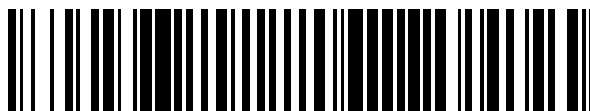


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 187**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2005 E 05757612 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1755628**

54 Título: **Bacterias lácticas y su uso en la prevención de la diarrea**

30 Prioridad:

18.06.2004 CA 2470090

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**BIO-K PLUS INTERNATIONAL INC. (100.0%)
495 BOULEVARD ARMAND-FRAPPIER
LAVAL, QUEBEC H7V 4A7, CA**

72 Inventor/es:

LUQUET, FRANÇOIS-MARIE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 400 187 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacterias lácticas y su uso en la prevención de la diarrea

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con el uso de cepas de bacterias lácticas en la prevención de la diarrea. Más particularmente, la presente invención trata del uso de bacterias lácticas con el fin de prevenir la diarrea asociada a los antibióticos (DAA).

Descripción de la técnica previa

La diarrea se puede causar por un problema temporal, como una infección, o un problema crónico, como una enfermedad intestinal. Algunas de las causas más comunes de diarrea se enumeran a continuación:

- 10
- Infecciones Bacterianas: Varios tipos de bacterias, consumidas a través de agua o alimentos contaminados, pueden causar diarrea tales como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Escherichia coli*.
 - Infecciones virales: Muchos virus causan diarrea, incluyendo rotavirus, virus Norwalk, citomegalovirus, virus del herpes simple, y hepatitis viral.
- 15
- Parásitos. Los parásitos pueden entrar al cuerpo a través de alimentos o el agua y se instalan en el sistema digestivo. Los parásitos que causan diarrea incluyen *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, y *Cryptosporidium*.
 - Reacción a los medicamentos, tales como antibióticos, medicamentos para la presión arterial, y antiácidos que contienen magnesio.
 - Enfermedades intestinales, como enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad celiaca.
- 20
- Trastornos funcionales del intestino, tales como síndrome del intestino irritable, en el cual los intestinos no trabajan normalmente.

Se sabe que aproximadamente el 10% de todos los tratamientos con antibiótico son responsables de efectos secundarios gastrointestinales, especialmente la diarrea denominada diarrea asociada a los antibióticos (DAA).

Todos los grupos de antibióticos pueden causar DAA, pero aquellos con una cobertura de amplio espectro, tales como cefalosporinas, penicilinas con cobertura extendida, y clindamicina, son las causas más comunes de DAA.

25 La incidencia de DAA, de 5 a 39%, ha ido en aumento en los últimos años, particularmente tras el uso incrementado de antibióticos de amplio espectro (Bergogne-Bérézin, 2000; McFarland, 1998; Spencer 1998). La presentación clínica de DAA es muy variable, variando de una diarrea sin complicaciones a una colitis pseudomembranosa.

30 Se debe señalar que del 10 al 20% de los casos de DAA se causan por una infección por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) (Bergogne-Bérézin, 2000; Bartlett, 2002). *C. difficile* es un bastón gram-positivo anaeróbico. La diarrea *C. difficile* es en gran medida una enfermedad nosocomial y es la causa más frecuente de diarrea en pacientes hospitalizados. Su ocurrencia en el ámbito ambulatorio, excepto en pacientes confinados a casas de reposo, es mucho menos común.

35 La diarrea por *C. difficile* se utiliza para describir un amplio espectro de enfermedades diarreicas causadas por las potentes toxinas producidas por este organismo, incluyendo casos de colitis severa con o sin la presencia de pseudomembranas.

40 En particular este organismo se puede aislar en un gran número de casos de DAA con evidencia de colitis y en todos aquellos con pseudomembranas. Este está ampliamente presente en el ambiente y puede sobrevivir durante un tiempo considerable. Se transmite por vía fecal-oral a individuos susceptibles. Se considera parte de la flora normal de los bebés y se puede aislar en aproximadamente 5% de adultos saludables y en hasta un tercio de pacientes hospitalizados, asintomáticos o colonizados.

Tanto las toxinas A y B de *C. difficile* muestran potentes efectos citotóxicos y de enterotoxina que son responsables de las manifestaciones clínicas.

DAA, y más particularmente DAA de *C. difficile*, posteriormente puede dar lugar a importantes consecuencias al nivel financiero así como al nivel clínico: aumento de la morbilidad, de la mortalidad, del número de hospitalizaciones así

como la duración de estas (McFarland, 2002). Se observa que el desarrollo de una DAA por *C. difficile* presenta un riesgo no solo para el paciente sometido a terapia con antibiótico, sino también para los otros pacientes hospitalizados en la misma unidad de cuidado, dado el carácter contagioso de esta diarrea (Bartlett, 2002).

5 Estudios epidemiológicos han mostrado que *C. difficile* por lo general se aísla en salas de hospital, incluyendo los suelos, manijas de puertas, y muebles incluso semanas después de pacientes con DAA se han retirado de la zona. Con menor frecuencia, se han hecho observaciones similares entre el personal médico asintomático y en salas de hospital ocupadas por pacientes no afectados. Se encuentra que los pacientes readmitidos después de hospitalizaciones recientes tienen una alta prevalencia de colonización por *C. difficile*, que representa una fuente importante de infección. Debido a las propiedades esporulantes de este organismo, todas estas observaciones
10 sugieren un papel importante para la contaminación cruzada entre pacientes, el contacto con superficies ambientales, y la transmisión a través de las manos de personal médico.

Se han utilizado muchos antimicrobianos para tratar colitis por *C. difficile*. El desarrollo de medidas preventivas efectivas contra DAA parece así inevitable.

Bacterias ácido lácticas

15 Es el científico E. Metchnikoff (1845-1919) quien propuso que la longevidad y la salud de la población de Bulgaria son atribuibles a la ingestión de productos lácteos fermentados. Es bien sabido que ciertas bacterias son patogénicas para el organismo. Por lo tanto, se propuso que estas bacterias se sustituyeran por bacterias de yogur dado que estas últimas han sido utilizadas durante mucho tiempo sin temor. Muchas directrices estándar se han establecido con el fin de definir una bacteria del ácido láctico. Entre estos estándares están: deben conservar su
20 actividad y su viabilidad antes de su consumo, deben sobrevivir el tracto gastro-intestinal, deben ser capaces de sobrevivir y proliferar en los intestinos, y eventualmente debe producir efectos benéficos. Además, los microorganismos no deben ser patológicos ni tóxicos.

Muchas pruebas se han realizado con el fin de mejorar el estado de salud modificando la flora intestinal a través de bacterias ácido lácticas vivas. Hoy en día, los efectos benéficos de estas bacterias ácido lácticas están bien
25 identificadas y existen intentos de explicar el o los mecanismos relacionados con dichos beneficios. El equipo de Salminen ha resumido los efectos benéficos más importantes, soportados por la evidencia científica tales como modulación inmunológica y el refuerzo de la barrera de la mucosa intestinal. Se han propuestos diferentes mecanismos con el fin de explicar a que se deben tales beneficios: la modificación de la flora intestinal, la adherencia a la membrana de mucosa intestinal con la capacidad de presentar la adherencia de bacterias patogénicas o la activación de patógenos, la modificación de proteínas de alimentos mediante microflora intestinal, la
30 modificación de capacidad enzimática bacteriana, y finalmente la influencia en la permeabilidad de mucosa intestinal.

Muchos estudios indican un potencial terapéutico de bacterias ácido lácticas y yogur que se debe principalmente al cambio en micro-ecología gastro-intestinal. La eficiencia de las bacterias ácido lácticas es realizada por su capacidad
35 de la adherencia a la pared intestinal dado que las cepas bacterianas adherentes tienen una ventaja competitiva, importante para mantener su lugar en el tracto gastro-intestinal. Por otro lado, ninguna cepa bacteriana ha demostrado que se adhiere de una manera permanente. Mediante el aumento de la cantidad de bacterias ácido lácticas en los intestinos, es posible eliminar el crecimiento de bacterias patogénicas, que a su vez contribuirá a una reducción de infecciones. Un epitelio intestinal intacto con una flora intestinal óptima representa una barrera contra
40 invasiones o colonización mediante micro-organismos patogénicos, antígenos y compuestos dañinos para el tracto intestinal.

En general, el consumo de bacterias ácido lácticas actúa por un refuerzo de la respuesta inmune no-específica o actúa como un adyuvante en la respuesta inmune antígeno-específica. Los estudios en animales han demostrado que el tejido linfóide asociado con los intestinos se estimula por bacterias ácido lácticas vivas, dando lugar a una
45 producción de citoquinas y anticuerpos (IgA) y un aumento de actividad mitogénica de las células que forman placas de Peyer y esplenocitos. En los estudios sobre células humanas, la producción de citoquina, actividad fagocítica, producción de anticuerpos, la función de las células T y actividad de la célula NK se aumentan por el consumo de yogur o cuando las células se exponen a bacterias ácido lácticas *in vitro*.

Existe evidencia que la estimulación del yogur del sistema inmune se puede asociar con la reducción de incidencias patológicas como cáncer, trastornos gastro-intestinales y síntomas de alergia.
50

Las bacterias ácido lácticas también se conocen como probióticos. El término "probiótico" describe los suplementos alimenticios compuestos de micro-organismos vivos destinados a mejorar la salud (D'Souza et al., 2002). Las especies más frecuentemente utilizadas son *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Saccharomyces* spp. (Cremonini et al., 2002; Lu et al., 2001; Lewis et al., 1998; D'Souza et al., 2002; Isolauri, 2001). Muchos mecanismos de acción se han propuesto para explicar su eficacia, tales como la producción de sustancias antimicrobianas, la
55

competición para la colonización gastro-intestinal así como para nutrientes disponibles, la inmunomodulación y la promoción de digestión de lactosa (Lu et al., 2001; D'Souza et al., 2002; Alvarez-Olmos et al., 2001).

