(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 862 176**

(51) Int. CI.:

A61K 35/747 (2015.01)
A01N 63/00 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015 PCT/US2015/065323**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16094836**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015 E 15868025 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2021 EP 3229595**

(54) Título: **Reducción de los glucanos de la leche y sus productos de degradación en el intestino del recién nacido**

(30) Prioridad:

12.12.2014 US 201462091298 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607, US

(72) Inventor/es:

MILLS, DAVID A. y
FRESE, STEVEN A.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

DESCRIPCIÓN

Reducción de los glucanos de la leche y sus productos de degradación en el intestino del recién nacido

Antecedentes de la invención

El ácido siálico, liberado de los glucanos de la leche, se ha identificado como una fuente primaria de carbono que impulsa el aumento de las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y *Clostridiaceae*, lo que conduce a la diarrea en mamíferos lactantes. Los datos han demostrado que las sialidasas bacterianas liberan ácido siálico que es consumido por poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el tracto gastrointestinal de los lechones. Este ácido siálico es liberado de los glucanos de la leche y los glucanos del hospedador por una enzima bacteriana, sialidasa, también conocida como neuraminidasa (EC 3.2.1.18). La presente tecnología demuestra la reducción de ácido siálico y N-acetilglucosamina, por la administración de un organismo que consume ácido siálico, glucanos de la leche que contienen ácido siálico, N-acetilglucosamina o glucanos de la leche que contienen N-acetilglucosamina para limitar las concentraciones disponibles de estos glucanos *in vivo*. Específicamente, esta investigación ha mostrado que esta reducción es eficaz para prevenir la colonización por estos patógenos en animales lactantes a través de este mecanismo. Se presentan pruebas de la reducción de *Enterobacteriaceae* por lactobacilos que consumen ácido siálico.

Actualmente no existen métodos que prevengan o reduzcan selectivamente el crecimiento de poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el intestino de los animales reduciendo su nicho nutricional en el intestino. La diarrea de los lechones (disentería) y las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y *Clostridiaceae* se controlan en la actualidad con antibióticos o vacunas, que no inhiben selectivamente las poblaciones de *Enterobacteriaceae*, y estrategias de prevención.

Alfonso *et al.* Brazilian archives of Biology and Technology, 56 (2): 249-258, 2013 desvela el efecto de los probióticos añadidos a la dieta de lechones expuestos a *Salmonella typhimurium.* Casas *et al.* Microbial Ecology in Health and Disease, 12 (4): 247-285, 2000 desvela que *Lactobacillus reuteri* confiere protección de amplio espectro contra enfermedades en seres humanos y animales. Oh *et al.* Korean Journal of Veterinary Research, 48 (1): 167-174, 2008 desvela una evaluación *in vivo* del efecto preventivo de *Lactobacillus reuteri* sobre la diarrea epidémica porcina en lechones. Shim *et al.* Archives of Animal Nutrition, 59 (6): 419-47, 2005 desvela los efectos de la alimentación con pienso selectivo exento de antibióticos complementado con prebióticos, probióticos o simbióticos de lechones sobre el aumento de peso corporal antes del destete y sobre la composición de la microbiota intestinal, estructura intestinal y respuestas inmunitarias de los lechones en el momento del destete. El documento CN 103053904 desvela un azúcar funcional compuesto que contiene oligosacárido funcional, L-arabinosa, fibra dietética y probióticos con función de ajuste de la flora intestinal. El documento US 2009/098240 describe composiciones prebióticas y probióticas que contienen oligosacáridos de la leche humana que proporcionan crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas.

Breve sumario

La presente divulgación se refiere en general a la reducción de los glucanos de la leche libres y, más específicamente, a la reducción de los monómeros de glucanos de la leche libres generados por la microbiota intestinal del recién nacido para eliminar la colonización por miembros disbióticos del microbioma.

En una realización, la presente invención proporciona un agente que comprende *Bifidobacterium longum subsp. infantis, B. longum subsp. longum, B. breve, B. pseudocatenulatum* o *B. bifidum* para su uso en un método de alteración de la composición del microbioma bacteriano intestinal en mamíferos no humanos lactantes para prevenir y tratar enfermedades, comprendiendo el método: administrar a un mamífero no humano lactante una dosis del agente; en donde el agente es un agente que limita la disponibilidad de al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche en el intestino del mamífero lactante; y en donde la disponibilidad limitada de dicho al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche reduce las poblaciones totales de patógenos entéricos y organismos relacionados en el intestino del mamífero no humano lactante.

A partir de la descripción del presente documento, se apreciará que la presente divulgación abarca múltiples aspectos que incluyen lo siguiente:

1. Un agente para su uso en un método para alterar la composición del microbioma bacteriano intestinal en mamíferos no humanos lactantes para prevenir y tratar enfermedades, comprendiendo el método:

   administrar a un mamífero no humano lactante una dosis de un agente que limita la disponibilidad de al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche en el intestino del mamífero lactante;

   en donde la disponibilidad limitada de dicho al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche reduce las poblaciones totales de patógenos entéricos y organismos relacionados en el intestino del mamífero no humano lactante.

2. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente comprende un microbio que utiliza de forma

competitiva al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche.

3. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente comprende un microorganismo con la capacidad de consumir un monómero de glucano de la leche.

4. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente comprende una bacteria del género de al menos uno de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium.*

5. El agente para su uso del aspecto 4, en donde dicho agente se administra a una dosis de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC).

6. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 3-5, que comprende además administrar al menos un agente prebiótico que estimula la colonización del microorganismo en el intestino del mamífero.

7. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente comprende *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis, B. longum* subsp. *longum, B. breve,* o *B. pseudocatenulatum* o *B. bifidum.*

8. El agente para su uso del aspecto 1:

en donde dicho agente comprende una especie de bacteria del género de al menos uno de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*;

en donde dichas especies se seleccionan para el crecimiento en al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche; y

en donde dicho crecimiento limita la disponibilidad de dicho al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche.

9. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente comprende al menos 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus reuteri,* seleccionadas para el crecimiento en gluconato.

10. El agente para su uso del aspecto 1, en donde dicho agente es un microorganismo que posee cualquier combinación de las siguientes características:
genes que codifican una neuraminidato liasa (nanA) [consumo de ácido siálico], transportador de ácido siálico y/o permeasa, transportador de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina permeasa, N-acetilglucosamina desacetilasa (nagA), glucosamina desaminasa (nagB) [nagA y nagB codifican el consumo de N-acetilglucosamina y el consumo de ácido siálico], transportador de fucosa y/o fucosa permeasa, isomerasa fucosa, transportador de gluconato y/o gluconato permeasa, gluconato cinasa, permeasas o transportadores capaces de transportar glucanos complejos compuestos por uno o más de los siguientes monómeros; ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina; o permeasas o transportadores capaces de transportar glucanos de la leche.

11. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-10, en donde dicho mamífero lactante es una especie capaz de producir leche que contiene glucanos compuestos por al menos uno de los monómeros de glucano de la leche, ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa y glucosa.

12. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-10, en donde dichos monómeros de glucano de la leche están compuestos por al menos uno de los monómeros de glucano de la leche seleccionados del grupo que consiste en ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, glucosa, gluconato, N-acetilmanosamina, N-acetilmanosamina-6-fosfato, fuculosa-1-fosfato, lactaldehído y 1,2-propanodiol, galactosa-1-fosfato y galactitol.

13. El agente para su uso del aspecto 4, en donde dicho agente se administra por vía oral en forma viva.

14. El agente para su uso del aspecto 4, en donde dicho agente comprende además un sustrato de glucano prebiótico y en donde dicha bacteria utiliza dicho sustrato de glucano prebiótico.

15. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-14, en donde dicho agente se administra por vía oral en forma liofilizada.

16. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-15, en donde el mamífero se trata con antibióticos.

17. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-15, en donde el mamífero no se trata con antibióticos.

18. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-17, en donde el mamífero es un mamífero porcino o bovino.

19. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-18, en donde el mamífero tiene diarrea.

20. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-18, en donde el mamífero no tiene diarrea.

21. El agente para su uso de cualquiera de los aspectos 1-20, en donde el mamífero tiene una concentración intestinal elevada de monómeros de glucano de la leche o proteobacterias (p. ej., *Enterobacteriaceae* o *Bacteroidaceae)* antes de la administración

22. El agente para su uso del aspecto 21, en donde el nivel de ácido siálico en el intestino del mamífero (medido en las heces del mamífero) es de al menos 1 mg por mg de proteína total o el nivel de fucosa es de al menos 1 mg/g de heces, o el nivel de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina es de al menos 10 microgramos/g de heces antes de la administración.

23. El agente para su uso del aspecto 21, en donde (i) al menos el 10 % de la comunidad total de bacterias en el intestino del mamífero es, o (ii) al menos 10^7 células por gramo de contenido de órganos intestinales son *Enterobacteriaceae* o *Bacteroidaceae* antes de la administración.

24. El agente para su uso del aspecto 21, en donde se analiza en el mamífero la presencia de niveles elevados de monómeros de glucanos de la leche o proteobacterias antes o después de la administración.

Aspectos adicionales de la tecnología descrita en el presente documento se destacarán en las siguientes partes de la memoria descriptiva, en donde la descripción detallada tiene la finalidad de desvelar completamente las realizaciones preferidas de la tecnología sin poner limitaciones a las mismas. El ámbito de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La tecnología descrita en el presente documento se entenderá de forma más detallada haciendo referencia a los siguientes dibujos que tienen solo fines ilustrativos:

FIG. 1: Gráfico que muestra un aislado de *E. coli* de lechón habitual con azúcares constituyentes frente a glucanos conjugados de la leche de cerda.

