

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 619**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**C12R 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2010 E 10743216 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014 EP 2585085**

54 Título: **Uso de bacterias coliformes productoras de gas inhibidoras de lactobacilos aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.09.2014**

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)  
Via E. Mattei 3  
28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:

**SCATIZZI, GIANNA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 491 619 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

5 Uso de bacterias coliformes productoras de gas inhibidoras de lactobacilos aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos

La presente invención se refiere a una cepa de bacterias probióticas que pueden inhibir bacterias coliformes productoras de gas aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos. Además, la presente invención se refiere a una composición o un complemento alimenticio o una composición farmacéutica que comprende dicha cepa de bacterias para su uso en tratamientos preventivos y/o curativos para trastornos intestinales y para cólicos en lactantes/bebés.

Es bien sabido que los cólicos del lactante representan uno de los trastornos más frecuentes en los tres primeros meses de vida de un bebé. Asimismo, se sabe que la etiología de los cólicos del lactante no está completamente clara todavía y que es probable que sea multifactorial.

En los últimos años, se ha producido un aumento de los datos que apuntan a la participación de la flora bacteriana intestinal en la patogenia de los cólicos. Estudios experimentales recientes parecen indicar que una modificación del entorno microbiano de los bebés afectados por cólicos podría provocar una desregulación de la función motora intestinal y un aumento de la producción de gas que, al dar lugar a un exceso de flatulencia, representa uno de los síntomas clásicos del trastorno.

Por último, se sabe que los lactantes afectados por cólicos presentan con mayor frecuencia colonización por *Clostridium difficile*, un microorganismo productor de gas, en comparación con lactantes sanos.

Actualmente, la simeticona parece ser el tratamiento más indicado para los cólicos. Se recomienda la simeticona para el tratamiento de los cólicos, si bien existen estudios que tienden a refutar su eficacia real *in vivo* frente al placebo en bebés con cólicos (Metcalf TJ, et al. Simethicone in the Treatment of Infant Colic: A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. 1994, Pediatrics. 94(1): 29-34; Sferra TJ, et al. Gastrointestinal gas formation and infantile colic. 1996, Pediatr Clin North Am. 43(2): 489-510).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de contar con un tratamiento preventivo y/o curativo para trastornos gastrointestinales y cólicos en lactantes que sea eficaz, sin efectos secundarios y fácil de aplicar.

El solicitante se comprometió a resolver el problema relacionado con el tratamiento preventivo y/o curativo para trastornos gastrointestinales en lactantes/bebés. En particular, el solicitante abordó el problema relacionado con el tratamiento preventivo y/o curativo para los cólicos en lactantes/bebés.

Tras una intensa actividad investigadora, el solicitante seleccionó cepas de bacterias probióticas específicas pertenecientes a la especie *Lactobacillus delbrueckii*.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa de bacterias probióticas seleccionada del grupo que comprende las cepas de bacterias pertenecientes a la especie *Lactobacillus delbrueckii*.

A continuación, en la siguiente descripción detallada, se exponen modos de realización preferentes de la presente invención, sin limitar en modo alguno el alcance de la presente invención.

La tabla n.º 1 se refiere a la actividad antagonista mostrada en placas por *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 frente a las coliformes aisladas a partir de lactantes con cólicos. La inhibición de la proliferación de los patógenos se expresa como el radio del halo de inhibición que se desarrolla alrededor de los discos impregnados con células completas del lactobacilo seleccionado.

La tabla n.º 2 se refiere a la cuantificación de coliformes totales en las muestras fecales de 20 lactantes afectados por cólicos durante la manifestación del trastorno.

(\*) el número total de coliformes se determinó contando las colonias que habían proliferado sobre placas de agar de MacConkey, mientras que las concentraciones de las especies se determinaron usando el procedimiento de huella genética por PCR específico de especie y por ribotipado.

Las cepas de bacterias probióticas seleccionadas actúan como inhibidoras de la proliferación de bacterias coliformes. Preferentemente, dichas bacterias coliformes se seleccionan del grupo que comprende las bacterias coliformes que producen gas por fermentación de azúcares, preferentemente lactosa.

Las cepas de bacterias probióticas seleccionadas tienen una actividad antibacteriana y/o antimicrobiana demostrada (actividad inhibidora) contra las especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y, por último, *Enterococcus faecalis* aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos y pertenecientes al género de las bacterias coliformes que participan en la fermentación de la

lactosa y la producción de gas intestinal, considerándose esto último una de las principales causas concomitantes del trastorno de los cólicos del lactante.

En particular, dichas bacterias coliformes se seleccionan del grupo que comprende las bacterias *Escherichia coli*.

5 En un modo de realización preferente, la cepa de bacterias probióticas es *Lactobacillus delbrueckii* MB386, depositada en la DSMZ por la empresa Steve Jones Sri, Florencia, Italia, el 10 de diciembre de 2008 y con número de expediente DSM 22106.

10 La cepa *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 tiene una actividad antibacteriana y/o antimicrobiana eficaz contra las bacterias coliformes aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos.

Otro objetivo de la presente invención es una composición o un complemento alimenticio que comprenda al menos una cepa de bacterias probióticas pertenecientes a la especie *Lactobacillus delbrueckii*, como se especifica anteriormente.

15 Otro objetivo de la presente invención es una composición que comprenda al menos una cepa de bacterias probióticas pertenecientes a la especie *Lactobacillus delbrueckii*, como se especifica anteriormente, para su uso como medicamento.

20 Todas las composiciones de la presente invención, mencionadas anteriormente, tienen aplicación en el tratamiento preventivo y/o curativo de trastornos o enfermedades relacionadas con la diarrea, los cólicos, la indigestión y la hiperacidez gástrica, el síndrome del intestino irritable, la flatulencia, la úlcera péptica, la úlcera gástrica o duodenal, la dispepsia, la enfermedad de Crohn, las lesiones abdominales y las enfermedades biliares.

25 En un modo de realización preferente, todas las composiciones de la presente invención mencionadas anteriormente tienen aplicación para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos afectados por trastornos gastrointestinales, cólicos y flatulencia, en particular en lactantes/bebés.

