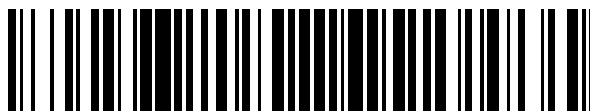


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 480**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74**

(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2007** **E 07838266 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015** **EP 2068899**

54 Título: **Lactobacillus acidophilus para su uso en reducir la incidencia y duración de infecciones respiratorias**

30 Prioridad:

**02.10.2006 US 848662 P**

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

**06.10.2015**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**

**Langebrogade 1, Postboks 17**  
**1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**LEYER, GREGORY y**  
**OUWEHAND, ARTHUR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 547 480 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

*Lactobacillus acidophilus* para su uso en reducir la incidencia y duración de infecciones respiratorias

## 5 Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones probióticas para su uso en la prevención de infecciones del tracto respiratorio en niños.

## 10 Antecedentes de la invención

Las infecciones del tracto respiratorio han sido reconocidas como la más común de todas las enfermedades infecciosas. Las infecciones del tracto respiratorio superior incluyen una gran cantidad de procesos inflamatorios agudos que implican principalmente la nariz, los senos paranasal, el oído medio, los tejidos laríngeos-epiglóticos, y la orofaringe. Estas infecciones agudas se clasifican como la causa más frecuente para pacientes de todas las edades que solicitan atención médica. Además, una proporción significativa de todas las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio son infecciones del tracto respiratorio inferior.

Aunque la mayoría de las enfermedades respiratorias superiores son auto-limitantes y benignas, representan una considerable carga socio-económica sobre las poblaciones. En contraste, las infecciones del tracto respiratorio inferior a menudo siguen un curso potencialmente mortal que puede comprometer gravemente el sistema terminal de vías aéreas pulmonares alveolares, especialmente en individuos con función pulmonar alterada.

Los niños y los ancianos tienen un mayor riesgo de enfermedad severa debido a infecciones respiratorias superiores e inferiores. Aquellos en proximidad cercana a otros individuos tienen un riesgo incluso mayor. De hecho, los niños que asisten a guarderías infantiles tienen un riesgo aumentado de 1,5 a 3 veces de infecciones del tracto gastrointestinal y respiratorio que niños cuidados en casa o en grupos familiares pequeños (véase por ejemplo, Hatakka et al., BMJ 322:1-5 [2001]). Además de los costes médicos directos asociados con dichas infecciones, existen costes indirectos incurridos por el abandono del puesto de trabajo por parte de los padres para cuidar a los niños enfermos. La ausencia de vacunas eficaces para muchas de estas enfermedades contribuye a la carga asociada con estas enfermedades. Por tanto, se necesitan composiciones y métodos para ayudar a prevenir y/o reducir la severidad de las enfermedades respiratorias.

Sanders et al. (J Dairy Sci (2000) 84:319-331) muestra la base científica de *L. acidophilus* NCFM como probiótico. Este documento describe numerosas aplicaciones para esta cepa, pero no muestra o sugiere el uso de *L. acidophilus* NCFM para tratar o prevenir una infección del tracto respiratorio o un síntoma de la misma en un niño.

Hatakka et al. (2001, BMJ, 332: 1327) describe que *Lactobacillus* GC reduce las infecciones respiratorias en niños.

## 40 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un cultivo de *L. acidophilus* NCFM para su uso en:

(a) tratar o prevenir una infección del tracto respiratorio en un niño; y/o

(b) tratar o prevenir los síntomas de tipo gripe de una infección del tracto respiratorio en un niño.

En algunas realizaciones preferidas, el cultivo comprende adicionalmente una cepa bacteriana adicional. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la cepa bacteriana adicional es *B. lactis*. En realizaciones preferidas adicionales, el niño es de edad pre-escolar. En algunas realizaciones preferidas, el niño está entre las edades de aproximadamente 3 años y aproximadamente 5 años. En más realizaciones adicionales, la administración se realiza durante los meses de otoño o invierno. En algunas realizaciones, el cultivo se administra por vía oral. En algunas realizaciones preferidas, el cultivo se proporciona en al menos un suplemento nutricional. En más realizaciones adicionales, los cultivos reducen la necesidad de administración de antimicrobianos para tratar la enfermedad respiratoria en un niño. En más realizaciones preferidas adicionales, los cultivos evitan el absentismo debido a dicha enfermedad respiratoria en un niño.

