

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 140**

51 Int. Cl.:

A61K 31/23 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009 E 09703269 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2249824**

54 Título: **Lactilatos para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas en animales**

30 Prioridad:

25.01.2008 EP 08100911

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

09.10.2014

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:

CAZEMIER, ANNE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 505 140 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

Lactilatos para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas en animales.

5 [0001] La presente invención pertenece a un método para prevenir o tratar las infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales, para composiciones específicas para prevenir o tratar infecciones intestinales causadas por bacterias grampositivas en animales, al uso de composiciones especificadas para prevenir o tratar infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales, y para una composición de nutrición para animales que comprende un compuesto específico en una cantidad eficaz para prevenir o tratar
10 infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales.

[0002] Las bacterias grampositivas se tiñen de color azul oscuro o violeta por la coloración de Gram, principalmente debido a una alta cantidad de peptidoglicano en su pared celular. Entre las bacterias gram positivas están las bacterias patógenas Enterococcus, Clostridium, Listeria, Estafilococo, distintas especies de Bacillus, y
15 Streptococos. Mientras algunos de estos organismos son principalmente de interés como contaminantes alimenticios, otros pueden causar enfermedades en animales.

[0003] Por ejemplo, la Clostridia es responsable de causar una serie de muy diversas enfermedades de intestino en los animales. Como es una bacteria casi ubicua se encuentra fácilmente en el suelo, el polvo, las heces, y la alimentación, por lo que es extremadamente difícil mantener a los animales libres de Clostridia. Las enfermedades intestinales relacionadas con Clostridium pueden ser bastante graves. Por ejemplo, la Clostridia está involucrada como causante de la enteritis necrótica en pollos. En el ganado bovino, la enteritis relacionada con clostridia puede coger la forma de "síndrome de la muerte súbita" que, en la práctica, puede provocar durante la noche la muerte de una parte del ganado bovino. Las enfermedades relacionadas con la Clostridia, también causan daños graves en
20 otros animales.

[0004] Se sabe que administrar antibióticos a los animales los protege de la infección intestinal. También se sabe que se pueden incluir tales antibióticos en la nutrición animal. No obstante, hay una creciente resistencia contra el uso de antibióticos en la alimentación animal, y, hoy en día, muchos países cuentan con una legislación que prohíbe el uso de antibióticos en la alimentación animal. Por otra parte, los antibióticos se deben administrar en cantidades muy controladas.
30

[0005] Por consiguiente, existe la necesidad de un método no antibiótico y composición para la alimentación animal que ayudará para tratar o prevenir infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales, en particular en mamíferos, incluyendo rumiantes (por ejemplo ganado bovino, oveja, cabra, ciervo) y monogástricos (por ejemplo puerco, caballos, conejos); en pájaros (por ejemplo ave, pavo, faisán, codorniz); en el pescado, incluyendo pescado marino (por ejemplo lenguado de salmón, atún), pescado de agua dulce (por ejemplo trucha, carpa, tilapia); moluscos (por ejemplo, la ostra, los mejillones, las almejas, los caracoles) y crustáceos (como por ejemplo, el cangrejo, la langosta, la gamba). La presente invención también puede tener aplicación en seres humanos, y en los animales de piel tal como visones, armiños, sable, y zorros.
35 40

[0006] Además, puede ser deseable eliminar unas bacterias grampositivas específicas del intestino con el propósito de aumentar el crecimiento de los animales. Se cree que esto puede ser de interés para Lactobacillus spp. La presente invención también es de interés para esta aplicación.
45

[0007] La presente invención proporciona un método y composición para la alimentación animal para tratar o prevenir infecciones intestinales provocadas por las bacterias grampositivas en animales. De acuerdo con la presente invención, se hace uso de un compuesto antibacteriano seleccionado de lactilato conforme a la fórmula 1,
50



o una sal de Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH₄, o de Cu(II), un glicosilato de fórmula 2,



o una sal de Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH₄, o de Cu(II), éster de lactato de fórmula 3,



60 Y/o un éster del ácido glicólico de fórmula 4,



65 en el que las fórmulas anteriores R1 es seleccionan de H, n representa un número entero con un valor entre 1-10, y R2 representa un alquilo o cadena de alquenoilo C1- C35 que puede estar ramificada o no para la prevención o

tratamiento de infecciones intestinales provocadas por las bacterias grampositivas.