30 En un modo de realización preferente, todas las composiciones de la presente invención mencionadas anteriormente comprenden además al menos otra cepa de bacterias con propiedades antioxidantes, seleccionadas del grupo que comprende las cepas de bacterias pertenecientes a la especie *Lactobacillus plantarum*; preferentemente, dicha cepa es *Lactobacillus plantarum* LP1, depositada en la DSMZ por la empresa Steve Jones Sri, Florencia, Italia, el 10 de diciembre de 2008 y con número de expediente DSM 22107. La cepa *Lactobacillus plantarum* LP1 DSMZ 22107 tiene propiedades antioxidantes. La cepa *Lactobacillus plantarum* LP1 DSMZ 22107 es una cepa probiótica, ya que muestra una actividad antioxidante asociada con una vitalidad excelente, probada *in vitro*, en jugos gástricos y en bilis, lo que implica tolerancia al tránsito intestinal.

35 Todas las composiciones descritas anteriormente son eficaces para evitar infecciones bacterianas y controlar trastornos y síntomas gastrointestinales, cólicos y la flatulencia.

40 En un modo de realización de la presente invención, la composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica pueden contener las cepas bacterianas de la presente invención mencionadas anteriormente en forma microencapsulada, es decir recubiertas con una composición que contiene al menos un lípido (composición lipídica), preferentemente de origen vegetal. De forma alternativa, la composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica pueden comprender las cepas de la presente invención mencionadas anteriormente como bacterias microencapsuladas y bacterias no microencapsuladas.

45 Dicha composición lipídica comprende al menos un lípido, y dicho al menos un lípido es de origen vegetal. De forma ventajosa, dicho lípido de origen vegetal se selecciona del grupo que comprende grasas saturadas. De forma ventajosa, se usan grasas saturadas con un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferentemente comprendido entre 45 °C y 65 °C.

50 En un modo de realización preferente, dichas grasas saturadas se seleccionan del grupo que comprende mono- y diglicéridos de ácidos grasos saturados, poliglicerol esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres. Preferentemente, dichas grasas saturadas se seleccionan de entre poli(diestearato de glicerol), palmitoestearato de glicerol y grasas vegetales hidrogenadas de origen no láurico.

55 En un primer modo de realización, las cepas bacterianas de la presente invención mencionadas anteriormente están recubiertas con una monocapa. En términos prácticos, se realiza un único recubrimiento con una única capa de lípido. De forma ventajosa, el recubrimiento individual es a base de poli(diestearato de glicerol) (nombre comercial Plurol Stearique WL 1009).

60 Las cepas de bacterias de la presente invención recubiertas con una monocapa, mencionadas anteriormente, se disponen en la composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de la presente invención.

65

En un segundo modo de realización, las cepas de bacterias de la presente invención, mencionadas anteriormente, están recubiertas con dos capas. En términos prácticos, se realiza un recubrimiento doble, sucesivo, con dos lípidos diferentes entre sí. De forma ventajosa, los dos lípidos seleccionados son una grasa de palma hidrogenada ( $T_f = 60\text{ }^\circ\text{C}$ ) y un dipalmitoestearato de glicerol ( $T_f = 57\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ ); se pulverizan sobre el liofilizado uno después del otro, es decir al liofilizado se le aplica un recubrimiento doble: el primero con la grasa de palma hidrogenada (por ejemplo, con Revel C) y el segundo con el dipalmitoestearato de glicerol (por ejemplo, Precirol Ato 5) en una relación en peso de 3:1 entre sí, de forma ventajosa de 2:1, por ejemplo 2/3 en peso del primero y 1/3 en peso del segundo. Las especies de bacterias mencionadas anteriormente están presentes en una cantidad comprendida entre el 0,1 % y el 75 % en peso, preferentemente entre el 0,5 % y el 15 % en peso; aún más preferentemente entre el 1 % y el 10 % en peso con relación al peso total de la composición o el complemento. Sin embargo, dicho porcentaje relativo al peso total de la composición depende del tipo de producto de la composición o el complemento.

En un modo de realización preferente, la composición o el complemento contienen bacterias recubiertas y/o sin recubrir en una concentración comprendida entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC/g, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC/g.

En un modo de realización preferente, la composición o el complemento contienen bacterias en una concentración comprendida entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC/dosis, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC/dosis. La dosis puede estar comprendida entre 0,2 g y 10 g; por ejemplo, puede ser de 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

Las bacterias probióticas usadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en forma de un polvo, deshidratado, pulverizado o un polvo liofilizado.

Las bacterias pueden estar recubiertas y/o sin recubrir. Las bacterias, preferentemente en forma microencapsulada (recubiertas), se pueden microencapsular usando técnicas ordinarias bien conocidas por los expertos en la técnica y empleando maquinaria conocida en la industria farmacéutica. Por ejemplo, se puede usar una técnica de lecho fluidizado (p. e.j, pulverización desde la parte superior o pulverización desde la parte inferior), en la que se usan materiales de recubrimiento de naturaleza lipídica.

Durante la microencapsulación, es importante el control térmico del proceso de producción. En particular, es importante controlar la temperatura del lípido usado con el fin de evitar la mortalidad de las cepas usadas.

En un modo de realización preferente, la composición o el complemento están en forma de una suspensión oleosa que comprende:

- al menos un aceite alimenticio seleccionado del grupo que comprende: aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de lino, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de pescado y aceite de arroz, estando presente dicho al menos un aceite en una cantidad mayor o igual al 70 % en peso con relación al peso total de la suspensión, y

- al menos una cepa de bacterias probióticas seleccionada del grupo que comprende las cepas de bacterias pertenecientes a las especies *L. delbrueckii* y *L. plantarum*, estando presente dicha cepa en una cantidad inferior o igual al 30 % en peso con relación al peso total de la suspensión.

En un modo de realización preferente, el aceite de la suspensión es solo aceite de oliva; preferentemente es aceite de oliva en una mezcla con aceite de maíz y/o aceite de soja y/o aceite de lino.

En un modo de realización preferente, la suspensión oleosa también puede comprender, en una cantidad comprendida entre el 0,1 y el 15 % en peso con relación al peso total de la suspensión, al menos un compuesto alimenticio finamente subdividido seleccionado del grupo que comprende sílice, dióxido de silicio, gel de sílice, sílice coloidal, sílice precipitada, talco, silicato de magnesio, óxido de magnesio, carbonato de magnesio, silicato de calcio, lecitina, mono- o diglicéridos tales como monoestearato de glicerol, monooleato de glicerol, ácido Plurol Oleique, almidón, almidones modificados, goma Konjac, goma xantana, goma gelan y carragenano.