En realizaciones preferidas adicionales, el niño está en edad pre-escolar. En algunas realizaciones preferidas, el niño está entre las edades de aproximadamente 3 años y aproximadamente 5 años. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a este intervalo de edades, ya que se contempla que la presente invención encuentre uso con otras diversas edades. En más realizaciones adicionales, la administración se realiza durante los meses de otoño o invierno. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a estas estaciones particulares, ya que se contempla que la presente invención también encuentre uso en otras estaciones. En algunas realizaciones, el cultivo se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el cultivo se proporciona en al menos un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, los síntomas de una infección del tracto respiratorio en un niño

infectado comprenden al menos un síntoma de fiebre, tos, secreción nasal, cefalea, dolor muscular, irritación de garganta, congestión nasal, malestar, diarrea, y vómitos.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona gráficos que muestran el porcentaje de tiempo con síntomas notables por grupo de estudio.

#### Descripción de la invención

La presente invención proporciona composiciones probióticas para su uso como se define en las reivindicaciones.

Durante el desarrollo de la presente invención, se descubrió que se proporcionaban efectos protectores significativos en la prevención de síntomas de tipo gripe (por ejemplo, fiebre, tos, secreción nasal, etc.) por *L. acidophilus* en solitario y en combinación con *B. animalis* subespecie *lactis*. Además de prevenir los síntomas de tipo gripe, la administración de estos organismos en solitario o en combinación provocaba una reducción significativa en la cantidad de días que los individuos eran sintomáticos.

Por tanto, la presente invención proporciona muchos beneficios en términos de prevención de enfermedad en niños, que también reduce el impacto económico de las enfermedades sobre las familias (por ejemplo, costes médicos directos), así como el absentismo de los padres en el trabajo por cuidar de niños enfermos. Debido al significativo impacto que representan las infecciones respiratorias, gran parte del trabajo se ha dirigido hacia la prevención y reducción de la severidad de dichas enfermedades. Por ejemplo, se han desarrollado suplementos nutricionales que reivindican ser eficaces en la mejora de la salud de los niños, incluyendo una combinación probiótica que comprende *B. lactis* (BB-12) y *L. reuteri* (ATCC 55730). Se descubrió que la administración de fórmulas suplementadas con este probiótico a bebés en guarderías infantiles daba como resultado una reducción en la cantidad y duración de los episodios de diarrea en los bebés, pero no afectaba a los síntomas respiratorios (Weitzman y Alsheikh, Pediatrics 115:5-9 [2005]).

Durante el desarrollo de la presente invención, se evaluaron los efectos asociados con el consumo de productos probióticos por niños en edad pre-escolar. Estos productos se tomaron dos veces al día durante seis meses durante la época del año cuando la enfermedad es más prevalente en niños, así como adultos (es decir, mediados de septiembre a mediados de febrero). En particular, se evaluó el consumo de probióticos en productos lácteos normalizados (por ejemplo, leche con un 1% de grasa u otro producto probiótico) para la reducción en los síntomas de tipo gripe de enfermedad en niños de edad pre-escolar que asisten a guarderías infantiles. La cantidad de días que un niño estuvo enfermo, pero asistió a la guardería/escuela infantil, así como el periodo de recuperación desde la enfermedad inicial también se incluyeron en esta evaluación. Además, también se evaluó la presencia/ausencia de otras enfermedades, así como parámetros nutricionales (incluyendo la ganancia o pérdida de peso corporal).

#### Definiciones

Salvo que se indique de otro modo, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales habitualmente usadas en microbiología de los alimentos, suplementos nutricionales, enfermedades pediátricas, epidemiología, biología molecular, microbiología, purificación de proteínas, y uso y desarrollo de enzimas industriales, todos los cuales pertenecen a las habilidades de la técnica.

Además, los encabezados proporcionados en este documento no se limitan a los diversos aspectos o realizaciones de la invención, que pueden obtenerse por referencia a la memoria descriptiva como un conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva como un conjunto. No obstante, para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se proporcionan definiciones para varios términos.