[0008] La presente invención pertenece a la prevención o tratamiento de infecciones intestinales por bacterias grampositivas en animales. La invención es particularmente atractiva para usarla contra las infecciones intestinales con bacterias anaeróbicas o bacterias anaeróbicas facultativas, incluso más en particular, bacterias anaeróbicas. En el grupo de bacterias anaeróbicas, es particularmente deseable tener un método para la prevención o tratamiento de infecciones intestinales por bacterias formadoras de esporas, porque este organismo tiende a ser difícil de controlar. La invención es de interés particular en la prevención y tratamiento de infecciones intestinales por Clostridia. En una forma de realización, la presente invención pertenece a la prevención o tratamiento de infecciones intestinales provocada por Clostridium, en particular por Clostridium perfringens en el ave, en particular en el pollo. En otra forma de realización, la presente invención pertenece a la prevención o tratamiento de infecciones intestinales provocadas por Clostridium, en particular por una o varias Clostridium tetanii, novyi (tipo B) septicum, chauvii, sordelii, hemolyticum, difficile o botulinum, en el ganado bovino. En otra forma de realización, la presente invención pertenece a la reducción del crecimiento intestinal de Lactobacillus spp.

[0009] Cabe señalar que WO 2004/107877 describe una composición antimicrobiana que comprende una mezcla de ácido láctico u otra derivada y un ácido inorgánico. La composición se describe en general como antimicrobiana. Se especifica su uso en contra de la Salmonela y Escherichia Coli. Aunque se mencionan los lactilatos como posibles derivados del ácido láctico, su uso no es otro que el dilucidado. No hay nada en esta referencia que enseñe o sugiera la eficacia particular encontrada en el uso de lactilatos en contra de las bacterias grampositivas en animales.

[0010] Además, se observa que GB115480 describe el uso de acilado alfa-hidroxiácido carboxílicos contra las bacterias y hongos, por ejemplo mohos, y levaduras. Se indica que el compuesto se puede usar para el consumo o para su aplicación en seres humanos u otros animales, pero esto no se aclara. No hay nada en esta referencia que enseñe o sugiera la eficacia particular que se ha encontrado en el uso de lactilatos contra las bacterias grampositivas.

[0011] Además, Wang y Wang (2007, un 2008-D116825 XP002523620) divulga el uso de estearil lactilato de calcio como emulsionante en el aditivo de pienso para la diarrea en animales como resultado de indigestión de grasa. WO01/06877A divulga un método para reducir el número de bacterias grampositivas en los productos alimentarios y no alimentarios que comprenden la etapa de tratamiento de los productos con una cantidad bacteriostáticamente o con una composición bactericida eficaz que comprende estearoil-2-lactilato de sodio. WO2004/037177A divulga una composición de gel de afeitado con agentes antimicrobianos que comprende también el isostearil lactilato de sodio. US2007/010856A1 divulga un multifilamento preparado para empapar la sutura con una solución antimicrobiana que comprende lactilatos.

[0012] En la presente invención, puede hacerse uso de un compuesto antibacteriano seleccionado de uno o varios de lactilato conforme a la fórmula 1, o un Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH₄, o Cu(II) derivado de sal, un glicosilato de fórmula 2, o un Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH₄, o Cu(II) derivado de sal, un éster de lactato de fórmula 3, y/o un éster del ácido glicólico de fórmula 4.

[0013] Se ha descubierto que se prefiere el uso de un lactilato de fórmula 1 o un derivado de sal.

[0014] En una forma de realización preferida de la presente invención, R2 es un alquilo o cadena de alqueno con 6-20 átomos de carbono. Más en particular, el R2 es un alquilo o cadena de alqueno con 6-18 átomos de carbono. En esta forma de realización, los sustituyentes adecuados incluyen grupos con 6 átomos de carbono (caprónico), 8 átomos de carbono (caprílico) 10 átomos de carbono (ácido cáprico), 12 átomos de carbono (lauril), 14 átomos de carbono (miristilo), 16 átomos de carbono (cetilo; palmitilo), 18 átomos de carbono (estearil). También se pueden usar mezclas de dos o más compuestos. Cuando se usa sal, se prefiere particularmente el uso de un Na, K, Ca, o Mg de sal. El valor para n está preferiblemente en el rango de 1-5. Más en particular n tiene un valor de 1, 2, o 3.

[0015] Se prefiere particularmente el uso de lauroil lactilato, miristoil lactilato, y sus sales de sodio. En una forma de realización, se utiliza una mezcla que comprende 5-95 % en peso de lauroil lactilato y 95-5 % en peso de miristoil lactilato, o la sal(es) de sodio de estos compuestos se usan, más en particular, una mezcla se usa que comprende 25-75 % en peso, más en particular 40-60 % en peso de lauroil lactilato, y 75-25 % en peso, más en particular 40-60 % en peso de miristoil lactilato, o la sal(es) de sodio de estos compuestos.