En un modo de realización preferente, la suspensión oleosa puede comprender también, en una cantidad comprendida entre el 0,5 y el 25 % en peso con relación al peso total de la suspensión, al menos una fibra prebiótica y/o un hidrato de carbono bifidógeno seleccionados de entre inulina, fructoligosacáridos (FOS), galacto- y transgalactoligosacáridos (GOS y TOS), glucoligosacáridos (GOSa), xiloligosacáridos (XOS), oligosacáridos de quitosano (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomaltoligosacáridos (IMOS), maltodextrina, almidón resistente, pectina, ispágula o zaragatona, arabinogalactanos, glucomananos, galactomananos, xilanos, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, fibra arábica, fibra de algarrobo, fibra de avena, fibra de bambú y fibra de cítricos.

En un modo de realización preferente, la suspensión oleosa comprende al menos una fibra y al menos un hidrato de carbono seleccionados de entre glucoligosacáridos (GOSa), fructoligosacáridos (FOS), inulina y/o maltodextrina.

En un modo de realización preferente, la suspensión oleosa comprende *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106

y *Lactobacillus plantarum* LP1 DSMZ 22107 recubiertas (microencapsuladas) con un solo recubrimiento (o con dos recubrimientos) con al menos un lípido con un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferentemente comprendido entre 45 y 65 °C, como se indica anteriormente.

5 La suspensión oleosa de la presente invención se prepara de acuerdo con técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y con maquinaria bien conocida. En términos prácticos, se introduce una cantidad de aceite dada en un recipiente equipado con medios de agitación y calefacción. Posteriormente, se añaden las bacterias probióticas en forma sólida de forma gradual y con agitación para evitar la formación de grumos y aglomeraciones. Una vez finalizada la adición de bacterias, la sustancia oleosa se mantiene con agitación durante un tiempo comprendido entre 1 y 30 minutos, si es necesario con una ligera calefacción hasta una temperatura comprendida entre 24 y 40 °C, preferentemente entre 30 y 35 °C.

10 En un modo de realización preferente de la presente invención, las bacterias probióticas se pueden usar en forma microencapsulada, es decir recubiertas con una composición que contenga al menos un lípido, preferentemente de origen vegetal. Después, las bacterias microencapsuladas se añaden al aceite usando los mismos procedimientos funcionales descritos anteriormente.

15 En otro modo de realización de la presente invención, las bacterias añadidas al aceite pueden estar en forma de bacterias microencapsuladas y "desnudas", bacterias no microencapsuladas.

20 Las bacterias, preferentemente en forma microencapsulada, se pueden microencapsular usando las técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una técnica de lecho fluidizado (p. e.j, pulverización desde la parte superior o pulverización desde la parte inferior), en la que se usan materiales de recubrimiento de naturaleza lipídica.

25 En un modo de realización preferente, se usan grasas vegetales saturadas con un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferentemente comprendido entre 45 °C y 65 °C.

30 En un modo de realización preferente, se pueden usar grasas vegetales con cierto grado de hidrofiliicidad; se pueden seleccionar de entre mono y diglicéridos de ácidos grasos saturados, poligliceroles esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres.

35 Por ejemplo, se puede usar poli(diestearato de glicerol) (nombre comercial Plurol Stearique WL 1009), palmitoestearato de glicerol (nombre comercial Precirol Ato 5), ácidos grasos saturados (nombre comercial Revel C) o grasas vegetales hidrogenadas de origen no láurico.

En un modo de realización preferente, la relación en peso entre el microorganismo liofilizado y el material de recubrimiento lipídico que lo recubre es de 50:50 o 40:60.

40 En un primer modo de realización, se pulverizan dos lípidos (una grasa de palma hidrogenada (Tf = 60 °C) y una dipalmitoestearato de glicerol (Tf = 57-60 °C)) sobre el liofilizado uno después de otro, es decir se aplica un recubrimiento doble al liofilizado: el primero con la grasa de palma hidrogenada y el segundo con el dipalmitoestearato de glicerol en una relación de 3:1 entre sí. Un recubrimiento doble de las células garantiza un mejor aislamiento de la bacteria del entorno, al producir una película continua sin poros que comuniquen con el exterior. No obstante, este envoltorio se debe abrir en el intestino para liberar las bacterias y permitir que colonicen el entorno. De hecho, los lípidos seleccionados son resistentes a pH ácidos, por lo que el recubrimiento permanece intacto en el estómago, pero sensibles a pH incluso ligeramente básicos, para permitir la formación de orificios en el recubrimiento durante su paso a través del intestino. La suspensión oleosa contiene las bacterias en una cantidad menor o igual al 30 % en peso, comprendida entre el 0,5 y el 20 % en peso con relación al peso total de la suspensión; preferentemente en una cantidad comprendida entre el 0,5 y el 10 %; aún más preferentemente en una cantidad comprendida entre el 1,5 y el 5 % en peso con relación al peso total de la suspensión.

45 La suspensión oleosa tiene aplicación válida para su uso como medicamento para el tratamiento de trastornos intestinales, tales como cólicos en pacientes pediátricos.

50 Se realizó un estudio para evaluar el papel de las bacterias coliformes productoras de gas en la etiología de los cólicos del lactante.

55 En términos prácticos, se realizó un estudio de cohortes aleatorizado en el que se incluyeron 49 lactantes afectados por cólicos del lactante y 35 lactantes sanos con edades de entre 20 y 90 días correspondientes a la edad gestacional, alimentados exclusivamente con leche materna y sin enfermedades del aparato digestivo. Se recogieron muestras fecales de ambos grupos de lactantes en momentos establecidos previamente y se examinaron en las 48 horas siguientes. El estudio tenía como objetivo determinar si existían diferencias cualitativas/cuantitativas significativas en los dos grupos de lactantes con respecto a la presencia de coliformes productoras de gas.