5 Muchos estudios, tanto in vitro como in vivo, han demostrado que *Lactobacilli* (en particular, *L. acidophilus*) no son solo habitantes normales del tracto intestinal. *Lactobacilli* también juega un papel importante en la estimulación del sistema inmune, inhibiendo los patógenos y reduciendo los riesgos de cáncer de colon.

Además, los efectos de probióticos en general salud son numerosos. Se conoce que los probióticos mejoran la salud intestinal, mejora la digestión, fortalece el sistema inmunológico, reduce el colesterol en sangre y reduce la relación HDL/LDL. También los probióticos se han probado en DAA.

10 Varios investigadores han concluido que los probióticos son efectivos en el tratamiento de diarrea infecciosa aguda en niños y en la prevención de DAA y diarrea adquirida en la comunidad/nosocomial (Gill and Garner, 2004). En un meta-análisis de más de 20 estudios, Cornelius et al. (2004) sugieren que *Lactobacillus* es un tratamiento efectivo y seguro de diarrea aguda en niños. Además, se ha demostrado que una fórmula para el cuidado de los niños suplementada con *Lactobacillus reuteri* o *Bifidobacterium lactis* redujo los episodios y la duración de diarrea en los bebés (Weizman et al. 2005). US 6,887,465 to Reniero et al., revela el uso de cepas de *Lactobacillus* para prevenir la diarrea causada por bacterias patogénicas y rotavirus en niños de 35 a 70 meses de edad.

15 Se cree que los probióticos son potencialmente eficientes para limitar la proliferación de patógenos secundarios cuando se toman antibióticos. Sin embargo, al día de hoy la profesión médica permanece prudente en cuanto al uso de probióticos en la práctica común, en parte porque pocos estudios se han publicado, con especificaciones sólidas que soporten su eficiencia en la prevención primaria de DAA (Lewis et al., 1998). En uno de estos estudios, Plummer et al. (2004) reportaron una reducción de incidencia en las toxinas asociadas con *C. difficile* en el grupo de pacientes con edad avanzada en un estudio que han recibido una cápsula de probiótico que contiene 2×10^{10} ufc de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Sin embargo, Pereg et al. (2005) también observó una tendencia no significativa de reducción de la incidencia de diarrea en adultos jóvenes sanos que consumen yogurt que contiene *Lactobacillus casei*. Por lo tanto, la eficacia de los probióticos en la prevención de DAA en adultos muestra resultados contradictorios y necesita ser más evaluada en adultos. (Szajewska and Mrukowicz, 2005).

20 La mayoría de los estudios publicados utilizan probióticos liofilizados en la forma de una cápsula y se evalúan diferentes cepas. Sin embargo, es importante mencionar que todos los probióticos no actúan de la misma manera y que pueden tener diferentes eficiencias clínicas. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios no deben ser considerados válidos para cepas diferentes de las evaluadas en estos ensayos (Cremonini et al., 2002; D'Souza et al., 2002).

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas composiciones con el fin de mejorar la prevención o cura de la diarrea y en especial la diarrea asociada con una terapia curativa de antibiótico prescrita a pacientes.

Resumen de la invención

35 Un objeto de la presente invención es proveer un producto que satisface las necesidades mencionadas anteriormente.

La presente invención, además revela una composición para la prevención o tratamiento de la diarrea en un mamífero, caracterizada porque comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus acidophilus* 1-1492 depositada en el CNCM y una cepa de *Lactobacillus casei* para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos en un humano, caracterizada porque la diarrea asociada a los antibióticos se causa por una infección por *Clostridium difficile*.

La presente invención también revela el uso de la composición de la invención para la prevención o tratamiento de la diarrea en un mamífero.

45 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* 1-1492 depositada en el CNCM y una cepa de *Lactobacillus casei* para la fabricación de una composición para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos en un humano, caracterizada porque la diarrea asociada a los antibióticos se causa por una infección por *Clostridium difficile*.

50 La presente invención además revela el uso de al menos una cepa de bacterias lácticas para la fabricación de una composición destinada a la prevención o tratamiento de la diarrea en un mamífero.

La presente invención además revela así el método de prevención o tratamiento de la diarrea, caracterizado porque este comprende la etapa de administración a un mamífero de una cantidad efectiva de la composición láctica de acuerdo con la invención.

5 Además, la presente invención además revela un kit para la prevención o tratamiento de la diarrea, caracterizado porque este comprende al menos un contenedor que contiene la composición de la invención.

Una ventaja proporcionada por el método de la presente invención es que en gran medida reduce o elimina el riesgo de aparición de DAA y también elimina el riesgo de contaminación cruzada en hospitales y por lo tanto reduce o elimina el riesgo de muerte causada por DAA.

Otra ventaja de la presente invención es que provee una prevención no tóxica o tratamiento de DAA.

10 Una tercera ventaja de la presente invención es que provee un método no-invasivo de prevención o tratamiento de DAA.

Otra ventaja de la presente invención es que provee un método de prevención o tratamiento de DAA que no requiere el uso de antibióticos. Esto evitará la aparición de efectos secundarios causados por la incompatibilidad entre fármacos.

15 Otra ventaja de la presente invención es que también provee una composición que se puede utilizar durante un periodo prolongado de tiempo para la prevención o tratamiento de DAA, que presenta pocos o ningún efecto secundario. Tal composición es disponible fácilmente en tiendas de naturistas o mercados especializados sin la necesidad de una prescripción.

20 Otra ventaja de la presente invención es que provee una composición, que alcanza la mucosa del intestino en una forma apropiada y viable sin ser destruida en la parte superior del tracto gastrointestinal, en especial en el estómago. Otra ventaja de la presente invención es que también provee una composición, que contiene un número suficiente de bacterias capaces de ser implantadas en los intestinos.

25 Otra ventaja de la presente invención es que provee una composición que se administra a adultos como niños. Esta composición se puede administrar en un medio hospitalario, en casa, en instalaciones del cuidado de niños o cualquier instalación, donde se necesita la prevención y control de diarrea.

En una modalidad preferida de la presente invención, la composición es ingerible, más preferiblemente es un alimento o suplemento alimentario.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes al leer la siguiente descripción detallada no-restrictiva, hecha con referencia a los dibujos acompañantes

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1 es una ilustración esquemática de la distribución de pacientes para el estudio descrito en el Ejemplo 1.

Figura 2 muestra gráficas que ilustran la incidencia de DAA de acuerdo con la clase de antibiótico recibido en el Ejemplo 1.

Figura 3 resume los resultados del estudio descrito en el Ejemplo 1

35 Figura 4 muestra la evolución en el tiempo de infección por *C. difficile* en el estudio descrito en el Ejemplo 2.

Breve descripción de las tablas

Tabla I muestra las características básicas de 89 pacientes aleatorios del Ejemplo 1

Tabla II muestra la incidencia y severidad de DAA y la duración de la hospitalización en el Ejemplo 1.

Tabla III muestra los efectos indeseables reportados durante el estudio en el Ejemplo 1.

40 Descripción detallada de la invención

Con el fin de proveer una comprensión de la descripción aún más clara y más consistente, incluyendo el alcance dado en el presente documento se proveen las siguientes definiciones, para tales términos:

Por "mamífero", se entiende cualquier organismo vivo, que puede ser sometido a DAA, y esto incluye vertebrados tales como en particular especialmente, seres humanos, animales domésticos y salvajes.

5 Por "diarrea" se entiende deposiciones blandas, acuosas que ocurren más de tres veces en un día.

Por "diarrea asociada a los antibióticos DAA" se entiende la diarrea debida a un tratamiento con antibiótico.

Por "prevenir, prevención", se entiende un proceso por el cual DAA se erradica o se hace más lento.

10 Por "tratar", se entiende un proceso por el cual los síntomas de DAA se mantienen a un nivel constante, reducido o completamente eliminado. Como se utiliza en este documento, "tratamiento" significa cualquier manera en la cual los síntomas de condiciones, trastorno o enfermedad se alivian o de otra manera se alteran beneficiosamente. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones en este documento. "El tratamiento" también se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico como medidas preventivas. Los que tienen necesidad del tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los cuales el trastorno se va a prevenir. Como se utiliza en este documento, el término 15 "tratamiento de una infección bacteriana" se refiere a un proceso por el cual la actividad metabólica de una bacteria o población bacteriana en un huésped, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, se inhibe o retira.

20 Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende un vehículo, que se puede administrar sin ningún riesgo a un mamífero, en particular a un ser humano, y esto con poco o ningún efecto secundario tóxico o negativo. Dicho vehículo se puede utilizar para diferentes funciones. Por ejemplo, se puede utilizar como un agente conservante, solubilizante, estabilizante, emulsificante, suavizante, de coloración, agente odorizante, o como un agente antioxidante. Estos tipos de vehículos se pueden preparar fácilmente utilizando métodos bien conocidos para un experto en la técnica.

25 Por "probiótico", se entiende microorganismos vivos, incluyendo especies de *Lactobacillus*, especies de *Bifidobacterium* y levaduras, que pueden afectar beneficiosamente el huésped con ingestión mejorando el balance de la microflora intestinal.

Por "aproximadamente", se entiende que el valor del número de micro-organismos, el peso de la unidad de la composición o el número de días de refrigeración puede variar dentro un cierto rango, dependiendo del margen de error del método utilizado para evaluar dicho número.

30 Por "aceptable nutricionalmente", se entiende un vehículo que se puede administrar sin riesgo a un mamífero, en particular a un humano, y esto con poco o ningún efecto secundario tóxico o negativo. Dicho vehículo se puede utilizar para diferentes funciones. Por ejemplo, se puede utilizar como un agente conservante, solubilizante, estabilizante, emulsificante, suavizante, de coloración, odorizante, o como un agente antioxidante. Estos tipos de vehículos se pueden preparar fácilmente utilizando métodos bien conocidos por una persona en la técnica.

35 La presente invención se relaciona con una composición para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos, que comprende una cantidad efectiva de al menos dos cepas de bacterias lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las cepas de bacterias lácticas son la cepa de *L. casei* y de *L. acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM.

