

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 162**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A23K 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2003 E 03759588 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1545216**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir el crecimiento de patógenos**

30 Prioridad:

**01.10.2002 US 319587 P**

**18.10.2002 US 273141**

**06.11.2002 US 288437**

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

**21.10.2013**

73 Titular/es:

**NUTRITION PHYSIOLOGY COMPANY, LLC  
(100.0%)**

**702 N. QUINN STREET, SUITE C  
GUYMON, OK 73942, US**

72 Inventor/es:

**GARNER, BRYAN y  
WARE, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 426 162 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

Composiciones y métodos para inhibir el crecimiento de patógenos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y usos para inhibir el crecimiento de patógenos. De forma más específica, la invención se refiere a composiciones y usos para inhibir el crecimiento de patógenos mediante el uso de microorganismos productores de ácido láctico tanto solos y en combinación con microorganismos que utilizan lactato.

**Antecedente de la técnica**

La ingestión de patógenos, especialmente patógenos bacterianos, pero que incluyen virus y otros microorganismos productores de enfermedades, es un problema común de la mayoría de animales. Se sabe que los patógenos producen enfermedades en animales que tienen una amplia gama de efectos perjudiciales que incluyen pérdida de peso, diarrea, calambres abdominales, e insuficiencia renal. Para animales que están inmunosuprimidos o desnutridos, incluso hasta los efectos de la diarrea pueden ser fatales. Los patógenos se transfieren a menudo entre animales cuando existen malas condiciones higiénicas, y algunas veces no se puede evitar la comunicabilidad incluso aunque se tenga el mayor cuidado. La solución más común a este problema ha sido proporcionar antibióticos a los animales; sin embargo, la solución no solamente es muy costosa, sino que también puede dar como resultado la generación de cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

Se originan riesgos para la salud extremadamente importantes cuando los seres humanos consumen patógenos en productos alimenticios contaminados tales como, por ejemplo, brotes, lechuga, productos cárnicos, leche y zumos sin pasteurizar, y agua contaminada con aguas residuales. El problema es particularmente prevalente en la industria de la carne de ternera y en la industria láctea. Los patógenos presentes en la ubre de la vaca o en un equipo de ordeño pueden abrirse camino hasta llegar a la leche cruda. La carne puede quedar contaminada durante la matanza, y los organismos patógenos se pueden mezclar con grandes cantidades de la carne cuando esta se pica. Cuando los seres humanos comen carne, especialmente ternera picada, que no se ha cocinado suficientemente para matar cualquiera de los patógenos presentes en la ternera, se pueden ocasionar graves infecciones con riesgo para la vida. Esto es un problema difícil de resolver debido a que la carne contaminada tiene frecuentemente un aspecto y un olor perfectamente normales. Además, el número de organismos patógenos necesarios para producir la patología es extremadamente pequeños haciendo de esta manera la detección extraordinariamente difícil.

Los patógenos que producen enfermedades en el tracto intestinal se conocen como enteropatógenos. Los ejemplos de bacterias enteropatógenas, o enterobacterias incluyen *Staphylococcus aureus*, cepas concretas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella spp.* Mientras que la mayoría de los cientos de cepas de *E. coli* no son perjudiciales y viven en los intestinos de los animales, incluyendo los seres humanos, algunas cepas, tales como *E. coli* O157:H7, O111:H8, y O104:H21 producen grandes cantidades de poderosas toxinas del tipo shiga, que están estrechamente relacionadas o son idénticas a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Estas toxinas pueden producir perturbaciones graves en el intestino delgado, produciendo a menudo lesiones en el revestimiento del intestino y dando como resultado casos extremos de diarrea. *E. coli* O157:H7 puede producir también colitis hemorrágica aguda, caracterizada por calambres abdominales graves y sangrado abdominal. En niños, esto puede progresar hasta el raro pero fatal trastorno denominado síndrome urémico hemolítico ("HUS", por sus siglas en inglés), caracterizado por insuficiencia renal y anemia hemolítica. En adultos, esto puede progresar a una dolencia denominada púrpura trombocitopénica trombótica ("TTP"), que incluye HUS más fiebre y síntomas neurológicos y puede tener un índice de mortalidad tan alto como un cincuenta por ciento en las personas mayores.

La reducción del riesgo por enfermedad debido a los patógenos que se transmiten a través de los alimentos se puede conseguir mediante el control de los puntos de potencial contaminación. La industria productora de carne de ternera ha reconocido la necesidad de investigar el control de los patógenos previo a la obtención de la carne, particularmente *E. coli* O157:H7, debido a la potencial contaminación por escorrentías, el contacto con seres humanos, y la transferencia de patógenos durante el procesamiento de la carne. En particular, se ha implicado a la hamburguesa cruda o poco cocinada (ternera picada) en muchos brotes documentados que contenían *E. coli* O157:H7.

De acuerdo con esto, existe una reconocida necesidad de composiciones y métodos para reducir o eliminar el crecimiento de enteropatógenos tales como *E. coli* O157:H7 para conseguir beneficios sanitarios en animales. Además, existe una importante necesidad de reducir o eliminar el crecimiento de enteropatógenos en los animales productores de carne y leche antes de su recogida para el beneficio de los consumidores. Mediante dicha reducción o eliminación en los animales destinados para alimentación, los consumidores de carne de ternera, leche y otros productos alimentarios estarán mejor protegidos del riesgo de consumir dichos patógenos.

65

### Divulgación de la invención

Puesto que se sabe que los patógenos habitan muchas zonas distintas de los tractos digestivos de los animales, se ha encontrado que lo más beneficioso es suministrar y potenciar aquellos organismos que se producen naturalmente en aquellas zonas en que son eficaces para inhibir el crecimiento patogénico a través del tracto digestivo, tal como el rumen, el intestino delgado, y el intestino grueso. La presente invención identifica dichos organismos que se producen naturalmente que son adecuados para servir a este fin y demuestra métodos para potenciar sus poblaciones y eficacia. Los microorganismos incluidos en las formulaciones y métodos de los presente inventores pueden producir individual y colectivamente compuestos que inhiben el crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal ("TGI") de los animales. Inhibiendo el crecimiento de los patógenos, los métodos y compuestos de la invención proporcionan una probabilidad reducida de productos alimenticios contaminados resultantes de los animales tratados.

La invención aprovecha la competición natural de determinados microorganismos con los organismos patógenos cuya reducción o destrucción es el objeto de la invención. Los microorganismos incluidos en las formulaciones de la invención pueden presentar modos multifacetados de acción. Esta gama de acciones proceden de acciones complejas tales como actuar como o producir bactericidas a la mera competición con el patógeno utilizando más nutrientes y espacios de unión que los patógenos, evitando de esta manera que lleguen a establecerse en el TGI. Estos modos de acción ventajosos pueden compararse con técnicas menos ventajosas conocidas convencionalmente por conseguir dichos efectos utilizando una estabulación aséptica acompañada por la adición de antibióticos y sustancias similares para la alimentación animal.