[0016] En una forma de realización de la presente invención, el compuesto antibacteriano, en particular los lactilatos o sales derivadas, se usan en combinación con uno o varios componentes coccidiostáticos. Esto es de particular interés en el ave durante el periodo de inmunosupresión, que es el periodo en una vida del polluelo donde el sistema inmunológico que protege el animal en el huevo se deteriora pero el sistema inmunológico del animal no se ha desarrollado completamente. Para los pollos esto ocurre entre el día 10 y 20 de la vida del animal. Esto es de particular interés pues aumenta la resistencia del pollo a infecciones intestinales de Clostridium. Más en particular, en el pollo se cree que la enteritis necrótica provocada por Clostridium es frecuentemente precedida por una infección con Eimeria. Se cree que el Eimeria daña la pared de los intestinos, lo que hace que este sea menos resistente a una infección de Clostridium. Por lo tanto, el uso de una combinación de lactilato con uno o varios

componentes coccidiostáticos, proporcionará un aumento de la resistencia del pollo contra la enteritis necrótica. Se conocen en la técnica componentes coccidiostáticos adecuados, así como las cantidades en las que éstos deberían ser proporcionados. Los componentes adecuados incluyen maduramycine, diclrzil, narasin, nicarbazin, monensin, robenidina, lasalocid, halofuginona, narasin, salinomycin, decoquinato, y semduramicina.

5 [0017] La composición se puede administrar a animales como un componente de una composición de alimento convencional para animales. En el contexto de esta invención, el término "nutrición animal" incluye alimentos sólidos y alimentos líquidos, como agua potable. Así, la composición se puede administrar al animal como un componente sólido o líquido de una composición de la alimentación convencional para animales o en su agua potable. La
10 composición también se puede administrar al animal en una etapa separada, independiente del suministro de la composición de la alimentación convencional para animales.

[0018] En una forma de realización de la invención, el compuesto antibacteriano, en particular el lactilato o derivado de sal, se fija a un soporte. Esto proporciona una forma conveniente de obtener la composición antimicrobiana en
15 forma de polvo sólido. Los soportes adecuados se seleccionan del material de fibra vegetal, carbohidratos vegetales tal como celulosa, y soportes minerales tales como sílice, almidón, yeso, y cal. En otra forma de realización, el compuesto antimicrobiano se añade a la mezcla con un aceite vegetal, por ejemplo, un aceite de maíz, aceite de soja, o aceite de oliva. El compuesto antimicrobiano puede también tener la forma de un cuerpo de tableta u otro cuerpo conocido para el suministro de componentes farmacéuticos a animales.

[0019] La cantidad de compuesto antimicrobiano, en particular lactilato, administrado al animal es de tal manera que resulta eficaz para tratar o prevenir infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en el animal al
20 que se le administra el compuesto. Tal cantidad se encuentra adecuadamente en el rango de 0,0001-5% basado en el peso total de cada uno de los alimentos suministrados al animal. En una forma de realización preferida, la cantidad puede estar en el rango de 0,001 a 2%, basado en el peso total de cada uno de los alimentos suministrados al animal. Se ha descubierto que en comparación con el uso del ácido láctico como se describe en WO 2004/107877 puede ser posible usar concentraciones inferiores del componente eficaz. Mientras que en los
25 ejemplos de WO 2004/107877 se usa un 1.2 % en peso de ácido láctico, el uso de, por ejemplo, lactilatos conforme a la presente invención permite el uso de una cantidad reducida del componente activo. Por consiguiente, en una forma de realización de la presente invención, la cantidad puede estar en el rango de 0,001 a 1 % en peso, más en particular 0,001 a 0,5 % en peso, basado en el peso total de cada uno de los alimentos suministrados al animal. Esto se encuentra dentro del campo del experto en la materia para determinar la cantidad necesaria.

[0020] Si así se desea, la cantidad puede ser mayor que la requerida para que el compuesto sea eficaz para tratar o
35 prevenir infecciones provocadas por enteritis relacionadas con clostridia de bacterias grampositivas en el animal. Este puede ser el caso si el compuesto también actúa para promover crecimiento, mejorar la alimentación para ganar proporción, y/o mejorar la digestibilidad de los aminoácidos administrados en piensos para animales.

[0021] Como se ha mencionado anteriormente, el compuesto antibacteriano se puede administrar a animales como
40 un componente de una composición del alimento convencional para animales. Una composición del alimento convencional para animales puede comprender trigo, almidón, harina de carne y hueso, maíz, comida de girasol, callo, cereales, cebada, harina de soja, tapioca, pulpa cítrica, leguminosas, pulpa de remolacha, etcétera. Conforme a la presente invención, el suministro de compuestos antibacterianos al animal para tratar o prevenir infecciones intestinales con bacterias grampositivas, en general, no se puede combinar con el suministro de antibióticos.

[0022] En WO 2004/107877 se usa el ácido láctico o un derivado de ácido láctico en combinación con el ácido
45 inorgánico seleccionado de nitrógeno, azufre, y ácidos con fósforo. Se indica que se cree que el ácido inorgánico reduce el pH en el chymus durante el paso total en el animal, así aumenta la presencia de ácido láctico no disociado, lo que disgrega la membrana externa de los patógenos. En cambio, la presente invención no se basa en la presencia del ácido láctico no disociado. Por lo tanto, la presente invención no requiere la presencia de un ácido inorgánico para reducir el pH en el chymus. Por consiguiente, la presente invención también hace referencia al uso de compuestos antibacterianos como se ha descrito anteriormente, en particular de lactilatos según la fórmula 1, en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas, donde tal uso no
50 está acompañado por el uso de un ácido inorgánico seleccionado de nitrógeno, azufre, y fósforo que contienen ácidos para aumentar la presencia del ácido láctico no disociado.

