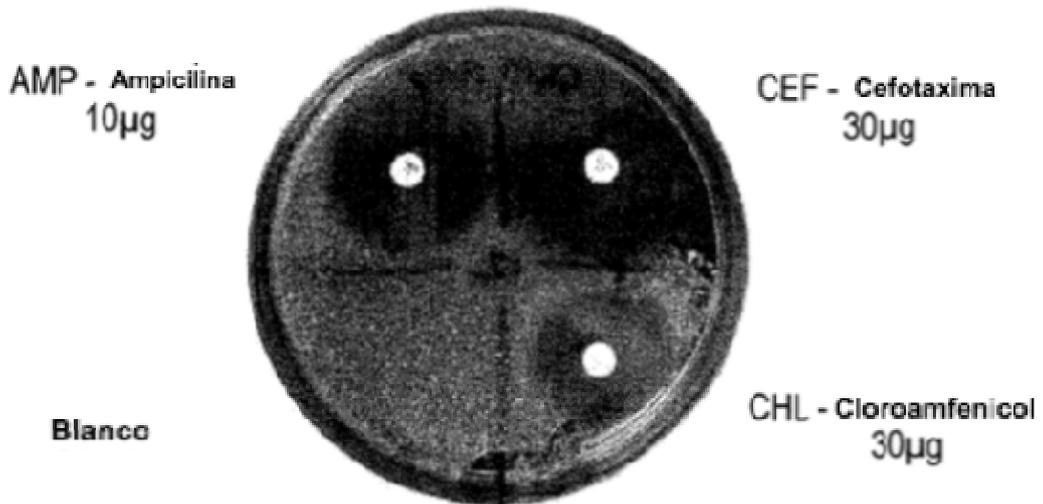
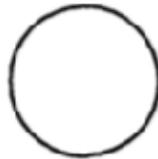


FIG. 4c

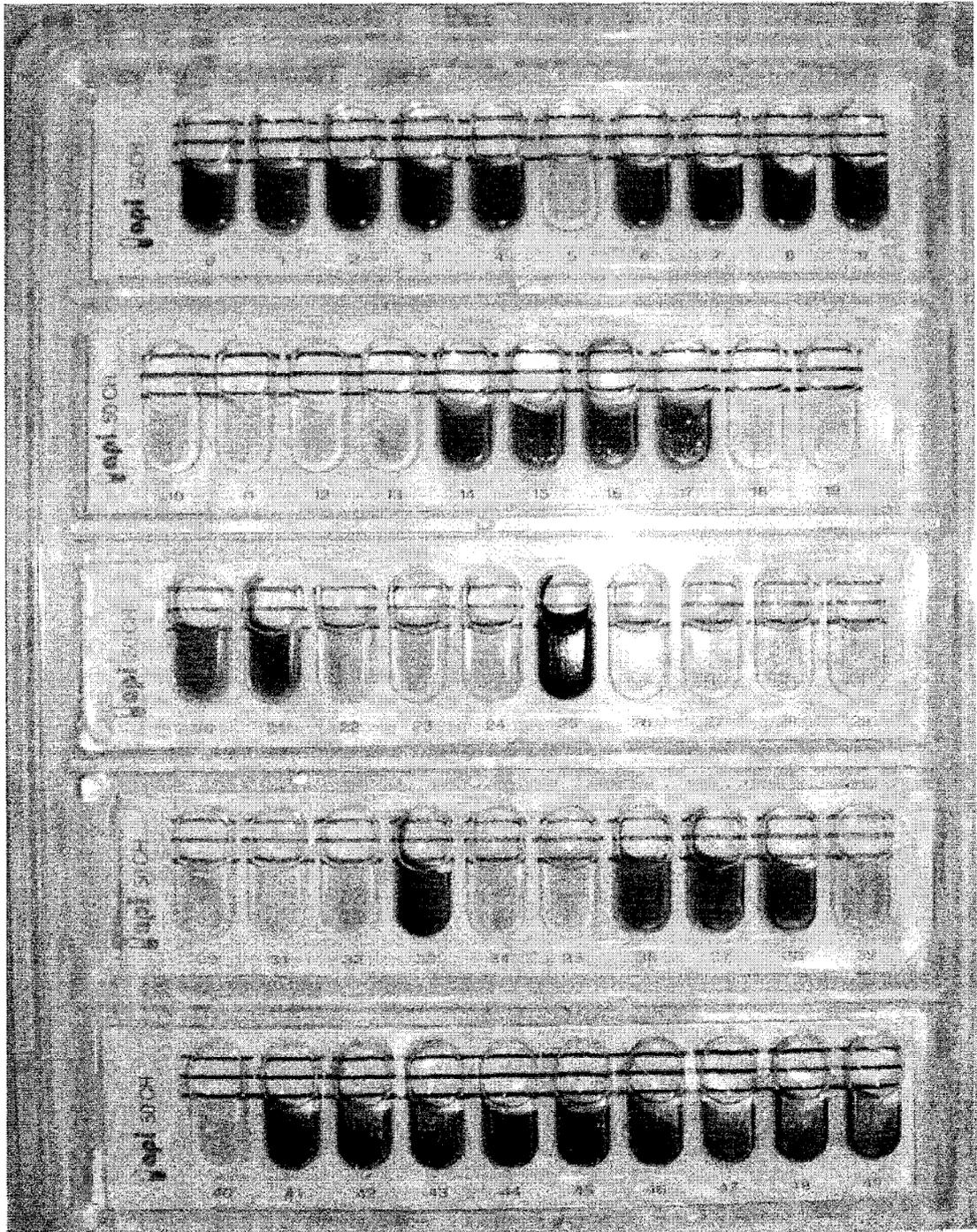


Área de inhibición =  $\pi R^2$



- Ampicilina
- Cefotaxima
- Cloroamfenicol
- Eritromicina
- Tetraciclina
- Vancomicina
- Gentamicina
- Canamicina
- Metronizadol
- Ácido nalidixico