FIG. 2: Diagrama de barras apiladas que muestra que la abundancia relativa de poblaciones de *Bacteroidaceae* (en amarillo) y, en azul, las *Enterobacteriaceae* están fuertemente correlacionadas ($r2 = 0,661$, $p < 0,001$) en las heces de los cerdos jóvenes. Las comunidades en animales destetados están encuadradas.

FIG. 3A: Diagrama que muestra la identidad taxonómica de lecturas metagenómicas anotadas como enzima sialidasa.

FIG. 3B: Diagrama que muestra diferencias significativas en la abundancia relativa de sialidasa entre la leche y las dietas de destete.

FIG. 4: Diagrama que muestra la concentración de ácido siálico libre en las heces de lechones lactantes y destetados.

FIG. 5: Diagrama que muestra que las poblaciones promedio de *Enterobacteriaceae* a lo largo del tiempo en cerdos (eje izquierdo, barras, lactantes, azul; destetados, rojo), son significativamente diferentes ($p < 0,001$) entre las dietas, así como las concentraciones de ácido siálico libre, $p < 0,001$ (eje derecho, bigotes, lactantes, azul; destetados, rojo).

FIG. 6: Diagrama que muestra la abundancia relativa biogeográfica de *Bacteroidales* y *Enterobacteriaes* en el intestino de lechones de 14 días de edad.

FIG. 7: Gráfico que muestra que el tratamiento de cerdos de 14 días por sonda con *Lactobacillus* UCD14261 condujo a reducciones significativas en las poblaciones de *Enterobacteriaceae*.

FIG. 8: Diagrama que muestra diferencias definidas en cerdos "en riesgo" o con alto contenido de *Enterobacteriaceae* frente a cerdos "NR" "sin riesgo" antes de la alimentación por sonda con *Lactobacillus.*

FIG. 9: Diagrama que muestra que los cerdos "en riesgo" (ER) o con alto contenido de *Enterobacteriaceae* podrían ser rescatados por alimentación por sonda con *Lactobacillus* para asemejarse a los animales sin riesgo o que no responden. Las letras indican grupos de significación (a, b; $p < 0,05$).

FIG. 10: Modelo de consumo de PMO.

Descripción detallada

Cualquier mamífero no humano lactante (p. ej., un mamífero lactante porcino o bovino) puede tratarse con un agente que reduzca la disponibilidad de al menos un glucano de la leche y/o monómero de glucano de la leche (p. ej., ácido siálico) en el intestino del mamífero lactante. La reducción del glucano de la leche y/o del monómero de glucano de la leche reducirá la población total de patógenos entéricos en el intestino del mamífero al reducir una fuente de carbono de los patógenos entéricos.

Los agentes ilustrativos que reducen los glucanos de la leche y/o los monómeros de glucanos de la leche incluyen microorganismos que consumen dichos glucanos, por ejemplo, bacterias *Lactobacillus o Bifidobacterium*. Las bifidobacterias que pueden incluirse en las composiciones administradas al mamífero incluyen *B. longum* subsp. *infantis, B. longum* subsp. *longum, B. breve* y *B. adolescentis.* El *Bifidobacterium* usado dependerá en parte del mamífero diana. El *Lactobacillus* que puede incluirse en las composiciones administradas al mamífero incluyen *L. acidophilus, L. brevis, L. buchneri, L. casei, L. curvatus, L. delbrueckii, L. fermentum, L. helveticus, L. plantarum, L. reuteri, L. sakei* o *L. salivarius* o como se enumera en la tabla 1 a continuación. En algunas realizaciones, los lactobacilos son de la especie *L. delbrueckii.* En algunas realizaciones, el *Lactobacilli* es *Lactobacilli delbrueckii bulgaris, Lactobacilli delbrueckii lactis, Lactobacilli delbrueckii delbrueckii* o *Lactobacilli delbrueckii indicus.*

Las dosis ilustrativas de bifidobacterias o lactobacilos para formulaciones pueden incluir de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis. Otro intervalo ventajoso es de 10^6 a 10^{10} UFC.

En algunas realizaciones, a los mamíferos se les administra además un compuesto prebiótico que aumenta la colonización por las bifidobacterias o los lactobacilos (es decir, el probiótico). El prebiótico se puede administrar con las bifidobacterias o los lactobacilos o se puede administrar en las 12 o 24 horas anteriores o posteriores a la administración del probiótico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden administrar como prebiótico uno o más oligosacáridos que se encuentran en la leche materna. Se describen oligosacáridos ilustrativos, p. ej., en el documento PCT/US2011/043644. Como alternativa, se pueden administrar como prebiótico galactooligosacáridos (GOS). Opcionalmente, los GOS se pueden enriquecer para obtener el grado de polimerización que más beneficie al probiótico. Véase, p. ej., el documento US2014/0037785.

El probiótico (y opcionalmente prebiótico) se puede introducir en la dieta del mamífero, por ejemplo, como ingrediente del pienso animal o añadido al agua o la leche.

En algunas realizaciones, la población de bacterias patógenas entéricas en el intestino del mamífero antes de la administración del agente incluye una población de *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *E. coli)* o las *Bacteroidaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *Bacteroides).* En algunas realizaciones, antes de la administración, la población de bacterias patógenas entéricas (p. ej., *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *E. coli)* o las *Bacteroidaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *Bacteroides))* es, por lo menos, p. ej., al menos 10 % de la comunidad bacteriana total, más preferentemente al menos 25 % o 50 % de la comunidad bacteriana total o preferentemente al menos más de 10^7 células por gramo de contenido de órganos intestinales, más preferentemente al menos 10^{10} células por gramo de contenido de órganos intestinales. En algunas realizaciones, la población de bacterias patógenas entéricas reducida en el intestino del mamífero incluye una reducción de una población de *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *E. coli)* y las *Bacteroidaceae* (por ejemplo, en algunas realizaciones, *Bacteroides).* En algunas realizaciones, la administración del agente que reduce el glucano de la leche o el monómero de glucano de la leche da lugar a una reducción de la población de bacterias patógenas entéricas (p. ej., población de *E. coli*) a menos de, p. ej., 50 % de la comunidad bacteriana total, más preferentemente menos de 10 % de la comunidad bacteriana total o preferentemente menos de 10^{10} células por gramo de contenido de órganos intestinales, más preferentemente menos de 10^7 células por gramo de contenido de órganos intestinales.

En algunas realizaciones, antes de la administración del agente, el nivel de ácido siálico en el intestino del mamífero (medido en las heces del mamífero) es de al menos 1 mg por mg de proteína total o, en algunas realizaciones, al menos 100 mg/mg de proteína total, o el nivel de fucosa es de al menos 1 mg/g de heces o, en algunas realizaciones, al menos 10 mg/g de heces, o el nivel de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina es de al menos 10 microgramos/g de heces o más preferentemente al menos 100 microgramos/g de heces. En algunas realizaciones, la administración del agente que reduce el glucano de la leche o el monómero de glucano de la leche da lugar a una reducción del ácido siálico (medido en las heces del mamífero) a menos de 100 mg/mg de proteína total, preferentemente menos de 1 mg por mg de proteína total, o fucosa a menos de 10 mg/g de heces o más preferentemente menos de 1 mg/g de heces; o N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina a menos de 100 microgramos/g de heces o más preferiblemente menos de 10 microgramos/g de heces.

Los mamíferos ilustrativos a los que se pueden administrar las composiciones incluyen cualquier mamífero no humano lactante. Los mamíferos ilustrativos incluyen, p. ej., primates (p. ej., monos), bovinos (p. ej., ganado vacuno o vacas lecheras), porcinos (p. ej., cerdos), ovinos (p. ej., cabras u ovejas), equinos (p. ej., caballos), caninos (p. ej., perros), felinos (p. ej., gatos domésticos), camellos, ciervos, burros, búfalos, antílopes, conejos y roedores (p. ej., cobayas, ardillas, ratas, ratones, jerbos y hámsteres). En algunas realizaciones, el mamífero puede estar en tratamiento con antibióticos (p. ej., haber recibido antibióticos en los siete, tres o un día después de recibir el agente que reduce el

glucano de la leche o el monómero de glucano de la leche). En otras realizaciones, el mamífero no ha recibido tratamiento con antibióticos o no ha recibido tratamiento con antibióticos en al menos uno, tres o siete días antes de recibir el agente que reduce el glucano de la leche o el monómero de glucano de la leche.

En algunas realizaciones, los mamíferos mostrarán signos de infección por patógenos entéricos o colibacilosis, p. ej., diarrea, en los 1, 2, 3, 4 o 5 días antes del tratamiento con el agente que reduce el glucano de la leche o el monómero de glucano de la leche. Como alternativa, no es necesario que el mamífero haya mostrado signos de infección por patógenos entéricos y se trata de forma profiláctica.