[0023] La invención es posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos, que muestran los méritos inventivos de esta invención, sin que la invención se encuentre limitada a ello o por ello.

60 **Ejemplo 1:** eficacia de una mezcla de lactilato de lauroilo de sodio y lactilato de miristoilo de sodio contra la enteritis necrótica en el pollo

[0024] La eficacia de una mezcla de lauroil lactilato de sodio y miristoil lactilato de sodio contra la enteritis necrótica
65 en el pollo han sido evaluados por Schothorst Feed Research en un modelo experimental de infección *C. perfringens* que han desarrollado donde una infección de coccidiosis se usa como un predesencadenante para *C. perfringens* para colonizar el intestino delgado y causar enteritis necrótica. Una infección de coccidiosis se inicia por una *Eimeria*

maxima patógena y, en el valor máximo de la infección de coccidiosis, las aves se inoculan con una cepa *C. perfringens* que resultó ser un patógeno para hacer que los pollos engorden. Una infección de coccidiosis provocada por *E. maxima* (que da lugar a lesiones en el segmento mediano del intestino delgado) seguida de una infección de *Clostridium* resulta en un modelo altamente reproducible y una manera precisa y fácil de marcado para las lesiones de enteritis necrótica, porque lesiones de *E. maxima* y *Clostridium* son fáciles de diferenciar mientras que las lesiones de ambos patógenos no ocurren en lo mismo segmento intestinal. Los experimentos se realizan con la cooperación del servicio de salud Animal (GD).

[0025] El experimento consiste en un tratamiento y dos tratamientos de control. Todos los tratamientos consisten en seis repetidas jaulas con 19 rejillas por jaula. Los tratamientos se dan en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos y códigos de la dieta

Trt.	Día 9	Día 14,15 y 16	Suplementación de aditivo	Observación
	Inóculo:			
1.	Salino	Caldo de hígado		Control
2.	<i>Eimeria maxima</i>	<i>C. perfringens</i> ²		Control/Experimental
3.	<i>Eimeria maxima</i>	<i>C.perfringens</i>	mezcla de prueba (0,3% mezcla del 50 % en peso del lactilato de lauroilo de sodio y 50 % en peso lactilato de miristoilo)	Experimental
¹⁾ 10.000 de esporulado oocysts de <i>Eimeria maxima</i> en 1 ml ²⁾ 1 x 10 ⁸ cfu <i>C. perfringens</i> en 1 ml				

Animales, gestión y procedimientos

[0026] Con un día de edad y de sexo masculino, Ross 308 suministra pollos para el consumo por Probroed & Sloot B.V., Países Bajos. En el día 0, los pollos llegaron a las instalaciones de los laboratorios del servicio de salud Animal (Deventer, Países Bajos) y fueron alojados en jaulas de digestibilidad tras pesarlos de manera individual. Basado en un sistema de peso, unas 19 aves se distribuyeron en 30 jaulas Schothorst de digestibilidad con suelo de arena, dando como resultado un peso medio similar por jaula. Los pollos se alojaron en estas jaulas hasta el final del experimento el día 20. El día 9, si no tiene lugar ninguna mortalidad, el número de pollos se estandariza a 17 y se mide de nuevo el peso de las aves. En primer lugar, las aves con obvias aberraciones visuales se retiran y en segundo lugar, se quitaron aves al azar para reducir el número a 17. La iluminación y la temperatura programada en todo el periodo experimental fue de la siguiente manera, 22 horas de luz seguidas de 2 horas de oscuridad en el primer periodo del día 0 al 9, seguido de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad durante el resto del experimento. La temperatura ambiente fue gradualmente disminuida desde los 32°C al principio a 25°C al final del experimento.

[0027] La alimentación fue suministrada para una alimentación libre desde el día 0 en adelante con excepción de las 5 horas anteriores a las inoculaciones (días 9, 14,15 y 16) y secciones (días 15,16 y día 20). El agua estaba disponible para su toma libre durante todo el experimento.

Composición alimentaria

[0028] A los pollos se le suministró una dieta inicial basada en trigo/semilla de soja desde el día de llegada hasta el día 9. Desde el día 9 en adelante se alimentaron con una dieta cultivada basada en trigo/cebada hasta el final del experimento (día 20). El alimento de crecimiento fue usado como comidas debido a la necesidad de mezclar homogéneamente en los productos de prueba después de la producción de la alimentación. Las dietas no contenían ningún coccidiostato o aditivos antimicrobianos alimenticios diferentes del producto de prueba. La composición nutriente de las dietas experimentales se hizo de acuerdo a los estándares holandeses para satisfacer los requisitos de nutrientes de los pollos (CVB, 2006).