FIG. 5



Bacteria evaluada: *Lactobacillus plantarum*

FIG. 6

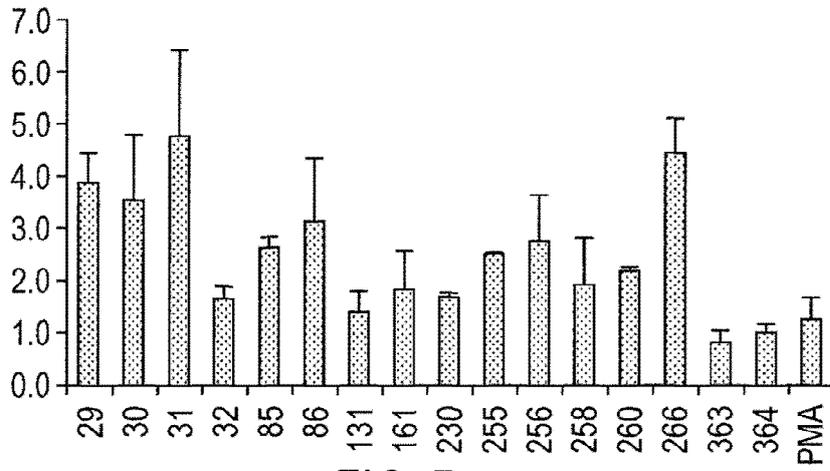


FIG. 7a

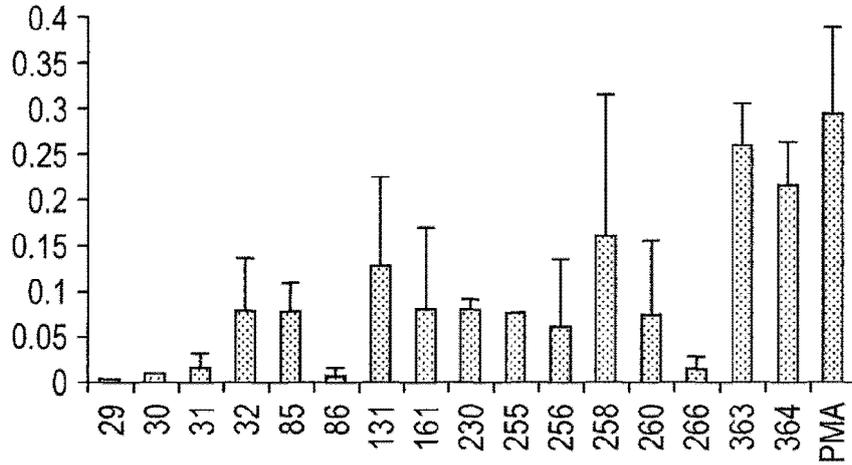


FIG. 7b

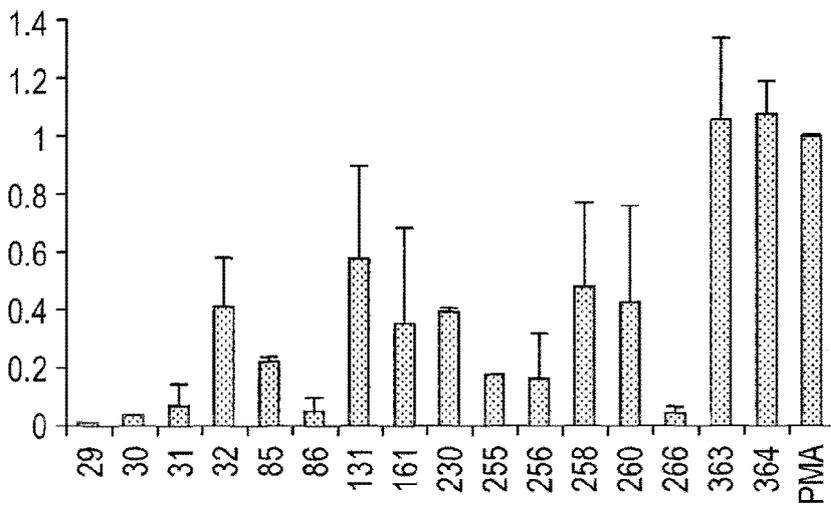


FIG. 7c

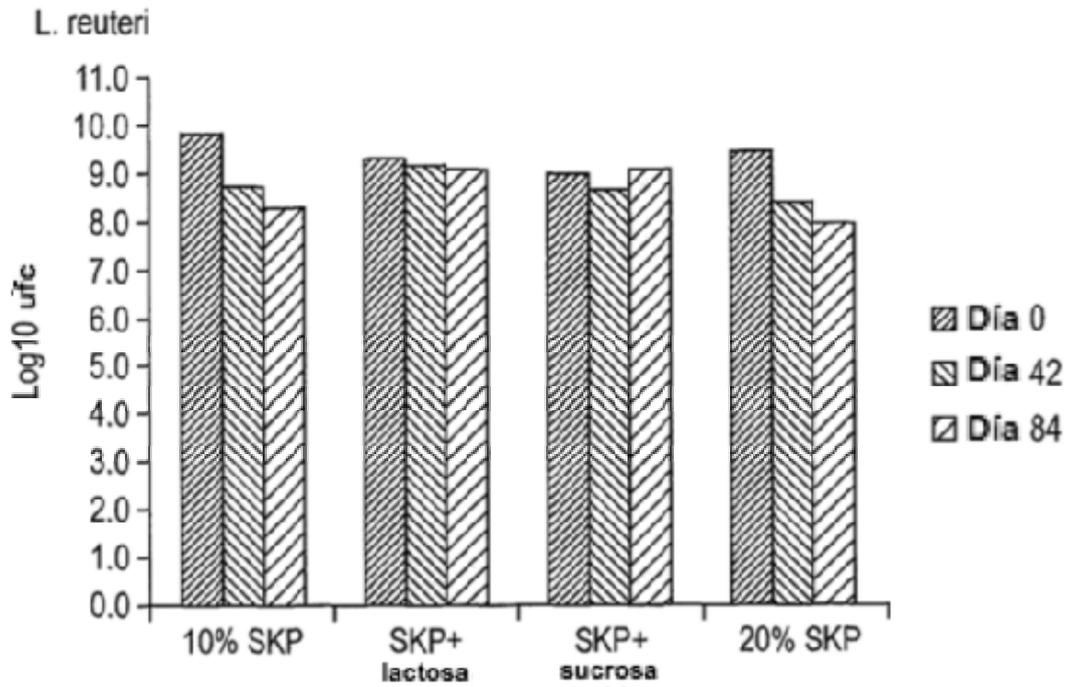


FIG. 8a

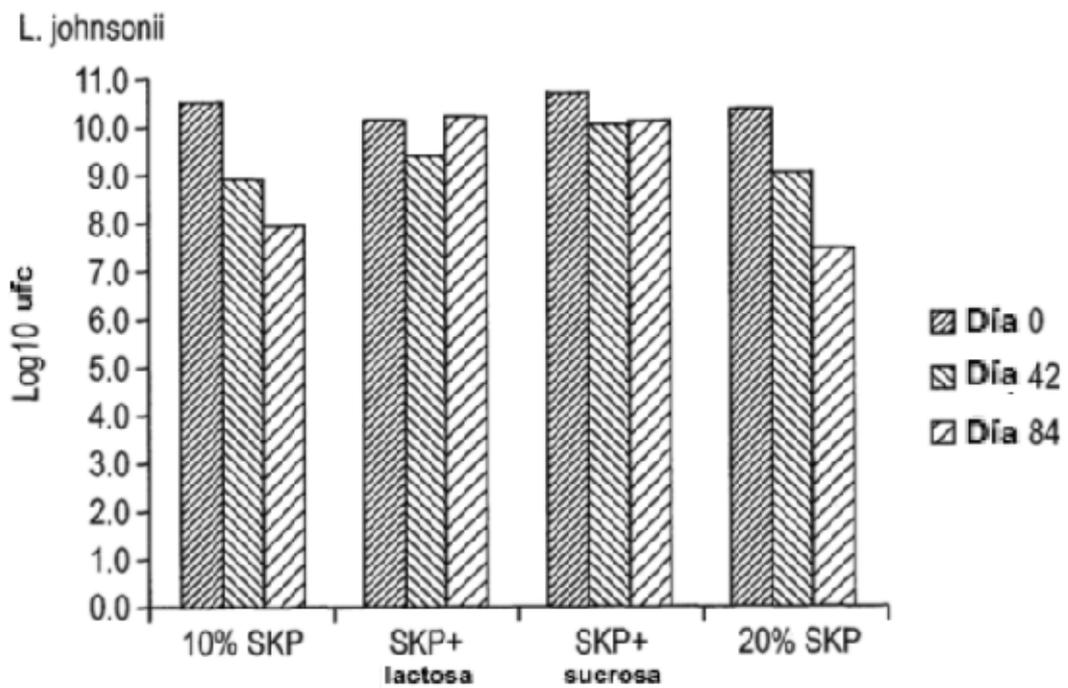


FIG. 8b

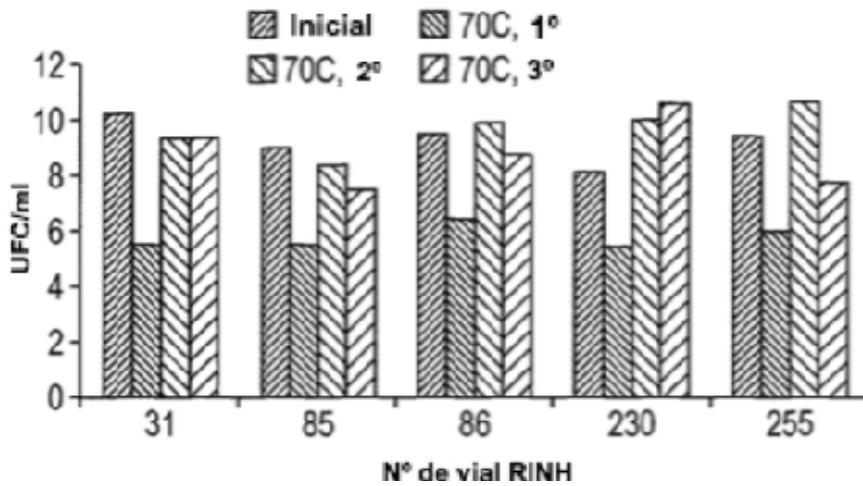


FIG. 9a

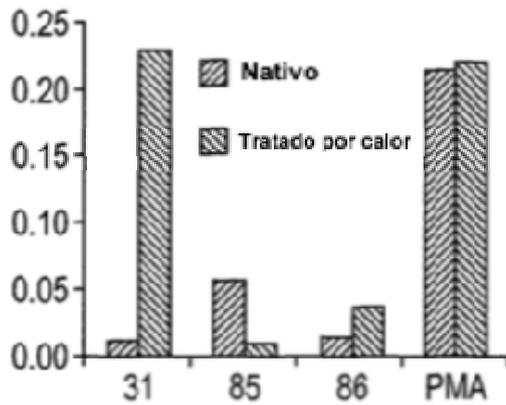


FIG. 9b

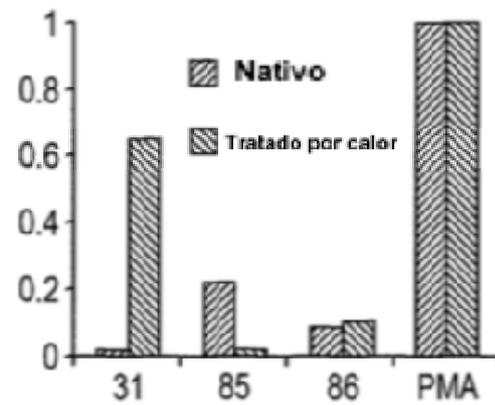


FIG. 9c

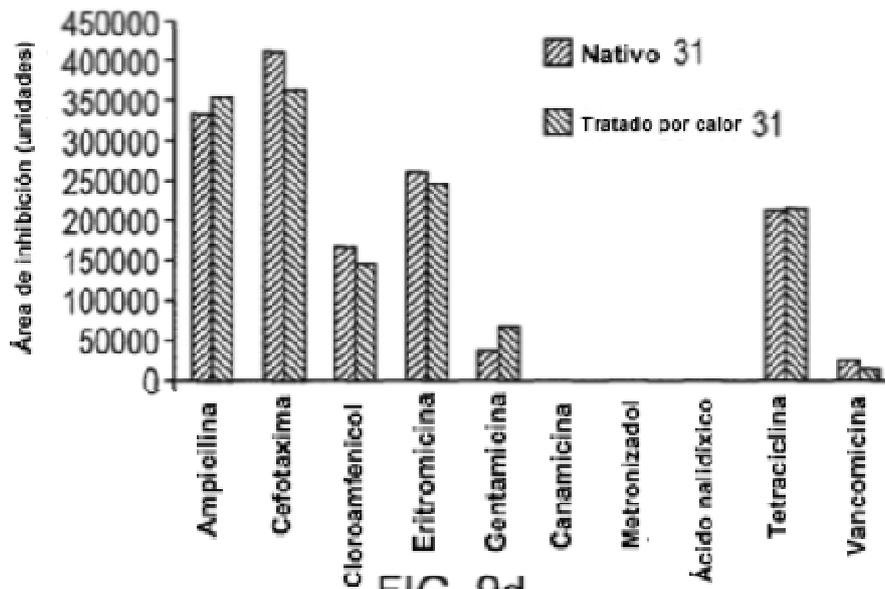


FIG. 9d

Día		Control	Salmonela	L. mucosae	L. mucosae + salmonela
-7	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
-4	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
-2	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
		↓	↓	↓	↓
0	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
	PM	LB media	SE S1400	LB media	SE S140
		↓	↓	↓	↓
1	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
2	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