Ejemplos

Los monómeros de glucanos de la leche libres impulsan la expansión de patógenos en los lechones. La diarrea porcina o colibacilosis es una de las principales causas de enfermedad y muerte en lechones lactantes o destetados en todo el mundo, lo que le cuesta solo a los Estados Unidos una estimación de 236 000 000 $ anuales por muerte y enfermedad. Es probable que las pérdidas resultantes del retraso en el crecimiento superen con creces esta cifra. La enfermedad en sí se caracteriza por diarrea que conduce a deshidratación y muerte entre los animales sin tratar y se propaga rápidamente dentro de una instalación. Deben implementarse costosos procedimientos de mitigación rápidamente y las estrategias preventivas son claramente más viables económicamente para los productores de cerdos. Las estrategias preventivas actualmente incluyen vacunación, procedimientos de saneamiento estrictos y antibióticos en el pienso para animales destetados. A pesar de estas estrategias preventivas, la diarrea sigue siendo un coste económico importante para los productores de cerdos y se han explorado diversas estrategias para controlar su incidencia y propagación.

La enfermedad en sí es causada por cualquiera de varias cepas de *Escherichia coli* o *Clostridia* capaces de adherirse al epitelio intestinal y producir cualquiera de diversas enterotoxinas, lo que conduce a daño tisular y diarrea en el animal. En lechones, en particular, se trata de una infección mortal y puede conducir rápidamente a síntomas graves o la muerte. Aunque muchos animales están colonizados por poblaciones benignas de *E. coli,* las cepas enterotoxigénicas de la especie pueden compartir el mismo nicho ecológico. Además, las cepas toxigénicas solo pueden distinguirse de cepas no toxigénicas mediante ensayos basados en PCR o ELISA para identificar la presencia de genes que codifican toxinas o las propias toxinas.

La dieta del lechón se compone principalmente de leche de la cerda. La leche de cerda contiene glucanos producidos por la cerda lactante para alimentar a los lechones y estos glucanos están compuestos por monómeros de glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, con un menor porcentaje de monómeros de fucosa (Tao *et al*. 2010). Como monómeros, se sabe que estos sustratos son consumidos por *Escherichia* y otros organismos potencialmente patógenos. Otros organismos patógenos pueden incluir miembros de *Salmonella,* o *Clostridium,* que también están asociados con enfermedades gastrointestinales en seres humanos y animales, pero *E. coli* es la causa predominante de diarrea en los cerdos. Sin embargo, en forma de glucanos de la leche, estos azúcares complejos no son digeribles para estos organismos. Por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* aislada de las heces de los lechones por los inventores es incapaz de crecer en un glucano habitual de la leche de cerda, sialilactosa, pero es capaz de consumir los componentes constituyentes (ácido siálico, N-acetilglucosamina y lactosa) (figura 1).

Realizaciones ilustrativas

Datos que conducen a la presente tecnología. Para comprender la relación de la microbiota intestinal con los glucanos de la leche de cerda, los inventores completaron un experimento para supervisar los cambios temporales en la microbiota fecal de los cerdos desde el nacimiento hasta el destete. Las poblaciones microbianas fecales se mantuvieron estables mientras los animales estaban en lactancia, pero cambiaron drásticamente en el momento del destete, cuando los glucanos de la leche se eliminaron de la dieta. Los cambios taxonómicos dominantes que se encontraron durante esta transición fueron en las familias *Enterobacteriaceae* (que incluye *E. coli)* y *Bacteroidaceae* (que incluye un género común para la microbiota intestinal, *Bacteroides)* (figura 2). La figura 2 muestra un diagrama de barras apiladas que muestra que la abundancia relativa de poblaciones de *Bacteroidaceae* (en amarillo) y, en azul, *las Enterobacteriaceae* están fuertemente correlacionadas (r^2 = 0,661, p < 0,001) en las heces de los cerdos jóvenes. Las comunidades en animales destetados están encuadradas.

Los genomas publicados de *Bacteroides* contienen secuencias que codifican enzimas sialidasa, que pueden separar el resto de ácido siálico de la sialilactosa y crear una oportunidad para que *E. coli* prospere en el intestino del animal lactante, donde es posible que no pueda prosperar sin la actividad de esta enzima. De manera similar, la actividad de las beta hexosaminidasas, que eliminan monómeros de N-acetilglucosamina de los glucanos complejos también genera un nicho para *E. coli* de esta forma, ya que los inventores descubrieron que las *E. coli* aisladas de lechones también consumían N-acetilglucosamina (figura 1). Para confirmar la presencia de estas enzimas en los animales, se sometió ADN microbiano genómico a secuenciación metagenómica, para determinar las capacidades metabólicas totales del ecosistema y asignar identidades taxonómicas a funciones metabólicas clave. Específicamente, los inventores intentan demostrar que la liberación de ácido siálico y N-acetilglucosamina de los glucanos de la leche de cerda es impulsada por poblaciones de la microbiota intestinal.

Se ha descubierto que los genes que codifican las sialidasas y las beta hexosaminidasas pertenecen a miembros de la microbiota intestinal. Se ha descubierto que la identidad taxonómica de las bacterias que albergan estas enzimas específicas es principalmente Bacteroides asociados con los lechones que disminuyeron cuando los cerdos fueron destetados (figura 3A). Además, la abundancia general de lecturas de secuenciación que podrían asignarse a sialidasas disminuyó cuando la dieta de los animales cambió a una que contenía menos de estos azúcares, lo que sugiere que esta enzima es funcionalmente relevante para las poblaciones asociadas con la dieta de leche de cerda, pero no con la dieta destetada compuesta principalmente de avena (figura 3B).

Se ensamblaron lecturas que podrían clasificarse como una enzima sialidasa e identificarse taxonómicamente dentro de los *Bacteroides* usando Velvet, para crear una secuencia hipotética de sialidasa de longitud completa. Se descubrió que uno de los contigs de este ensamblaje contenía un gen codificante de sialidasa de longitud completa perteneciente a *Bacteroides fragilis* y coincidía con esta secuencia génica con una identidad de nucleótidos del 99 %, y se usó para generar cebadores que amplificarían esta secuencia a partir de la muestra de ADN fecal total.

Se construyó amplificación por PCR del gen, usando cebadores que coinciden con la sialidasa hipotética. Estos cebadores amplificaron con éxito una secuencia del ADN fecal total, que posteriormente se secuenció en las instalaciones centrales de secuenciación de ADN de UC Davis. La secuencia verificada coincidió con la secuencia hipotética generada a partir de lecturas metagenómicas al 100 %.

En paralelo, una cepa de *Bacteroides* representativa se aisló de muestras fecales de lechones por aislamiento en agar bilis-esculina de *Bacteroides*, un medio selectivo y diferenciador para el aislamiento de *Bacteroides.* Se descubrió que cepas de *Bacteroides* aisladas contenían la sialidasa por PCR, usando los mismos cebadores diseñados anteriormente, y se verificó mediante secuenciación de ADN posterior en el núcleo de secuenciación de ADN de UC Davis. Se observó el crecimiento de *Bacteroides* con sialilactosa, ya que este organismo posee claramente una enzima sialidasa funcional (datos no mostrados).

Además, las concentraciones de ácido siálico en estas muestras fecales se pudieron comparar entre las dietas de lactancia y destete y se descubrió que eran significativamente mayores en muestras con mayor abundancia de *Bacteroides* (y, por tanto, abundancia de enzima sialidasa) (figura 4). La figura 5 muestra estos datos desde otra perspectiva. En los días en que hay una alta abundancia relativa de *Enterobacteriaceae,* hay una alta concentración de ácido siálico en las heces. En los días con baja cantidad de *Enterobacteriaceae*, hay una baja concentración de ácido siálico. La figura 5 muestra el promedio de poblaciones de *Enterobacteriaceae* a lo largo del tiempo en cerdos (eje izquierdo, barras, lactantes, azul; destetados, rojo), son significativamente diferentes ($p < 0,001$) entre las dietas, así como las concentraciones de ácido siálico libre, $p < 0,001$ (eje derecho, bigotes, lactantes, azul; destetados, rojo). La figura 6 muestra que este efecto parece estar confinado principalmente al ciego y al colon del lechón. Hay altos niveles de *Bacteroides* en el intestino grueso, pero igual aumento de *Enterobacteriaceae* en las heces subsiguientes, lo que sugiere que el *Bacteroides* de hecho está creando un sustrato (es decir, ácido siálico y más) para que lo consuman las *Enterobacteriaceae*. La figura 6 muestra la abundancia relativa biogeográfica de *Bacteroidales* y *Enterobacteriaes* en el intestino de lechones de 14 días de edad.

Por tanto, los datos de los inventores se pueden resumir como (a) que se descubrió que las poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el intestino de los lechones se correlaciona con la abundancia de *Bacteroides* ($r2 = 0,661$, $p < 0,001$), (b) y que estas poblaciones de *Enterobacteriaceae* no pueden, por sí solas, consumir oligosacáridos de leche de cerda sialilados, pero (c) los *Bacteroides* poseen enzimas capaces de liberar ácido siálico de los oligosacáridos de la leche de cerda, que está (d) asociado con mayor abundancia de ácido siálico en las heces, que (e) estas *Enterobacteriaceae* pueden consumir.

La síntesis de este conocimiento es que los monosacáridos liberados de los glucanos de la leche de cerda conducen a un aumento de las poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el intestino de los lechones, creando un entorno donde los agentes etiológicos de la diarrea puedan prosperar. Específicamente, la invención es el conocimiento de que, al reducir la abundancia de azúcares mono, di u oligoméricos, que pueden incluir glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico o fucosa derivada de glucanos de la leche, se reducirán las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y otros organismos potencialmente patógenos capaces de consumir estos glucanos, sus productos de degradación o monosacáridos y se evitará la diarrea o se reducirá su gravedad.