Salvo que se defina de otro modo en este documento, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Por ejemplo, Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); y Hale y Margham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los especialistas en la técnica diccionarios generales de muchos de los términos usados en la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento encuentra uso en la práctica de la presente invención, en este documento se describen métodos y materiales preferidos. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se describen más completamente por referencia a la memoria descriptiva como un conjunto. Además, como se usa en este documento, los términos singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Debe apreciarse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que éstos pueden variar, dependiendo del contexto en que se usen por los especialistas en la técnica.

- Se pretende que toda limitación numérica máxima dada durante toda esta memoria descriptiva incluya toda limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en este documento. Cada limitación numérica mínima dada durante toda esta memoria descriptiva incluirá toda limitación numérica superior, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en este documento. Todo intervalo numérico dado durante toda esta memoria descriptiva incluirá todo intervalo numérico más estrecho que caiga dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más estrechos estuvieran todos expresamente escritos en este documento.
- Como se usa en este documento, el término "alimento" se refiere a cualquier artículo nutricional que proporcione nutrición a una planta y/o animal. No se pretende que el término se limite a ningún artículo particular, ya que se usa en referencia a cualquier sustancia tomada en y asimilada por una planta o animal para mantenerse vivo. Tampoco se pretende que el término se limite a alimentos "sólidos", ya que la definición abarca nutrición líquida. De hecho en algunas realizaciones, se prefiere nutrición líquida sobre artículos alimenticios sólidos. En algunas realizaciones preferidas, el término se usa específicamente en referencia a alimentos para consumo humano.
- Como se usa en este documento, el término "pienso" se refiere a cualquier artículo nutricional que proporcione nutrición a animales no humanos. No se pretende que el término se limite a ningún artículo particular, ya que se usa en referencia a cualquier sustancia tomada en y asimilada por una planta o animal para mantenerse vivo. Tampoco se pretende que el término se limite a alimentos "sólidos", ya que la definición abarca nutrición líquida. De hecho en algunas realizaciones, se prefiere nutrición líquida sobre artículos alimenticios sólidos.
- Como se usa en este documento, las expresiones "suplemento nutricional" y "suplemento dietético" se refieren a cualquier producto que se añade a la dieta. En algunas realizaciones particularmente preferidas, los suplementos nutricionales se toman por vía oral y a menudo contienen uno o más ingredientes dietéticos, incluyendo aunque sin limitación vitaminas, minerales, hierbas, aminoácidos, enzimas, y cultivos de organismos.
- Como se usa en este documento, el término "nutracéutico" se refiere a un alimento/suplemento dietético que se cree que y/o se toma para proporcionar beneficios para la salud.
- Como se usa en este documento, el término "probiótico" se refiere a un ingrediente alimenticio microbiano vivo que es beneficioso para la salud.
- Como se usa en este documento, el término "prebiótico" se refiere a un ingrediente alimenticio no digerible que afecta de forma beneficiosa a un ser humano y/u otro animal que ingiere el prebiótico. En realizaciones preferidas, los prebióticos estimulan de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de al menos un tipo de bacteria en el tracto intestinal, de modo que se mejora la salud del ser humano y/u otro animal.
- Como se usa en este documento, el término "sinbiótico" se refiere a una mezcla de prebióticos y probióticos.
- Como se usa en este documento, los términos "dolencia" y "enfermedad" se refieren a cualquier desviación de o alteración de la estructura y/o función normal de cualquier parte corporal, órgano, o sistema que se manifiesta por un conjunto característico de síntomas y signos. El término abarca afecciones con etiología y/o patología conocida o desconocida.
- Como se usa en este documento, el término "tratar" se refiere a proporcionar composiciones que provocan la mejora, paliación, y/o remediación de una enfermedad, trastorno, o síntoma de enfermedad o afección.
- Como se usa en este documento, las expresiones "administración oral" y "per os" se refieren a tomar alimentos y/o suplementos mediante la boca.
- Como se usa en este documento, las expresiones "prevención de dolencia" y "prevención de enfermedad" se refieren a medidas tomadas para evitar la incidencia de la dolencia/enfermedad. En algunas realizaciones, se toman medidas "profilácticas" para evitar la enfermedad/dolencia.
- Como se usa en este documento, la expresión "síntoma de enfermedad" se refiere a cualquiera subjetivo de enfermedad y/o afección de un paciente. Se usa en referencia a cualquiera de estas evidencias percibida por el paciente.
- Como se usa en este documento, la expresión "signo de enfermedad" se refiere a una indicación de la existencia de enfermedad/dolencia. Se usa en referencia a cualquier evidencia objetiva de enfermedad que es perceptible para el médico que examina y/u otros asistente sanitario.
- Como se usa en este documento, el término "absentismo" se refiere a la tasa de ausencia de la guardería y/o escuela infantil debido a enfermedad. También se refiere a la ausencia del colegio y/o el trabajo debido a enfermedad. En algunas realizaciones particularmente preferidas, los cultivos de la presente invención son para su