3	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
4	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
5	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
6	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
7	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
8	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
9	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	L. mucosae	L. mucosae
10		Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa

SE S1400, S enteritidis S1400. Medio LB, Caldo Luria Bertani

FIG. 10

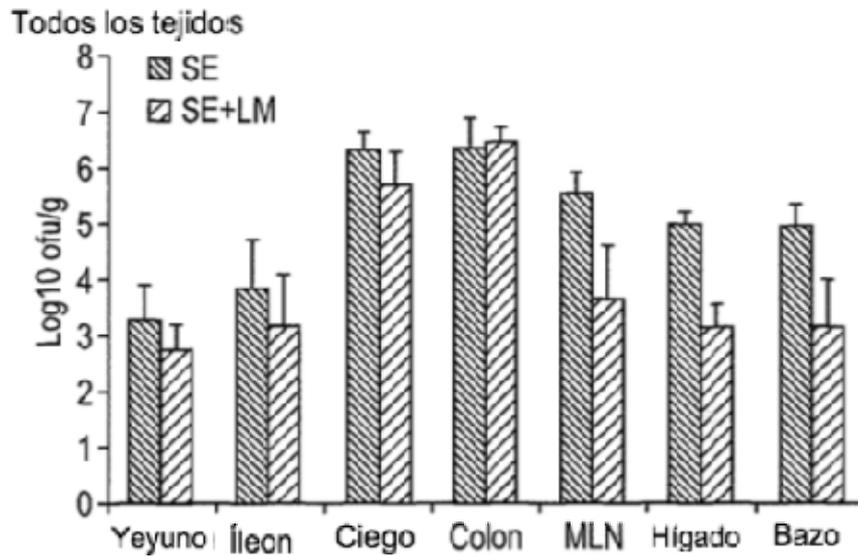
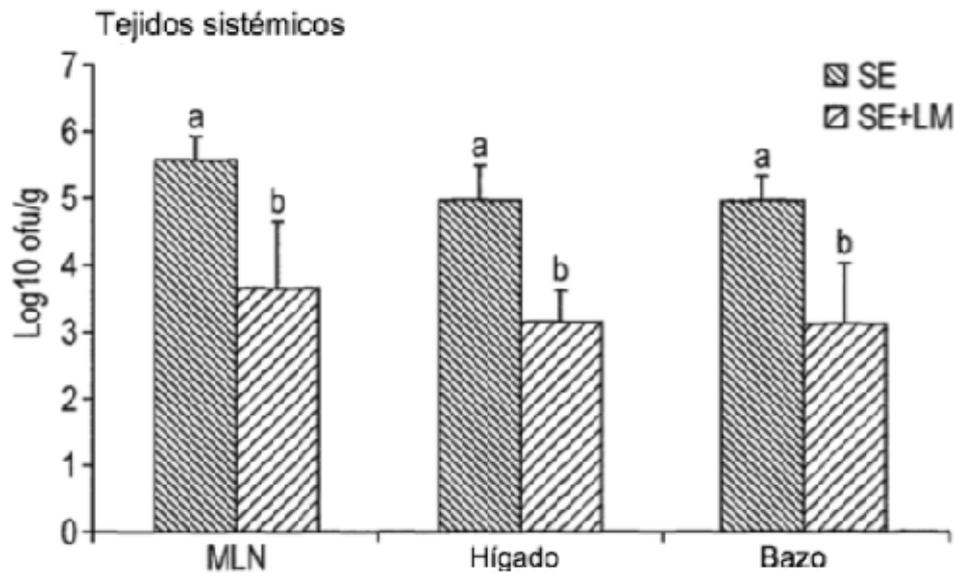


FIG. 11a



Columnas con superíndices distintos difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ )

FIG. 11b

Análisis estadística ;

S. enteritidis vs S. enteritidis + L. mucosae

Yeyuno	$p > 0.05$
Íleon	$p > 0.05$
Ciego	$p > 0.05$
Colon	$p > 0.05$
MLN	$p < 0.01$
Hígado	$p < 0.01$
Bazo	$p < 0.01$