Inóculo

[0029] El día 9, los pollos se inocularon con bien 1 ml solución salina o *E. maxima* (10.000 oocistos esporulados /pollo en 1 ml) después de un periodo de 5 horas de ayuno. Desde el día 14 en adelante, los pollos se inocularon con 1 ml de caldo de hígado (DIFCO) o *C. perfringens* una vez al día persistiendo tres días después de una retirada de la alimentación de 5 horas. En la Tabla 1 se presenta una visión de conjunto detallada de los diferentes tratamientos.

[0030] La cepa patogénica *C. perfringens* se obtuvo del Servicio de Salud Animal en Deventer, Países Bajos (aprox. 10⁸ cfu en 1 ml). La cepa se cultiva en un agar de sangre de oveja y el cultivo está escrito por CIDC (instituto Central de Control de enfermedad de animal en Lelystad) como que *C. perfringens* produce un tipo a y ?2 toxinas. Cada día se utilizó un inóculo recién preparado.

Puntuación de las lesiones

- 5 [0031] Clostridium perfringens: las lesiones macroscópicas y microscópicas generalmente ocurren en el intestino delgado, en particular en el sitio proximal.
Se ha utilizado el siguiente método de puntuación:
- 0: Sin lesiones
1: 1 a 5 lesiones pequeñas (puntos inferiores a 1 mm diámetro)
10 2: Más de 5 lesiones pequeñas (puntos inferiores a 1 mm diámetro) o de 1 a 5 lesiones más grandes (puntos de 1 a 2 mm diámetro)
3: Más de 5 lesiones más grandes (de 1 a 2 mm diámetro) o zonas erosivas
4: Aves muertas con un diagnóstico de enteritis necrótica positiva post mórtem
- 15 Todas las aves se marcaron como "ciegas", es decir, la persona que puntuaba las lesiones de las aves desconocía el tratamiento de las aves.

Mediciones

- 20 [0032] Durante el experimento se midieron los siguientes parámetros:
El peso corporal individual el día de llegada y la media por jaula el día 9 y el día 20 del experimento
El peso corporal de las aves antes de la necropsia
El consumo de pienso por jaula en el periodo entre el día 0 y el 9 y consumo de alimento diario desde los 9-20 días de edad
- 25 Las lesiones de coccidiosis y lesiones de enteritis necrótica en la mucosa del intestino delgado de 24 aves por tratamiento en el día 15, día 16 y día 20 del experimento (un total de 72 aves por tratamiento).
Mortalidad por jaula desde 0 a 20 días de edad.
Se mantuvieron los registros diarios de todas las actividades rutinarias de estudio, trastornos de salud y de mortalidad (con su causa más probable).

30 Análisis estadísticos

- [0033] Se analizaron los datos en bruto de los valores atípicos. Se excluyeron los valores atípicos significativos del análisis estadístico. Se analizó la incidencia de lesiones de NE (% de aves afectados) mediante el Fisher Exact Test, mientras que la gravedad de lesiones y mediciones de consumo de alimento diario fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico Genstat. Las medias de tratamiento se compararon mediante la mínima diferencia significativa (LSD). Se consideró $P \leq 0.05$ estadísticamente significativo, mientras que $0.05 < P \leq 0.10$ fue considerado como una tendencia casi significativa.

40 Resultados y discusión

Incidencia y gravedad de las lesiones

45 Puntuación de la lesión el día 15 (1 día después de la infección)

- [0034] En la Tabla 2, se da tanto el porcentaje de aves con una puntuación positiva (aves con lesiones NE) como la puntuación de lesiones media de todas las aves con puntuación positiva. Debido a que la puntuación de la lesión media es todas las aves examinadas, tanto afectadas como no afectadas, se da una imagen más representativa de la población, los análisis estadísticos se han realizado sobre estos resultados (véase la quinta columna de la tabla 2). La gravedad de lesiones tanto en las aves puntuadas en positivo y como las negativas se indican en una escala de 0 a 4 (véase sección "puntuación de las lesiones").

Tabla 2: las aves observadas con NE (%) y la gravedad media de lesiones anotadas el día 15 (1 día p.i.).

Grupo	Tratamiento	Dosis	Aves positivas (%)	Gravedad de la lesión	Gravedad de la lesión (pos. aves) ¹⁾
1	Control negativo	-	0 ^a	0,0 ^a	0,0
2	Control positivo	-	16 ^{ab}	0,5 ^b	3,0
3	Mezcla de prueba	0,3%	17 ^{ab}	0,4 ^d	2,5

^{a,b} Valores sin índice superior común en una columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

¹⁾ gravedad de las lesiones de las aves anotadas como positivas de N

- 55 [0035] Se observa un efecto significativo del tratamiento en la incidencia NE. Como era de esperar, se observó la incidencia mínima en el tratamiento de control no infectado pero los resultados fueron comparables a los resultados

de los tratamientos suplementados con la mezcla de prueba y el control infectado no suplementado.