En el modo de acción competitivo, particularmente de *Lactobacillus acidophilus*, que incluye la cepa 381-IL-28 (también conocida como y denominada en todas partes como la cepa LA51 y NPC747), los microorganismos recrecen y sobrepasan la población de *E. coli* O157:H7, actuando por tanto como un inhibidor de este patógeno. Se entiende que *E. coli* O157:H7 y *Lactobacillus acidophilus* utilizan al menos parcialmente el mismo suministro limitado de nutrientes *in vitro* tales como azúcar. Además, estos microorganismos compiten por el mismo espacio de unión: sobre el revestimiento del TGI. Con un inhibidor de proliferación rápida tal como *Lactobacillus acidophilus*, el modo primario de acción contra *E. coli* O157:H7 es superarla utilizando el alimento disponible y los espacios de unión adecuados.

La invención incluye el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una bacteria productora de ácido láctico que es una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, para la fabricación de un medicamento para tratar o evitar una infección patógena intestinal en un rumiante.

La cepa de *Lactobacillus acidophilus* es LSA51. La bacteria productora de ácido láctico se puede administrar a un nivel de al menos  $1 \times 10^8$  UFC/día. Alternativamente, la bacteria productora de ácido láctico se puede administrar a un nivel de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día. El patógeno se puede seleccionar entre el grupo que consiste en *E. coli*, *Salmonella spp.*, que incluye *Salmonella typhimurium* y alternativamente, el patógeno puede ser *E. coli* O157:H7.

Otro aspecto de la invención incluye una composición para tratar o evitar una infección patógena en un rumiante que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus* en combinación con un alimento animal o agua. La cepa de *Lactobacillus acidophilus* es LA51. El *Lactobacillus acidophilus* puede estar presente en el alimento animal en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC para cada cantidad de alimento igual a la cantidad ingerida por un animal en un día, o el *Lactobacillus acidophilus* puede estar presente en el alimento animal en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC para cada cantidad de alimento igual a la cantidad ingerida por un animal en un día.

Como se ha mencionado ya, la cepa LA51 es también conocida como 381-IL-28, y está disponible con el número de acceso de la colección de la Universidad del Estado de Oklahoma. Aunque los inventores han caracterizado LA51 como un *Lactobacillus acidophilus*, otros medios de caracterización la han identificado como *Lactobacillus animalis*, y *Lactobacillus murinus*. LA45 está depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC 53545. M35 y L411 son los números de acceso de las bacterias disponibles de la Universidad de Nebraska.

El uso puede comprender administrar al rumiante una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una bacteria productora de ácido láctico y una bacteria utilizadora de lactato, donde la bacteria productora de ácido láctico reduce la cantidad de un patógeno en el intestino del rumiante. La bacteria utilizadora de lactato se puede seleccionar entre el grupo que consiste en *Megasphaera eilsdenii*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acid-propionici*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium globosum*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium spp.*, *Selenomonas ruminantium*, y sus combinaciones. La bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus acidophilus*. El *Lactobacillus acidophilus* es la cepa LA51. En una realización, la bacteria utilizadora de lactato es *Propionibacterium freudenreichii*. En otra realización, la cepa de *Propionibacterium freudenreichii* se selecciona entre el grupo que consiste en P9, PF24, P42, P93 y P99. En otra realización, la cepa de *Propionibacterium freudenreichii* es PF24, disponible de la ATCC con el número de acceso ATCC 9615. La bacteria utilizadora de lactato y la bacteria productora de ácido láctico pueden cada una administrarse en una cantidad mayor de aproximadamente  $1 \times 10^8$

UFC/día, o en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día. Alternativamente, la bacteria utilizadora de lactato se puede administrar en una cantidad de más de  $1 \times 10^6$  UFC/día, preferentemente en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC/día, y lo más preferible, en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día.

- 5 La composición para tratar o evitar una infección patógena en un rumiante que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus* que es LA51, puede estar en combinación con una cepa de *Propionibacterium freudenreichii* seleccionada entre el grupo que consiste en P9, PF24, P42, P93, P99, y sus combinaciones. En una realización, la composición comprende además alimento animal. En otra realización, el *Lactobacillus acidophilus* y el *Propionibacterium freudenreichii* están cada una presentes en el alimento animal en una cantidad de
- 10 aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC para cada cantidad de alimento igual a la cantidad ingerida por un animal en un día. En otra realización la cepa LA51 de *Lactobacillus acidophilus* y la cepa PF24 de *Propionibacterium freudenreichii* están cada una presentes en el alimento animal en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC para cada cantidad de alimento igual a la cantidad ingerida por un animal en un día. La composición puede comprender además la cepa LA45 de *Lactobacillus acidophilus*, que puede estar presente en el alimento animal en una cantidad de
- 15 aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC para cada cantidad de alimento igual a la cantidad ingerida por un animal en un día.

### Modo(s) de llevar a cabo la invención

- 20 La presente invención proporciona métodos y composiciones para reducir o eliminar el crecimiento de patógenos en el intestino de un animal. Se han llevado a cabo ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando determinadas cepas de microorganismos, que se ha encontrado que son particularmente eficaces en la inhibición del crecimiento de muchos patógenos, incluyendo *E. coli* O157:H7. Tal como se usa en el presente documento, el término "patógenos" se refiere a cualquier bacteria que produce un efecto perjudicial en un animal hospedador, y especialmente aquellas bacterias
- 25 que infectan los animales productores de carne y de leche y posteriormente infectan el suministro de alimentos para los seres humanos, produciendo de esta manera enfermedades en los seres humanos. Se considera que la invención es útil para evitar el crecimiento de una amplia variedad de organismos patógenos tal como se demuestra en el presente documento mediante diferentes ensayos que muestran la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella spp.*, que incluye *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*.

- 30 Las formulaciones y métodos descritos en el presente documento son aplicables a una amplia variedad de especies animales y prácticas comerciales, Se puede considerar la inhibición de patógenos en el TGI de animales, en aquellos animales utilizados en la producción comercial de carne, leche, aves de corral, y peces. En un aspecto, la invención incluye un método para tratar un animal para inhibir la incidencia y el crecimiento de *E. coli* O157:H7. El método de tratamiento incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un *Lactobacillus acidophilus* seleccionado en un animal que inhibe el crecimiento *in vivo* de *E. coli* O157:H7. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de bacterias administradas a un animal que da como resultado un efecto terapéutico creando un entorno no hospitalario para los patógenos. Se ha encontrado que una cantidad terapéuticamente eficaz de *Lactobacillus acidophilus* puede ser tan pequeña como de
- 35  $1 \times 10^6$  UFC/día cuando se administra en combinación con otros componentes, aunque es preferible que la bacteria productora de ácido láctico de la invención se administre en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC/día. Se ha encontrado que es particularmente eficaz cuando el *Lactobacillus acidophilus* seleccionado se administra a un nivel de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día.