Esto podría lograrse mediante cualquier enfoque que reduzca las concentraciones de estos monómeros o glucanos compuestos por estos monómeros en el intestino. Por ejemplo, se podría introducir un microorganismo probiótico que consuma de forma constitutiva y competitiva estos componentes liberados o glucanos. A modo de ejemplo, y de ninguna manera limitante, la tabla 1 muestra ejemplos de consumidores conocidos de azúcar de la leche. Las especies enumeradas tienen un miembro (de cualquier subespecie) que posee genes que codifican, por ejemplo, una neuraminidato liasa (nanA) [para el consumo de ácido siálico], transportador de ácido siálico y/o permeasa, transportador de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina permeasa, N-acetilglucosamina desacetilasa (nagA), glucosamina desaminasa (nagB) [nagA y nagB codifican el consumo de N-acetilglucosamina y el consumo de ácido siálico], transportador de fucosa y/o fucosa permeasa, isomerasa fucosa, transportador de gluconato y/o gluconato permeasa, gluconato cinasa, permeasas o transportadores capaces de transportar glucanos complejos compuestos por uno o más de los siguientes monómeros; ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina; o permeasas o

transportadores capaces de transportar glucanos de la leche.

Tabla 1

Fenotipos de crecimiento previstos, por anotaciones del genoma					
Especie	Fucosa	Ácido siálico	Gluconato	N-acetilglucosamina	Lactosa
Lactobacillus acidophilus	X	X		X	X
L. amylovorus	X	X	X		X
L. brevis	X	X	X	X	X
L. buchneri	X	X	X	X	X
L. casei		X	X	X	X
L. crispatus	X			X	X
L. delbrueckii				X	X
L. fermentum	X		X		X
L. gasseri				X	X
L. helveticus	X	X		X	X
L. johnsonii	X	X		X	X
L. kefiranofaciens	X			X	X
L. paracasei			X		X
L. plantarum	X	X	X	X	X
L. reuteri	X		X	X	X
L. rhamnosus	X		X	X	X
L. ruminus	X			X	X
L. sakei	X	X	X	X	X
L. salivarius	X	X		X	X
B. adolescentis	X	X	X	X	X
B. animalis	X	X	X	X	X
B. asteroides	X		X		X
B. bifidum	X	X	X	X	X
B. breve	X	X	X	X	X
B. dentium	X		X	X	X
B. longum	X	X	X	X	X
B. thermophilum	X	X			X

Para probar esto, los inventores aislaron una cepa de *Lactobacillus reuteri* de heces de cerdo que puede crecer con gluconato. Esta cepa se cultivó a altas densidades celulares y se usaron 10^{10} UFC para alimentar por sonda a lechones de 14 días de edad diariamente durante tres días en un experimento piloto. Se recogieron muestras fecales antes de la alimentación por sonda y dos días después, y estas se analizaron mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S. Es importante destacar que se descubrió que las poblaciones relativas de *Enterobacteriaceae* disminuyeron significativamente, en comparación con las muestras de referencia (figura 7), a pesar de que estas poblaciones permanecieron por lo demás estables durante la lactancia en estudios anteriores en cerdos de la misma edad (figura 2). Por tanto, los datos preliminares de los inventores proporcionan pruebas atractivas de que el mecanismo (y solución) planteado como hipótesis por los inventores puede ser eficaz para reducir poblaciones de *Proteobacteria*. Específicamente, la figura 7 muestra que el tratamiento de cerdos de 14 días por sonda con *Lactobacillus* UCD14261 condujo a reducciones significativas en las poblaciones de *Enterobacteriaceae*.

También se identificó una distinción entre poblaciones de lechones incluso dentro de la misma camada. Algunos animales (7/11) albergaron poblaciones mayores ($p < 0,05$) de *Enterobacteriaceae,* que eran, en promedio, el doble de la población promedio que se encuentra en animales con bajo contenido de *Enterobacteriaceae* (4/11 animales) (figura 8). La figura 8 proporciona diferencias definidas en cerdos "en riesgo" o con alto contenido de *Enterobacteriaceae* frente a cerdos "NR" "sin riesgo" antes de la alimentación por sonda con *Lactobacillus.* Estos lechones respondieron de manera diferente a la complementación con *Lactobacillus reuteri* UCD14261, donde los animales que albergaban altas poblaciones de *Enterobacteriaceae* (que los inventores denominaron animales "en riesgo" (ER)) mostraron disminuciones significativas en estos organismos después de la alimentación por sonda con *Lactobacillus* (figura 9), las poblaciones en los animales con bajo contenido de *Enterobacteriaceae* en su mayor parte no se vieron afectadas. Estos animales "en riesgo" tenían poblaciones significativamente más bajas de *Lactobacillaceae* iniciales ($p < 0,05$), lo que puede ayudar a explicar por qué poblaciones más altas de *Enterobacteriaceae* podrían prosperar, y por qué la complementación con *Lactobacillus* condujo a una reducción donde las poblaciones de *Enterobacteriaceae* no fueron significativamente diferentes de los animales con bajo contenido de *Enterobacteriaceae*. La figura 9 muestra que los cerdos "en riesgo" (ER) o con alto contenido de *Enterobacteriaceae* podrían ser rescatados por alimentación por sonda con *Lactobacillus* para asemejarse a los animales sin riesgo o que no responden. Las letras indican grupos de significación (a, b; $p < 0,05$).

La figura 10 muestra un modelo de consumo de PMO.

Materiales y métodos

Todos los experimentos que implicaban animales fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de California Davis antes de la experimentación (aprobación n.º 17776, n.º 18279). A lo largo del estudio, todos los animales se alojaron en una instalación sin patógenos específicos de acceso controlado en la Universidad de California Davis dedicada a la cría de cerdos. Para este estudio se seleccionaron tres cerdas adultas sanas y gestantes de la piara de la Universidad de California. A la entrega, los lechones se alojaron junto con las cerdas y se marcaron en las orejas para su identificación, siguiendo las prácticas convencionales. Se permitió que los lechones mamaran libremente hasta el destete después de los 21 días de edad. Los lechones se retiraron de la cerda y se transfirieron a un alojamiento separado y se les alimentó con un pienso de partida convencional (Hubbard Feeds Mankato, MN, Estados Unidos) después de los 21 días de edad. A los animales se les dio acceso a voluntad al agua y al alimento. Se recogió leche de las cerdas mientras amamantaban a sus camadas respectivas y se almacenó a -80 °C.

Muestreo. Se recogieron muestras fecales usando un hisopo de algodón estéril (Puritan Medical, Guilford, ME Estados Unidos) por vía rectal de cada lechón después de 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después del nacimiento. También se usaron hisopos para recoger muestras fecales de las cerdas madres y sitios de ~4 cm^2 dentro del recinto a lo largo del estudio.

Secuenciación de la construcción de biblioteca. El ADN se extrajo de los hisopos usando el equipo de ADN fecal de Zymo Research (Zymo Research Irvine, CA Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se usó como molde para la PCR usando cebadores con códigos de barras para amplificar la región V4 del gen de ARNr 16S como se ha descrito anteriormente para bacterias y la región espaciadora transcrita interna (ITS) para evaluar las comunidades fúngicas {Bokulich:2013uf, Bokulich:2013vd}.

En resumen, el dominio V4 del gen de ARNr 16S se amplificó usando los cebadores F515 (5'-NNNNNNNNGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'; SEQ ID NO: 1) y R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; SEQ ID NO: 2), donde la secuencia poli-N (en cursiva) era un código de barras de 8 nt único para cada muestra y una secuencia conectora de 2 nt (en negrita). Se llevó a cabo amplificación por PCR en una reacción de 15 ml que contenía GoTaq Green Mastermix 1X (Promega, Madison, WI Estados Unidos), $MgCl_2$ 1 mM y 2 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 50 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 90 segundos, seguido de una única etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Todos los cebadores usados en este estudio se resumen en la tabla S1. Los amplicones se agruparon y purificaron usando una columna de purificación de PCR de Qiagen (Qiagen) y se enviaron al núcleo de secuenciación de tecnologías de ADN del Centro de Genoma de UC Davis para la preparación de bibliotecas de extremos emparejados, generación de agrupamientos y secuenciación de extremos emparejados de 250 pb en un Illumina MiSeq. Se secuenciaron amplicones fúngicos y bacterianos en series independientes de MiSeq. Se analizaron lecturas demultiplexadas filtradas por calidad usando QIIME 1.8.0 {Kuczynski: 2012 gz, Walters: 2010ts} como se ha descrito anteriormente {Bokulich: 2014tx}, excepto que la publicación de la base de datos greengenes 13_8 se usó para la selección de OTU y la asignación taxonómica y las secuencias bacterianas se alinearon usando UCLUST {Edgar: 2010cv}. Se submuestrearon al azar 7000 secuencias por muestra para el análisis de comunidades bacterianas a fin de garantizar comparaciones adecuadas. Se omitieron las muestras con menos de 7000 secuencias. Las estimaciones de diversidad alfa se calcularon para el árbol completo de diversidad filogenética (DF) y se compararon mediante una prueba de t no paramétrica de dos muestras con corrección de Bonferroni y 999 permutaciones de Monte Carlo para análisis bacterianos. La diversidad beta se calculó mediante métricas de UNIFRAC ponderadas (o sin ponderar, cuando se indique) para poblaciones bacterianas {Lozupone: 2005 gn}.