60 Los géneros típicos incluidos en el grupo de coliformes son: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y

otros grupos minoritarios. Se llevó a cabo la identificación de las especies más representativas aisladas a partir de las muestras fecales a nivel molecular usando técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y ribotipado automático. Por último, se estudió la capacidad de las colonias microbianas de producir gas por fermentación de lactosa y otros azúcares.

5 La identificación molecular y fenotípica de las diversas especies de coliformes mostró un patrón de colonización diferente en los dos grupos, con y sin cólicos, y en particular la concentración de la especie *Escherichia coli* se mostró significativamente más alta en el grupo de lactantes con cólicos [(6,04 Log<sub>10</sub> frente a 4,47 Log<sub>10</sub>) UFC·g<sup>-1</sup> de heces]. Se cree que precisamente la concentración anómala de esta especie de *Escherichia coli* puede contribuir al desarrollo del trastorno.

10 No se puede descartar que la abundancia de especies coliformes observada en el estudio en los lactantes afectados por la enfermedad pueda estar relacionada con una disminución de algunas otras especies (aún sin identificar) de bacterias beneficiosas para el huésped, lo que da lugar a posibles consecuencias sobre el estado de salud del huésped.

## 15 **Parte experimental**

### 20 **1. Introducción**

El solicitante llevó a cabo un estudio con el objetivo de seleccionar cepas de bacterias probióticas pertenecientes al género *Lactobacillus*, seleccionadas y evaluadas con relación a la eficacia de su acción antioxidante, antibacteriana y antimicrobiana contra especies de bacterias coliformes aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos.

25 Se aislaron decenas de cepas de bacterias coliformes, productoras de gas por fermentación de azúcares, en particular de lactosa, a partir de las heces de lactantes afectados por cólicos con el fin de evaluar *in vitro* la inhibición de su proliferación por las cepas de bacterias probióticas pertenecientes al género *Lactobacillus* que se tuvieron en cuenta.

### 30 **2. Aislamiento de las cepas y condiciones de cultivo**

Con el fin de cuantificar y estudiar la presencia de coliformes, se recogieron muestras fecales de 49 lactantes, alimentados exclusivamente con leche materna, afectados por cólicos, que los habían manifestado  $6 \pm 1$  días antes de su inclusión en el estudio. El aislamiento de las cepas se llevó a cabo en placas selectivas de agar de MacConkey (DIFCO n.º 0075.17.1), que es el medio que se usa por lo general para aislar y cuantificar bacterias entéricas (llamadas "coliformes") después de ponerlas en condiciones ideales para que proliferen: a 37 °C en una atmósfera controlada.

40 Después de 12 horas de incubación, se cuentan las colonias que aparecen en la placa y se observan detenidamente todas las diferencias morfológicas entre las propias colonias. Los resultados numéricos se muestran como Log<sub>10</sub> de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces. Después, cada colonia aislada se toma individualmente y se inocula en un tubo de medio líquido LB (Luria-Bertani) para obtener cultivos puros.

### 45 **3. Identificación de colonias de coliformes**

Se analizaron un total de 20 cultivos fecales obtenidos a partir de heces de lactantes afectados por cólicos con el fin de aislar los géneros de coliformes más representativos.

50 El reconocimiento específico de especie de las colonias se llevó a cabo usando dos procedimientos de identificación molecular diferentes: PCR específica de cebador y ribotipado automático. La combinación de los resultados obtenidos por ambos procedimientos permitió tanto identificar las cepas aisladas con un alto grado de precisión como definir qué especies son las más representativas de la población de coliformes que coloniza los intestinos de los lactantes afectados por cólicos.

55 Por último, se cuantificó cada especie bacteriana calculando en qué porcentaje representaba la población de coliformes aislada completa.

#### a. Ribotipado automático

60 El ribotipado automático específico de cepa implica el uso de un instrumento extremadamente sofisticado: el Sistema de Caracterización Microbiana RiboPrinter (Qualicon Inc., Wilmington, DE, EE. UU.). Se toman individualmente las colonias bacterianas aisladas en la placa; después de una etapa térmica y a través del uso de enzimas líticas se consigue la liberación del ADN, que se escinde por la endonucleasa de restricción EcoRI. Por último, se analizan los fragmentos de ADN, separados por electroforesis en gel, usando la técnica de transferencia de bandas de Southern modificada. Se traduce el análisis de hibridación a una imagen de bandas quimioluminiscentes independientes que el instrumento transforma en datos electrónicos, o un patrón de RiboPrinter, que captura y almacena en la memoria.

La identificación final se lleva a cabo por comparación del patrón de RiboPrinter obtenido con los almacenados en la base de datos Dupont del instrumento. Los perfiles con una semejanza al menos igual al 93 %, calculado por medio de un algoritmo apropiado, se combinan para formar un ribogruppo dinámico que refleja las relaciones o identidades genéticas entre las colonias aisladas.

#### 5 b. PCR específica de cebador

Con el propósito de la identificación molecular de las bacterias coliformes, se amplificaron fragmentos de ADN ribosómico de las regiones espaciadoras transcritas internas 16S-23S.

Se cogieron individualmente las colonias puras aisladas en la placa y se resuspendieron en agua destilada estéril y después se lisaron durante 5 min a 95 °C para permitir la liberación del ADN. Las reacciones de amplificación se obtuvieron usando los cebadores universales: 16S-dir (5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3') y 23S-inv (5'-AGTGCCAAGGCATCCACC-3').

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Biometra, Gottingen, Alemania), configurando un programa de termociclado específico. Se separaron los amplificados por electroforesis en gel; se purificaron los fragmentos de aproximadamente 400 pb usando un kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania); por último, se sometieron los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores de 16S y 23S a un análisis de secuencia automático.

#### 4. Producción de gas por bacterias coliformes

Se evaluó la capacidad para producir gas mediada por todas las bacterias coliformes aisladas, inoculando cada cepa individual en un caldo de cultivo líquido LB y/o un caldo de cultivo de lauril sulfato triptosa (LST) que contenían 10 g/l de lactosa como única fuente de carbono. 24-48 horas después de la inoculación y tras la incubación a 35 °C, se examinaron los cultivos bacterianos para determinar la presencia de burbujas de gas en el medio líquido de acuerdo con el procedimiento de Jiang T et al.<sup>51</sup>. La presencia de gas indicaba una reacción positiva a la prueba.