- 45 Entre las cepas de *Lactobacillus acidophilus* que se han encontrado como particularmente eficaces como inhibidores de *E. coli* O157:H7 se encuentra la 381-IL-28, o la cepa LA51. En un aspecto, la invención incluye cepas de *Lactobacillus acidophilus* que son composiciones eficaces en los métodos anteriormente descritos cuando se proporcionan como un producto para el consumo animal en las concentraciones prescritas como inhibidores de *E. coli* O157:H7. Antes de la presente invención, los microorganismos de *Lactobacillus acidophilus* se han administrado como aditivos de alimentos animales para fines diferentes tal como una mejor utilización de los comestibles. Por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.534.271 y 5.529.793, notifican que determinadas combinaciones de bacterias productoras de ácido láctico y bacterias utilizadoras de lactato podrían utilizarse en un método para mejorar la utilización de comestibles por los rumiantes. La presente invención, en contraste, define métodos para
- 50 inhibir el crecimiento de patógenos en animales y para mejorar la calidad y la cantidad de productos lácteos. Sin embargo, un aspecto de la presente invención incluye el descubrimiento de que determinadas formulaciones novedosas para inhibir el crecimiento de patógenos dadas a conocer en el presente documento son también útiles para mejorar la utilización de comestibles. En la medida que estas formulaciones eran anteriormente desconocidas para mejorar la utilización de los alimentos, forman parte de la presente invención a este fin.

- 60 En una realización, la presente invención incluye un método para proporcionar un producto como inhibidor del crecimiento de *E. coli* O157:H7 en animales. El método incluye seleccionar un microorganismo terapéuticamente eficaz como inhibidor de *E. coli* O157:H7 en animales y producir un producto que contiene este microorganismo. En general, dichos productos requieren una homologación gubernamental de que están certificados como inhibidores de patógenos, específicamente, se necesita normalmente la certificación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Si el producto es para consumo humano, por ejemplo, para contrarrestar una infección de *E. coli* en un ser humano, se necesita la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los
- 65

Estados Unidos (FDA).

Un ejemplo de un microorganismo que se ha descubierto que es terapéuticamente eficaz es *Lactobacillus acidophilus*, preferentemente la cepa LA51, que inhibe el crecimiento in vivo de *E. coli* O157:H7 y otros microorganismos patógenos cuando se administra a animales a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día. Alternativamente, se puede considerar que un nivel suficiente es al menos como mucho de  $1 \times 10^8$  UFC/día. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los niveles de dosificación exactos evaluando la tolerancia biliar de las bacterias que se van a administrar a fin de verificar que los organismos viables se administran al tracto intestinal para competir e inhibir el crecimiento de bacterias patógenas tales como *E. coli* O157:H7.

La presente divulgación identifica algunos organismos que se producen naturalmente que son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos en el TGI de un animal. Debido a que muchos patógenos son acidoresistentes y habitan muchas zonas distintas del tracto digestivo de un animal, los organismos de la invención que se producen naturalmente son, de forma preferible, capaces de inhibir el crecimiento de patógenos a un pH inferior y en varias zonas del TGI; por ejemplo, el rumen, el intestino delgado y el intestino grueso. Las investigaciones iniciales han mostrado que se puede conseguir la disminución de las poblaciones de *E. coli* O157:H7 en ganado alimentado con raciones de heno, que ya de por sí aumentan el pH del rumen a 7,0. Sin embargo, esto tiene una aplicación limitada en las industrias de acabado o de cebo de ganado debido a que los animales en esta fase del procedimiento de producción se alimentan normalmente con una dieta que tiene una mayor proporción de grano a fin de reforzar mejor las características de la carcasa.

Los microorganismos que son útiles en las formulaciones y métodos para producir ácido láctico en el TGI incluyen, por ejemplo, los géneros *Lactobacillus* o *Enterococcus*. Se pueden utilizar cualquiera o ambos géneros. Se distinguen por su capacidad de utilizar azúcares tales como glucosa o lactosa o, en el caso de *Enterococcus*, de utilizar almidón, para producir ácido láctico y de esta manera reducir el nivel del pH local. La elección del microorganismo puede depender del locus en el cual se va a administrar el efecto deseado. Por ejemplo, el género *Lactobacillus* es capaz de reducir el pH local más que los microorganismos *Enterococcus*.

Los organismos productores de ácido láctico que se pueden usar incluyen: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus galactosus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus batatas*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus bifermens*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus cateniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus corynoides*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus desidiosus*, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus enterii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus frigidus*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fructosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus heterohiochii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus hordniae*, *Lactobacillus inulinus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus mobilis*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pseudoplantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus rogosae*, *Lactobacillus tolerans*, *Lactobacillus torquens*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus trichodes*, *Lactobacillus vaccirostercus*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus zeeae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*.

Los microorganismos productores de ácido láctico anteriormente relacionados se pueden usar para inhibir o tratar las infecciones de patógenos en un hospedador, particularmente los patógenos bacterianos que incluyen bacterias patógenas tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella spp.*, incluyendo *Salmonella typhimurium*. Estos microorganismos productores de ácido láctico son particularmente útiles para inhibir o tratar infecciones de *E. coli* O157: H7. Se ha encontrado también que estos organismos se pueden utilizar para mejorar el rendimiento de los animales con fines alimentarios aumentando el peso de la carcasa, la calidad de la carcasa, reducción de los patógenos de la carcasa y aumento de la ganancia de peso diario promedio y la relación de eficacia alimentaria. Se puede utilizar uno cualquiera de estos microorganismos para cualquiera de estos fines, o se puede utilizar cualquier combinación de estos microorganismos. La invención se refiere al uso y a las composiciones de la cepa LA51 de *Lactobacillus acidophilus*, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la invención incluye una formulación de una combinación de una cepa LA51 productora de ácido láctico con un segundo microorganismo que potencia la eficacia de los microorganismos productores de ácido láctico en competencia con microorganismos patógenos. Los microorganismos potenciadores que se pueden usar en las formulaciones de la presente invención son preferentemente microorganismos utilizadores de lactato. Los ejemplos de microorganismos utilizadores de lactato útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

*Megasphaera eilsdenii*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acid-propionici*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium globosum*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium spp.*, and *Selenomonas ruminantium*. Una cantidad terapéuticamente eficaz de estos microorganismos potenciadores es una cantidad que produce un efecto terapéutico beneficioso en el animal al cual se administra, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de estos microorganismos potenciadores puede ser mayor de  $1 \times 10^6$  UFC/día, preferentemente  $1 \times 10^8$  UFC/día, o incluso de forma más preferible aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día.