40 Preferiblemente, la composición de la invención comprende al menos aproximadamente 0.5 mil millones de microorganismos vivos y activos de la cepa de *L. acidophilus* por gramo de la composición, hasta aproximadamente 120 días bajo refrigeración. En una modalidad más preferida, la composición de la invención comprende al menos aproximadamente 50 mil millones de una población de micro-organismos vivos y activos de la cepa de *L. acidophilus*, por unidad de la composición, hasta aproximadamente 120 días bajo refrigeración en aproximadamente 98 gramos de la composición o por cápsula, donde al menos aproximadamente 80% son micro-organismos de la 45 cepa de *L. acidophilus* 1-1492 depositada en el CNCM. En otra modalidad preferida, la composición de la invención también puede comprender al menos aproximadamente 100 mil millones de una población de micro-organismos vivos y activos de la cepa de *L. acidophilus*, por unidad de la composición, hasta aproximadamente 90 días bajo refrigeración, donde al menos aproximadamente 80% son micro-organismos de la cepa de *L. acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM. Por "unidad", se entiende cualquier contenedor apropiado para uso comercial, que contiene aproximadamente 98 gramos de la composición de la invención, tales como, pero no se limita a, un frasco o un 50 contenedor plástico por lo general utilizado para contener productos lácteos tales como yogures, u otros fermentos.

Preferiblemente, la composición comprende los productos Bio-K Plus™. Opcionalmente, la composición láctica de la invención además comprende proteínas de la leche fermentada y proteínas de la soja fermentada. Los productos Bio-K Plus™ son productos de fermento láctico disponibles fácilmente en el mercado y vendidos por la compañía Bio-K Plus International Inc. Los productos Bio-K Plus™ contienen *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, y más específicamente *Lactobacillus acidophilus* I-1492 CNCM. La composición de la invención contiene por lo tanto aproximadamente 95% de *Lactobacillus acidophilus* y aproximadamente 5 % de *Lactobacillus casei*.

Como se menciona anteriormente, la diarrea es diarrea asociada a los antibióticos. Se conoce que aproximadamente el 10% de todos los tratamientos con antibiótico son responsables de efectos secundarios gastrointestinales, especialmente la diarrea asociada a los antibióticos (DAA). Todos los grupos de antibióticos pueden causar DAA, pero aquellos con cobertura de amplio espectro, tales como las cefalosporinas, penicilinas de cobertura extendida, y clindamicina, son las causas más comunes de DAA. Por lo tanto, en una modalidad preferida, el humano se trata con un antibiótico de amplio espectro. Del 10 al 20% de casos de DAA se causan por una infección por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) (Högenauer et al., 1998; Bartlett, 2002). Por lo tanto, en una modalidad preferida de la invención, la composición de la invención es para la prevención o tratamiento de la diarrea en un mamífero causada por *C. difficile*. Sin embargo, la composición de la invención también se puede utilizar en la prevención o tratamiento de la diarrea del tipo "tourista". En una modalidad preferida, el mamífero es un ser humano.

Un experto en la técnica sabrá cómo preparar las composiciones que sean aceptables nutricionalmente y determinar, en función de muchos factores, el método de administración privilegiado y la cantidad que se debe administrar. Entre los factores que pueden influenciar sus elecciones están: la naturaleza exacta de los ingredientes, activos o no, que entran en la composición; la condición, la edad y el peso del mamífero, la etapa de DAA y la naturaleza del tratamiento.

De acuerdo con un aspecto, la invención propone la composición de la invención para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de DAA en un humano

De acuerdo con otro aspecto, la invención propone el uso de una cepa de bacterias lácticas para la fabricación de la composición de la invención. En una modalidad preferida, la composición además comprende la cepa de *Lactobacillus acidophilus* diferente de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* 1-1492 depositada en el CNCM. Opcionalmente, la cepa de *Lactobacillus casei* puede ser de origen comercial y se puede adquirir de los fabricantes de fermentos lácticos.

En una modalidad preferida, la composición de acuerdo con la presente invención comprende aproximadamente 50 mil millones a aproximadamente 100 mil millones micro-organismos por unidad de aproximadamente 98 g de la composición o por cápsula.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede obtener mediante la fermentación de las bacterias lácticas en un medio basado en la leche. Para este propósito, se puede utilizar el siguiente proceso.

En primer lugar, las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *casei*, I-1492, se incuban en un medio de fermentación del tipo MRS bajo 10% de CO₂ de acuerdo con un programa estándar que comprende varias etapas. La base láctea recombinada, que es parcialmente libre de lactosa y desgasificada, se pasteuriza durante 1,5 minutos a 95°C y se inoculan al 10%. Por último, se incuban de acuerdo con el siguiente programa:

1) la cepa I-1492: 2 horas a 37°C. con 10% de CO₂;

2) la cepa *acidophilus*: 2 horas a 37°C y

3) la cepa *casei*: 1 hora a 37°C

El producto luego se co-fermenta en una atmósfera anaeróbica y medio durante 15 horas a 37°C (desgasificación con CO₂).

En otra modalidad preferida, la diarrea asociada a los antibióticos se caracteriza por tres deposiciones líquidas o más, cinco deposiciones líquidas o más, o nueve deposiciones líquidas o más en un periodo de 24 horas.

Con el fin de realizar la invención, cualquiera de las cepas *acidophilus* y *casei* se puede utilizar, siempre que no presenten ningún riesgo para la salud. La concentración total de *Lactobacilli acidophilus* (incluyendo aquellos obtenidos de la cepas I-1492) que están presentes en la composición de la invención, debe ser al menos igual a 50 mil millones por unidad de 98 g de la composición y la concentración de I-1492 debe ser al menos 80% del número total de micro-organismos por unidad de aproximadamente 98 g de la composición.

Aunque el contenido total de aminoácidos es similar a la leche, los aminoácidos libres son preferiblemente significativamente mayores. El nivel de péptidos comprendidos en la composición de la invención, que tienen un peso molecular entre 1000 y 5000 Da. es alrededor del 30% y el nivel de péptidos pequeños que tienen menos de 10 residuos es aproximadamente 15%. Se conoce que tales niveles de péptidos fortalecen, de una manera sorprendente, los sistemas inmune y digestivo.

La cantidad o la concentración de bacterias lácticas que se administra a un humano o un animal, o que está presente en la composición de la invención, es una cantidad efectiva terapéuticamente. Una cantidad eficiente terapéuticamente de bacterias lácticas es la cantidad necesaria para obtener resultados positivos sin causar efectos excesivamente negativos en el huésped al cual se le administran las bacterias lácticas o la composición. En efecto, una cantidad eficiente de bacterias lácticas para prevenir DAA es una cantidad, que es suficiente para atenuar o reducir de cualquier manera los síntomas unidos a DAA. Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más administraciones, de acuerdo con un régimen. Por ejemplo, como se menciona anteriormente, una cantidad eficiente de acuerdo con una modalidad preferida de la invención es aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mil millones de bacterias en aproximadamente 98 g de la composición. En una modalidad preferida, una cantidad se puede administrar en una dosis única. De manera alternativa, también se puede administrar mediante otro régimen de acuerdo con el cual es eficiente. Sin embargo, se entiende que la cantidad exacta de bacterias lácticas o de cada uno de los componentes de la composición y la cantidad de la composición que se administra variará de acuerdo con factores tales como el tipo de DAA para prevenir, los otros ingredientes en la composición, el modo de administración, la edad y el peso del mamífero, etc...

La composición de acuerdo con la presente invención se puede presentar como una forma sólida o una líquida, usual para la administración farmacéutica o nutricional, i.e. por ejemplo formas líquidas de administración, en un gel, cápsula o cualquier otro soporte conocido para el experto en la técnica. Entre las composiciones utilizables, en una modalidad preferida, las composiciones se administran por vía oral. En el presente caso, la composición de la invención se puede administrar como forma de alimento (por ejemplo un fermento láctico) o como suplementos alimenticios. Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención se puede presentar en una variedad de formas ingeribles, tales como por ejemplo leche, yogur, cuajada, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, productos fermentados a base de soja, productos basados en cereales fermentados, polvos a base de leche y fórmulas infantiles. La composición también se puede administrar en la forma de alimento o suplementos alimenticios. Tales alimentos pueden ser concentrados de proteínas tales como aquellos utilizados en los hospitales.

En el caso de una preparación farmacéutica, el producto se puede preparar en formas, pero limitadas a cápsulas, comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales secos, suplementos orales húmedos, alimentación seca por sonda o una alimentación húmeda por sonda etc., con una cantidad de cepas de *Lactobacillus* en el rango de hasta pero no limitado a 30 mil millones, que se incorporan en estas.

La presente invención también trata un método para la prevención o tratamiento de DAA, que comprende la etapa de administración a un mamífero de una cantidad efectiva de la composición láctica de la invención. En una modalidad preferida la administración es una administración oral. En una modalidad preferida, la composición se administra a la velocidad de aproximadamente 49 g por día durante los primeros dos días y luego a la velocidad de aproximadamente 98 g por día para el siguiente periodo de al menos 10 días.

Como una medida preventiva y para el mantenimiento general del tránsito y salud intestinal, se recomienda que preferiblemente se administren aproximadamente 98 g por día de la composición de la invención. Como mantenimiento general para la salud, se recomienda que preferiblemente se administren aproximadamente 98 g, cada dos días y durante 30 días. En caso de diarrea del tipo "tourista", se recomienda que preferiblemente se administren aproximadamente 98 g dos veces al día durante 3 días seguido por aproximadamente 98 g por día durante 7 a 15 días. Para el caso de estreñimiento, se recomienda que preferiblemente se administren aproximadamente 49 g por día durante 4 días. La composición de la invención también se puede administrar a niños mayores de 12 meses a un ritmo preferido de aproximadamente 24.5 g por día y para los bebés más pequeños como un suplemento de la alimentación con biberón a un ritmo preferido de aproximadamente una cuchara de té por día.