uso en reducir el absentismo de niños de la guardería y/o escuela infantil debido a enfermedad (por ejemplo, enfermedad respiratoria).

Como se usa en este documento, el término "morbilidad" se refiere a dolencia/enfermedad.

Como se usa en este documento, el término "mortalidad" se refiere a muerte.

Como se usa en este documento, el término "incidencia" se refiere a la tasa a la cual sucede un cierto evento, como en la cantidad de nuevos casos de una enfermedad específica que aparece durante un cierto periodo de tiempo.

Como se usa en este documento, el término "prevalencia" se refiere a la cantidad total de casos de una enfermedad y/o afección específica en existencia en una población dada en un cierto momento.

Como se usa en este documento, la expresión "tracto respiratorio" se refiere al sistema que está implicado con la respiración. El tracto respiratorio a menudo se divide en tres segmentos, concretamente el tracto respiratorio superior (es decir, nariz, fosas nasales, senos paranasales, garganta/faringe), las vías respiratorias (es decir, laringe, tráquea, bronquios, y bronquiolos), y el tracto respiratorio inferior (es decir, los pulmones, compuestos por bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, y alveolos).

Como se usa en este documento, la expresión "enfermedad respiratoria" se refiere a cualquier enfermedad del tracto respiratorio.

Como se usa en este documento, los términos "gripe" e "influenza" se refieren a enfermedad respiratoria contagiosa causada por cualquiera de los virus de la influenza.

Como se usa en este documento, la expresión "síntomas de tipo gripe" se refiere a síntomas comúnmente asociados con la influenza, incluyendo aunque sin limitación tos, secreción nasal, congestión nasal (es decir, "nariz tapada"), irritación de garganta, fiebre, dolor muscular (es decir, mialgia), dolor de estómago, cefalea, malestar, diarrea, vómitos, dolor de oídos, otitis media, etc.).

Como se usa en este documento, el término "secuelas" se refiere a dolencia/enfermedad y síntomas/signos que aparecen como consecuencia de un evento de afección y/o enfermedad. En algunas realizaciones, las secuencias aparecen mucho después de haberse resuelto la enfermedad/dolencia inicial.

Como se usa en este documento, la expresión "infección sub-clínica" se refiere a infección que no provoca la producción/observación de signos o síntomas de enfermedad. A menudo, el paciente se infecta con un organismo que causa enfermedad, pero es inconsciente de la infección.

Como se usa en este documento, el término "infección" se refiere a la invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en el cuerpo.

Como se usa en este documento, la expresión "tracto gastrointestinal" ("GI") se refiere al canal alimentario completo, desde la cavidad oral hasta el recto. La expresión abarca el tubo que se extiende desde la boca hasta el ano, en que el movimiento de músculos y la liberación de hormonas y enzimas digieren los alimentos. El tracto gastrointestinal empieza con la boca y continúa hasta el esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto y, finalmente, el ano.

Como se usa en este documento, la expresión "flora gastrointestinal" se refiere a los microorganismos que habitan en el sistema gastrointestinal de seres humanos y otros animales. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el término se usa en referencia a organismos bacterianos, pero no se pretende que el término esté así limitado.

Como se usa en este documento, los términos "niño" y "niños" se refieren a seres humanos jóvenes por debajo de los 18 años de edad.