Secuenciación metagenómica. Se extrajo ADN genómico total de las muestras fecales con el equipo de extracción de ADN fecal de ZYMO Research según las instrucciones del fabricante y se preparó usando química de reactivo Illumina MiSeq v3 para la secuenciación indiscriminada del genoma completo de bibliotecas multiplexadas de 150 pb en el núcleo de secuenciación del genoma de la Universidad de California Davis (http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu). Las muestras se agruparon y secuenciaron a través de ciclos de secuenciación por triplicado. Los archivos FASTQ se demultiplexaron, se filtraron por calidad, se recortaron a 150 pb y después las lecturas para cada muestra se agruparon a partir de los tres ciclos, produciendo 15-20 millones de lecturas por muestra, y se envió al proyecto MGRAST para su análisis {Glass: 2010ke}, que elimina las lecturas del ADN genómico del hospedador y las lecturas duplicadas, agrupa el ARNr 16S y clasifica funcionalmente las lecturas restantes según la secuencia proteica predicha. Las lecturas clasificadas se normalizaron en MGRAST y se compararon entre tratamientos usando STAMP {Parks: 2014hi}.

Aislamiento de *Bacteroides* y *Escherichia coli* consumidores de PMG. Las muestras fecales se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0) y se sembraron en placas de agar bilis esculina de *Bacteroides* prerreducidas (HiMedia Mumbai, India) y se incubaron a 37 °C de manera anaeróbica durante 2 d, después se subcultivaron hasta su pureza y se tipificaron usando un MALDI-TOF Biotyper (Bruker Corporation Fremont CA, Estados Unidos) según

las instrucciones del fabricante. Se usó la secuenciación de ARNr 16S usando los cebadores 8F y 1391R para confirmar la identidad. Se cultivaron *Bacteroides* en BHI-S durante una noche, anaeróbicamente a 37 °C. Se cultivó *Bacteroides* en medio mínimo para ensayos de crecimiento, como se ha descrito anteriormente {Martens: 2008kp}, usando lactosa, glucosa, galactosa, 2,3-sialilactosa, 2,6-sialilactosa, ácido siálico como únicas fuentes de carbono (1 % p/v).

Identificación de especies de *Lactobacillus* consumidoras de ácido siálico. Se cultivaron muestras fecales de lechones lactantes y destetados en medio Rogosa SL que contenía glucosa, rafinosa o ribosa como únicas fuentes de carbono y se dejaron crecer a 37 o 45 °C de forma anaerobia, para aislar preferentemente especies de *Lactobacillus.* Las colonias se aislaron hasta su pureza e inicialmente se identificaron usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF y un sistema BioTyper (Bruker, Fremont, CA, Estados Unidos). Se extrajo ADN genómico como se ha descrito anteriormente {Oh: 2009bo} y se generaron secuencias parciales de ARNr 16S mediante PCR usando los cebadores 8F y 581R en condiciones de ciclado y reacción descritas en otro lugar {Bokulich: 2013vd}. Los aislados se agruparon a nivel de especie y los representantes se seleccionaron para exploración del crecimiento y determinación del ARNr 16S. Las secuencias fueron determinadas por el núcleo de secuenciación de ADN de UC Davis (http://dnaseq.ucdavsis.edu) y se compararon con la base de datos de ARNr 16S del NCBI para confirmar la identificación de MALDI-BioTyper. Se exploraron aislados representativos para determinar la capacidad de crecer en ácido siálico (1 % p/v) o N-acetilglucosamina como únicas fuentes de carbono en medio basal MRS que los contiene como única fuente de carbono. La lactosa y la glucosa también se compararon como controles positivos. Se exploraron los genomas disponibles de *Lactobacillus* en la base de datos JGI-IMG para determinar la presencia de un repertorio completo de utilización de ácido siálico.

Secuenciación genómica. Se seleccionaron lactobacilos, *Bacteroides* spp. aislados de muestras fecales de lechones y que poseen la sialidasa predicha por secuenciación metagenómica, y la *Escherichia coli* que contiene la ruta de catabolismo del ácido siálico según lo determinado por PCR, para la secuenciación indiscriminada de genoma completo en un Illumina HiSeq en el Laboratorio de Secuenciación Genómica Vincent J. Coates de UC Berkeley (http://qb3.berkeley.edu/qb3/gsl/index.cfm). Las lecturas se compilaron usando Velvet {Zerbino: 2008vu}, lo que produjo una cobertura promedio >20 veces, y se cargaron en la base de datos JGI para anotación y declaración pública.

Detección de ácido siálico en heces. Las muestras fecales se suspendieron en 500 ul de dH2O y se agitaron en vórtex durante 30 m a 2500 RPM y después se centrifugaron a 14 000 RPM durante 15 minutos, de las que se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos extracciones adicionales del sedimento para un volumen final de 1,5 ml. Se eliminaron 150 ul para la cuantificación de proteínas utilizando el ensayo de Bradford, con BSA para generar una curva patrón. Las muestras se purificaron en una resina de intercambio aniónico y se eluyeron con 5 ml de NaCl 50 mM y se secaron al vacío antes de reconstituir en 500 ul de dH2O. Las concentraciones de ácido siálico se determinaron usando un equipo comercial según las instrucciones del fabricante (Abcam Cambridge, MA Estados Unidos). La concentración de ácido siálico se normaliza con respecto a la concentración de proteína total y se expresa como mg de ácido siálico por mg de proteína.

Análisis estadístico. Se calcularon pruebas de T y correlaciones lineales usando Graph Pad Prism 6 para OSX (Graph Pad Software, La Jolla, CA Estados Unidos) con un valor de p mínimo de 0,05.

Aunque la descripción en el presente documento contiene muchos detalles, estos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la divulgación, sino como simplemente ilustraciones de algunas de las realizaciones actualmente preferidas. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de la divulgación abarca completamente otras realizaciones que pueden resultar evidentes para los expertos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los Regentes de la Universidad de California Mills, David A. Frese, Steven A.

<120> REDUCCIÓN DE GLUCANOS DE LA LECHE EN EL INTESTINO DEL RECIÉN NACIDO

<130> 0966525

<150> US 62/091,298
<151> 12/12/2014

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 29
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético F515

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> n es a, t, c o g

<400> 1
nnnnnnnngt gtgccagcmg ccgcggtaa 29

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético R806

<400> 2
ggactachvg ggtwtctaat 20

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende *Bifidobacterium longum* sp. *infantis, B. longum* subsp. *longum, B. breve, B. pseudocatenulatum* o *B. bifidum* para su uso en un método de alteración de la composición del microbioma bacteriano intestinal en mamíferos no humanos lactantes para prevenir y tratar enfermedades, comprendiendo el método:

administrar a un mamífero no humano lactante una dosis del agente;
en donde el agente es un agente que limita la disponibilidad de al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche en el intestino del mamífero lactante; y

en donde la disponibilidad limitada de dicho al menos uno de los glucanos de la leche y los monómeros de glucanos de la leche reduce las poblaciones totales de patógenos entéricos y organismos relacionados en el intestino del mamífero no humano lactante.

2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho agente se administra a una dosis de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC).

3. El agente para el uso de la reivindicación 1, que comprende además administrar al menos un agente prebiótico que estimula la colonización del microorganismo en el intestino del mamífero.

4. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde:

(a) dicho agente es un microorganismo que posee cualquier combinación de las siguientes características:
genes que codifican una neuraminidato liasa (nanA) [consumo de ácido siálico], transportador de ácido siálico y/o permeasa, transportador de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina permeasa, N-acetilglucosamina desacetilasa (nagA), glucosamina desaminasa (nagB) [nagA y nagB codifican el consumo de N-acetilglucosamina y el consumo de ácido siálico], transportador de fucosa y/o fucosa permeasa, isomerasa fucosa, transportador de gluconato y/o gluconato permeasa, gluconato cinasa, permeasas o transportadores capaces de transportar glucanos complejos compuestos por uno o más de los siguientes monómeros; ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina; o permeasas o transportadores capaces de transportar glucanos de la leche; o
(b) dicho mamífero lactante es una especie capaz de producir leche que contiene glucanos compuestos por al menos uno de los monómeros de glucano de la leche, ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa y glucosa; o
(c) dichos monómeros de glucano de la leche están compuestos por al menos uno de los monómeros de glucano de la leche seleccionados del grupo que consiste en ácido siálico, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, glucosa, gluconato, N-acetilmanosamina, N-acetilmanosamina-6-fosfato, fuculosa-1-fosfato, lactaldehído y 1,2-propanodiol, galactosa-1-fosfato y galactitol; o
(d) dicho agente se administra por vía oral en forma liofilizada.

5. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde:

(a) dicho agente se administra por vía oral en forma viva; o
(b) dicho agente comprende además un sustrato de glucano prebiótico y en donde dicha bacteria utiliza dicho sustrato de glucano prebiótico.

6. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el mamífero se trata con antibióticos.

7. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el mamífero no se trata con antibióticos.

8. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el mamífero es un mamífero porcino o bovino.

9. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el mamífero tiene diarrea.

10. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el mamífero no tiene diarrea.

11. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el mamífero tiene una concentración intestinal elevada de monómeros de glucano de la leche antes de la administración y en donde el nivel de ácido siálico en el intestino del mamífero (medido en las heces del mamífero) es de al menos 1 mg por mg de proteína total o el nivel de fucosa es de al menos 1 mg/g de heces, o el nivel de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina es de al menos 10 microgramos/g de heces antes de la administración.

12. El agente para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el mamífero tiene una concentración intestinal elevada de proteobacterias antes de la administración y en donde

(i) al menos 10 % de la comunidad total de bacterias en el intestino del mamífero es, o

(ii) al menos 10^{10} células por gramo de contenido de órganos intestinales son *Enterobacteriaceae* o *Bacteroidaceae* antes de la administración.