FIG. 11c

Bazo

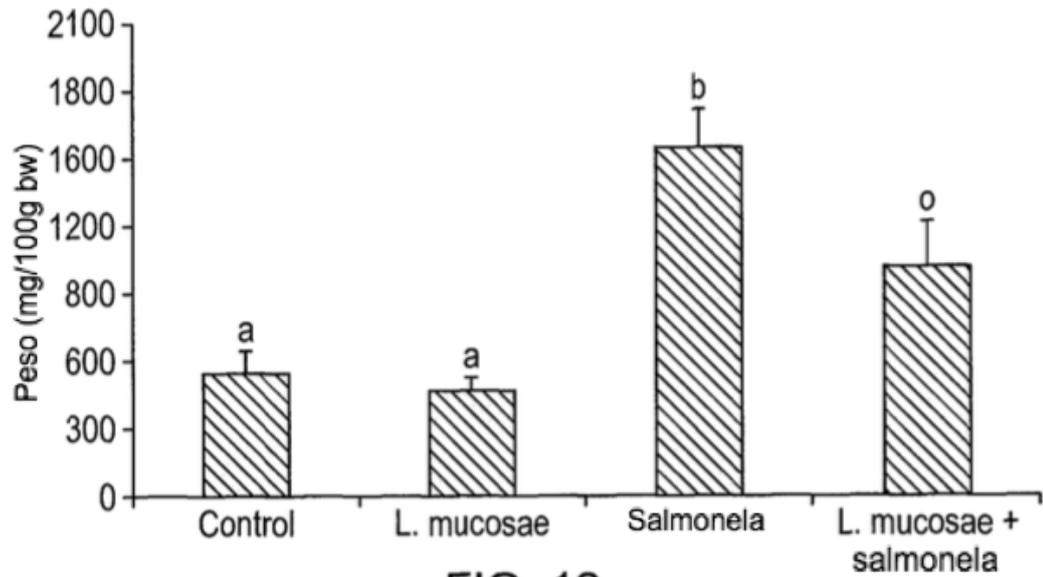
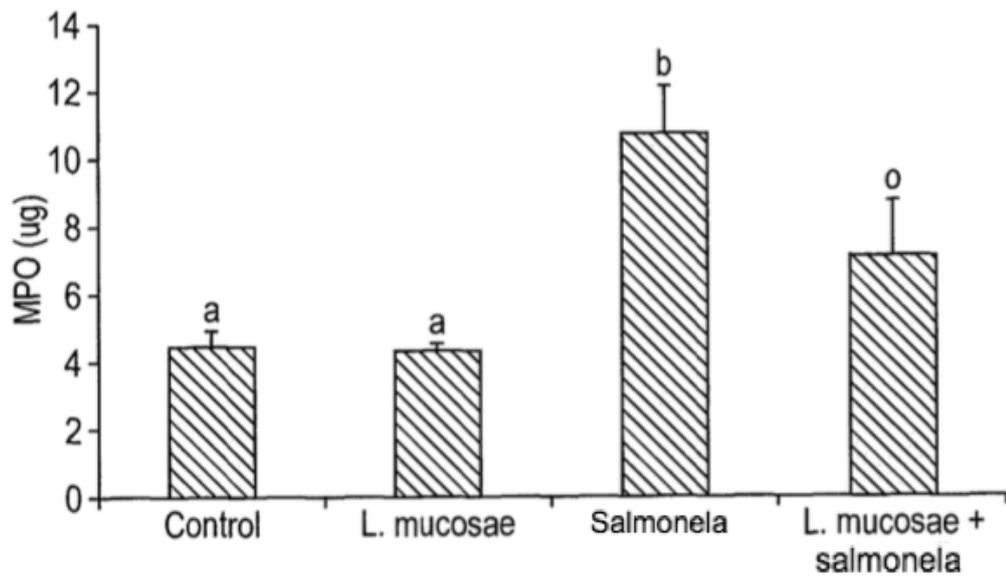


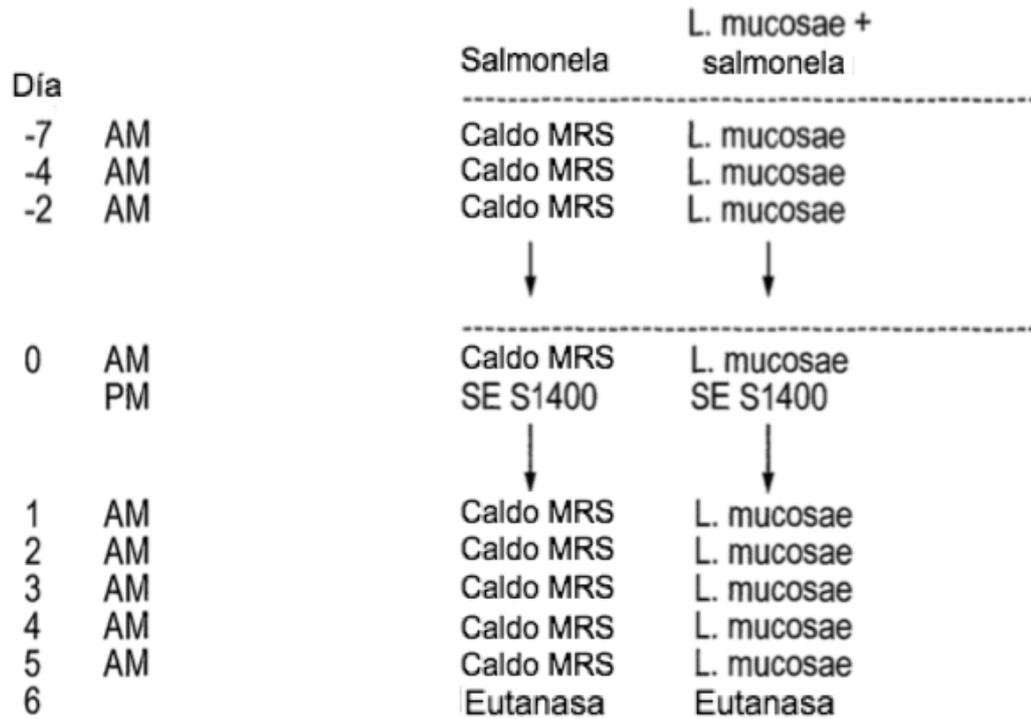
FIG. 12a

Mieloperoxidasa ileal (MPO)



Columnas con superíndices distintos difieren significativamente / ( $p \leq 0.05$ )

FIG. 12b



SE S1400, S enteritidis S1400. Medio LB, Caldo Luria Bertani

FIG. 13

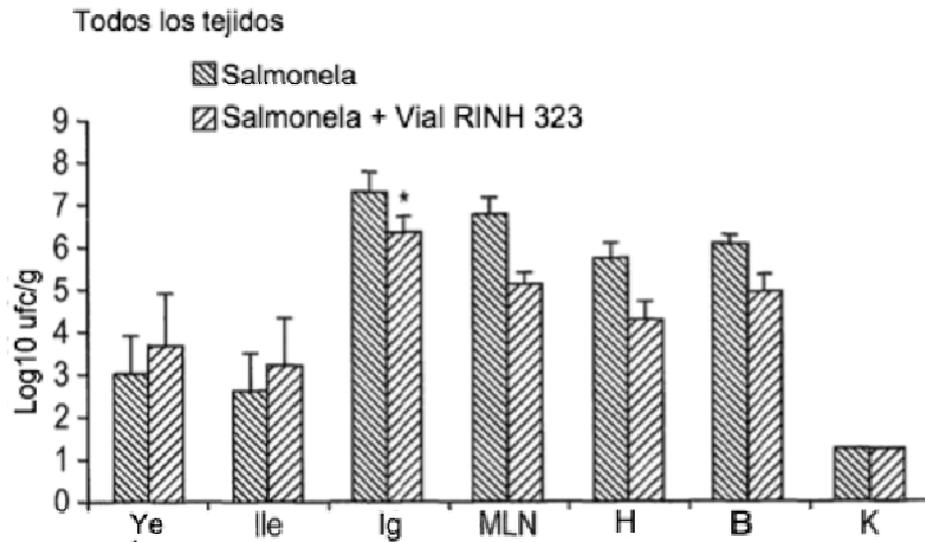


FIG. 14a

Tejidos sistémicos  
 Columnas con superíndices distintos se diferencian significativamente ( $p \leq 0.05$ )