#### 5. Selección aleatoria de bacterias lácticas y condiciones de cultivo

Las cepas de bacterias lácticas de las que se probó la actividad antimicrobiana contras las bacterias coliformes de los lactantes fueron 30 cepas seleccionadas aleatoriamente representativas de diferentes especies de bacterias lácticas. Los lactobacilos usados en este estudio provenían de las colecciones de la ATCC y la DSMZ (American Type Culture Collection, Rockville, Md., y Deutsche Sammlung von Mikroorganismem und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania, respectivamente).

La taxonomía de la cepa de *Lactobacillus plantarum* LP1 DSM 22107 se confirmó a nivel de especie por ribotipado automático. La cepa seleccionada por cribado, *Lactobacillus delbrueckii* MB386, proviene de la colección alemana DSMZ (DSM 20074 o ATCC 9649).

Todos los lactobacilos usados en el estudio en cuestión se cultivaron durante 24 horas a 37 °C en caldo de cultivo MRS para lactobacilos - Difco Laboratories, Sparks, Maryland, EE. UU. - (MRS) que contenía 0,5 g/l de cisteína como agente reductor.

#### 6. Ensayo para evaluar las propiedades antimicrobianas

Se evaluaron las propiedades antimicrobianas usando dos estrategias: la inhibición de la proliferación de las bacterias en las placas o el procedimiento de difusión en disco de Kirby-Bauer (1940), y la preparación de cocultivos de las bacterias lácticas seleccionadas con una o más bacterias coliformes obtenidas a partir de lactantes afectados por cólicos.

##### a) Actividad antimicrobiana en las placas

El propósito de este procedimiento es examinar el efecto inhibitorio de las cepas de lactobacilos consideradas en la proliferación *in vitro* de bacterias coliformes aisladas a partir de lactantes. Se hicieron crecer las cepas de lactobacilos en un cultivo anaerobio en medio líquido MRS durante 48 horas a 37 °C. Las células, recogidas del cultivo por centrifugación, se resuspendieron en solución salina hasta obtener una concentración de  $10^4$  y  $10^6$  células/ml, determinada midiendo la densidad óptica a 600 nm. EL sobrenadante, separado de la biomasa, se neutralizó hasta pH 7,0. Se distribuyó la suspensión celular que contenía las bacterias coliformes consideradas en una concentración de  $10^3$  y  $10^6$  células/ml sobre un medio sólido de agar de LB (Luria Bertani) (al 0,7 %); posteriormente, se dispusieron dos discos (6 mm de diámetro) sobre el medio, uno impregnado con la suspensión celular del lactobacilo considerado y el otro con el sobrenadante asociado. El control se preparó de la misma manera, pero se dispusieron dos discos estériles sin impregnar en el medio.

Después de 18 horas de incubación a 37 °C, se midió el área de inhibición del pseudopatógeno que apareció

alrededor de los discos.

#### b) Actividad antimicrobiana en cocultivos líquidos

5 El antagonismo ejercido por los lactobacilos considerados en el presente estudio contra la proliferación de bacterias coliformes se confirmó por coincubación en un medio líquido de cada posible inhibidor probiótico con las coliformes más representativas aisladas a partir de los lactantes. El inóculo del cocultivo se obtuvo cultivando por separado las probióticas y las coliformes en condiciones óptimas. Se recogieron las células bacterianas de cada uno de los dos cultivos por centrifugación y se resuspendieron en un medio equivalente recién preparado para evitar cualquier  
10 condicionamiento de la proliferación que pudiera producirse en el cocultivo debido a variaciones no deseadas del pH o a una disminución de los nutrientes. Se inoculó un medio líquido de caldo de cultivo de LB modificado (Luria Bertani con la adición de extracto de levadura al 3 %, a pH 7) con un total de  $10^5$  UFC/ml de lactobacilos y la misma concentración de una suspensión bacteriana conocida de coliformes. El control se preparó de la misma manera, reemplazando el inóculo probiótico con el medio recién preparado solo, sin células.

15 Los cocultivos y los controles preparados de este modo se incubaron a 37 °C en microaerofilia controlada y después de 8-10 horas se evaluó la actividad antagonista llevada a cabo por las probióticas determinando la inhibición de la proliferación de las bacterias coliformes. Esto se calculó restando el número de bacterias coliformes encontradas en el tubo de coincubación del número de bacterias coliformes del tubo de control, inoculado solamente con bacterias coliformes. Se midieron las UFC/ml de la población bacteriana vital que había proliferado distribuyendo alícuotas conocidas de los cocultivos y los controles sobre medios selectivos tanto para lactobacilos (agar MRS para lactobacilos) como para coliformes (agar de MacConkey) (Annuk 2003); por último, se determinó el cambio en el pH después de 24 horas de coincubación. Los resultados en cuanto a las concentraciones bacterianas de lactobacilos y coliformes se expresaron en  $\text{Log}_{10}$  UFC/ml.

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención en modo alguno.

#### Ejemplo 1

30 Se cultivó la cepa seleccionada *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 en condiciones anaerobias en un medio líquido durante 48 horas a 37 °C. Para analizar la actividad antimicrobiana en las placas, se trató como en el ensayo descrito anteriormente un cultivo durante la noche de las bacterias coliformes de la cepa *a* de *Escherichia coli* sp., aisladas a partir del lactante 15 (véase la tabla n.º 2), que presentaba síntomas clínicamente diagnosticados de cólicos del lactante. Se distribuyó una suspensión que tenía una concentración de  $10^3$ - $10^6$  células/ml de bacterias coliformes sobre medio LB sólido; posteriormente, se dispusieron dos discos en el medio, uno (disco B, figura n.º 1) impregnado con la suspensión de células de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 recogidas y el otro con el sobrenadante neutralizado correspondiente (disco A, figura n.º 1).

40 La placa preparada de este modo se dejó reposar a 4 °C durante al menos una hora. Después de 18 horas de incubación a 37 °C, se realizó una medida del área de inhibición de la proliferación de la cepa *a* de *Escherichia coli* sp., que se había desarrollado alrededor de los dos discos.