Como se usa en este documento, el término "bebé" se refiere a un niño por debajo de un año de edad. Un "neonato" es un bebé recién nacido (es decir, desde el nacimiento hasta aproximadamente cuatro semanas de edad).

Como se usa en este documento, la expresión "niños pequeños" se refiere a niños que están aprendiendo a andar. Generalmente, la expresión se usa en referencia a niños jóvenes entre uno y tres años de edad.

Como se usa en este documento, el término "pre-escolares" se refiere a niños que están asistiendo a la escuela infantil, así como niños que son demasiado jóvenes para asistir al parvulario. En algunas realizaciones preferidas, el término se usa en referencia a niños entre los grupos de niños pequeños y edad escolar (por ejemplo, entre aproximadamente dos años de edad y cinco años de edad).

Como se usa en este documento, la expresión "niños en edad escolar" se refiere a niños que son de edad adecuada para asistir al colegio, en particular desde parvulario hasta secundaria.

Como se usa en este documento, el término "cultivo" se refiere a cualquier muestra o artículo que contenga uno o más microorganismos. Los "cultivos puros" son cultivos en que los organismos presentes son solamente de una cepa de un género y especie particular. Esto está en contraste con "cultivos mixtos" que son cultivos en que están presentes más de un género y/o especie de microorganismo. En algunas realizaciones de la presente invención, encuentran uso los cultivos puros. Por ejemplo, en algunas realizaciones particularmente preferidas, encuentran uso los cultivos puros de *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. acidophilus*). Sin embargo, en realizaciones alternativas, encuentran uso los cultivos mixtos. Por ejemplo, en algunas realizaciones particularmente preferidas, encuentran uso cultivos compuestos por *L. acidophilus* y *Bifidobacterium*.

Como se usa en este documento, el término "*Lactobacillus*" se refiere a miembros del género *Lactobacillus*, en la familia *Lactobacillaceae*. Estas bacterias son bacterias Gram-positivas facultativamente anaeróbicas que representan una parte principal del grupo bacteriano a menudo mencionado como "bacterias acidolácticas". Se han identificado diversas especies de *Lactobacillus*, incluyendo aunque sin limitación *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, etc. *L. acidophilus* NFCM encuentra uso en la presente invención. Se pretende que el género incluya especies que se han reclasificado (por ejemplo, debido a cambios en la especiación de organismos como resultado de investigaciones genéticas y otras investigaciones).

Como se usa en este documento, el término "*Bifidobacterium*" se refiere a miembros del género *Bifidobacterium*. Estas bacterias son bacterias Gram-positivas anaeróbicas que son una de las cepas principales de las bacterias presentes en la flora gastrointestinal. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ninguna especie particular de *Bifidobacterium*, en algunas realizaciones particularmente preferidas, *B. lactis* Bi-07 encuentra uso en la presente invención. Se pretende que el género incluya especies que se han reclasificado (por ejemplo, debido a cambios en la especiación de organismos como resultado de investigaciones genéticas y otras investigaciones).

Como se usa en este documento, el término "antimicrobiano" se refiere a cualquier compuesto que inhiba el crecimiento o elimine microorganismos. Se pretende que el término se use en su sentido más amplio e incluye, aunque sin limitación compuestos tales como antibióticos producidos de forma natural o sintética. También se pretende que el término abarque compuestos y elementos que son útiles para inhibir el crecimiento de o eliminar microorganismos. En algunas realizaciones preferidas, la presente invención reduce la necesidad de administración de antimicrobianos a niños en riesgo de o que están experimentando enfermedad respiratoria.

Como se usa en este documento, las expresiones "medio microbiológico", "medio de cultivo" y "medio" se refieren a cualquier sustrato adecuado para el crecimiento y reproducción de microorganismos. Las expresiones abarcan medios sembrados en sólido, así como sistemas semi-sólidos y líquidos de crecimiento microbiano.

Como se usa en este documento, la expresión "meses de otoño" se refiere a aquellos meses habitualmente reconocidos como encontrados durante el otoño. En el hemisferio norte, estos meses incluyen septiembre, octubre y noviembre. En el hemisferio sur, estos meses incluyen marzo, abril y mayo.