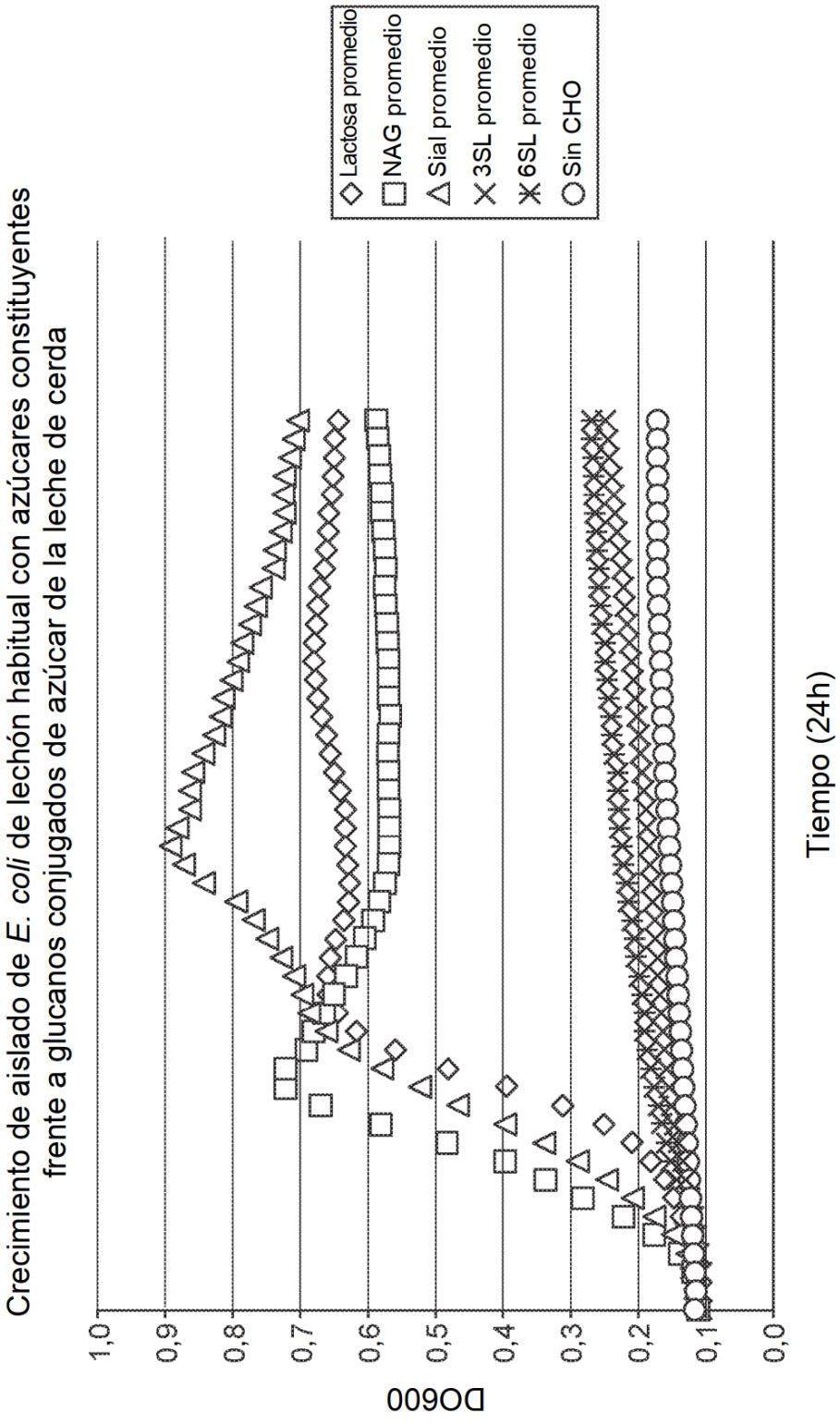

Crecimiento de aislado de E. coli de lechón habitual con azúcares constituyentes frente a glucanos conjugados de azúcar de la leche de cerda
Lactosa promedio
NAG promedio
Sial promedio
3SL promedio
6SL promedio
Sin CHO
DO600
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Tiempo (24h)

FIG. 1

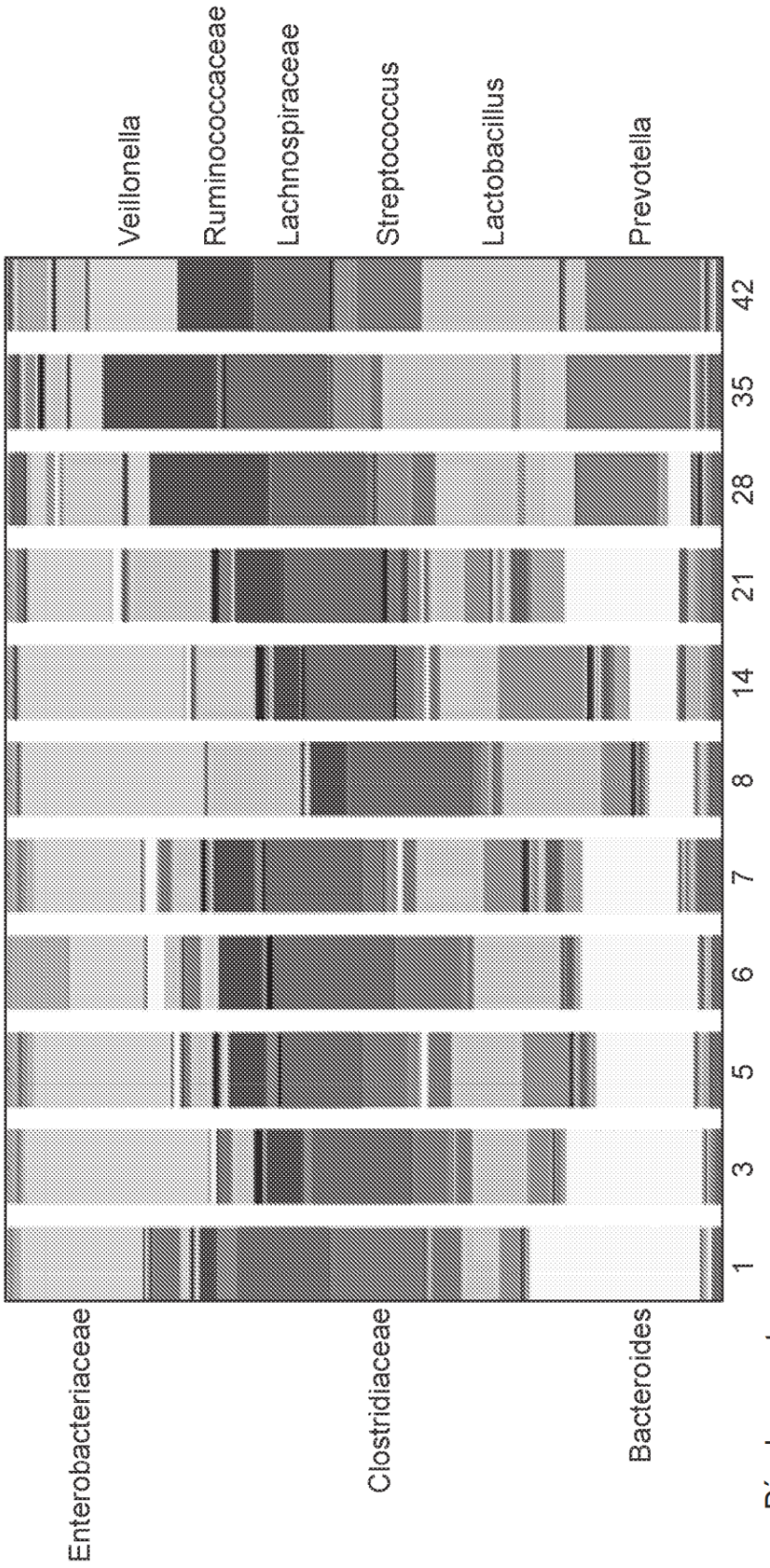

Veillonella
Ruminococcaceae
Lachnospiraceae
Streptococcus
Lactobacillus
Prevotella
Enterobacteriaceae
Clostridiaceae
Bacteroides
1
3
5
6
7
8
14
21
28
35
42
Día de muestra