También se describen kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, para la prevención de DAA. Los kits comprenden uno o muchos recipientes que contienen una composición de acuerdo con la presente invención. Tales kits pueden incluir adicionalmente, si se desea, uno o muchos componentes farmacéuticos convencionales como, por ejemplo, recipientes que contienen uno o muchos vehículos farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro recipiente adicional, el cual será evidente para un experto en la técnica. Un kit puede incluir ventajosamente las instrucciones en la forma de un folleto o de cualquier otro soporte impreso, indicando las cantidades de las composiciones que se administran, las instrucciones para la administración, y/o las instrucciones para mezclar los componentes.

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar el alcance del uso de la presente invención y no para limitar su alcance.

A pesar de que otros productos equivalentes o métodos equivalentes de aquellos que se encuentran en este documento para probar o realizar la presente invención se pueden utilizar, el material y los métodos preferidos se describen.

Ejemplo 1

5 **Estudio que compara la eficacia de una preparación de lactobacillus (BIO-K+) con la de un placebo en la prevención de diarrea asociada a los antibióticos**

10 El estudio descrito en este ejemplo evalúa el uso de una preparación de *Lactobacillus* en un fermento láctico en la profilaxis primaria de DAA. Por consiguiente, se realizó un estudio doble ciego, aleatorio, clínico de placebo controlado. Dos grupos se comparan en este estudio: el grupo experimental que recibe la preparación de *Lactobacillus* y el grupo control que recibe la preparación del placebo: suero desprovisto de cualquier cepa bacteriana.

Población estudiada

15 Los pacientes adultos hospitalizados en el hospital Maisonneuve-Rosemont en Montreal, QC, Canadá, que reciben un tratamiento con antibiótico por vía oral o parenteral durante un periodo estimado de un mínimo de 3 días, con excepción de una aminosida o una vancomicina en monoterapia, fueron elegibles para el estudio. Los criterios de exclusión fueron: negativa a participar, imposibilidad de obtener consentimiento, incapacidad de hablar Francés, diarrea activa, una infección por *C. difficile* en los 3 meses precedentes al reclutamiento, intolerancia confirmada a la lactosa, enfermedad intestinal inflamatoria descontrolada, y una absorción regular del probiótico. Además, pacientes que recibieron quimioterapia, radioterapia, alimentación parenteral o alimentación enteral vía una sonda nasogástrica, pacientes *nil per os*, pacientes con ostomía, pacientes con un válvula cardíaca artificial o dañada, y pacientes con un trasplante, fueron excluidos del estudio.

20 Un consentimiento por escrito fue obtenido para cada participante y fue necesaria una aprobación del médico tratante. El protocolo de investigación así como el formulario de consentimiento fueron sometidos al comité de ética del hospital y se aceptaron el 12 de Septiembre del 2003.

25 Objetivos del estudio

El principal objetivo consistió en la evaluación de la incidencia de DAA en cada uno de los dos grupos, si esta se produjo durante la hospitalización o después de que el paciente ha sido dado de alta. DAA se definió por la presencia de al menos 3 deposiciones líquidas durante un periodo de 24 horas. Con el fin de asegurar que la terapia con antibiótico fue la causa, toda otra etiología tal como el uso de un enema o laxante fue excluida. Un seguimiento fue planeado con el fin de evaluar la incidencia de DAA, 21 días después del final de la terapia con antibiótico para todos los pacientes, a menos que una DAA haya ocurrido antes de este tiempo.

35 Los objetivos secundarios pretenden evaluar la severidad de DAA, la duración de la hospitalización, y la inocuidad de la preparación del *Lactobacillus*. Para la evaluación de la severidad de la DAA, los siguientes parámetros se evaluaron: la presencia de toxina B de *C. difficile* en las deposiciones, la presencia de sangre en las deposiciones (vía un test Gaïac positivo), la presencia de fiebre, la duración de la diarrea, el número promedio de deposiciones líquidas por día durante un episodio de diarrea (agrupados en tres categorías: 3 a 4, 5 a 9 o más de 9 deposiciones líquidas por día) y el recurso a un tratamiento con antibiótico contra DAA.

40 Con el fin de evaluar la influencia de las potenciales variables de confusión, fueron documentados la edad, las indicaciones clínicas de tratamiento, la gravedad de la condición del paciente, las clases de antibióticos utilizados, la longitud de la terapia con antibiótico, el número de antibióticos recibidos, el uso de antibióticos en el mes precedente del reclutamiento o durante el periodo de post-profiláctico de seguimiento, los antecedentes de *C. difficile*, la hospitalización en una unidad de cuidados contaminada con *C. difficile*, el uso de un inhibidor de la bomba de protones, el uso de laxantes, el uso de narcóticos, la ingesta de un suplemento oral de magnesio así como el consumo de yogur. Se debe notar que los pacientes fueron advertidos de no consumir yogur durante toda la duración del estudio. La severidad de la condición del paciente se determinó mediante la incidencia de la gravedad clínica obtenida con la ayuda del sistema de clasificación "All Patient Refined Diagnosis Related Groups" (APR-DRG v12.0) utilizado por el servicio de archivo médico del HMR.

Recolección de datos y curso del estudio

50 Los potenciales sujetos se identificaron diariamente de una lista de pacientes que recibieron terapia con antibiótico. Una vez los archivos previos y actuales se revisaron, los pacientes fueron entrevistados con el fin de verificar si fueron elegibles y para obtener su consentimiento.

La asignación al azar fue realizada por la farmacia de investigación del hospital, de acuerdo con una secuencia en bloque pre-establecida. Inicialmente, la asignación al azar fue realizada en las 24 horas después del inicio de la terapia con antibiótico. Después de una enmienda al protocolo, los pacientes pueden ser aleatorios en las siguientes 48 horas al inicio de su terapia con antibiótico.

5 Después de la asignación al azar, los pacientes recibieron ya sea la preparación de *Lactobacillus acidophilus* (I-1492) y *casei*, el placebo, de acuerdo con el grupo atribuido. La dosificación utilizada fue aproximadamente 49 gramos de la preparación (1/2 taza) una vez al día durante 2 días y aproximadamente 98 gramos (1 taza) una vez al día para el siguiente día. La duración total de la profilaxis corresponde a la duración de la terapia con antibiótico. La
10 terapia con antibiótico consistió en todo el antibiótico recibido de manera consecutiva. Las preparaciones se distribuyeron por la farmacia de investigación diariamente durante la hospitalización y se administraron por la enfermera. Si el paciente fue dado de alta del hospital antes del final de la terapia con antibiótico, se le dio la cantidad de tazas necesarias para la realización de la profilaxis.

15 Durante la terapia con antibiótico, los datos relativos a la ingesta de antibióticos y al brote de DAA fueron recolectados de los archivos médicos cada tres días. Después, los datos se recolectaron en el final del tratamiento con antibiótico y el día 7, 14 y 21 post-terapia con antibiótico. Además, con el fin de evaluar la emergencia de efectos no deseados, los pacientes fueron entrevistados cinco días después de la asignación al azar (o en el tiempo de dar de alta al paciente si se presentara antes) además al último día de terapia con antibiótico. Estas modalidades de seguimiento solo aplican al periodo de hospitalización. Si el paciente fue dado de alta antes del final del
20 seguimiento, los datos se recolectaron mediante entrevistas telefónicas realizadas al final de la terapia con antibiótico y el día 7, 14 y 21 post-terapia con antibiótico. Una ayuda-recuerdo se entregó al paciente para que el/ella apuntaran la diferente información sobre la que se le va a preguntar.

25 En cualquier momento, si una DAA se produce, la profilaxis se detuvo, y el seguimiento se limitó a la evaluación de la severidad de la DAA. Si el paciente presenta una DAA después de haber salido del hospital, el/ella tuvo que contactar a uno de los investigadores y, si se juzga oportuno, el/ella se invitó a la clínica de enfermedades infecciosas del HMR para una evaluación médica y un análisis de las deposiciones.

Análisis estadístico

30 El estudio fue concebido como función de un tamaño de muestra de 120 pacientes por grupo con el fin de ser capaces de detectar una disminución del 50% en la incidencia de DAA (i.e. 30% a 15%) entre los dos grupos de tratamiento para una potencia estadística de 80% y un nivel de confianza de 95%. Este cálculo se basó en una prueba de hipótesis bilateral para la diferencia entre dos proporciones.

35 Las características de los pacientes así como las mediciones de eficiencia de severidad e inocuidad se evaluaron en las proporciones, los promedios y la desviación estándar o en la media y el intervalo intercuartiles. Las comparaciones de variables discretas entre los grupos estudiados se hicieron mediante una prueba de Khi cuadrado o una prueba exacta de Fisher. En cuanto a las variables continuas, un prueba t de Student permitió la verificación de la significación estadística de las diferencias observadas entre el grupo experimental y el control. Todos los análisis fueron bilaterales y el error tipo α utilizado fue 0.05.

40 Para cada uno de los análisis, un enfoque con el intento para tratar se utilizó con el fin de evaluar la eficiencia real de las preparaciones de *Lactobacillus*. Para ello, se consideró para el análisis el grupo de pacientes asignado al azar fue aleatorio y haber recibido al menos una dosis de la preparación estudiada. Para el objetivo primario, se realizó un segundo análisis de acuerdo con el enfoque por protocolo, con el fin de incluir solo los pacientes que han recibido un mínimo de tres dosis de la preparación con estudio, después de haber tomado al menos 75% de las dosis previstas y de haber completado el seguimiento previsto.

Resultados

45 Los expedientes de 1422 pacientes que inician una terapia con antibiótico fueron consultados con el fin de verificar su elegibilidad. De estos, 89 pacientes fueron asignados al azar. Las razones para la exclusión de los otros pacientes se describen en la figura 1. De los 89 pacientes asignados al azar, cinco pacientes no fueron contados porque no habían recibido una dosis o debido a un criterio de exclusión que ocurre después de la asignación al azar. Para los 84 participantes analizados, la duración media del seguimiento fue de 20 ± 12 días y no se observó, ninguna diferencia significativa entre los dos grupos ($p=0.53$). De ellos, 58 pacientes (69.0%) completaron el estudio tal como
50 estaba previsto por el protocolo. Se debe notar que tres pacientes del grupo de *Lactobacillus* fallecieron durante el curso del estudio. Ninguno de estos pacientes habían presentado DAA y las muertes no parecen estar directamente relacionadas con el uso de la preparación estudiada. Un diagrama de la distribución de los pacientes se presenta en la figura 1.