Como se usa en este documento, la expresión "meses de invierno" se refiere a aquellos meses habitualmente reconocidos como encontrados durante el invierno. En el hemisferio norte, estos meses incluyen diciembre, enero y febrero. En el hemisferio sur, estos meses incluyen junio, julio y agosto.

Como se usa en este documento, la expresión "meses de primavera" se refiere a aquellos meses habitualmente reconocidos como encontrados durante la primavera. En el hemisferio norte, estos meses incluyen marzo, abril y mayo. En el hemisferio sur, estos meses incluyen septiembre, octubre y noviembre.

Como se usa en este documento, la expresión "meses de verano" se refiere a aquellos meses habitualmente reconocidos como encontrados durante el verano. En el hemisferio norte, estos meses incluyen junio, julio y agosto. En el hemisferio sur, estos meses incluyen diciembre, enero y febrero.

## Parte experimental

El siguiente ejemplo se proporciona para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no debe entenderse como limitante del alcance de la misma.

En la siguiente descripción experimental, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados centígrados); H<sub>2</sub>O (agua); g (gramos); µg y ug (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl y ul (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm y um (micrómetros); M (molar); mM (milimolar); µM y uM (micromolar); U (unidades); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); dt y DT (desviación típica); PBS (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2]); p/v (peso a volumen); v/v (volumen a volumen); CFU (unidades formados de colonias); y NFCM (North Carolina Food Microbiology Department); Becton

Dickinson (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD); (Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Los organismos usados en el desarrollo de la presente invención fueron *L. acidophilus* NCFM (PTA-4797) y *B. animalis* subespecie *lactis* Bi-07 (PTA-4802). Estas cepas se cultivaron a 37°C, en medio MRS (por ejemplo, Difco, Becton Dickinson) que contenía cisteína al 0,05%. Los cultivos se incubaron durante 48-72 horas en frascos anaeróbicos BBL GASPAC™ que contenían atmósfera de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Becton-Dickinson). Para producción a gran escala, las cepas se cultivaron en medio de fermentación, se recogieron por centrifugación y se crioestabilizaron usando métodos conocidos en la técnica. La solución crioestabilizada se liofilizó. Los cultivos liofilizados se normalizaron para proporcionar recuentos bacterianos deseados en cada cultivo, usando dextrosa como diluyente para métodos de recuento realizados como se sabe en la técnica.

Los sobres usados en el desarrollo de la presente invención se produjeron añadiendo polvo que contenía el material probiótico y un excipiente de vehículo adecuado para encases de sobre de aluminio de baja tasa de transmisión de vapor de humedad para proporcionar 5<sup>9</sup> bacterias/g de material. Se añadieron dos sobres a leche y se consumieron tomados diariamente para una dosis diaria de 1<sup>10</sup> bacterias. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ningún nivel de dosificación particular, ya que se contempla que un intervalo de dosificaciones encuentre uso en la presente invención.

En la revisión de los datos obtenidos durante el desarrollo de la presente invención, se compiló la información de los cuestionarios, las visitas al médico (cuando fuera aplicable), la cantidad de días de enfermedad, las incidencias, la duración, y episodios de la enfermedad específica (*por ejemplo*, diarrea) para determinar los efectos que sucedieron sobre la salud desde el tratamiento con probióticos. Los grupos de ensayo con probiótico 1 y 2 recibieron dos dosis de probióticos cada día, siete (7) días por semana, sucediendo la administración en las guarderías infantiles solamente durante cinco (5) días por semana y la administración en casa durante los 2 días restantes por semana. El grupo 3 (el grupo de placebo), recibió un placebo dos veces al día siete (7) días por semana, en el mismo esquema que los grupos 1 y 2.

#### A. Diseño del estudio

El diseño del estudio consistió en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo sobre un periodo de seis meses. Los sujetos se asignaron a la fórmula suplementada (grupo 1 y 2) o de control (grupo 3) por procedimiento de aleatorización en bloque para cada centro y recibieron la fórmula asignada mientras duró su estancia en el centro.