[0036] Basado en el ANOVA se concluyó que hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la gravedad de las lesiones necróticas en el día 15 ($P < 0,001$).

5 Por la gravedad de la lesión era evidente que las lesiones eran más graves en los tratamientos infectados, tanto no suplementados como suplementados, que en el tratamiento de control no infectado en el que no habían aves con puntuación positiva. Entre los tratamientos infectados no se observaron diferencias estadísticas.

Puntuación de la lesión el día 16 (2 días después de la infección)

10 [0037] En la tabla 3, el porcentaje de aves positivas anotadas y la puntuación media de la lesión de aves se da para el día 16.

15 Tabla 3: Las aves observadas con NE (%) y la gravedad media de lesiones puntuadas en todas las aves a las que se les ha realizado una necropsia el día 16 (2 días p.i.).

Grupo	Tratamiento	Dosis	Aves positivas (%)	Gravedad de la lesión	Gravedad de la lesión (pos. aves) ¹⁾
1	Control negativo	-	0 ^a	0,0 ^a	0,0
2	Control positivo	-	68 ^b	2,1 ^c	3,2
3	Mezcla de prueba	0,3%	41 ^b	1,1 ^b	2,7

^{a,b}. Valores sin índice superior común en una columna difieren significativamente ($P \leq 0,05$)

20 [0038] Comparando los resultados de incidencia de NE y la gravedad de la lesión el día 16 a los resultados del día 15, queda claro que la gravedad de la infección fue más alta 2 días después de la infección. Aunque de nuevo se observó un efecto significativo de tratamiento en la incidencia NE, es evidente que esto se debe a la diferencia entre el tratamiento de control no infectado y los tratamientos infectados, que es como se esperaba, mientras que entre tratamientos infectados no se observó ninguna diferencia significativa. Se puede sacar una clara distinción en la gravedad de la lesión 2 días posteriores a la infección. El tratamiento suplementado con la mezcla de prueba dio lugar a una clara reducción en la gravedad de lesión en comparación con el control infectado no suplementado, aunque las puntuaciones medias de la lesión fueron todavía superiores a las del control no infectado.

25 Puntuación de la lesión el día 20 (6 días después de la infección)

30 [0039] El día 20 no se observó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos. Todos tratamientos recuperados de NE, al menos basados en una evaluación macroscópica, con un 0% de incidencia y obviamente un 0,0 de gravedad de lesión.

Mortalidad

35 [0040] La mortalidad es uno de los parámetros para medir la gravedad de una infección con Clostridium en una bandada. En este experimento la mortalidad se comparó entre tratamientos. Mortalidad fue de un 14,6% en el tratamiento de control infectado (tratamiento 2) y de un 0% en el control no infectado. La suplementación de la mezcla de prueba redujo la mortalidad (5.1%).

Parámetros de producción

40 [0041] Además de la puntuación de las lesiones, también se midieron durante el periodo de prueba los parámetros de producción como el peso corporal y el consumo de alimento diario. El peso corporal de un pollo de un día de edad fue en todos tratamientos de aprox. 47 gramos. Dado que los tratamientos de los días 0 a 9 fueron similares, no se observó ninguna diferencia en la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento en este periodo. En el periodo de infección desde el día 9 al 20 ambos parámetros de producción se vieron significativamente afectados por los tratamientos individuales. La ganancia de peso corporal fue mayor en el control no infectado, como estaba previsto, mientras que los pollos con los tratamientos suplementados infectados han mostrado una ganancia de peso corporal mínima. Esto resultó en un peso final inferior a 30% el día 20 (523 g frente a 749 g). El tratamiento suplementado infectado dio lugar a una ingesta de alimento significativamente más alta y a una ganancia de peso corporal en comparación con el control infectado no suplementado. La disminución en el rendimiento de la producción podría ser reducida con 10% mostrando una pérdida en el peso final de aprox. 20% en comparación con el grupo de control no infectado (aprox 583 g frente a 749 g). Se concluyó que la mezcla de prueba aumentó significativamente el rendimiento de la producción durante una infección subclínica Clostridium.

Ejemplo 2: pruebas in vitro de lactilatos frente a Clostridium

[0042] Los cultivos líquidos de Clostridium perfringens ATCC 13124 se cultivaron con tubos de tapón de rosca (100 x 16 mm) que contienen 10 ml caldo infusión cerebro corazón (Oxoid CM225, Basingstoke, Reino Unido) durante 24 horas a 30 °C. El caldo de infusión cerebro corazón se preparó con cantidades variables de lactilatos. El pH de los medios se ajustó a 6,0 con 9 M de ácido sulfúrico que utiliza un medidor Handylab pH 12 ph metro equipado con un Blueline 16 pH (micro) sonda (n. 285129163). Todos medios se esterilizaron por filtración usando filtros de 0.45 µm de acetato de celulosa (Minisart filtro de jeringas, estéril y no pirogénico, nº 16555, Sartorius, Göttingen, Alemania) (9). Se transfirieron 300 µl de cada medio a un panel de una Bioscreen estéril alveolada con 100 placas de pocillo (Thermo electron Oy, Vantaa, Finlandia). Las placas de pocillos completadas se almacenaron a -30 °C hasta otro uso posterior.