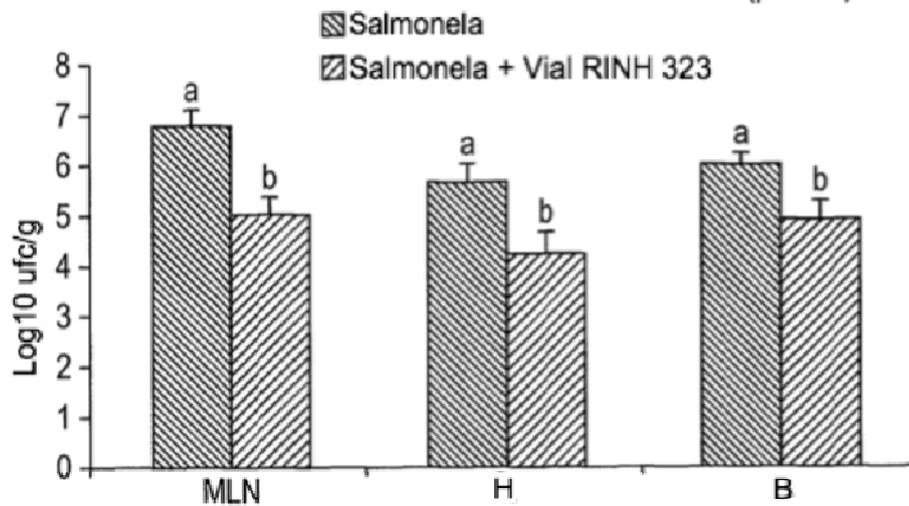


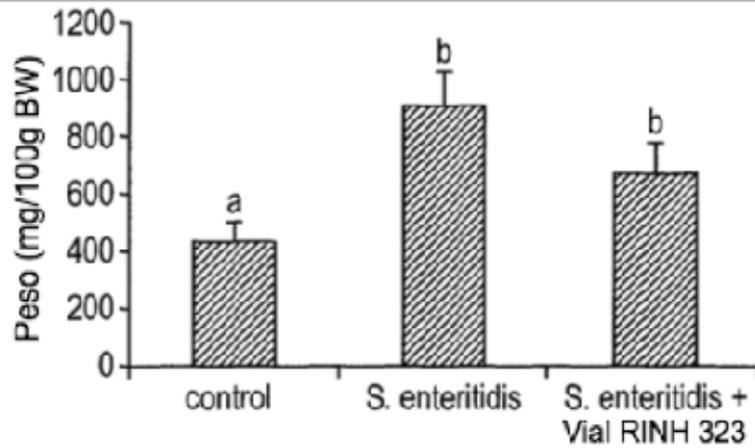
FIG. 14b

Análisis estadístico

S. enteritidis vs S. enteritidis + 323

Yeyuno	$p > 0.05$
Íleon	$p > 0.05$
Intestino grueso	$p < 0.05$
MLN	$p < 0.05$
Hígado	$p < 0.05$
Bazo	$p < 0.05$

FIG. 14c



Columnas con superíndices distintos se diferencian significativamente ( $p \leq 0.05$ )

FIG. 15

		Grupo 6		Grupo 3		Grupo 1		Grupo 1;	
Provocación de LAB		Salmonela		L. reuteri 31	L. reuteri 32	L. mucosae	L. reuteri 46	L. reuteri 47	
Día		Control	Salmonela	Salmonela	Salmonela	Salmonela	Salmonela	Salmonela	
-6	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
-4	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
-2	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
0	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
	PM	Medios LB	SE S1400	SE S1400	SE S1400	SE S1400	SE S1400	SE S1400	
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
1	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
2	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
3	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
4	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
5	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
6	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
7	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
8	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
9	AM	Caldo MRS	Caldo MRS	LR 31	LR 32	L. mucosae	LR 46	LR 47	
10		Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	Eutanasa	

LR 31, Pig L. reuteri vial 3. LR 32, Pig L. reuteri vial 32. LR 46, Pig L. reuteri vial 46. LR 47, Pig L. reuteri vial 47. SE S1400, S. enteritidis S1400. Medios LB, caldo Luria Bertani

FIG. 16

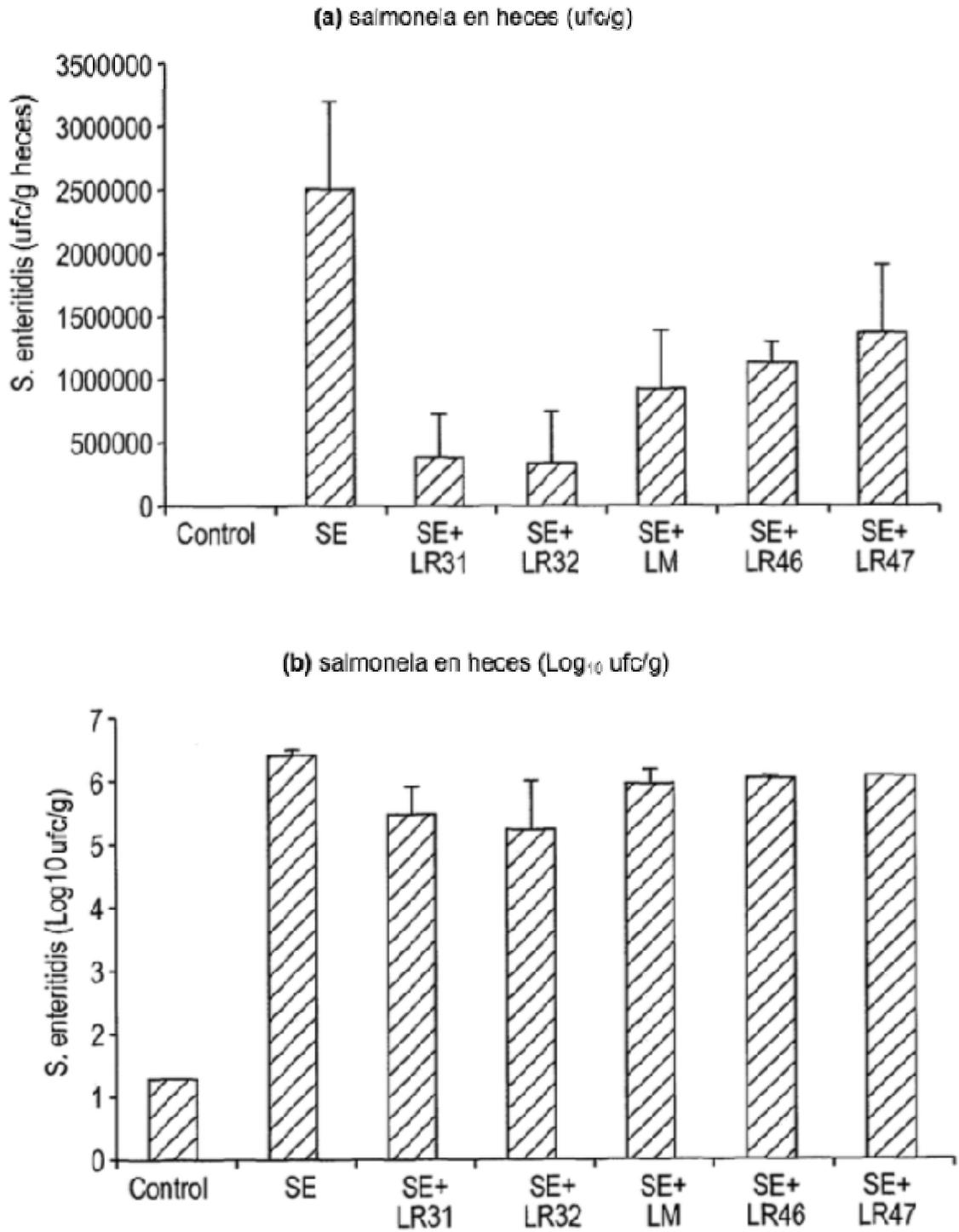
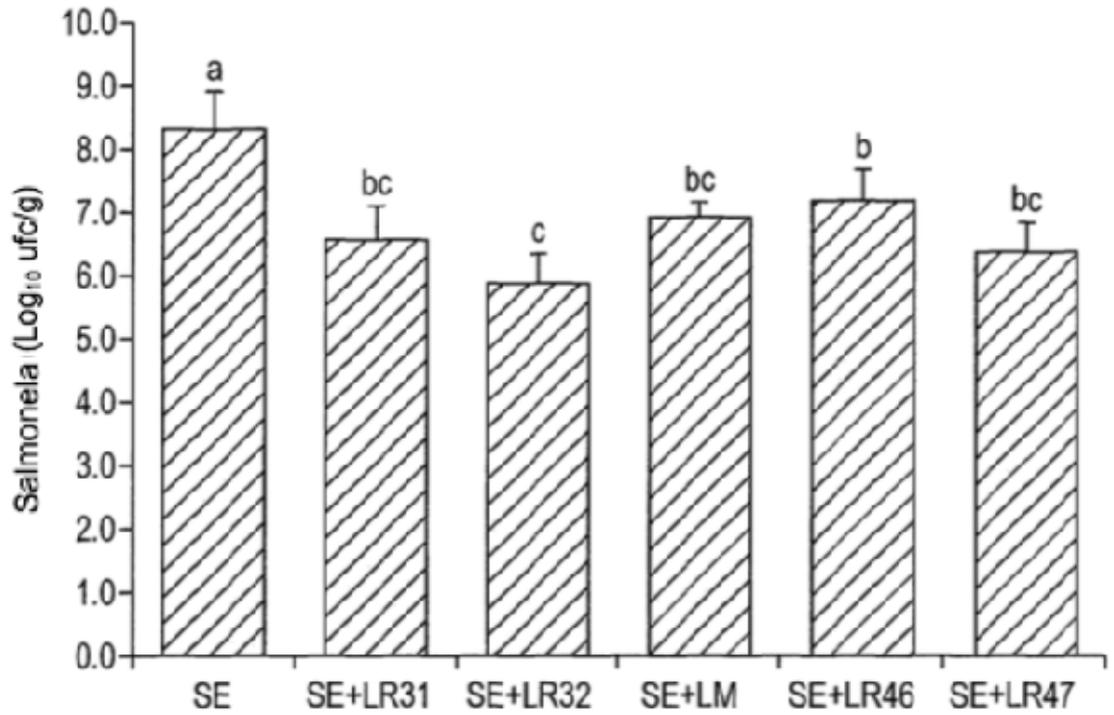
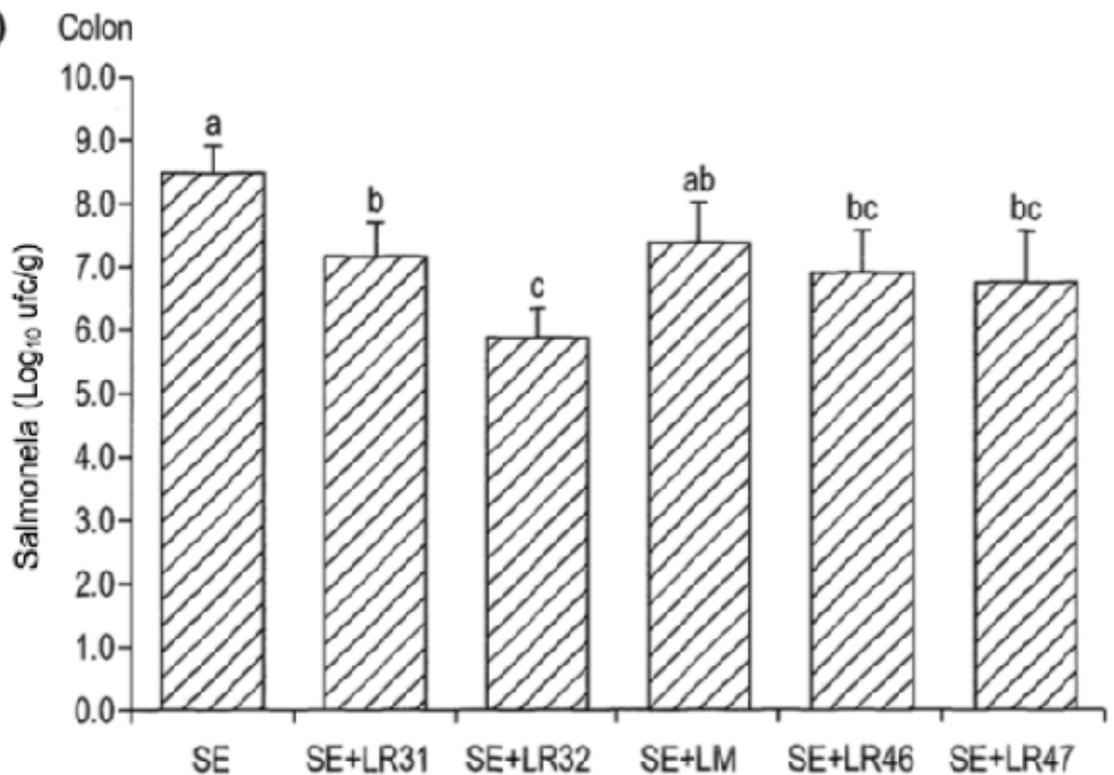