El uso de microorganismos específicos asegura que el efecto deseado se produce localmente. Los diferentes microorganismos usados en la formulación deben ser compatibles entre sí, por ejemplo, capaces de crecer conjuntamente, y preferentemente, potenciar al otro. Adicionalmente, los microorganismos crecen preferentemente rápidos en el lugar de la acción. Los microorganismos se pueden seleccionar para diversas características, tales como resistencia a los ácidos biliares y/o antibióticos comerciales que los hacen más adecuados para el uso previsto.

Las formulaciones de la invención incluyen la cepa LA51 de *Lactobacillus acidophilus*, y puede incluir adicionalmente *Propionibacterium freudenreichii* o *Propionibacterium shermanii* o ambos. Preferentemente, las formulaciones de la invención se aplican al alimento diario de la ternera o de la vaca lechera en un suplemento seco, o en una pulverización líquida aplicada al alimento diario de los animales. Las formulaciones se pueden administrar una vez al día o durante el curso del día, tanto en una comida, como dividido entre las comidas, o de cualquier otra manera adecuada.

ENSAYOS *IN VITRO*: EJEMPLOS 1 Y 2

Se han llevado a cabo algunos ensayos *in vitro* para demostrar la capacidad de una bacteria concreta de competir eficazmente con e interferir con el crecimiento de bacterias patógenas tales como *E. coli* O157:H7 y otras.

EJEMPLO 1

Cultivos liofilizados de organismos utilizadores de lactato y productores de ácido láctico se seleccionaron por su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos tales como *E. coli* O157:H7, *Streptococcus aureus* y *Salmonella*. Se seleccionaron adicionalmente combinaciones de los organismos productores de ácido láctico y de los organismos utilizadores de lactato para su capacidad de maximizar la inhibición del crecimiento de diversos patógenos.

A fin de identificar aquellos microorganismos que se podrían utilizar en el método y la formulación de la invención, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para identificar las cepas individuales particularmente eficaces. Se sometieron a criba siete cepas de *Propionibacterium* y seis cepas de *Lactobacillus* por su capacidad de producir bacteriocinas capaces de crear zonas de inhibición en placas de agar que se hicieron crecer con *E. coli* O157:H7. Los resultados de dichos ensayos se tabulan a continuación

Tabla 1. Actividad inhibidora de cepas de *Propionibacterium* que crecen en medio selectivo

	P9	P42	P79	P88	P93	P99	PF24
PATÓGENO							
Gram +							
<i>B. cereus</i>	No	No	No	No	No	No	No
<i>S. aureus</i>	Si	Si	Si	No	No	No	No
Gram-							
<i>E. coli</i> O157:H7	Si	Si	No	No	Si	Si	Si
<i>Sal. typhimurium</i>	No	Si	No	Si	Si	Si	Si

Tabla 2. Actividad inhibitoria de cepas de *Lactobacillus* que crecen en medio selectivo

	30SC	53545	3811L28	C28	FR3	R2
PATÓGENO						
<i>E. coli</i> 43985 O157:H7	-4,1	16,8	91,8	89,7	88,7	64,9
<i>E. coli</i> 933 O157:H7	28,1	-3,4	92,7	93,5	91	89,4
<i>S. aureus</i> 305	-15,6	-22,1	82,6	80,6	84,8	23,3

Con respecto a las anteriores tablas, se puede apreciar que tres cepas de organismos productores de ácido láctico de *Lactobacillus* -3811L28, C28 y FR3– y cuatro cepas de organismos utilizadores de lactato de *Propionibacterium* – P9, P42, P93 y P99– demuestran la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, en particular, *E. coli* O157:H7. Debe reconocerse que las combinaciones de microorganismos productores de ácido láctico y utilizadores de lactato se pueden seleccionar por su capacidad de maximizar la inhibición del crecimiento de diversos patógenos.

#### EJEMPLO 2

Se hicieron crecer bacterias de cepas seleccionadas de *Lactobacillus acidophilus* y *Propionibacterium freudenreichii*, en una comparación *in vitro* con medio semianaeróbico rico en *E. coli* a 38° C para determinar qué cepas podrían competir eficazmente con *E. coli* en crecimiento en condiciones de crecimiento *in vivo*. Se encontró que las cepas LA51 y LA45 podrían sustancialmente sobrepasar la población de *E. coli*.

Tabla 3. Crecimiento (densidad óptica) de las cepas seleccionadas de bacterias comparado con el de *E. coli* O157:H7 a en un medio semianaeróbico rico en 38° C

MINUTOS	<i>E. coli</i> O157:H7	LA45	LA51	PF24
0	0,2	0,2	0,2	0,2
50	0,3	0,38	0,55	0,3
90	0,45	0,65	0,84	0,35
120	0,6	0,85	1	0,36
200	0,8	1,2	1,28	0,38
230	0,85	1,25	1,28	0,39
365	0,9	1,25	1,28	0,5
440	0,9	1,25	1,28	0,58

#### ENSAYOS *IN VIVO*: EJEMPLOS 3-9

En los siguientes estudios *in vivo*, se inocularon rumiantes proporcionando una cantidad suficiente de las cepas bacterianas ensayadas junto con los componentes necesarios del medio de crecimiento a los intestinos de los rumiantes mediante la ingestión normal. Se observó inhibición del crecimiento de patógenos tales como *E. coli* O157:H7 en instalaciones para cebo de ganado y ganado para producción láctea, así como otros rumiantes tales como ovejas, cabras y caza. Se utilizaron diversos métodos de inoculación. Los ejemplos de estos métodos de inoculación incluyen:

- Colocar cultivos liofilizados en agua, y a continuación pulverizar o combinar la mezcla sobre el alimento del animal. La mezcla puede estar en forma seca, junto con los vehículos adicionales que se añaden a la dieta del animal. La dieta puede incluir uno o más ingredientes tales como maíz, granos de cereal, subproductos del maíz, subproductos del grano de cereal, heno de alfalfa, ensilado de maíz, ensilado de grano pequeño, heno de hierba, tallos de plantas, subproductos de semillas oleaginosas, harinas proteicas, urea, minerales, melazas y diversas grasas y productos oleosos.
- Cultivos liofilizados suspendidos en diversos aceites, agua y/o compuestos para proporcionar una porción que se va a suministrar directamente al animal y al tracto digestivo del animal.
- Añadir los cultivos liofilizados al agua de bebida de los animales.