Los participantes en el estudio eran niños en edad pre-escolar entre 3 y 5 años de edad, sin especificidad de género, sin enfermedades pre-existentes o alteraciones anatómicas propicias para enfermedad frecuente. Los niños en edad pre-escolar con contraindicaciones a productos lácteos (por ejemplo, intolerancia a la lactosa, o reacción a proteína bovina [alergia a la leche de vaca]) se excluyeron del estudio. Además, los participantes que tenían historial de enfermedad inflamatoria, enfermedad intestinal, enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad celiaca, tos crónica por enfermedades relacionadas con distrés respiratorio recurrente, enfermedad de Hirschsprung, fibrosis quística, o cualquier otra alteración metabólica, neurológica, anatómica, tales como síntomas de estreñimiento o distrés funcional gastrointestinal (diarrea crónica), se excluyeron del estudio. Además, los niños que tomaban en el momento suplementos probióticos en alguna otra forma (por ejemplo, Yakult) también se excluyeron de participar. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a su uso para la prevención de enfermedad únicamente en niños sin enfermedades pre-existentes y/o alteraciones anatómicas propicias para enfermedad frecuente, ya que se contempla que la presente invención encuentre uso extendido y demuestre ser valiosa en prevenir la enfermedad en estos grupos.

Como se ha indicado anteriormente, hubo tres (3) grupos, cada uno de los cuales contenía 85 participantes (es decir, para un total de 255 niños). A cada uno de los tres (3) grupos se le dio un nombre alternativo asignado variable en lugar de mencionarlos como "grupo 1", "grupo 2" y "grupo 3". Por tanto, en algunos casos, los grupos se mencionaron como 95, 94 y 93, como se describe a continuación. El grupo 3 recibió el placebo 5 días por semana, dos veces al día en la guardería y 2 días por semana, dos veces al día en casa. La administración en casa se proporcionó por los padres, el tutor, o el miembro designado de la familia. La administración en la guardería se proporcionó por un representante de la guardería designado. Los grupos 1 y 2 recibieron productos probióticos. Los miembros de ambos grupos 1 y 2 recibieron el probiótico en el mismo esquema de administración que el grupo 3. Una dosis diaria típica para el probiótico fue de 1<sup>10</sup> a 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colonias/ml de cepa. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a esta dosificación ni régimen de dosificación específicos. En algunas realizaciones preferidas, la dosificación es de aproximadamente 10<sup>8</sup> a aproximadamente 10<sup>12</sup> CFU/día, mientras que en otras realizaciones preferidas, la dosificación es de aproximadamente 10<sup>9</sup> a aproximadamente 10<sup>11</sup> CFU/día. Además, en algunas realizaciones, el producto probiótico se administra una vez al día, mientras que en realizaciones alternativas, la administración sucede dos veces o más cada día. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la administración sucede dos veces por día.

Los 85 participantes del grupo 1 recibieron un producto probiótico que contenía *Lactobacillus acidophilus* NCFM (producto probiótico A) y los 85 participantes del grupo 2 recibieron un producto probiótico que contenía dos cepas, concretamente *Lactobacillus acidophilus* NCFM y *Bifidobacterium*, Bi-07 (producto probiótico B), comprendiendo cada cepa la mitad de la dosis diaria.

La dosificación para la ingesta del producto probiótico (o sobre) para ambos grupos 1 y 2 consistió en 170-250 ml de leche convencional con un 1% de grasa. Los productos probióticos estaban contenidos en sobres de aluminio para facilidad de uso y transporte. Las dosificaciones se administraron como  $5^9$  bacterias en 170-250 ml de leche para una dosis total diaria de  $10^{10}$  bacterias. Los contenidos del sobre de aluminio se distribuyeron en la leche en el momento del consumo. Se proporcionaron sobres de aluminio que contenían placebos y probióticos, de modo que la adición de los contenidos del sobre a la leche fuera común para todos los grupos. Las dosis se proporcionaron dos veces al día para un total de 170-250 ml por día, durante 6 meses. Estas dosis se tomaron con alimentos, que consistían en un aperitivo o comida. El suplemento se preparó en una sala de preparación con una temperatura mantenida a 18 a 20°C. El suplemento en polvo se añadió a la leche, se agitó, y sirvió a los niños en 5 minutos. Los niños recibieron el suplemento en un área designada común.