FIG. 2

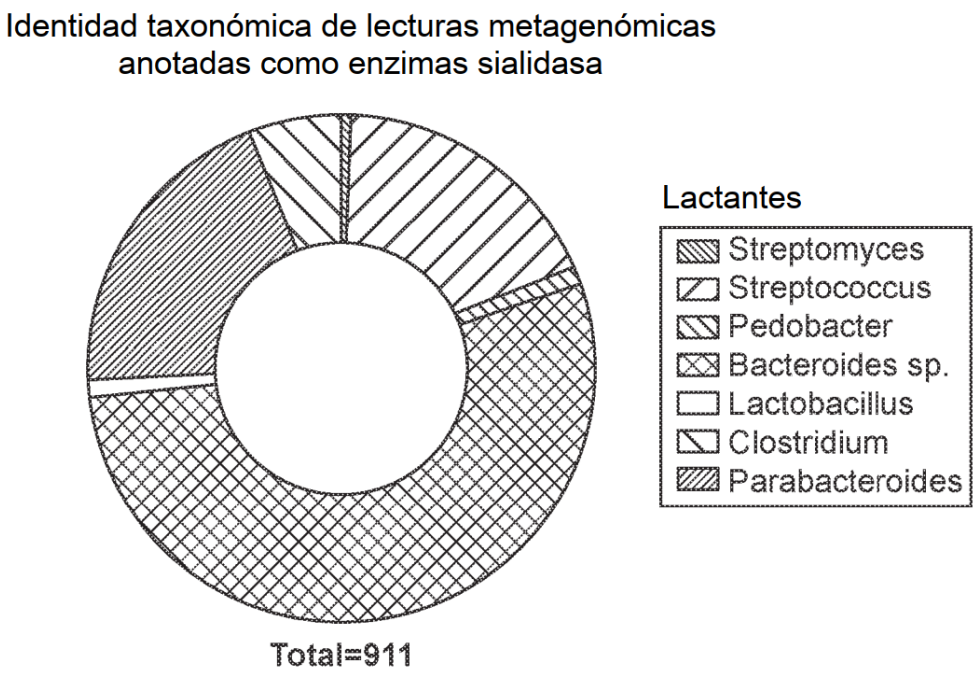

Identidad taxonómica de lecturas metagenómicas anotadas como enzimas sialidasa
Lactantes
Streptomyces
Streptococcus
Pedobacter
Bacteroides sp.
Lactobacillus
Clostridium
Parabacteroides
Total=911

FIG. 3A

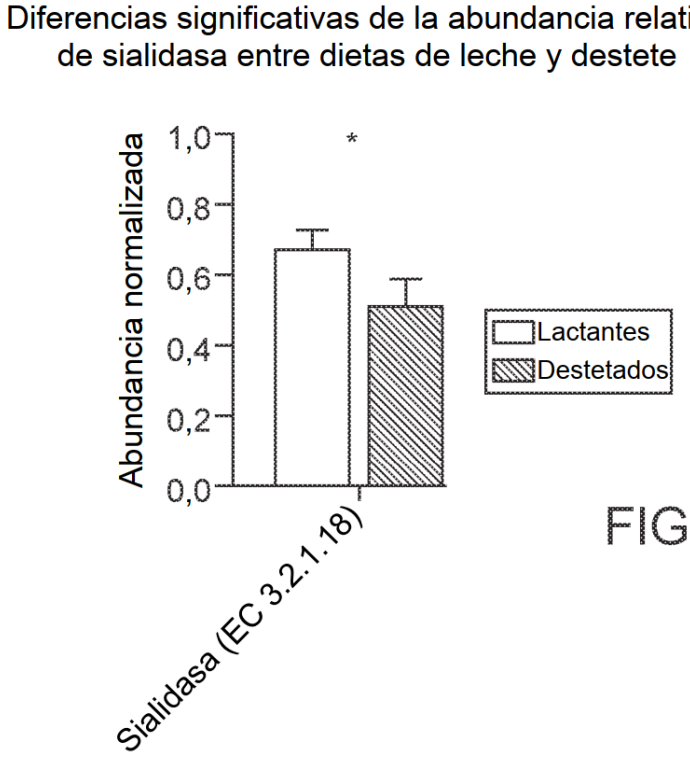

Diferencias significativas de la abundancia relativa de sialidasa entre dietas de leche y destete
Abundancia normalizada
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
Lactantes
Destetados
Sialidasa (EC 3.2.1.18)

FIG. 3B

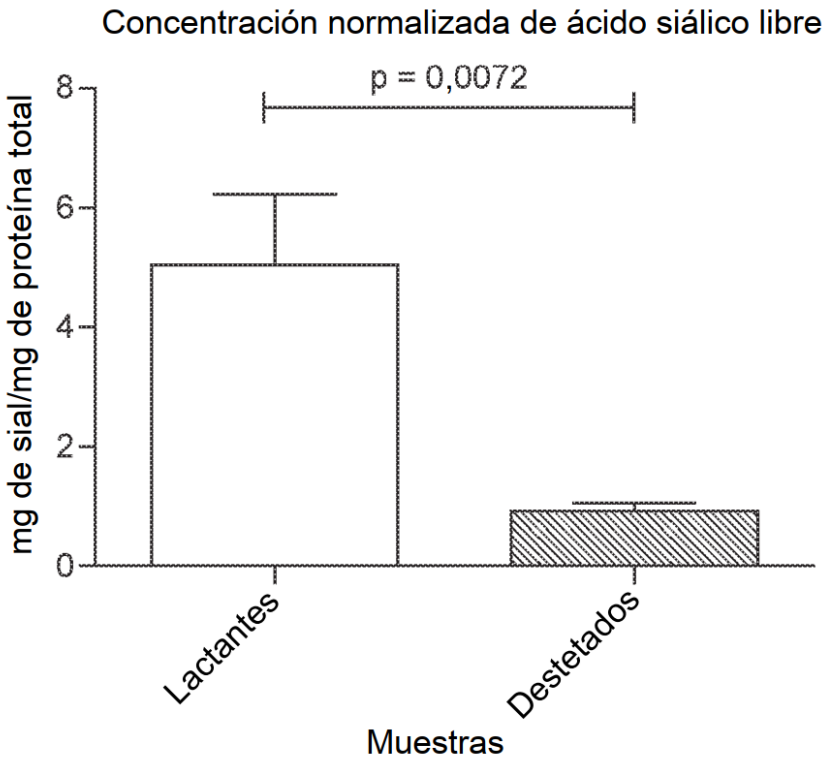

Concentración normalizada de ácido siálico libre
p = 0,0072
mg de sial/mg de proteína total
8
6
4
2
0
Lactantes
Destetados
Muestras

FIG. 4

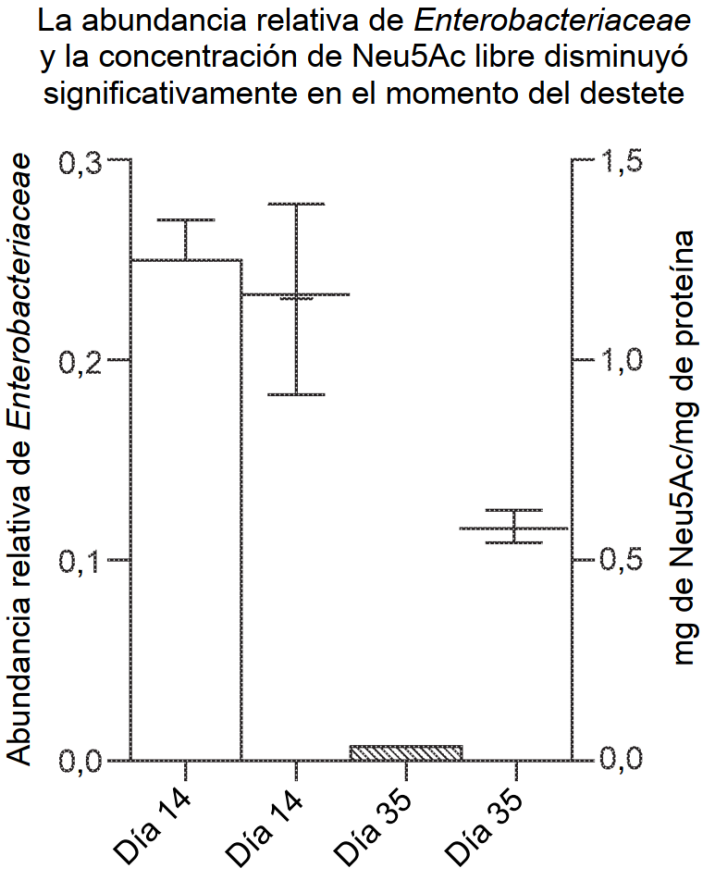

La abundancia relativa de *Enterobacteriaceae* y la concentración de Neu5Ac libre disminuyó significativamente en el momento del destete
Abundancia relativa de *Enterobacteriaceae*
0,3
0,2
0,1
0,0
1,5
1,0
0,5
0,0
mg de Neu5Ac/mg de proteína
Día 14
Día 14
Día 35
Día 35

FIG. 5

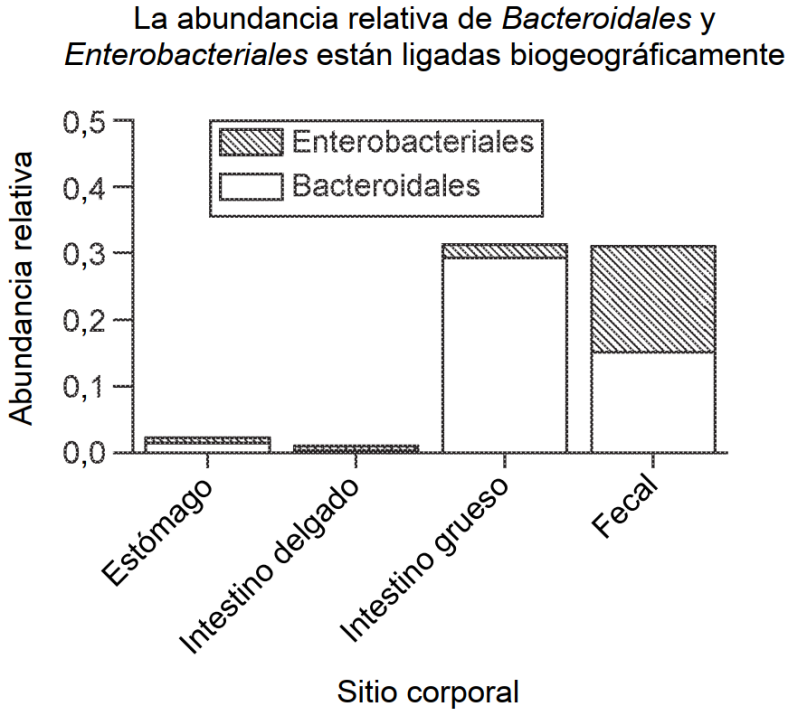

La abundancia relativa de *Bacteroidales* y *Enterobacteriales* están ligadas biogeográficamente
Abundancia relativa
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Enterobacteriales
Bacteroidales
Estómago
Intestino delgado
Intestino grueso
Fecal
Sitio corporal