Veintisiete pacientes se negaron a participar en el estudio. Sus características demográficas así como la terapia con antibiótico son comparables a las de los pacientes que han aceptado participar en el estudio. Más mujeres que hombres se negaron (66.7% vs. 33.3%), pero esta distribución no es significativamente diferente de la de los pacientes que han aceptado participar ($p=0.17$).

5 Las características básicas de los pacientes son similares en los dos grupos como se describe en la tabla I. Solo el uso de β -lactaminas no se distribuye uniformemente entre los dos grupos ($p=0.02$). Por lo tanto, después de un análisis de regresión logística, esta característica no se consideró que era una variable de confusión en cuanto a la aparición de la DAA ($p=0.08$). La población estudiada tiene un promedio de 70 años de edad y fue tratada principalmente por infecciones del tracto respiratorio.

10 Los resultados relativos a la incidencia de DAA, su severidad y la duración de la hospitalización se presentan en la tabla II.

15 En cuanto al objetivo principal del estudio, 27% (23/84) de los pacientes desarrollaron DAA, i.e. 37.2% (16/34) en el grupo placebo en comparación con el 17.1% (7/41) en el grupo que recibe la preparación de *Lactobacillus*. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.04$). Sigue siendo significativa cuando el análisis se limita a pacientes que han completado el estudio tal como estaba previsto por el protocolo (53.3% (16/30) y 25.0% (7/28), respectivamente; $p=0.03$). Durante la hospitalización, el 18.6% (8/43) de los pacientes del grupo desarrollaron DAA, en comparación con el 7.3% (3/41) de pacientes que reciben la preparación del *Lactobacillus*. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.13$). De los pacientes que han sido dados de alta del hospital durante el estudio, más los pacientes desarrollaron una DAA en el grupo placebo en comparación con el grupo de *Lactobacillus*, i.e. 34.8% (8/23) y 13.8% (4/29). En este caso también, la diferencia no es significativa ($p=0.07$).

20 En cuanto a la gravedad de DAA en la lista, el número limitado de pacientes analizados limita las posibles conclusiones. Además, ciertas medidas de severidad no se realizaron para todos los pacientes. En el 65.2% de los casos de DAA, se hizo un análisis de las deposiciones con el fin de detectar la presencia de *C. difficile*. Entre todos los pacientes que han desarrollado una DAA, un resultado positivo fue obtenido para el 43.8% (7/16) de los pacientes en el grupo placebo y el 14.3% (1/7) de pacientes que recibieron la preparación de *Lactobacillus*. Esta diferencia sin embargo no es estadísticamente significativa ($p=0.051$). En el número total de pacientes analizados, 16.3% (7/43) del grupo placebo desarrollaron una infección por *C. difficile*, en comparación con el 2.4% (1/41) en el grupo de *Lactobacillus*. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p<0.05$).

25 La detección de sangre en las deposiciones mediante un test Gaïac positivo se llevó a cabo en solo el 8.7% de los pacientes que han desarrollado DAA. La temperatura corporal fue medida en el 65.2% de los pacientes que han desarrollado DAA. Para estas dos variables, no se observó ninguna diferencia significativa entre los dos grupos. La duración media del episodio de DAA no fue diferente entre los dos grupos ($p=0.85$), no más que el número de deposiciones por día ($p=0.13$). Es interesante observar que la mayoría de DAA se desarrolló después del final de la terapia con antibiótico, i.e. el 75% (12/16) en el grupo placebo y el 71.4% (5/7) en el grupo *Lactobacillus* ($p>0.99$). La demora media entre el final del tratamiento con antibiótico y la aparición de DAA no fue diferente entre los dos grupos (8.5 días (66.3) y 4.2 días (63.8) respectivamente ($p=0.18$)).

30 Entre los pacientes que han desarrollado DAA, un tratamiento con antibiótico (vancomicina *per os* o i.v. o metronidazol *per os*), administrado de una manera empírica, u objeto de una infección por *C. difficile* confirmada, se utilizó para el 81.3% (13/16) y el 42.9% (3/7) de los grupos de pacientes placebo y *Lactobacillus*, respectivamente ($p=0.14$).

35 La duración media de hospitalización de los pacientes que recibieron la preparación de *Lactobacillus* es más corta que la de los pacientes que recibieron el placebo. Esta fue de 8 días (6-14.5) para el grupo que recibe la preparación en estudio y de 10 días (9-8) para el grupo que recibió el placebo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.048$).

40 La eficacia de la preparación de *Lactobacillus* con relación a la del placebo también se comparó de acuerdo con las clases de antibióticos utilizadas (β -lactaminas, macrólidos, quinolonas y diversos antibióticos no enumerados en otras clases). Estas diferencias no son estadísticamente significantes para cada una de las clases de antibióticos. Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 2 y 3

45 En cuanto a la inocuidad del producto objeto de estudio, la incidencia de cada uno de las manifestaciones indeseadas se reporta en la tabla III, para los dos grupos. Al menos un efecto indeseado se reportó por el 48.8% de los pacientes, y este en cada uno de los dos grupos. En cuanto a la incidencia de pacientes que han suspendido después de la manifestación de un efecto indeseado, no difieren de un grupo a otro (20.1% (9/43) en el grupo placebo y 9.8 (4/41) en el grupo de *Lactobacillus*; $p=0.15$).

Discusión

Aunque muchos estudios han evaluado la eficiencia de probióticos en la prevención primaria de DAA, son pocos los datos clínicos concluyentes disponibles y los resultados obtenidos hasta la fecha son mixtos (Siitonen et al., 1990; Cremonini, et al., 2002; Thomas et al., 2001; Tankanow et al., 1990; Armuzzi, et al., 2001; McFarland et al., 1995; Surawicz et al., 1989; Arvola et al., 1999; Adam et al., 1977; Gotz et al., 1979; Lewis et al., 1998). En ciertos estudios, una disminución en la severidad de DAA o un retraso en su aparición se han observado sin estar necesariamente relacionados con una disminución significativa de su incidencia (Siitonen et al., 1990; McFarland et al., 1995; Arvola et al., 1999; Vanderhoof et al., 1999). Además, se presentaron vacíos importantes en relación con la duración del seguimiento, de las definiciones de DAA utilizada, de las características de los pacientes reclutados o de los antibióticos incluidos en los estudios (Lewis et al., 1998; Surawicz et al., 1989; Stoddart et al., 2002). La duración de la profilaxis (5-21 días) y la dosis utilizada también fueron muy variables (D'Souza et al., 2002).

Además, la mayoría de los estudios publicados utilizan probióticos liofilizados en la forma de una cápsula y diferentes cepas se evalúan. Sin embargo, es importante mencionar que todos los probióticos no actúan de la misma manera y que pueden tener diferentes eficiencias clínicas. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios no deben ser considerados válidos para las diferentes cepas de las evaluadas en estos ensayos (Cremonin et al., 2002; D'Souza et al., 2002). A día de hoy, ningún estudio publicado ha evaluado la eficiencia de la combinación utilizada en este estudio, i.e. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* I-1492 y *Lactobacillus casei*.

En el presente Ejemplo, diferentes parámetros se estudiaron con el fin de remediar ciertos vacíos observados en los estudios enumerados anteriormente. Por lo tanto, se utilizó una definición objetiva y reproducible de DAA, i.e. la presencia de tres deposiciones líquidas o más por 24 horas. Esta definición deja poco margen a la interpretación por el paciente, el personal de atención y los investigadores. Adicionalmente, la duración de la profilaxis, establecida de acuerdo con la duración de la terapia con antibiótico es una estrategia que ofrece una protección equivalente para todos los pacientes, contraria a una duración fija.

En el presente Ejemplo, el uso de un fermento láctico enriquecido con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* I-1492 y *casei* de aproximadamente 98 gramos (1 taza) una vez al día (aproximadamente 49 gramos en los primeros dos días) mostró ser eficaz en la prevención primaria de DAA. Aunque el tamaño de la muestra inicialmente determinada previó la asignación al azar de 240 pacientes, una diferencia estadísticamente significativa se podría observar entre los dos grupos con una muestra limitada a 84 pacientes. Esta observación se puede explicar, entre otras cosas, por la marcada incidencia de DAA durante el estudio (37.2% en el grupo placebo), probaron mayor del 30% predicho en el cálculo del tamaño de muestra. Esta incidencia está entre las más altas de las reportadas en la literatura, que coincide, entre otras cosas, con el aumento del número de casos de DAA de *C. difficile* observado durante el curso de estos últimos años.

Se debe mencionar que el 52.1% (12/23) de DAA ocurrió en casa. Por lo tanto, el seguimiento posterior al alta del paciente fue necesario para asegurar una evaluación más completa del riesgo real de DAA. Un seguimiento en casa es igualmente pertinente en el contexto actual de la vuelta ambulatoria en los sistemas para el cuidado de la salud, donde se acorta la duración de la hospitalización. Es útil para alertar los pacientes ya que las complicaciones que pueden ocurrir en casa eventualmente tienen repercusiones en el medio hospitalario.

Un seguimiento post-antibiótico fue particularmente importante ya que casi el 75% de la DAA observada ocurrió después de la terapia con antibiótico, y esto en los dos grupos. Aunque DAA puede ocurrir hasta 6 semanas después del final de la terapia con antibiótico, el seguimiento post-antibiótico se limitó a 3 semanas ya que la última diarrea se produce, la más podría estar asociada a otra etiología (McFarland et al., 1995; Arvola et al., 1999). Se debe señalar que el alcance de los datos para el retraso de la aparición de DAA después de la terapia con antibiótico fue mayor en los dos grupos: 1 a 20 días en el grupo placebo y 2 a 11 días en el grupo *Lactobacillus*. Como tal, es posible que ciertos casos de DAA no se detectaran, si ocurrieron más de 21 días después del final de la terapia con antibiótico.