[0043] Las placas de pocillos fueron inoculadas con 3 µl de cultivo que utiliza un dispensador Hamilton estéril repetitivo (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). El índice de crecimiento de los organismos de prueba se determinó a 30 °C con el sistema de cultivo Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd, Helsinki, Finlandia). Para asegurar unas condiciones bajas en oxígeno, el Bioscreen se colocó dentro de un armario anaeróbico equipado con un tipo de sensor de oxígeno M-12 (En Vivo2 400 terminal de trabajo de hipoxia, Biotrace International Plc, Bridgend, Reino Unido). La tensión de oxígeno se reguló al 0 % de oxígeno utilizando un módulo de mezclador de gas de Ruskinn (Biotrace International Plc). El Bioscreen C mide cinéticamente el desarrollo de la turbidez por fotometría vertical de hasta 200 pocillos simultáneamente. La densidad óptica de los cultivos se midió automáticamente a intervalos de tiempo fijos de 420 a 580 nm utilizando un filtro de banda ancha.

[0044] La Tabla 4 muestra los valores del MIC para los diversos lactilatos evaluados para Clostridium perfringens ATCC 13124 en el caldo de infusión cerebro corazón. En los paréntesis se da el número de repeticiones. El MIC representa la concentración inhibidora mínima, que es la concentración más baja donde el aumento de la absorbancia de un cultivo no excede el valor de umbral, que fue definido como el aumento medio en el valor de absorbancia de las formas preliminares más tres veces la desviación típica. Parece que incluso con una concentración muy baja, los lactilatos son capaces de suprimir el crecimiento de Clostridium perfringens.

Tabla 4. Valores MIC de diferentes lactilatos

Lactilatos	Valores MIC (%)
Lactilato C8	0,05 % (2x)
Lactilato C10	0,04 % (2x)
Lactilato C12	0,002 % (2x)
Lactilato C14	0,001 % (2x)
Lactilato C16	0,002 % (2x)
Lactilato C18	0,02 % (2x)
Mezcla de 1:1 lactilato C10/C12)	0,002 % (3x)
Mezcla de 1:1 lactilato C12/C14	0,001 % (3x)

Ejemplo 3: Estudios de dosis-respuesta y estudios de prevención de una mezcla de sodio lauroil lactilato y sodio miristoil lactilato contra la enteritis necrótica en pollos

[0045] Análogo al ejemplo 1, se estudió la influencia de la dosis del compuesto. Además, se estudió el uso de la mezcla en pollos que no estaban previamente infectados con Emeria y Clostridium.

[0046] Los tratamientos realizados se resumen en la tabla 5:

Tabla 5 Descripción de los tratamientos

Trt.	Descripción	
1.	No infectado	
2.	No infectado + 0,3%	mezcla de prueba
3.	Infectado ¹⁾	mezcla de prueba
4.	Infectado + 0,6 %	mezcla de prueba
5.	Infectado + 0,3 %	mezcla de prueba (sílice)
6.	Infectado + 0,3 %	mezcla de prueba
7.	Infectado + 0,15 %	mezcla de prueba

ES 2 505 140 T3

8.	Infectado + 0,075 %	mezcla de prueba
9.	Infectado + 0,038 %	mezcla de prueba
10.	Infectado + 0,019 %	mezcla de prueba
11.	Infectado + 0,010 %	mezcla de prueba
12.	Infectado + 0,005 %	mezcla de prueba

La mezcla de prueba se compuso por un 50 % en peso de sodio lauroil lactilato y 50 % en peso de miristoil lactilato

- 5 [0047] Los resultados pueden resumirse de la siguiente manera. En este experimento, una posterior infección con E. maxima y C. perfringens resultó en una incidencia de enteritis necrótica de 56% y una puntuación de lesión media de 1,6 durante los primeros dos días después de la infección. Complementando las dietas de las aves con la mezcla de prueba, se redujo el número de pájaros infectados y se observó un efecto de respuesta a la dosis, mostrando la máxima eficacia en el 0,6% y 0,3% de los tratamientos. La gravedad de la lesión se redujo significativamente debido a la suplementación con la mezcla de prueba y el efecto de respuesta de la dosis se tuvo también presente en este parámetro. Las lesiones fueron menos severas en los tratamientos con las dosis más altas de mezcla de prueba. La mezcla de prueba suplementada de una forma pura resultó, en cierta forma, mejorar la respuesta que la mezcla de prueba suministrada a través de un portador de sílice. La suplementación de la mezcla de prueba con un 0,6% resultó en una reducción significativa de la mortalidad (4,6%) y no fue significativamente superior al tratamiento de control no infectado. Los resultados con un 0,3% de mezcla de prueba apoyaron los resultados observados en la puntuación de la lesión.
- 10
- 15 [0048] Con respecto al rendimiento de la producción, se observó un efecto cuando se compararon las aves saludables con o sin suplementación de mezcla de prueba entre sí. El suministro de la mezcla de prueba tendía a aumentar el peso corporal en la fase de iniciación y fase de crecimiento. Complementando las aves infectadas con dosis más altas de la mezcla de prueba resultó en que las aves consiguieron un peso final similar (día 37) al de las aves que no estaban infectadas del todo.
- 20 [0049] Se puede concluir que la mezcla de prueba, especialmente en una dosis de 0,3 % en peso o superior, es eficaz para prevenir el desarrollo de enteritis necrótica en la pollos, mostrando una incidencia inferior y lesiones menos severas.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto antibacteriano seleccionado de lactilato conforme a la fórmula 1,