FIG. 6

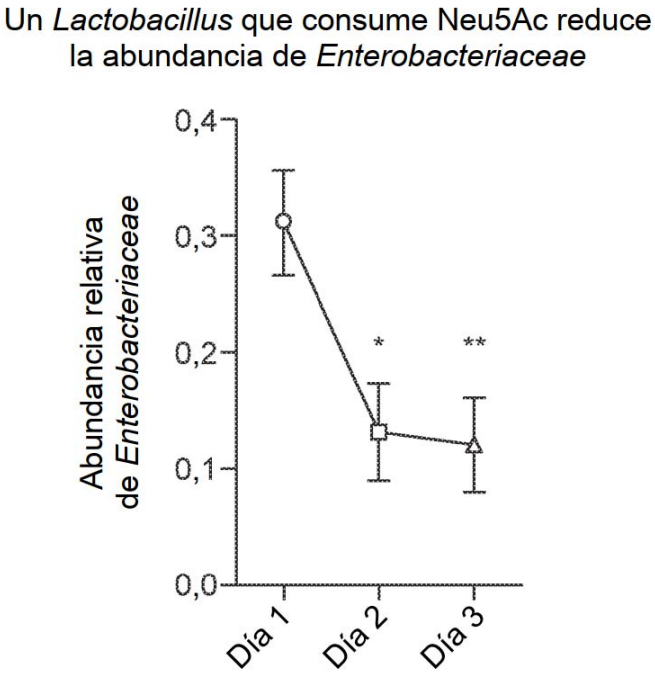

Un *Lactobacillus* que consume Neu5Ac reduce la abundancia de *Enterobacteriaceae*
Abundancia relativa de *Enterobacteriaceae*
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
**
Día 1
Día 2
Día 3

FIG. 7

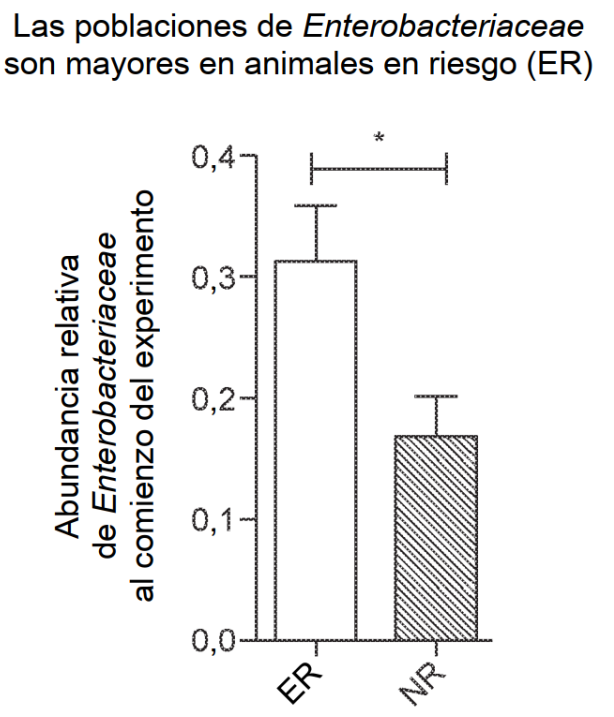

Las poblaciones de *Enterobacteriaceae*
son mayores en animales en riesgo (ER)
Abundancia relativa
de *Enterobacteriaceae*
al comienzo del experimento
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
ER
NR

FIG. 8

El tratamiento con *Lactobacillus* reduce las poblaciones de *Enterobacteriaceae* a niveles vistos en animales que no responden

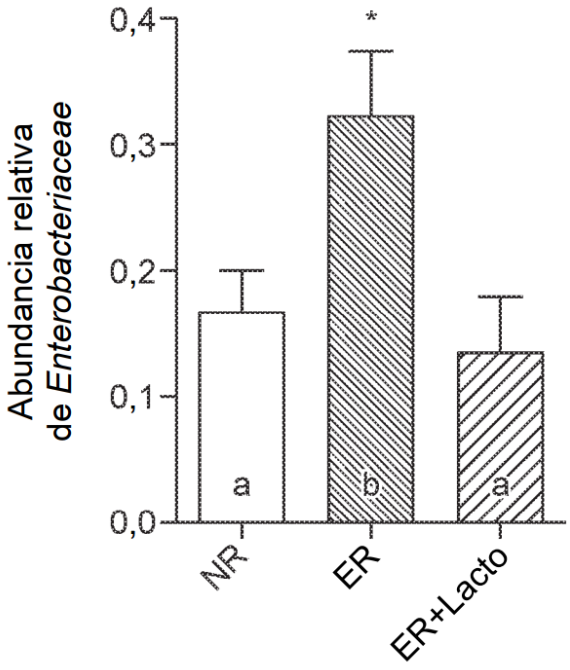


FIG. 9

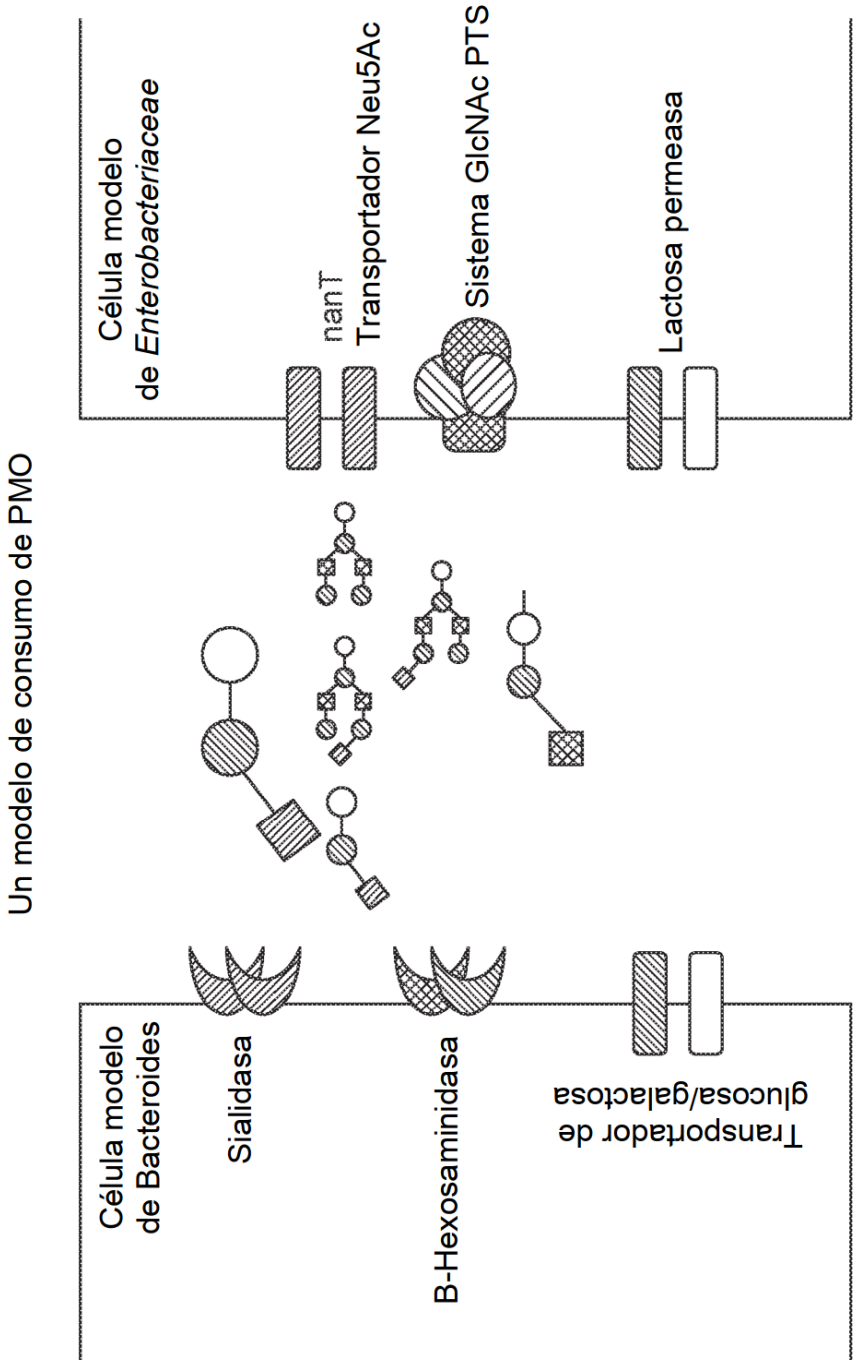

Un modelo de consumo de PMO
Célula modelo de Bacteroides
Sialidasa
B-Hexosaminidasa
Transportador de glucosa/galactosa
Célula modelo de Enterobacteriaceae
nanT
Transportador Neu5Ac
Sistema GlcNAc PTS
Lactosa permeasa

FIG. 10