El promedio de 20 días de duración del seguimiento, incluyendo la duración de la terapia con antibiótico, puede parecer sorprendente ya que se considera menor que el seguimiento previsto de la terapia post-antibiótico de 21 días. Esto se puede explicar por el hecho que para el 21% de los pacientes, el seguimiento previsto no se completó (abstinencia, pérdida del seguimiento, muerte o incumplimiento del protocolo). También, el seguimiento fue más corto cuando hubo una presentación apresurada de DAA.

El desarrollo de una DAA por *C. difficile* es un parámetro de severidad importante para tener en cuenta las implicaciones clínicas y económicas, que se asocian a esta. Además, es interesante observar que la composición en estudio disminuye significativamente la incidencia de DAA por *C. difficile*. En la literatura, se reporta que las infecciones debidas a *C. difficile* representan del 10 al 20% de todos los casos de DAA (D'Souza et al., 2002; Gaynes et al., 2004). En el contexto actual del brote de infecciones por *C. difficile* en el medio hospitalario, los resultados del estudio sugieren más bien una proporción del 50%, tales como aquellos observados en el grupo

placebo. Aunque este valor se puede sobreestimar dado el número bajo de pacientes en el estudio, esta proporción probablemente es más cercano a la realidad actual.

5 La duración de la hospitalización fue más corta en el grupo de *Lactobacillus*. Esta observación se explica por la eficiencia de la preparación de *Lactobacillus* para disminuir la incidencia de DAA. Sin embargo, el posible impacto de la gravedad de la condición médica básica de los pacientes se debe considerar. En efecto, aunque no fue significativamente diferente entre los dos grupos, se observa que el grupo de grupo de *Lactobacillus* incluye menos casos de extrema gravedad y más casos de baja gravedad que en el grupo placebo.

10 Muchos pacientes presentaron al menos un efecto indeseado, i.e. el 48.8% en cada uno de los dos grupos, la mayoría de los cuales afectaron el sistema gastro intestinal. Esta incidencia es alta, pero ningún efecto indeseado serio se declaró. No obstante, un número no-despreciable de pacientes se retiraron después de la aparición de efectos no deseados. Estos datos sugieren un potencial problema de observancia, durante el curso del estudio así como durante el ulterior uso de la preparación en la práctica común. También, es sorprendente observar como una alta incidencia en manifestaciones indeseadas en el grupo placebo. Sin embargo, se debe considerar que el placebo fuera suero que tiene un gusto particular y que el uso se puede asociar con problemas de digestión.

15 En conclusión, un fermento láctico enriquecido con una combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* CNCM I-1492 y *casei* por 98 gramos por día permitió la reducción de incidencia de DAA en 84 pacientes adultos hospitalizados que recibieron una terapia curativa de antibiótico. La preparación de *Lactobacillus* también permitió una disminución significativa de la duración de la hospitalización. Muy pocos pacientes fueron asignados al azar con el fin de detectar un efecto de la preparación en la severidad de la DAA. La incidencia de *DAA por C. difficile* fue inferior en el grupo tratado.

Ejemplo 2

Eficacia de los probióticos en la resolución de un brote de colitis severa por *Clostridium difficile* en el centro hospitalario Pierre-le Gardeur

Introducción:

25 La colitis por *Clostridium difficile* es una infección nosocomial frecuente en el centro hospitalario Pierre-le Gardeur (región de Montreal, Quebec, Canadá). En efecto, durante el año fiscal 2002-2003, la incidencia fue 9.5 casos/1000 admisiones. Sin embargo, estas infecciones, incluso las recurrentes, no presentaron ninguna severidad y respondieron a un tratamiento estándar de metronidazol o vancomicina oral.

30 Entre Agosto y Octubre de 2003, hubo casi un aumento del 50% en la incidencia de casos de infección nosocomial con una severidad y una mortalidad rara vez encontrada con este tipo de patología. Adicionalmente, la respuesta al tratamiento usual a veces fue lento, e incluso sin efecto.

35 En Noviembre de 2003, una serie de medidas para contrarrestar la situación se tomaron. Los pacientes infectados se aislaron como una cohorte con personal dedicado. Además, se realizó un mantenimiento más riguroso del hospital, con desinfección de los baños, los suelos y las paredes principalmente en los cuartos donde residían los pacientes con diarrea. También, el equipo médico fue desinfectado entre usos con cada uno y todos los pacientes (brazaletes, cuencos de mezcla a mano, etc.). Los antibióticos se continuaron (cefalosporinas de 2ª y 3ª generación) y la moxifloxacina se retiró. En efecto, este antibiótico se implicó en el 35% de los casos entre Agosto y Octubre de 2003 (15% cuando se utiliza solo). Posteriormente, hasta el 5.6% de pacientes que tomaron moxifloxacina desarrollaron colitis por *C. difficile* (2.2% cuando se utiliza sola). En comparación, el 4.6% de los pacientes tratados con cefalosporinas de 2a y 3a generación sufrieron de colitis (1.2% si se utilizan solas) y solo el 0.9% de los tratados con clindamicina se afectaron (0.4% cuando se utilizan sin asociación). Esta asociación entre las quinolonas y la colitis pseudomembranosa se ha descrito en publicaciones recientes (Gaynes et al., 2004 and McCusker et al. 2003).

45 A pesar de estas medidas, la incidencia progresó. Por consiguiente, el 1 de Febrero de 2004, los probióticos se administraron a todos los pacientes sometidos a terapia con antibiótico. La disminución de la incidencia de casos graves de colitis por *C. difficile* fue el objetivo principal.

Metodología:

50 El Centro Hospitalario Pierre-Le Gardeur es un hospital no-universitario de 250 camas. Sin embargo, desde el 16 de Abril de 2004 el centro hospitalario se ha trasladado a un nuevo edificio de 284 camas. El estudio se realizó entre el 1 de Febrero de 2004 y 31 de Agosto de 2004. Debido a los numerosos paros en los servicios durante el traslado, la incidencia de *C. difficile* durante los meses de Abril no se consideró en el estudio.

Todos los pacientes, los hospitalizados y los sometidos a terapia con antibiótico con observación en la sala de urgencia, recibieron un probiótico durante el periodo de un mes. El probiótico utilizado fue el Bio-K+ (International Inc.). Este producto contiene *Lactobacillus acidophilus* (I-1492), que es una cepa de origen humano, caracterizada en el Instituto Pasteur. El producto existe como dos formas: como un producto fresco de aproximadamente 98 g de la composición que contiene aproximadamente 50 mil millones de bacterias y como una cápsula que contiene aproximadamente 30 mil millones de bacterias. La dosificación utilizada fue la de un frasco de aproximadamente 98 g por día (administrado durante los meses de Febrero y Marzo de 2004) o de 2 cápsulas por día (administradas al principio de Mayo de 2004). El probiótico fue distribuido por la Farmacia del hospital. Una prescripción permanente fue realizada con el fin de asegurar el inicio rápido del tratamiento con probiótico cuando comienza la terapia con antibiótico.

La incidencia se calculó cada mes mediante el reporte del número de nuevos casos nosocomiales por 1000 admisiones. Los casos nosocomiales se determinaron de acuerdo con el criterio de la CDC en Atlanta (Garner et al. 1988). Sin embargo, los pacientes que han recibido terapia con antibiótico y quienes se mantuvieron en observación en la sala de urgencia sin necesidad de ser hospitalizados durante 3 días y más, también fueron incluidos en el estudio. Los casos recurrentes solo se tabularon una vez. Adicionalmente, los casos nosocomiales se subdividieron de acuerdo con su severidad. La severidad se definió por la presencia de al menos uno de los siguientes: requisito para cuidado intensivo, choque séptico, megacolon tóxico, necesidad de una colectomía, respuesta lenta o ausente al tratamiento (> 48 horas) y mortalidad.

La detección de la toxina A/B de *C. difficile* se hizo con una prueba de ELISA de la compañía R-Biopharm (Ridascreen™). Las pruebas se realizaron cinco veces al día en una muestra de deposiciones sin conservantes.

La observancia del tratamiento por los pacientes sometidos a terapia con probióticos (producto fresco solo) fue analizada durante tres días durante el mes de Marzo de 2004. A los pacientes que no habían observado el tratamiento se les preguntó por qué no lo observaron. Este análisis no se realizó por los pacientes tomando las cápsulas ya que no se observó ningún problema con respecto al producto. El cumplimiento del tratamiento por los pacientes en la comunidad no se verificó, pero una prescripción se dio al paciente después de darse del alta.

Resultados:

Un número total de 2544 pacientes recibieron el probiótico entre el 1 de Febrero y el 31 de Agosto de 2004. Los resultados se resumen en la figura 4.

La incidencia promedio de los casos graves durante el brote fue 7.7 casos /1000 admisiones (entre Agosto de 2003 y Enero de 2004). Después del primer mes del estudio, la incidencia se redujo a 2.6 casos/1000 admisiones (una disminución del 66%). Además, desde Marzo de 2004, ya no había casos graves. Hubo 10 casos de mortalidad directa entre Agosto 2003 y Enero 2004. Un paciente fue sometido a una colectomía total en Noviembre de 2003. El último caso de mortalidad se remonta a Enero de 2004. La incidencia total también había disminuido. En efecto, la incidencia actual (2.1 casos/1000 admisiones) es 78% menos de lo que era antes del brote (9.5 casos /1000 admisiones). No se declaró ningún nuevo caso en aislamiento para *C. difficile* desde el 11 de Agosto de 2004.

En cuanto al cumplimiento, 201 observaciones se hicieron durante 3 días. Una tasa de cumplimiento del 66% para el producto fresco se registró. 23% de los pacientes que estaban bajo observación se negaron a tomar el probiótico y el 11% lo tomó parcialmente. La principal razón para la falta de cumplimiento para el tratamiento fue el sabor del producto (incluso para el producto con sabor a frutas).

El costo anual estimado de las cápsulas es de CAN \$10 000.00, mientras que el costo del producto fresco es alrededor de CAN \$25 000.00.