45 Resultado: un halo de inhibición de la proliferación de la cepa de *Escherichia coli* examinada aislada a partir del lactante 15, afectado por cólicos del lactante visible solamente alrededor del disco que se había impregnado con la suspensión de células de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106, mientras que alrededor del disco impregnado con el sobrenadante correspondiente del lactobacilo no apareció área de inhibición. Se midió el halo de inhibición de la proliferación de las bacterias coliformes y resultó tener un radio de 13 mm (figura n.º 1).

#### Ejemplo 2

50 Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana manifestada por el lactobacilo probiótico *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 frente a la cepa *b* de *Klebsiella pneumoniae*, aislada a partir del lactante 12 afectado por cólicos del lactante (tabla n.º 2). Para los fines de la prueba, se trataron las dos cepas bacterianas como se describe en el ejemplo 1.

55 Resultado: se realizó una medida del área de inhibición de la proliferación de la cepa *b* de *Klebsiella pneumoniae*, aislada a partir del lactante 12 con cólicos del lactante, que apareció alrededor del disco que se había impregnado con la suspensión de células de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106. En este caso, tampoco se observó actividad antagonista resultante del disco impregnado solamente con el sobrenadante sin células obtenidas por el cultivo de lactobacilo. Se midió el halo de inhibición, que resultó tener un radio de 12,5 mm, como se puede ver en la figura n.º 2.

#### Ejemplo 3

65 Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana manifestada por el lactobacilo probiótico *Lactobacillus*



*delbrueckii* MB386 DSM 22106 frente a todas las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y, por último, *Enterococcus faecalis*, aisladas a partir de los lactantes afectados por cólicos del lactante y de controles sanos.

- 5 Para los fines de la prueba, la cepa probiótica de bacterias lácticas y las bacterias coliformes aisladas a partir de los lactantes se trataron como se describe en el ejemplo 1.

10 Resultado: en general, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 examinada mostró siempre una actividad inhibidora contra todas las coliformes probadas. Se preparó una placa de control colocando en el medio de agar LB dos discos estériles análogos que no estaban impregnados ni con la suspensión celular ni con el caldo de cultivo solo. El control nunca mostró efecto inhibidor alguno sobre la proliferación de las cepas coliformes examinadas. Todos los resultados obtenidos a partir de las pruebas realizadas para evaluar la actividad antagonista manifestada en las placas por el lactobacilo considerado y expresados como el radio medio de las áreas de inhibición se recogen en la tabla n.º 1.

#### 15 Ejemplo 4

20 Se realizó también una evaluación de la actividad antimicrobiana manifestada por el lactobacilo probiótico seleccionado *Lactobacillus plantarum* LP1 DSM 22107 frente a todas las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y, por último, *Enterococcus faecalis*, aisladas a partir de los lactantes afectados por cólicos del lactante y de controles sanos. Para los fines de la prueba, la cepa probiótica de bacterias lácticas y las bacterias coliformes aisladas a partir de los lactantes se trataron como se describe en el ejemplo 1.

25 Resultado: en general, la cepa de *Lactobacillus plantarum* LP1 DSM 22107 examinada nunca mostró efecto inhibidor alguno sobre las coliformes examinadas.

#### Ejemplo 5

30 Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana manifestada conjuntamente por las dos cepas probióticas de bacterias lácticas de la invención, *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 y *Lactobacillus plantarum* LP1 DSM 22107, frente a todas las cepas aisladas de bacterias coliformes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y, por último, *Enterococcus faecalis*, aisladas a partir de los lactantes afectados por cólicos del lactante. Para los fines de la prueba, las dos cepas de bacterias lácticas probióticas se cultivaron por separado como se describe en el ejemplo 1 y, del mismo modo, se trató cada bacteria coliforme como se describe en el ejemplo 1. Se distribuyó una suspensión con una concentración de  $10^3$ - $10^6$  células/ml de bacterias coliformes sobre medio LB sólido. Posteriormente, se dispusieron dos discos en el medio, uno impregnado con una suspensión de células de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 recogidas de concentración conocida más una suspensión con una concentración análoga de células recogidas del cultivo de *L. plantarum* DSM 22107, y el otro con una mezcla formada a partir de los dos sobrenadantes neutralizados, sin células, obtenido a partir de los cultivos de las dos bacterias lácticas. La placa preparada de este modo se dejó reposar a 4 °C durante al menos una hora. Después de 18 horas de incubación a 37 °C, se realizó una medida del área de inhibición de la proliferación de la coliforme considerada que se había desarrollado alrededor de los dos discos, de estar presente.

45 Resultados: las pruebas de actividad antibacteriana realizadas en sinergia revelaron que el área de inhibición de la proliferación de cada cepa coliforme aislada a partir de lactantes con cólicos aparecía siempre solamente alrededor del disco que se había impregnado con las dos suspensiones de células de *L. delbrueckii* DSM 22106 y *L. plantarum* DSM 22107, mientras que no aparecía inhibición alrededor del disco impregnado con los sobrenadantes correspondientes, obtenidos a partir de los cultivos de las dos bacterias lácticas. Por último, se midió el halo de inhibición originado a partir de las células completas y mostró un radio medio comparable al resultante de la actividad exclusiva antagonista manifestada por *L. delbrueckii* DSM 22106 (tabla n.º 1).

#### 55 Ejemplo 6

60 Se evaluó la actividad antagonista de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 *in vitro* inoculando un medio LB modificado, ya descrito en el párrafo relativo al procedimiento de evaluación de la actividad antimicrobiana en cocultivo líquido, con un total de  $10^5$  UFC/ml de lactobacilos y una concentración igual de células de la cepa *a* de *Escherichia coli*, aisladas a partir del lactante 15 afectado por cólicos (tabla n.º 3). Se inoculó un segundo tubo que contenía LB modificado solamente con células de bacterias coliformes. El cocultivo y el control se incubaron a 37 °C en microaerofilia y, después de 8-10 horas, se evaluó la actividad antagonista manifestada por las bacterias lácticas contra la cepa de *Escherichia coli*.

65 Con el fin de cuantificar la proliferación de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 y de *Escherichia coli*, ambas obtenidas a partir de las pruebas de coincubación y del control, se evaluaron las UFC/ml de las dos cepas bacterianas tanto en el punto temporal 0 de la inoculación como a las 24 horas mediante la

distribución de alícuotas de caldo de cultivo del cocultivo y del control tanto sobre agar MRS con un contenido del 0,2 % en vancomicina (selectivo para bacterias lácticas) como sobre agar de MacConkey (selectivo para *Escherichia coli*); por último, se determinó el cambio en el pH en el tubo coincubado y en el de control después de 24 h.