FIG. 17

(a) Ciego

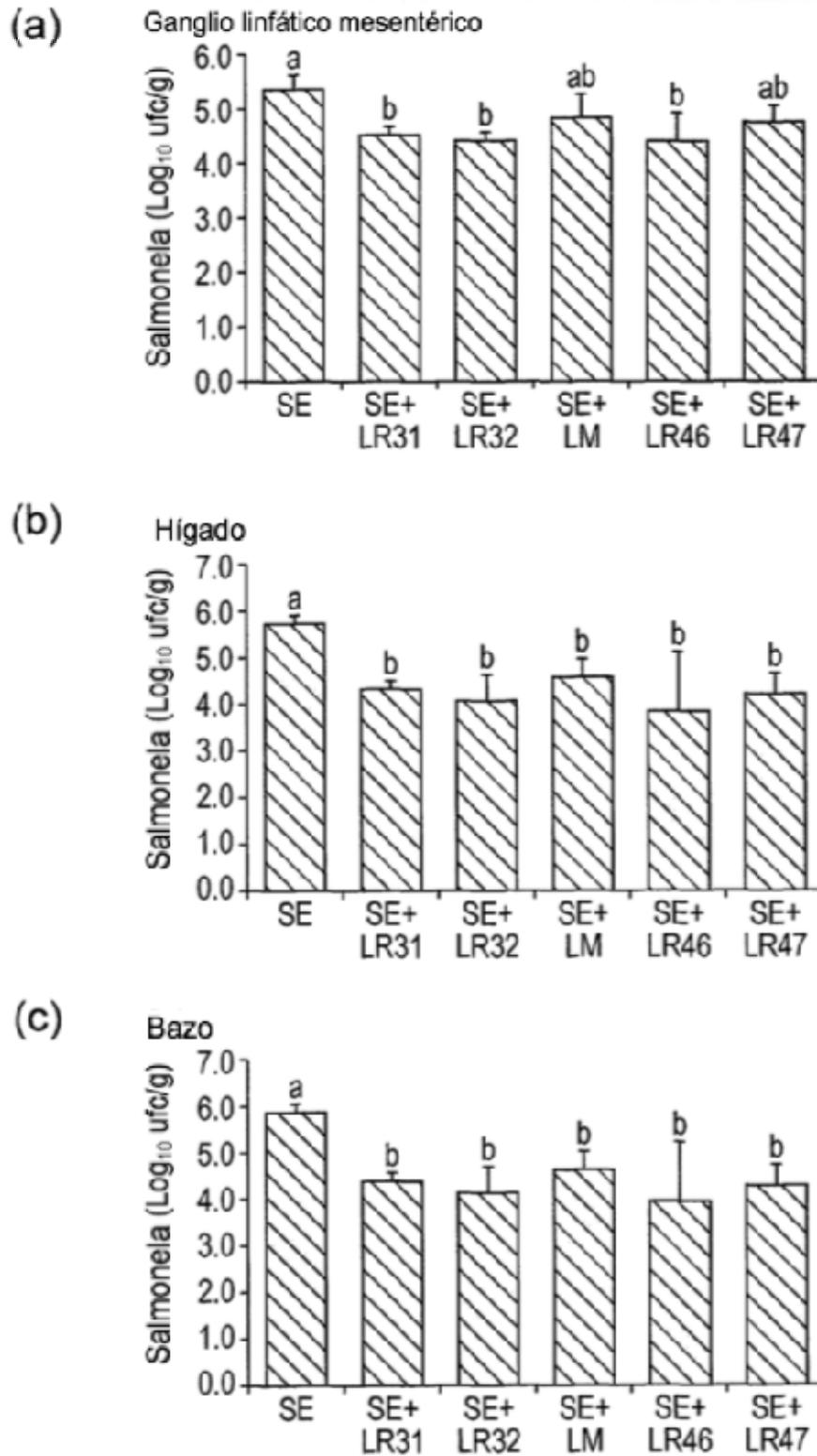


(b)



Columnas con superíndices distintos se diferencian significativamente ( $p \leq 0.05$ )

FIG. 18



Columnas con superíndices distintos se diferencian significativamente ( $p \leq 0,05$ )