5 Fórmula 1 $R_2\text{-COO-[-CH(CH}_3\text{)-COO]}_n\text{-R}_1$

o una sal de Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH_4 , o de Cu(II),
un glicosilato de fórmula 2,

10 Fórmula 2: $R_2\text{-COO-[-CH}_2\text{-COO]}_n\text{-R}_1$

o un Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH_4 , o sal de de Cu(II) de un éster de lactato de fórmula 3,

15 Fórmula 3: $\text{HO-CH(CH}_3\text{)-COO-R}_2$

y/o un éster del ácido glicólico de fórmula 4,

Fórmula 4: $\text{HO-CH}_2\text{-COO-R}_2$

20 donde las fórmulas anteriores R_1 se seleccionan de H, n representa un número entero con un valor de 1-10, y R_2 representa un alquilo o cadena de alqueno C1-C35 que puede estar ramificada o no ramificada para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales.

25 2. Compuesto antibacteriano según la reivindicación 1, donde el compuesto antibacteriano es un lactilato de fórmula 1 o una sal de Na, K, Ca, Mg, Fe(II), Zn, NH_4 , o de Cu(II) para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.

30 3. Compuesto antibacteriano según la reivindicación 1 o 2, donde R_2 es un alquilo o cadena de alqueno C6-C18 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.

35 4. Compuesto antibacteriano según la reivindicación 1 o 2, en el que n es 1, 2, o 3 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.

40 5. Composición de nutrición animal que comprende un compuesto antibacteriano tal y como se define en las fórmulas 1-4 en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales provocadas por bacterias grampositivas en animales.

45 6. Compuesto antibacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición para nutrición animal 5 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1, donde la bacteria grampositiva es del género Clostridia.

50 7. Compuesto antibacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o composición para nutrición animal según la reivindicación 5 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1, donde el animal seleccionado es bovino o son aves.

55 8. Compuesto antibacteriano tal y como se define en las fórmulas 1-4 en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1 para aumentar el crecimiento de un animal.

60 9. Compuesto antimicrobiano tal y como se define en las fórmulas 1-4 en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso según la reivindicación 8, donde se aumenta el crecimiento del animal por la supresión de bacterias grampositivas en el intestino por la alimentación del animal con una cantidad eficaz de un compuesto antimicrobiano.

65 10. Compuesto antibacteriano tal y como se define en las fórmulas 1-4 en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso según la reivindicación 9, donde las bacterias grampositivas son Lactobacillus spp.

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1, donde la infección es necrótica enteritis.

60 12. Compuesto tal y como se define en las fórmulas 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1 para mejorar la alimentación para ganar proporción.

65 13. Compuesto tal y como se define en las fórmulas 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1 para mejorar la digestibilidad de aminoácidos administrados en alimentos para animales.

- 5 14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en combinación con uno o varios compuestos seleccionados de trigo, almidón, harina de carne y hueso, maíz, harina de girasol, granos, cereales, cebada, harina de soja, tapioca, pulpa de cítricos, leguminosas, y pulpa de remolacha para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.
- 15 15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en combinación con un coccidiostático para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.
- 10 16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1, donde el compuesto está presente en un soporte seleccionado de materia de fibra vegetal, carbohidratos vegetales y soportes minerales.
- 15 17. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto se añade a una mezcla con aceite vegetal para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.
- 20 18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en ausencia de un ácido inorgánico seleccionado de nitrógeno, azufre, y ácidos con fósforo para aumentar la presencia de ácido láctico no dissociado para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.
- 25 19. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto es seleccionado de uno o varios de lauroil lactilato, miristoil lactilato, cetil lactilato, palmitil lactilato y sales de sodio de los mismos para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 1.
- 20 20. Composición de nutrición animal que comprende un compuesto antibacteriano tal y como se define en las fórmulas 1-4 en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto está presente en una cantidad de 0,001 a 1 % en peso, más en particular de 0,001 a 0.5 % en peso, basado en el peso total de cada uno de los alimentados suministrados al animal para usar en la prevención o tratamiento de infecciones intestinales según la reivindicación 5.