5 Resultados: en el punto temporal  $t_0$  (tiempo de inoculación) se coinocularon  $2,7 \times 10^5$  células de *Lactobacillus delbrueckii* DSM 22106 con  $5,0 \times 10^5$  células de *Escherichia coli*. El pH era de 6,8. Después de 24 horas ( $t_{24}$ ), el recuento en placas selectivas reveló  $7,0 \times 10^9$  UFC/ml de *Lactobacillus delbrueckii* DSM 22106 y  $5,0 \times 10^5$  UFC/ml de *Escherichia coli*, mientras que el pH había disminuido hasta 4,3. En el tubo de control solamente se inocularon  $4,5 \times 10^5$  UFC/ml de *Escherichia coli* a  $t_0$ ; se reemplazó el inóculo de bacterias lácticas con la adición de un volumen  
10 igual de medio recién preparado solo, sin células. Después de 24 horas de incubación, el recuento reveló  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml de *Escherichia coli* inoculadas. El pH del medio, igual a 6,8, permaneció sin cambios después de 24 horas.

### Ejemplo 7

15 Como en el ejemplo 5, pero se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana expresada por una combinación de las dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii* MB386 DSM 22106 y *Lactobacillus plantarum* LP1 DSM 22107 al coincubarlas con las cepas coliformes más representativas de cada especie identificada aislada a partir de los lactantes.

20 Se evaluó la actividad antagonista realizada en "sinergia" por las dos bacterias lácticas mediante la inoculación del medio LB modificado con un total de  $10^2$  UFC/ml de *L. delbrueckii* DSMZ 22106 y  $10^2$  células de *L. plantarum* DSMZ 22107 y, por último, una concentración igual ( $10^4$ ) de células de las bacterias coliformes consideradas. Se inoculó un segundo tubo que contenía LB modificado solamente con las células de ambas bacterias lácticas. El cocultivo y el control preparados de este modo se incubaron a 37 °C en microaerofilia y, después de 8-10 horas, se evaluó la  
25 actividad antagonista resultante, en caso de que la hubiera.

Con el fin de cuantificar la proliferación de las bacterias lácticas y las coliformes resultante tanto de las pruebas de coincubación como del control, se evaluaron las UFC/ml de cada bacteria tanto en el punto temporal 0 de la inoculación como después de 24 horas, como se describe en el ejemplo 5.

30 Se calcularon las UFC/ml totales de bacterias lácticas junto con las UFC/ml de las coliformes consideradas; por último, se determinó el cambio en el pH en el tubo coincubado y en el de control después de 24 horas.

35 Resultados: independientemente de la especie y del lactante a partir del que se aislaron, la concentración de bacterias coliformes en cocultivo con los dos lactobacilos probióticos se redujo en al menos 4 unidades logarítmicas decimales (de  $E10^9$  a  $E10^5$ ) en comparación con el tubo de control. El pH, medido siempre antes y después de las 24 horas de incubación, varió en un valor de al menos  $3,3 \pm 0,4$  al coincubar los tubos tanto con bacterias lácticas como con la cepa de bacterias coliformes, mientras que el pH de los tubos de control permaneció siempre sin cambios.

40 De lo anterior se deduce que la cepa de *L. delbrueckii* MB386 DSM 22106 tiene una clara actividad antibacteriana frente a las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y, por último, *Enterococcus faecalis*, aisladas a partir de lactantes afectados por cólicos y pertenecientes al género de bacterias coliformes implicadas en la fermentación de la lactosa y la producción de gas  
45 intestinal, considerada una de las principales causas concomitantes del trastorno de los cólicos del lactante.

Se considera que la disminución de la concentración de bacterias coliformes intestinales es esencial para mantener un equilibrio estable en la microbiota intestinal humana, lo que beneficia al estado de salud del ser humano.

### 50 Tabla n.º 1

Actividad antagonista mostrada por *Lactobacillus delbrueckii* DSKZ 22106 en placas y expresada como el radio medio del área de inhibición

Bacterias coliformes aisladas	Halo de inhibición (radio medio de la zona $\pm$ DE)
<i>Escherichia coli</i>	10,23 $\pm$ 1,29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	983 $\pm$ 104
<i>Klebsiella oxytoca</i>	975 $\pm$ 106
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10,25 $\pm$ 0,35
<i>Enterobacter cloacae</i>	10,25 $\pm$ 0,35
<i>Enterococcus faecalis</i>	10,16 $\pm$ 0,76

55

Tabla n.º 2

Sujetos n.º	Coliformes totales (UFC g <sup>-1</sup> heces)*	N.º de colonias morfológicamente diferentes en la placa	Factor de dilución en la placa	Especie identificada
2	5,0 x 10 <sup>6</sup>	2	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-6*</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>E. coli</i>
3	1,0 x 10 <sup>6</sup>	2	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-4</sup>	a. <i>K. pneumoniae</i> b. <i>E. coli</i>
4	1,0 x 10 <sup>7</sup>	2	a. 10 <sup>-6</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>K. oxytoca</i>
7	2,0 x 10 <sup>7</sup>	1	a. 10 <sup>-7</sup>	a. <i>E. faecalis</i>
9	7,0 x 10 <sup>3</sup>	1	a. 10 <sup>-3</sup>	a. <i>E. coli</i>
12	4,0 x 10 <sup>7</sup>	2	a. 10 <sup>-7</sup> b. 10 <sup>-7</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>K. pneumoniae</i>
13	3,7 x 10 <sup>7</sup>	2	a. 10 <sup>-7</sup> b. 10 <sup>-7</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>E. coli</i>
15	3,4 x 10 <sup>8</sup>	2	a. 10 <sup>-8</sup> b. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>E. coli</i>
16	4,3 x 10 <sup>8</sup>	2	a. 10 <sup>-8</sup> b. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>K. oxytoca</i>
17	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>Enterobacter cloacae</i>
18	8,1 x 10 <sup>6</sup>	2	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>K. oxytoca</i> b. <i>E. faecalis</i>
22	1,1 x 10 <sup>3</sup>	1	a. 10 <sup>-3</sup>	a. <i>E. coli</i>
23	9,5 x 10 <sup>6</sup>	4	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-6</sup> c. 10 <sup>-6</sup> d. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>K. oxytoca</i> b. <i>E. aerogenes</i> a. <i>E. coli</i> b. <i>E. coli</i>
24	1,0 x 10 <sup>3</sup>	1	a. 10 <sup>-3</sup>	a. <i>E. coli</i>
29	5,8 x 10 <sup>8</sup>	2	a. 10 <sup>-8</sup> b. 10 <sup>-7</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>E. coli</i>
32	2,7 x 10 <sup>6</sup>	4	a. 10 <sup>-6</sup> b. 10 <sup>-5</sup> c. 10 <sup>-5</sup> d. 10 <sup>-5</sup>	a. <i>E. coli</i> b. <i>K. oxytoca</i> c. <i>K. pneumoniae</i> d. <i>K. oxytoca</i>
36	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1	a. 10 <sup>-4</sup>	a. <i>K. oxytoca</i>
39	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1	a. 10 <sup>-4</sup>	a. <i>K. pneumoniae</i>
48	2,6 x 10 <sup>6</sup>	1	a. 10 <sup>-6</sup>	a. <i>K. oxytoca</i>