FIG. 19

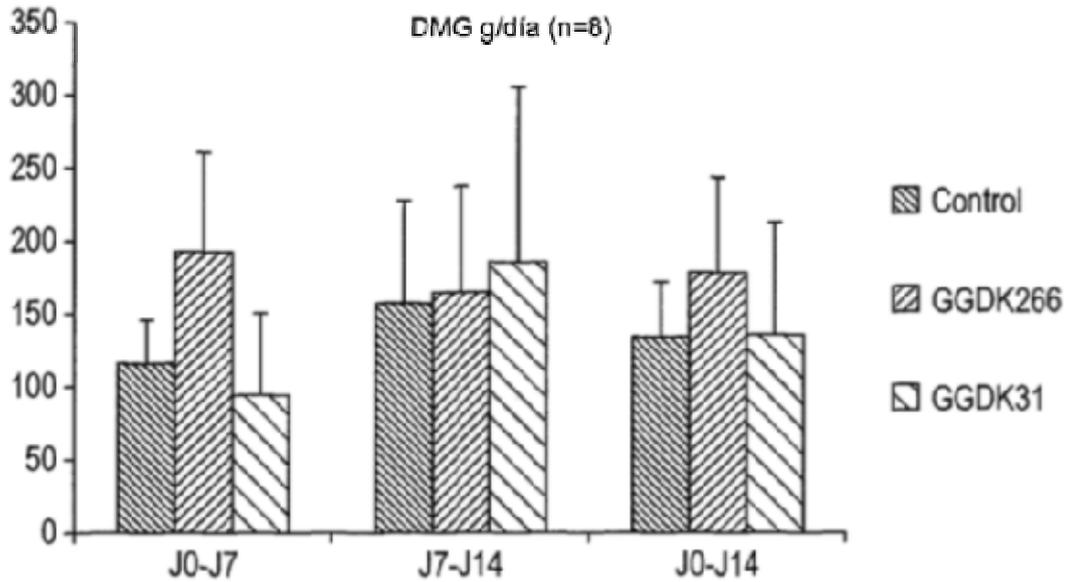


FIG. 20

Dados (Tol 1.0%-1.0%)(H>0.0% S>0.0%)[0.0%-100.0%]  
 DGGE DGGE

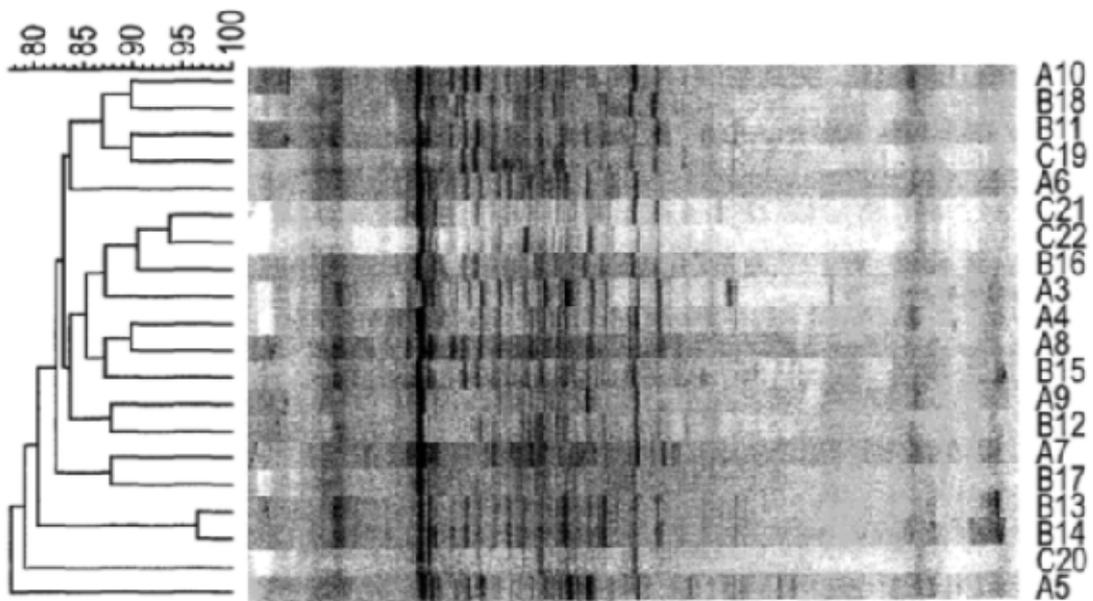


FIG. 21