#### EJEMPLO 3

Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con combinaciones de microorganismos productores de ácido láctico y microorganismos utilizadores de lactato para la inhibición del patógeno *E. coli* O157:H7. Los resultados de aquellos ensayos se tabulan por debajo en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Inhibición de *E. coli* O157:H7 en estiércol a 37° C

TRATAMIENTO	0 Horas	24 Horas
Control	5,74	6,56
Combinación de PF24, LA45, LA51	5,74	4,48

Tabla 5. Inhibición de *E. coli* O157:H7 en fluido de rumen a 37° C

TRATAMIENTO	0 Horas	24 Horas	48 Horas
Control	6,64	6,7	6,79
Combinación de PF24, LA45, LA51	5,56	5,04	5,00

Los datos se notifican como log<sub>10</sub> UFC de *E. coli* O157:H7 ml. Todos los organismos PF24, LA45 y LA51 son capaces de funcionar a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0 hasta por encima de un pH de aproximadamente 7,0. En la producción de carne de ternera, la preocupación principal es inhibir los patógenos del ganado en una dieta terminada que contenga elevados niveles de concentrado que tienda a disminuir el pH del rumen desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente valores comprendidos en el intervalo de 5,0 a 6,9 intervalo donde funciona preferentemente la formulación de la presente invención. Aunque los anteriores ensayos *in vivo* ilustran el uso del organismo PF24 utilizador de lactato y de los organismos LA45 y LA51 productores de ácido láctico, debe entenderse que la presente invención no está limitada a estos organismos ya que existen muchas cepas que se pueden adaptar para la formulación y el método de la invención.

Se ha llevado a cabo también el ensayo *in vivo* con cepas individuales para evaluar su eficacia de inhibición del crecimiento de patógenos, incluyendo *E. coli* O157:H7. En particular, M35 y LA51 demuestran cada uno la capacidad de inhibir la siembra de *E. coli* O157:H7 en aproximadamente un cincuenta por ciento por encima del nivel de los animales del control.

#### EJEMPLO 4

Se clasificaron ciento ocho cabezas de ganado en función del peso en corrales de cinco (5) animales por corral. Durante el pesado, se tomó una muestra fecal directamente del recto de cada animal. Inicialmente, solo 3 de los 180 animales ensayados dieron positivo para *E. coli* O157:H7. Los animales se vigilaron bisemanalmente para siembra tomando una muestra de material compuesto a partir de cinco boñigas recientes sobre el suelo de cada corral. Dos semanas después del periodo de clasificación, veinticinco (25) de los treinta y seis (36) corrales, o el 69%, dieron positivo para *E. coli* O157:H7. Cuatro semanas después de la clasificación, la prevalencia había disminuido hasta siete corrales que dieron positivo, o un 19,4%.

Transcurridos aproximadamente sesenta días en el periodo de alimentación, se pesó el ganado, se volvió a clasificar, y se ensayaron de nuevo los animales individuales para la siembra del patógeno. En un total de veintiséis (26) animales, o el 14,4%, se llevó a cabo la siembra del patógeno. Los animales se volvieron a clasificar basándose en el peso y en el modelo de siembra. El tratamiento de los animales comenzó en este momento.

Se administraron dos tratamientos diferentes utilizando dos tipos diferentes de bacterias productoras de ácido láctico (NPC 747 y NPC 750) para ensayar su capacidad para reducir *E. coli* O157:H7 en los animales del estudio.

Las muestras tomadas de los corrales una semana después del comienzo del periodo de tratamiento indicaron que el 25% de los corrales que no recibieron tratamiento dieron positivo para *E. coli* O157:H7, mientras que el 8% de los corrales que recibieron el tratamiento de NPC 750 dieron positivo y un 0% de los corrales que recibieron tratamientos de NPC 747 dieron positivo. Dos semanas después de los tratamientos, el 50% de las muestras tomadas de los animales control (no tratados), fueron positivas, mientras que solo un 30% y un 20% de las muestras de los animales que recibieron los tratamientos de NPC 750 y NPC 747, respectivamente, fueron positivas para *E. coli* O157:H7. Los ensayos indican una reducción en la tasa de siembra de aproximadamente la mitad que la del control en aquellos animales que recibieron el tratamiento de NPC 747, que fue una reducción mayor que en aquellos que recibieron el tratamiento de NPC 750. Todos los animales que fueron sembrados con *E. coli* O157:H7 antes de recibir el tratamiento con NPC 747 dieron negativo tras recibir el tratamiento. Además, el patógeno no se diseminó a otros animales en el mismo corral. La mayoría de los animales del control que dieron positivo al comienzo de la administración del tratamiento continuaron dando positivo, comenzando con otros animales en el mismo corral a diseminar el patógeno.

En el día 42, hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos de las muestras animales individuales. Un diez por ciento (10%) de los animales alimentados con la cepa NPC 747 dieron positivo, mientras que un 20% de los animales alimentados con NPC 750 dieron positivo. En contraste, el 58% de los animales del control dieron positivo.

Los animales se muestrearon antes del sacrificio. Los animales que recibieron el tratamiento con NPC 747 tuvieron *E. coli* O157:H7 significativamente ( $P < 0,05$ ) menos detectable, dando positivo solamente un 3,3% de los animales. Los animales que recibieron la cepa NPC 750 y los incluidos en el grupo del control no fueron significativamente diferentes con una siembra del 15% y del 20%, respectivamente.

Las muestras fecales tomadas en el matadero indicaron que el 3,3% de los animales tratados con NPC 747 dieron positivo, un 6,6% de los animales tratados con NPC 750 dieron positivo y un 10% de los animales del control dieron

positivo. Todas las muestras se promediaron para todos los tiempos de muestreo, se sembró el patógeno en un 61,7% de los animales del control durante el periodo de alimentación, se sembró el patógeno en un 51,7% de los animales alimentados con NPC 750, y se sembró el patógeno en solo un 35% de los animales tratados con NPC 747.

5 EJEMPLO 5

10 Se colocaron cien (100) bueyes en corrales de diez (10) animales por corral. Inicialmente, se tomó una muestra fecal directamente del recto de dos bueyes por corral. Se tomó otra muestra 170 días después. Los mismos animales se muestrearon durante ambos tiempos de muestreo. Un grupo control que no recibió tratamiento se incluyó en el estudio. Los animales que fueron tratados, se trataron con la cepa LA51 de *Lactobacillus acidophilus* (adquirida con el nombre comercial NPC2000) Todos los grupos se alimentaron con Rumensin y Tylan. Los resultados de los ensayos se tabulan a continuación.

15 Tabla 6. Inhibición de *E. coli* tratada con NPC 2000

TRATAMIENTO	E. coli + inicial	% +	E. coli + secundaria	% +	E. coli + final	% +
Control	2 de 20	10	4 de 20	20	3 de 20	15
LA51	5 de 20	25	0 de 20	0	0 de 20	0

Tabla 7. Datos de rendimiento animal después de 198 días (Resultados finales)

TRATAMIENTO	Peso vivo inicial, kg.(lbs)	Peso vivo final, Kg (lbs.)	Peso de la carcasa en caliente, Kg. (lbs)	Promedio de ganancia de peso diario, Kg. (lbs)
Control	350,18 Kg (772 lbs)	707,61 Kg (1560 lbs)	428,65 Kg (945 lbs)	1,81 Kg (3,98 lbs)
LA 51	350,18 KG (772 lbs)	737,55 Kg (1626 lbs)	446,34 Kg (984 lbs)	1,96 Kg (4,31 lbs)
Respuesta, Kg. (lbs)		29,94 kg (66 lbs)	17,69 Kg (39 lbs)	0,15 Kg (0,33 lbs)
% de Respuesta		1,92 Kg (4,23 lbs)	1,87 Kg (4,12 lbs)	3,76 Kg (8,30 lbs)

20 EJEMPLO 6

Se llevó a cabo un estudio para determinar si las bacterias probióticas de calidad alimentaria podrían reducir la siembra fecal de *E. coli* O157: H7 en terneros de razas de carne destetados infectados experimentalmente. Las bacterias probióticas del estudio incluyeron diversos aislados de *Lactobacillus spp* fecales bovinos que se seleccionaron sobre la base de un elevado nivel de toxicidad *in vitro* frente a *E. coli* O157:H7.