Discusión:

Se probó que el uso de probióticos (*Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii*) era eficiente en la prevención primaria de diarrea asociada a los antibióticos. Un meta-análisis reciente menciona esto (D'Souza et al. 2002). El principio es reconstituir la flora intestinal destruida en parte por la terapia con antibiótico.

El uso masivo de probióticos en el Centro Legardeur ha arrojado resultados muy rápidos. En efecto, a pesar de una mejora de la higiene ambiental, fue imposible controlar el brote. Esto se puede explicar por el hecho que la ubicación antigua del Centro fue difícil de mantener. Había pocos baños y un importante número de pacientes que se encontraban en los pasillos de las salas de emergencia y de las diferentes unidades. La otra explicación es que la masa crítica de los pacientes infectados o colonizados con los que la cepa de *C. difficile* particular se había vuelto muy importante.

5 El nuevo centro hospitalario presenta una cierta ventaja en el nivel de la limpieza del ambiente. En efecto, 70% de las habitaciones son habitaciones individuales, cada una equipada con un cuarto de baño. Las otras habitaciones se concibieron para dos pacientes y también están provistos con una instalación de cuarto de baño. Ninguna habitación puede acomodar cuatro pacientes. Tampoco, no hubo más pasillos en la sala de urgencias. A pesar de estas mejoras, es importante observar que los casos nosocomiales de *C. difficile* ya habían empezado a disminuir de manera significativa dos meses después del traslado.

A pesar de una comparación retrospectiva en este estudio para determinar la eficacia de los probióticos, el rápido control de este brote grave y el costo reducido de esta medida son elementos que los hospitales deben considerar seriamente ante esta problemática.

10

TABLA I Características básicas de 89 pacientes asignados al azar*

Características	Placebo (N=45)	Preparación del Lactobacillus (N=44)	valor p
Edad media (años)	72,9 ± 13,5	68,8 ± 14,5	0,14
número(s) de antibiótico media	2,4 ± 1,2	2,0 ± 1,0	0,13
Duración media de antibioterapia (días)	9,8 ± 4,4	8,8 ± 3,7	0,29
Duración media bajo profilaxis (días)	7,3 ± 4,3	7,6 ± 4,3	0,74
Hombres	23 (51,0)	20 (45,5)	0,59
Indicaciones clínicas			
Infeción respiratoria	41 (91,1)	40 (90,9)	0,97
Otras infecciones [§]	4 (8,9)	4 (9,1)	
Categorías de antibióticos			
β-lactaminas ^{&}	30 (66,7)	18 (40,9)	0,02
Macrólidos	25 (55,6)	27 (61,4)	0,58
Quinolonas	28 (62,2)	25 (56,8)	0,60
Diferentes	6 (13,3)	6 (13,6)	0,97
Índice de gravedad clínica (APRDRG)*			
1- Bajo	2 (4,7)	6 (15,8)	0,14
2- Moderado	20 (46,5)	18 (47,4)	0,94
3- Alto	14 (32,6)	13 (34,2)	0,88
4- Extremo	7 (16,3)	1 (2,6)	0,06
Hospitalización en una unidad contaminada con <i>C. difficile</i>	34 (75,6)	30 (68,2)	0,44
Antecedentes de <i>C. difficile</i>	4 (8,9)	2 (4,5)	0,68
Antecedentes de DAA	9 (20,0)	8 (18,2)	0,83
Uso de IBP	18 (40,0)	15 (34,1)	0,56
Uso de suplemento oral con magnesio	2 (4,4)	2 (4,5)	>0,99
Uso laxativo(s)			
Ninguno	30 (66,7)	34 (77,3)	
Ocasionalmente	5 (11,1)	5 (11,4)	0,39
Regularmente	10 (22,2)	5 (11,4)	

(continuación)

Características	Placebo (N= 45)	Preparación del Lactobacillus (N=44)	valor p
Uso de narcótico(s)			
Ninguno	31 (68,9)	32 (72,7)	
Ocasionalmente	9 (20,0)	10 (22,7)	0,51
Regularmente	5 (11,1)	2 (4,5)	
Consumo de yogur	9 (20,0)	5 (11,4)	0,26
Antibioterapia en el mes anterior a asignación al azar	9 (20,0)	9 (20,5)	> 0,99
*: los datos se presentan como número de pacientes (porcentaje) o como \pm la desviación estándar media; DAA : diarrea asociada con antibióticos; IBP: inhibidor de la bomba de protones			
§: incluyen : infecciones urinarias, infecciones de tejidos limf y de la piel; & : incluyen penicilinas y cefalosporinas; ¥ : 8 faltantes de resultados (grupo placebo: n=2, grupo lactobacillus: n=6)			

Tabla II: Incidencia y severidad de DAA y duración de la hospitalización*

	Placebo (N= 43)	Preparación del Lactobacillus (N=41)	Valor p
Incidencia de DAA			
DAA	16 (37,2)	7 (17,1)	0,04
Ocurrió durante hospitalización	8/43 (18,6)	3/41 (7,3)	0,13
Ocurrió en casa	8/23 (34,8)	4/29 (13,8)	0,07
Severidad de DAA			
Presencia de toxina <i>C. difficile</i>	7/43 (16,3)	1/41 (2,3)	<0,05
Sangre en las deposiciones			
Prueba Gaïac positiva	2/16 (12,5)	0/7 (0)	>0,99
Fiebre	2/16 (12,5)	1/7 (14,3)	0,83
Duración media de DAA (días)	4,6 \pm 3,6	5 \pm 4,4	0,85
Número medio de deposiciones líquidas [¥]			
3 a 4	7/16 (43,8)	3/7 (42,9)	0,13
5 a 9	7/16 (43,8)	2/7 (28,6)	
>9	2/16 (12,5)	0/7 (0)	
DAA que necesita tratamiento	13/16 (81,3)	3/7 (42,9)	0,14
Duración de la hospitalización			
Mediana de duración	10 (8-19)	8 (6-14,5)	0,048

(continuación)

*: los datos se presentan como número de pacientes (porcentaje), como \pm desviación estándar media o como mediana (intervalo intercuartil)

¥: 2 faltantes de resultados en el grupo lactobacillus

TABLA III: Efectos indeseables reportados durante el estudio*

	Placebo (N=43)	Preparación del Lactobacillus (N=41)
Presencia de al menos un efecto indeseable-- nb. (%)	21 (48,8)	20 (48,8)
Reblandecimiento de las deposiciones	9 (20,1)	8 (19,5)
Mal sabor	7 (16,3)	6 (14,6)
Calambres adicionales	5 (11,6)	4 (9,8)
Distensión	3 (7,0)	3 (7,3)
Nauseas	4 (9,3)	0
Reflujo gastro-esófago	2 (4,7)	2 (4,9)
Color de la deposición modificado	2 (4,7)	1 (2,4)
Estreñimiento	1 (2,3)	2 (4,9)
Flatulencia	1 (2,3)	2 (4,9)
Regurgitación	1 (2,3)	0
Olor pútrido de la deposición	1 (2,3)	0
Erupción cutánea	1 (2,3)	0
Pruritu	0	1 (2,4)
Efecto indeseable que conduce a la recuperación del estudio --- nb. (%)	9 (20,1)	4 (9,8)
*No se ha detectado diferencia estadística entre los dos grupos para cada variable		

5

Referencias

1. Högenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, et al. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998; 27: 702-10.
2. Miller MA, Hyland M, Ofner -Agostini M, et al. Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhea in Canadian hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002 Mar;23(3) :137-40.
3. Dionne J-Y. Les probiotiques, bien plus qu'un yogourt! L'actualité pharmaceutique 2003; 11 (3) : 32.
4. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, et al. A. Effect of Lactobacillus GG yoghurt in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. Ann Med 1990; 22: 57-9.

10

5. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1461-67.
6. Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 : 1124S-30S.
- 5 7. Lewis SJ, Freedman AR. Review article : the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998 ;12 :807 -22.
8. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea : meta-analysis. *BMJ* 2002; 324: 1361.
9. Isolauri E. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1142S-6S.
- 10 10. Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases : A modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1567 - 76.
11. Thomas MR, Litin SC, Osmon DR, et al. Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2001 Sep; 76(9):883-9.
- 15 12. Tankanow, RM, Ross MB, Ertel IJ, et al. Double blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhoea. *DICP* 1990; 24: 382-4.
13. Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, et al.. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169.
- 20 14. McFarland L, Surawicz CM, Greenberg RN, et al. Prevention of β -lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90 (3): 439-48.
15. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, et al. Prevention of antibiotic associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterology* 1989; 96: 981-8.
16. Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, et al. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections : a randomized study. *Pediatrics* 1999; 104(5) :A64 (Abstract).
- 25 17. Adam J, Barret A, Barret-Bellet C. Essais cliniques contrôlés en double insu de l'Ultra-levure lyophilisée: etude multicentrique par 25 médecins de 388 cas. *Gaz Med Fr* 1977; 84: 2072-8.
18. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, et al. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhoea with a lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979; 36: 754-7.
- 30 19. Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. The lack of therapeutic effect of *S. boulardii* in the prevention of antibiotic related diarrhoea in elderly patients. *J Infect* 1998; 36: 171-4.
20. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, et al. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J Pediatrics* 1999; 135: 564-8.
21. Stoddart B, Wilcox MH. *Clostridium difficile*. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15 : 513-18.
- 35 22. Gaynes R, Rimland D, et al. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: Association with gatifloxacin use. *Clin. Infect Dis* 2004; 38 : 640-5.
23. McCusker ME, Harris AD, et al. Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Emerg. Infect Dis* 2003; 9: 730-3.
24. Garner JS, Jarvis WR, et al. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-40.
- 40 25. Bergogne-Bérézin E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 521-26.

26. McFarland LV. Facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques. *Ann Med interne* 1998; 149(5):261-6.

27. Spencer RC. The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chem* 1998; 41(Suppl C):21-7.

5 28. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 346(5) : 334.

29. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 1769-75.

30. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY et coll.. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320: 204-10

10

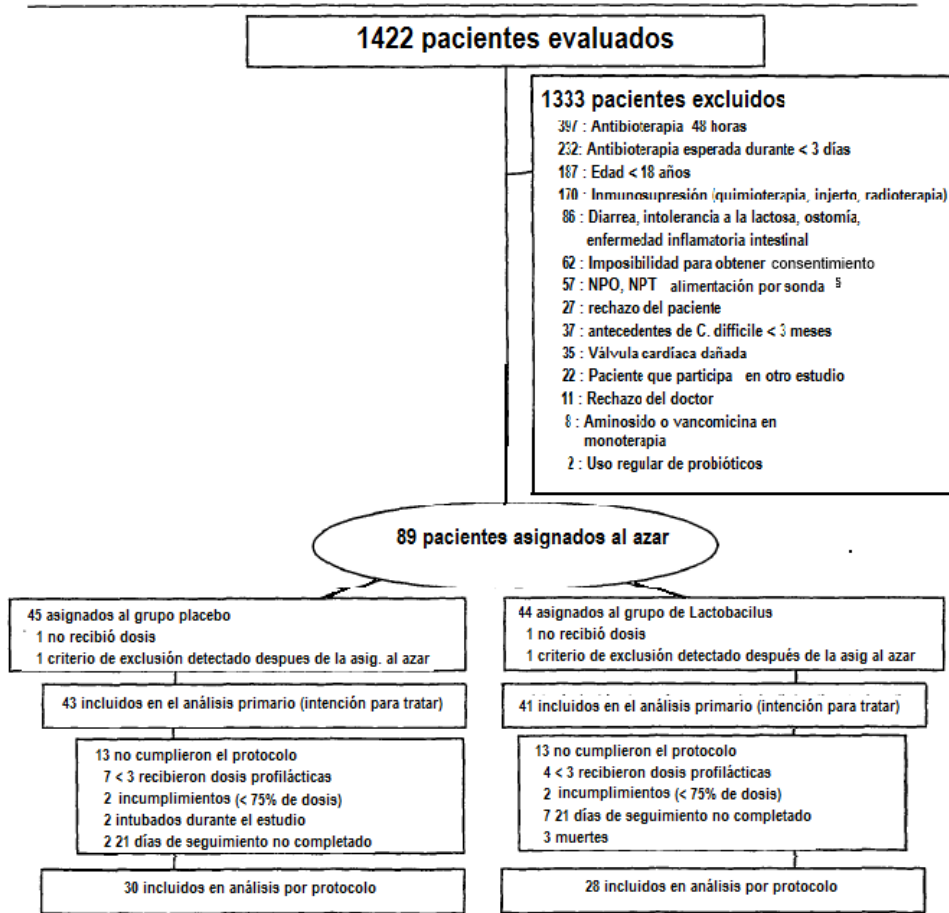
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende la cepa *Lactobacillus acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM y una cepa *Lactobacillus casei* para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos en un humano, **caracterizada porque** la diarrea asociada a los antibióticos se causa por una infección por *Clostridium difficile*.
2. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de la reivindicación 1, en donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la diarrea asociada a los antibióticos se **caracteriza por** tres deposiciones líquidas o más, cinco deposiciones líquidas o más, o nueve deposiciones líquidas o más en un periodo de 24 horas.
4. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición es ingerible.
- 15 5. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha composición es un alimento o un suplemento alimentario.
- 20 6. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una cepa *Lactobacillus acidophilus* diferente de la *Lactobacillus acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM.
- 25 7. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** esta comprende al menos aproximadamente 50 mil millones de una población de microorganismos vivos y activos de la cepa *Lactobacillus acidophilus* hasta aproximadamente 120 días bajo refrigeración en aproximadamente 98 gramos de la composición o por cápsula o comprende al menos 100 mil millones de una población de micro-organismos vivos y activos de la cepa *Lactobacillus acidophilus* hasta 90 días bajo refrigeración, cuando al menos aproximadamente 80% de dichos microorganismos son de la *Lactobacillus acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM.
- 30 8. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** esta comprende aproximadamente 50 mil millones a aproximadamente 100 mil millones de bacterias en aproximadamente 98 gramos de la composición o por cápsula.
- 35 9. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de la reivindicación 8, en donde la composición es para administrar en una sola dosis.
10. La composición para utilizar en un método para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el humano se trata con un antibiótico de amplio espectro.
- 40 11. Uso de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* I-1492 depositada en el CNCM y una cepa de *Lactobacillus casei* para la fabricación de una composición para la prevención o tratamiento de la diarrea asociada a los antibióticos en un humano, **caracterizada porque** la diarrea asociada a los antibióticos se causa por una infección por *Clostridium difficile*.
12. El uso de la reivindicación 11, con las características como se definen por cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizada porque** la prevención o tratamiento comprende la etapa de administración a un humano de una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
14. El uso o composición para utilizar en un método para la prevención como tratamiento de diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 o 13, **caracterizada porque** dicha composición se administra por vía oral.

15. El uso o composición para utilizar en un método para la prevención como tratamiento de diarrea asociada a los antibióticos de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizada porque** la administración oral es 49 g/día de la composición durante dos (2) días y 98 g/día después de dichos dos (2) días.

5 16. El uso o composición para utilizar en un método para la prevención como tratamiento de diarrea asociada a los antibióticos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho humano es un paciente hospitalizado.

Figura 1 : Distribución de los pacientes



* : inicialmente, ≥ 24 horas

§: NPO : *nil per os*; TNP : nutrición parenteral total

Figura 2
Incidencia de DAA en relación con la categoría de antibiótico recibido

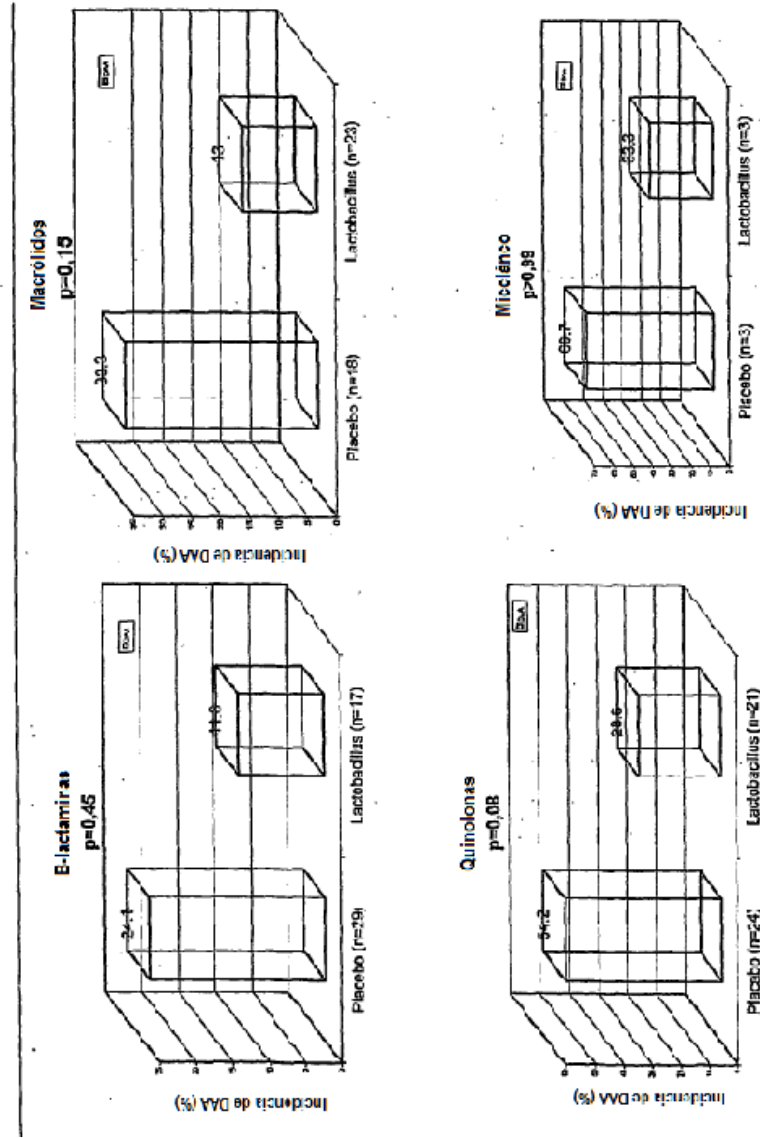


Figura 3 Resultados del estudio descrito en el Ejemplo 1

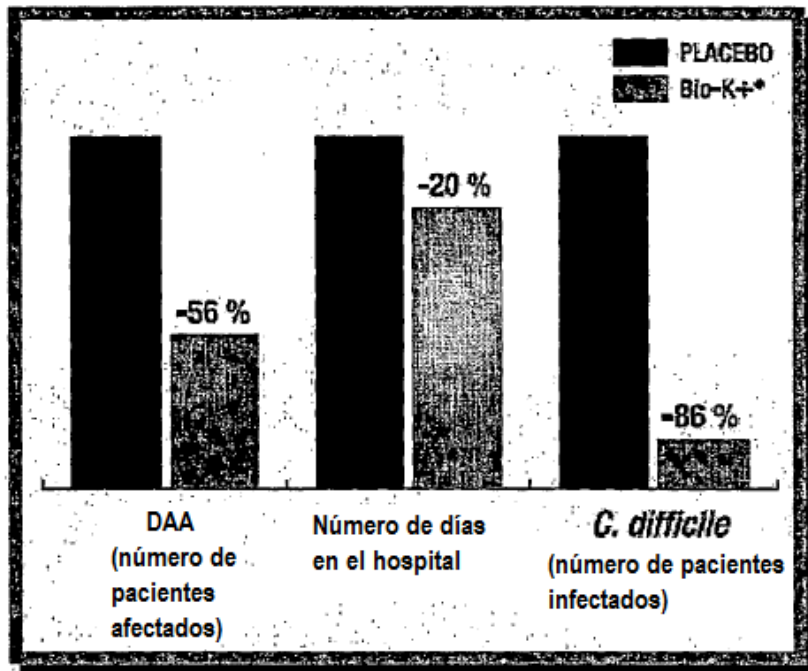


Figura 4 número de casos nosocomiales / 1000 admisiones en Legardeur