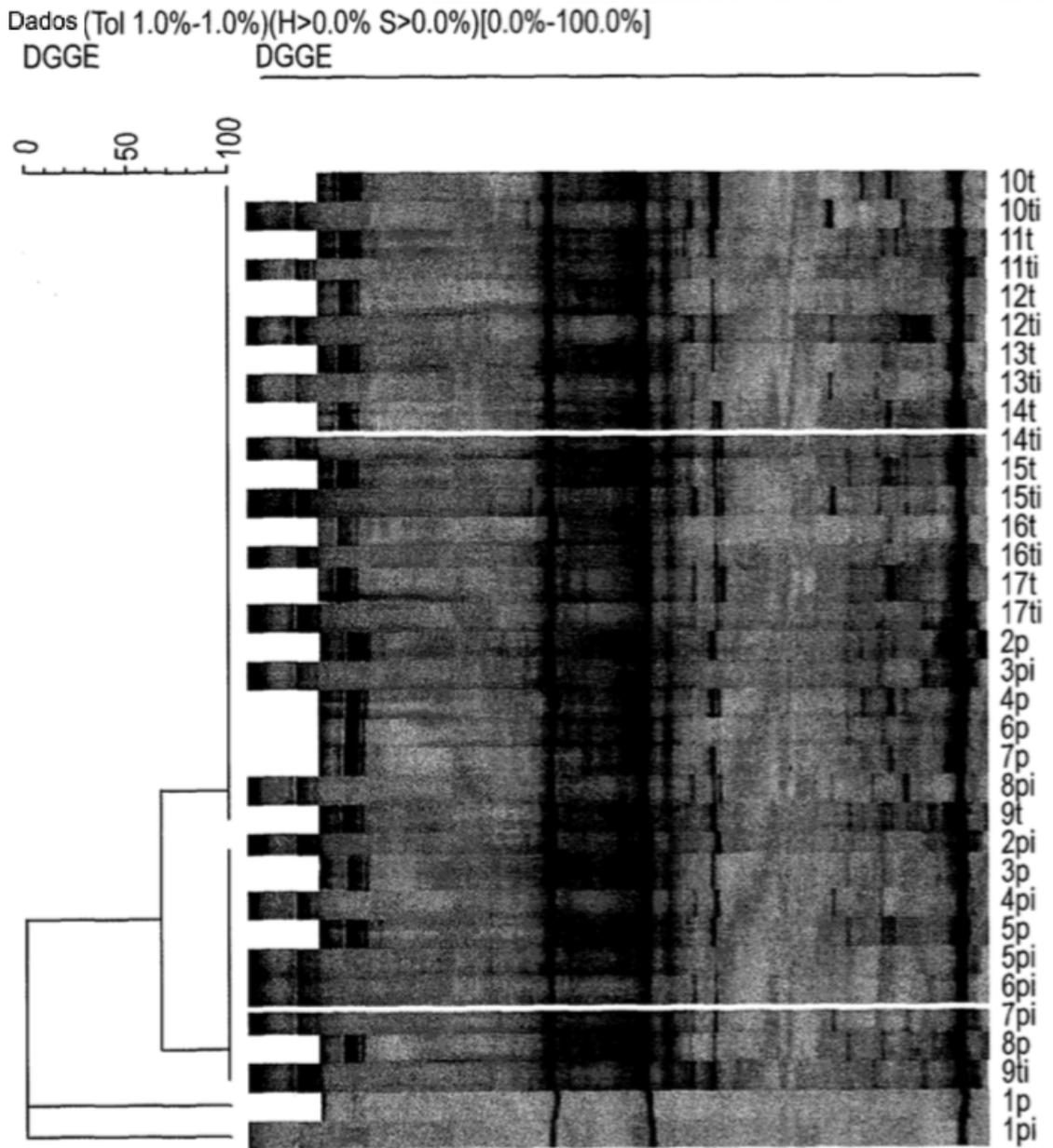


FIG. 22

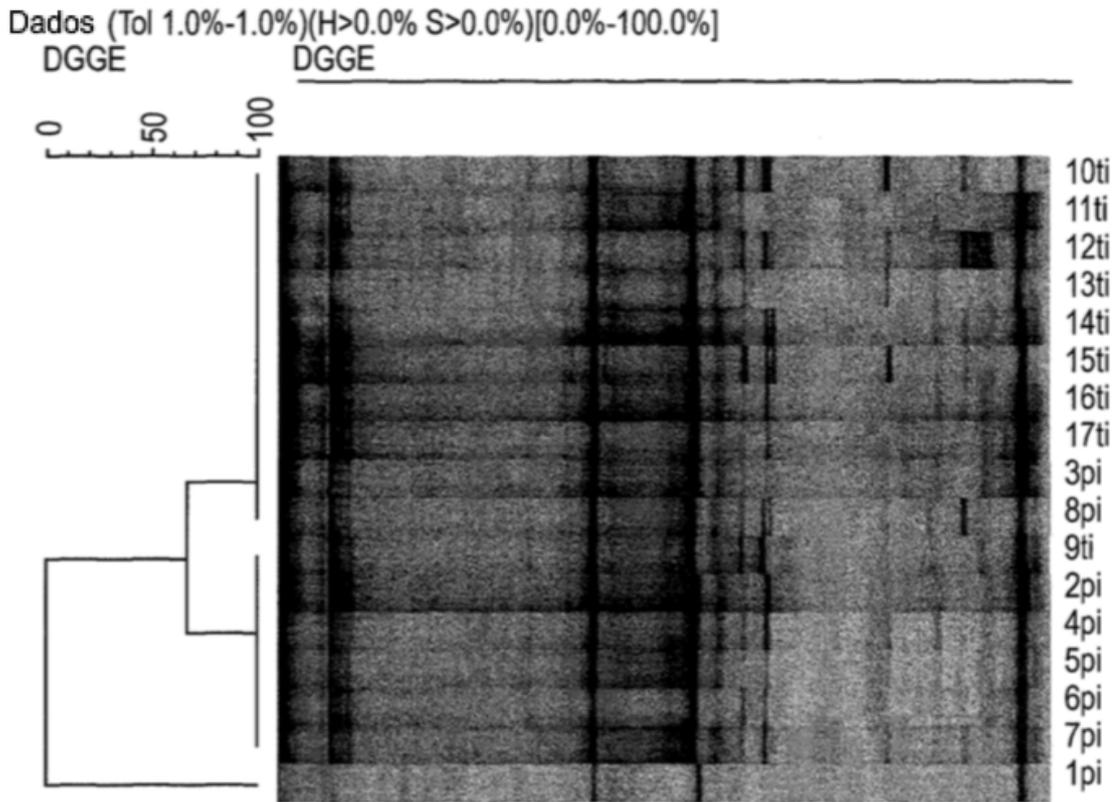


FIG. 23

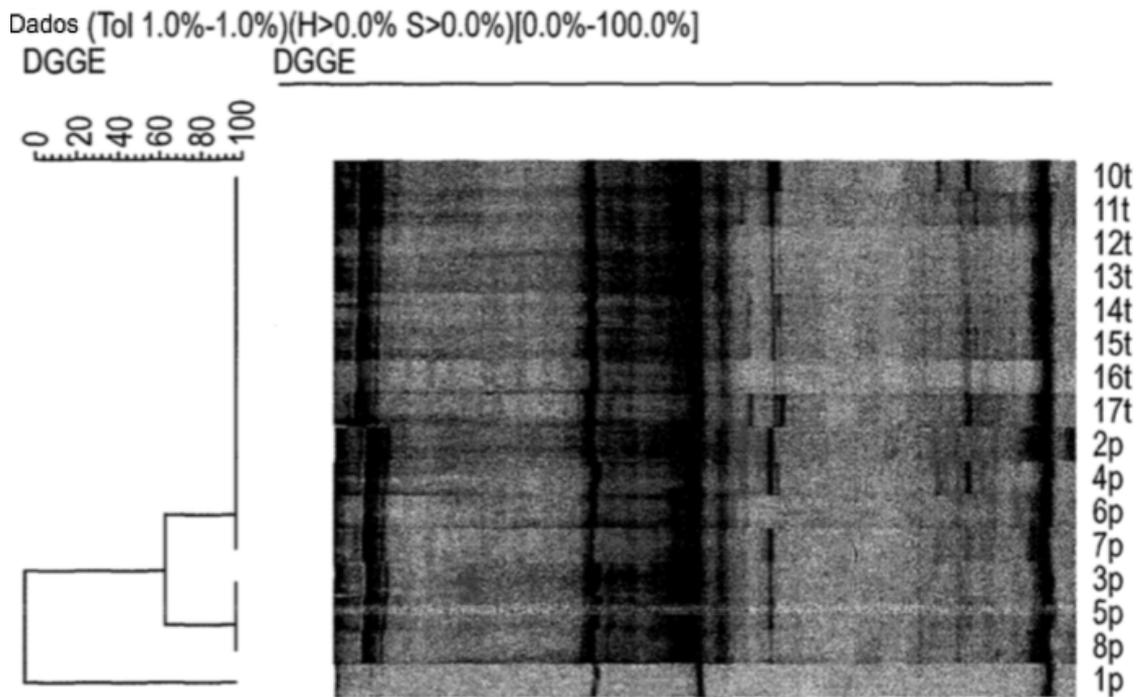


FIG. 24



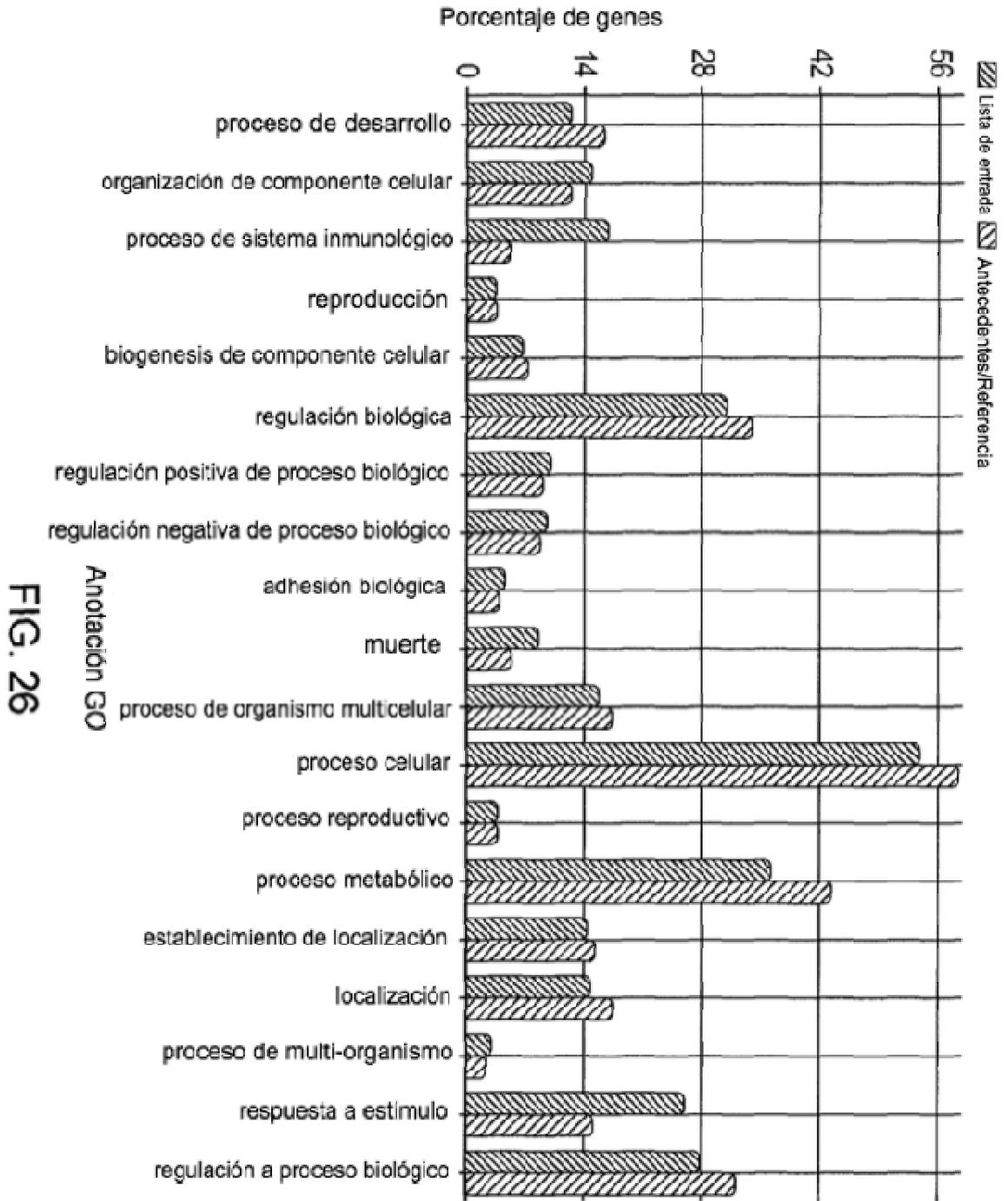




FIG. 27