25 Cinco terneros de razas de carne de 7 meses de edad se sometieron a cirugía de canulación del rumen y, tras la recuperación, se alojaron en estancias de aislamiento con un nivel 3 de bioseguridad. Los terneros se inocularon intrarruminalmente una vez al día durante un periodo de sesenta días con  $1 \times 10^9$  UFC de una de las cepas bacterianas probióticas relacionadas en la siguiente Tabla 8.

30 Dos semanas después del inicio de la administración probiótica, se estimuló a los terneros mediante inoculación intrarruminal con *E. coli* O157:H7 (C1). Quince (C2) y veintisiete (C3) días después de la primera inoculación (C1) se estimuló a los terneros de nuevo. La primera inoculación C1 comprendió un total de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC de una combinación de las cepas 920, 922, 944 y 966. La segunda inoculación C2 fue con un total de aproximadamente  $1,63 \times 10^{11}$  UFC de estas cepas. La tercera inoculación C3 incluyó aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC de la cepa 86-24.

40 Antes y después de cada estímulo, los terneros se ensayaron diariamente para determinar la siembra fecal de las cepas del inóculo. Cada dos semanas, los animales se ensayaron para establecer la evidencia de la inmunidad evaluada mediante los títulos de anticuerpo en suero para la proteína Tir y el antígeno del lipopolisacárido (LPS) O157. En la Tabla 8 a continuación se muestran los resultados. Todos los terneros tuvieron antes del estímulo un título de anticuerpo dirigido contra Tir relativamente elevado que proporcionó a los terneros un significativo nivel de inmunidad frente a las cepas del estímulo, ya que todos los terneros, incluyendo el control, tuvieron una relación S:C de menos de uno tras el primer tratamiento C1 y el segundo tratamiento C2.

45

Tabla 8. Comparación del efecto de la alimentación diferente de las cepas probióticas de *Lactobacillus spp.* Sobre la siembra de *E. coli* O157:H7 en terneros de raza de carne destetados

Cepa probiótica y tiempo de estímulo	Títulos de anticuerpo		Nº de días de siembra	Siembra total	Relación Siembra: Estímulo
	Tir	157			
M35	Tir	157			
C1	1:12,800	1:12,800	3	1,45x10 <sup>6</sup> (S1)	0.00145 (S1/C1)
C2	1:12,800	1:12,800	2	3,59x10 <sup>6</sup> (S2)	0.000022 (S2/C2)
C3	1:12,800	1:12,800	3	3,14x10 <sup>8</sup> (S3)	0.314469 (S3/C3)
Total	1:51,200	1:51,200	8	3,2x10 <sup>8</sup> (S)	0.001936 (S/C)
LA45					
C1	1:6,400	1:12,800	3	1,8x10 <sup>6</sup> (S1)	0.0017955 (S1/C1)
C2	1:6,400	1:12,800	2	5,13x10 <sup>6</sup> (S2)	0.0000031 (S2/C2)
C3	1:6,400	1:12,800	19	1,84x10 <sup>11</sup> (S3)	184.4 (S3/C3)
Total	1:12,800	1:51,200	24	1,84x10 <sup>11</sup> (S)	1.1759 (S/C)
PBS					
C1	1:25,600	1:12,800	2	1,0x10 <sup>4</sup> (S1)	0.001 (S1/C1)
C2	1:25,600	1:12,800	1	1,47x10 <sup>9</sup> (S2)	0.009 (S2/C2)
C3	1:25,600	1:12,800	8	2,07x10 <sup>8</sup> (S3)	0.207 (S3/C3)
Total	ND	1:51,200	11	1,87x10 <sup>9</sup> (S)	0.01 (S/C)
LA51					
C1	1:6,400	1:12,800	2	9,41x10 <sup>6</sup> (S1)	0.0009405 (S1/C1)
C2	1:6,400	1:12,800	1	5,13x10 <sup>6</sup> (S2)	0.0000031 (S2/C2)
C3	ND	1:12,800	9	2,62x10 <sup>8</sup> (S3)	0.26163 (S3/C3)
Total	1:6,400	1:51,200	12	2,63x10 <sup>8</sup> (S)	0.0015944 (S/C)
L411					
C1	1:12,800	1:6,400	2	1,03x10 <sup>4</sup> (S1)	0.001026 (S1/C1)
C2	1:12,800	1:6,400	8	6,44x10 <sup>8</sup> (S2)	0.0039529 (S2/C2)
C3	1:12,800	1:6,400	4	5,13x10 <sup>9</sup> (S3)	0.0513 (S3/C3)
Total	1:51,200	1:25,600	14	6,97x10 <sup>9</sup> (S)	0.0042221 (S/C)

5 La relación de siembra/estímulo en la anterior tabla representa la cantidad total de *E. coli* O157:H7 sembrada después de la inoculación. Este número normaliza los valores que permiten una comparación más precisa de los animales y que proporciona más información significativa que la mera revisión del número total de días en que el ganado estuvo sembrado el ganado con el organismo. M35, LA45, LA51 y L411 representan las diversas cepas de *Lactobacillus* ensayadas. PBS representa el animal control La siembra total es la UFC por gramo en las heces multiplicado por la producción fecal en gramos en un día de siembra positivo multiplicado por el número total de días de siembra positivos.

10 Como los títulos anti-Tir no fueron significativamente diferentes entre los terneros, tres de los cuatro probióticos tienen un efecto basado en la siguiente reducción de la relación S:C en comparación con el control -80% para el ternero alimentado con M35%, 84% para el ternero alimentado con LA51, y 58% para el ternero alimentado con L411-. Además, los animales alimentados con M35 experimentaron una reducción del 27% en el número de días en que estuvo sembrado en comparación con el control J3. Sin embargo, en el animal alimentado con LA51, hubo un

9% de aumento en el número de días en que estuvo sembrado en comparación con el control J3. De acuerdo con esto, la alimentación de probióticos es eficaz en la reducción de la siembra fecal de *E. coli* O157:H7 en terneros.