(\*) el número total de coliformes se determinó contando las colonias que habían proliferado sobre placas de agar de MacConkey, mientras que las concentraciones de las especies se determinaron usando el procedimiento de huella genética por PCR específico de especie y por ribotipado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de bacterias probióticas seleccionada del grupo que comprende cepas de bacterias pertenecientes a la especie *Lactobacillus delbrueckii*, en la que dicha cepa probiótica es *Lactobacillus delbrueckii* MB386, depositada en la DSMZ el 10.12.2008 y con número de expediente DSM 22106, como inhibidor de bacterias coliformes.
- 10 2. La cepa de bacterias probióticas de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas bacterias coliformes se seleccionan del grupo que comprende bacterias coliformes que producen gas por fermentación de azúcares, preferentemente lactosa.
- 15 3. La cepa de bacterias probióticas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dichas bacterias coliformes se seleccionan del grupo que comprende bacterias pertenecientes a las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis*.
- 20 4. La cepa de bacterias probióticas de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que la cepa de *L. delbrueckii* MB386 DSM 22106 tiene una actividad antibacteriana contra bacterias pertenecientes a las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis*.
- 25 5. Una composición o un complemento alimenticio o composición farmacéutica que comprende la cepa de bacterias de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en los que también está presente al menos otra cepa de bacterias con propiedades antioxidantes; preferentemente dicha cepa es *Lactobacillus plantarum* LP1, depositada en la DSMZ el 10.12.2008 y con el número de expediente DSM 22107.
- 30 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos afectados por cólicos.
- 35 8. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en los que dichas *Lactobacillus delbrueckii* MB386, DSM 22106 y dichas *Lactobacillus plantarum* LP1, DSM 22107 están recubiertas con una composición que contiene al menos un lípido, preferentemente de origen vegetal, lípido que se selecciona del grupo que comprende grasas saturadas con un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferentemente comprendido entre 45 y 65°C.
- 40 9. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en los que dichas grasas saturadas se seleccionan de entre mono- y diglicéridos de ácidos grasos saturados, poligliceroles esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres.
- 45 10. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en los que dichas grasas saturadas se seleccionan de entre poli(diestearato de glicerol), palmitoestearato de glicerol, ácidos grasos saturados o grasas vegetales hidrogenadas de origen no láurico.
- 50 11. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en los que las cepas de bacterias probióticas *Lactobacillus delbrueckii* MB386, DSM 22106 y *Lactobacillus plantarum* LP1, DSM 22107 están recubiertas con un primer y un segundo recubrimiento, siendo dicho primer recubrimiento una grasa de palma hidrogenada con un punto de fusión de alrededor de 60 °C y siendo dicho segundo recubrimiento una grasa de dipalmitoestearato de glicerol con un punto de fusión comprendido entre 57 y 60 °C.
- 55 12. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en forma de una suspensión oleosa que comprende:
  - 55 - al menos un aceite alimenticio seleccionado del grupo que comprende: aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de lino, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de pescado y aceite de arroz, estando presente dicho al menos un aceite en una cantidad mayor o igual al 70 % en peso con relación al peso total de la suspensión, y
  - 60 - al menos una cepa de bacterias probióticas seleccionada del grupo de que comprende las cepas de bacterias pertenecientes a las especies *L. delbrueckii* y *L. plantarum*, estando presente dicha cepa en una cantidad inferior o igual al 30 % en peso con relación al peso total de la suspensión.
- 65 13. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en los que el aceite de la suspensión es aceite de oliva, preferentemente en una mezcla con aceite de maíz y/o aceite de soja y/o aceite de lino.

14. La composición o el complemento alimenticio o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en los que las cepas de bacterias son las probióticas *Lactobacillus delbrueckii* MB386, DSM 22106 y *Lactobacillus plantarum* LP1, DSM 22107, estando dichas bacterias recubiertas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-11.

Figura n.º 1

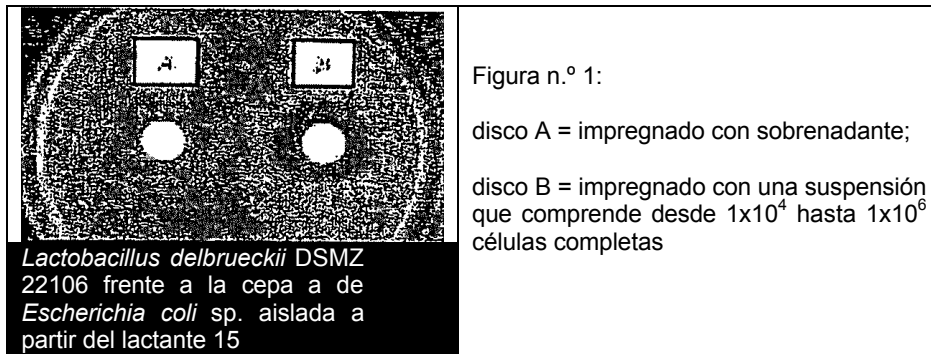


Figura n.º 2