EJEMPLO 7

5 Se llevó a cabo un estudio para determinar si las combinaciones de bacterias que utilizan lactato y bacterias productoras de ácido láctico añadidas al alimento de las vacas lecheras podrían reducir los patógenos y mejorar la producción de leche de las vacas lecheras. Se ensayaron tres conjuntos de vacas lecheras. El primer conjunto de vacas lecheras fue el grupo control (Grupo 1). Al segundo conjunto de vacas lecheras se le administró la bacteria  
10 utilizadora de lactato *Propionibacterium freudenreichii* cepa PF24 en combinación con la bacteria productora de ácido láctico *Lactobacillus acidophilus* cepa NPC 747 de acuerdo con los métodos que se han definido en las secciones anteriores (Grupo 2). Al tercer conjunto de vacas lecheras se le administró la bacteria utilizadora de lactato *Propionibacterium freudenreichii* cepa PF24 en combinación con dos cepas de la bacteria productora de ácido láctico *Lactobacillus acidophilus*, LA51 (NPC747) y LA45, de acuerdo con los métodos que se han definido en  
15 las secciones anteriores (Grupo 3). En la tabla 9 se muestran los resultados de este estudio.

La tabla 9 demuestra los efectos de cada uno de los regímenes de tratamiento sobre la producción de leche, el peso corporal, y el consumo de alimento de las vacas lecheras. Los datos demuestran que los tratamientos que implican la alimentación de las vacas lecheras con bacterias que utilizan lactato en combinación con bacterias productoras de ácido láctico dieron como resultado mejoras estadísticamente significativas en la cantidad de leche producida, la cantidad de leche corregida por la grasa (es decir, se pesó más leche con un alto contenido de grasa), la relación de la leche corregida por la grasa por cantidad de alimento consumido, la cantidad de leche corregida por la energía producida (es decir, se pesó leche con un mayor contenido calórico), la cantidad de leche corregida por energía producida por cantidad de alimento consumido, la cantidad de grasa láctea en la leche producida, y el contenido de urea del suero sanguíneo de las vacas. La adición de la cepa LA45 en el Grupo 3 dio como resultado un aumento en  
20 el contenido de urea del suero sanguíneo de las vacas.  
25

Tabla 9: El efecto de la adición de cultivos bacterianos sobre las variables de rendimiento de las vacas lecheras lactantes.

Variable	Tratamientos			Error estándar	Contrastes del tratamiento (P<0,10)	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3		Grupo 1 vs. Grupos 2 y 3	Grupo 2 vs. Grupo 3
DMI <sup>2</sup> , kg/día	25,5	26,2	26,3	0,5	NS <sup>1</sup>	NS
Leche, kg/día	37,7	39,6	38,5	0,7	0,08	NS
FCM <sup>3</sup> , kg/día	34,9	37,8	37,6	0,8	0,007	NS
Leche/DMI, kg/kg	1,45	1,53	1,48	0,04	NS	NS
FCM/DMI, kg/kg	1,35	1,45	1,44	0,03	0,03	NS
ECM <sup>4</sup> , kg/día	34,5	36,8	37	0,8	0,03	NS
ECM/DMI, kg/kg	1,34	1,42	1,41	0,04	0,03	NS
Grasa láctea, %	3,19	3,23	3,4	0,1	NS	NS
Grasa láctea, kg/día	1,15	1,27	1,29	0,04	0,02	NS
Proteína láctea, %	2,95	2,94	3	0,05	NS	NS
Proteína láctea, kg/día	1,09	1,13	1,12	0,03	NS	NS
Células somáticas/ml, x1000	259	198	257	111	NS	NS
Peso corporal final, kg	667,6	658,3	664,1	6,5	NS	NS
Glucosa en suero, mg/dl	64,73	67,55	65,52	1,19	NS	NS
Cambio en el peso corporal, kg	28,9	20,8	21,2	7,3	NS	NS
N de urea en suero, mg/dl	22,62	20,43	21,66	0,48	0,01	0,08

<sup>1</sup> Sin significación estadística para P>0.10  
<sup>2</sup> Captación de materia seca  
<sup>3</sup> Leche corregida con grasa al 3.5%  
<sup>4</sup> Leche corregida con energía para comparación sobre una base calórica equivalente

La tabla 10 muestra una marcada reducción en la incidencia del patógeno *E. coli* O157:H7 en muestras fecales procedentes de cada uno de los conjuntos de vacas lecheras a los cuales se administró la combinación de bacterias utilizadoras de lactato y bacterias productoras de ácido láctico. El efecto fue particularmente pronunciado en las vacas lecheras a las que se administró las cepas LA51 (NPC747) y LA45 de *L. acidophilus* en combinación con la cepa PF24 de *P. freudenreichii*. En este conjunto de vacas no se detectó *E. coli* O157:H7 en ninguna de las muestras fecales

Tabla 10. Incidencia de *E. coli* O157:H7 en muestras fecales procedentes de vacas lecheras

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Incidencia de <i>E. coli</i> O157:H7	19%	12%	0%

10 EJEMPLO 8

Se llevó a cabo un estudio para determinar si combinaciones novedosas particulares de bacterias podrían reducir la incidencia de bacterias patógenas. Se ha encontrado también que estas combinaciones mejoraron la eficacia de la alimentación del ganado. Se asignaron doscientos cuarenta bueyes (240) a 48 corrales de cinco bueyes cada uno. El peso promedio de los bueyes era de 780 libras (338,84 kg). Cada corral se asignó a uno de cuatro tratamientos: (1) grupo 1, fue el grupo control y se alimentó sin microorganismos, (2) grupo 2, se alimentó con dos cepas: *Propionibacterium freudenreichii* cepa PF24 y *Lactobacillus acidophilus* cepa LA51 (NPC747), cada cepa en una cantidad de  $1 \times 10^9$  UFC/día, (3) grupo 3, se alimentó con tres cepas; PF24 en una cantidad de  $1 \times 10^9$  UFC/día, LA51 (NPC747) en una cantidad de  $1 \times 10^9$  UFC/día, y *Lactobacillus acidophilus* cepa LA45 en una cantidad de  $1 \times 10^6$  CFU/día, y (4) grupo 4, se alimentó con tres cepas: PF24 en una cantidad de  $1 \times 10^9$  UFC/día, LA51 (NPC747) en una cantidad de  $1 \times 10^6$  UFC/día, y *Lactobacillus acidophilus* cepa LA45 en una cantidad de  $1 \times 10^6$  UFC/día.

La Tabla 11 demuestra una mejora en las eficacias de alimentación de los grupos a los que se administraron las combinaciones novedosas de bacterias. Todos los grupos a los que se administraron las combinaciones novedosas de bacterias presentaron una mayor promedio de ganancia de peso diario durante el curso de 56 y 140 días con respecto al grupo del control

Tabla 11: Eficacias de alimentación

	Promedio durante los días 0-56		Promedio durante los días 0-140	
	Promedio de ganancia diaria	Captación de alimento	Promedio de ganancia diaria	Captación de alimento
Grupo 1 (control)	2,002 kg (4,42 lbs.)	8,67 kg (19,16 lbs.)	1,63 kg (3,62 lbs.)	8,52 kg (18,82 lbs.)
Grupo 2	2,04 kg (4,52 lbs.)	8,88 kg (19,62 lbs.)	1,67 kg (3,70 lbs.)	8,75 kg. (19,32 lbs)
Grupo 3	2,05 kg (4,54 lbs.)	8,71 kg. (19,24 lbs)	1,68 kg (3,72 lbs.)	8,51 kg (18,79 lbs)
Grupo 4	2,08 kg (4,61 lbs.)	8,88 kg. (19,61 lbs)	1,67 kg (3,69 lbs.)	8,74 kg (19,31 lbs.)

La Tabla 12 demuestra una mejora sustancial en la cantidad de *E. coli* O157:H7 encontrada en las carcasas y piel de los bueyes tras el sacrificio. De forma notable, las carcasas de los bueyes en el Grupo 2 presentaron menos de la mitad de este patógeno que el grupo control, y las carcasas de los bueyes en los otros dos grupos presentaron también una sustancial reducción en la cantidad de este patógeno. Particularmente notable es la drástica reducción en la cantidad de *E. coli* en las pieles de todos los bueyes a los que se administraron las formulaciones de la invención.

Tabla 12; incidencia de *E. coli* O157:H7

	Carcasa	Piel
Grupo 1 (control)	33,3%	20%
Grupo 2	13,3%	0%
Grupo 3	26,6%	0%
Grupo 4	20%	0%

40 EJEMPLO 9

Se llevó a cabo un estudio para determinar cuáles de los diversos métodos de controlar el crecimiento patogénico en ganado esa superior. El primer método implicó alimentar al ganado con las bacterias NPC 747 y NPC 750 (conocida también como M35, disponible con este nombre procedente de la Universidad de Nebraska). El segundo método

- implicó eliminar el almidón de la dieta del ganado. El tercer método implicó la limpieza del corral. El diseño del estudio fue 3 H 2 H 2 factorial. Se alimentó al ganado con una dieta de acabado (33% de maíz con humedad elevada, 20% de maíz enrollado seco, 40% de alimento de gluten de maíz húmedo, y 7% de alfalfa, con vitaminas, minerales, Rumensin, y Tylan) a 432 bueyes (peso promedio 340 kg) en 54 corrales, con 8 bueyes en cada corral.
- 5 Las bacterias NPC 747 y NPC 750 se alimentaron diariamente al ganado de 18 corrales. La mitad de los corrales se limpió mensualmente, y la otra mitad se limpió solo al final del estudio. Dos semanas antes del sacrificio, se cambió la dieta para la mitad del ganado sustituyendo de maíz por salvado de maíz en la alimentación del ganado.
- 10 Ninguno del primer ni el tercer métodos afectó el rendimiento de los bueyes ( $P>0,39$ ), pero el cambio de dieta redujo la DMI ( $P<0,001$ , 12,8 kg/d frente a 11,5 kg/d) durante las dos últimas semanas, y redujo la ADG y la eficacia durante el periodo de alimentación completo ( $P<0,001$ ). El peso de la carcasa se redujo 8,4 kg debido al cambio de la dieta.
- 15 Se obtuvieron muestras fecales individuales mensualmente y 0, 1, y 2 semanas antes del sacrificio y se analizaron para *E. coli* O157:H7. Un corral completo fue la unidad de detección experimental, y un corral se consideró positivo para *E. coli* O157:H7 si cualquiera de los 8 bueyes dio positivo. La detección global de *E. coli* O157:H7 fue baja (145/3024 animales/semanas). El segundo y el tercer métodos no tuvieron efecto sobre la prevalencia de *E. coli* O157:H7. El primer método redujo numéricamente los corrales positivos para *E. coli* O157 durante la semana de comercialización (44% frente a 17%;  $P=0,10$ )
- 20 Aunque se han descrito anteriormente diversas realizaciones de la invención, debe entenderse que se han presentado solo a modo de ejemplo, y no de limitación. De esta manera, la amplitud y el alcance de la presente invención no deben limitarse por ninguna de las realizaciones a modo de ejemplo anteriormente descritas, sino que deben definirse solamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.
- 25

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una bacteria productora de ácido láctico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección patógena intestinal en un rumiante, siendo dicha bacteria productora de ácido láctico una cepa LA51 de *Lactobacillus acidophilus*.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la bacteria productora de ácido láctico se administra a un nivel de al menos  $1 \times 10^6$  UFC/día.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la bacteria productora de ácido láctico se administra a un nivel de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la infección patógena está producida por un patógeno seleccionado entre el grupo que consiste en *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus*.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el patógeno es *E. coli* O157:H7.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el medicamento comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de una bacteria utilizadora de lactato.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde la bacteria utilizadora de lactato se selecciona entre el grupo que consiste en *Megasphaerae eilsdenii*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidpropionici*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium globosum*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium spp.*, *Selenomonas ruminantium*, y sus combinaciones.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la bacteria utilizadora de lactato es *Propionibacterium freudenreichii*.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la cepa de *Propionibacterium freudenreichii* se selecciona entre el grupo que consiste en P9, PF24, P42, P93 y P99.
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde la bacteria utilizadora de lactato y la bacteria productora de ácido láctico se administran cada una en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC/día.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde la bacteria utilizadora de lactato y la bacteria productora de ácido láctico se administran cada una en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/día.
12. Una composición para tratar o evitar una infección de patógenos en un rumiante, comprendiendo dicha composición una bacteria productora de ácido láctico, *Lactobacillus acidophilus* cepa LA51, comprendiendo además dicha composición alimento animal o agua.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde el *Lactobacillus acidophilus* está presente en el alimento animal en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC para cada cantidad de alimento o agua igual a la cantidad ingerida o bebida por un animal en un día.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde está presente *Lactobacillus acidophilus* en el alimento animal en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC para cada cantidad de alimento o agua igual a la cantidad ingerida o bebida por un animal en un día.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde la composición comprende además una bacteria utilizadora de lactato, donde dicha bacteria utilizadora de lactato es una cepa de *Propionibacterium freudenreichii* seleccionada entre el grupo que consiste en P9, PF24, P42, P93, P99, y sus combinaciones.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde el *Lactobacillus acidophilus* y el *Propionibacterium freudenreichii* están cada uno presentes en la alimentación animal o el agua en una cantidad de más de  $1 \times 10^8$  UFC para cada cantidad de alimento o agua igual a la cantidad ingerida o bebida por un animal en un día.
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde el *Lactobacillus acidophilus* y el *Propionibacterium freudenreichii* están cada uno presentes en la alimentación animal o el agua en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC para cada cantidad de alimento o agua igual a la cantidad ingerida o bebida por un animal en un día.
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, donde la cepa de *Propionibacterium freudenreichii* es PF24.