El estudio comenzó en noviembre con N=326 niños (grupo 3: 104, grupo 1: 112 y grupo 2: 110) y finalizó en mayo con N=248 (grupo 3: 92, grupo 1: 77, y grupo 2: 79). La diferencia neta entre noviembre y mayo fue una pérdida de 78 niños (grupo 3: 12, grupo 1: 35, y grupo 2: 31). Había 144 participantes masculinos y 182 femeninos, edades 3 - 5 años, y todos de origen étnico chino.

Los niños llevaron diariamente en la franja horaria de 6:40 a.m.- 8:40 a.m. y se fueron en la franja horaria de 3:50 p.m. - 4:40 p.m. La única bebida disponible (fuera de los suplementos del estudio) fue agua. Las familias de los niños consistían en granjeros, empleados del gobierno, y profesores. Se requirió que los niños obtuvieran vacunas convencionales proporcionadas a los niños en China.

En base a la entrada del investigado médico local en cuanto a enfermedades que son prevalentes en los niños pre-escolares locales, este estudio permitió la inclusión de la frecuencia de estas enfermedades para determinar si la inclusión o consumo de cualquiera de los productos probióticos (producto probiótico A o producto probiótico B) por estos niños conducía a una disminución de las incidencias de estas enfermedades. De hecho, en base a los 170 participantes (grupos 1 y 2 combinados), se proporcionó un ensayo t para detectar efectos medios a grandes con al menos una potencia del 80% y un nivel alfa de 0,05. El estudio también permitió la inclusión de otros parámetros a definir por adelantado por el pediatra/médico local para determinar el beneficio de este producto sobre la salud de niños pre-escolares. El estudio también se usó para determinar si podrían usarse antimicrobianos de forma menos frecuente cuando se administran los productos probióticos, provocando de este modo un uso disminuido de antimicrobianos.

Se proporcionó un cuestionario para cada participante, para determinar los factores de calificación y descalificación (o criterios de inclusión y exclusión) para los participantes. Por ejemplo, se requirió que las familias de los participantes tuvieran refrigeración adecuada para el producto y se requirió que el progenitor o tutor de cada niño (en cada grupo) firmara un acuerdo de exoneración para proporcionar el suplemento en casa y vigilar y notificar cualquier signo/síntoma de enfermedad al representante de la guardería.

El cuestionario inicial se completó por el representante designado de la guardería en cada guardería, utilizando información suministrada por los padres o el tutor. El progenitor y el representante designado de la guardería proporcionaron verificación inicial de la información. El coordinador clínico (es decir, un investigador médico) para el estudio recogió los formularios completados de todas las guarderías infantiles de cada uno de los titulares de las guarderías (es decir, las personas a cargo de las guarderías infantiles, o los directores). El representante de la guardería y el progenitor/tutor de cada niño pre-escolar proporcionó registros diarios en el formulario de lista de comprobación de síntomas records de cualquier síntoma de enfermedad, ausencias y razón para ausencia de la guardería, cualquier diagnóstico del doctor, prescripción (detalle) de antimicrobianos, y síntomas específicos que conducen a ausencia (ya que no todos los síntomas provocan ausencia). El representante de la guardería aseguró la coordinación de la información desde el progenitor/tutor cada vez que un niño estuvo ausente del centro. El representante designado de la guardería revisó las hojas de síntomas diariamente y proporcionó las hojas de síntomas al coordinador clínico (médico) en reuniones semanales regulares que incluyeron adicionalmente el director de la guardería infantil. El representante designado de la guardería, el director de la guardería, (y el coordinador clínico (médico)) desconocían todos la fórmula que se estaba suministrando al grupo de control y las fórmulas que estaban suministrando a los grupos de probiótico.

#### B. Validación de las guarderías infantiles

El investigador médico (o la enfermera nombrada por el médico) examinó de doce a quince centros con una selección final de ocho (8) guarderías seleccionadas en una región occidentalizada de Asia. Todos los productos probióticos y todos los productos de placebo se mantuvieron en un área de almacenamiento fresca en una localización designada en Asia para su almacenamiento hasta el suministro a los sitios.

Las guarderías se validaron para asegurar que los entornos de estudio fueran comparable entre sí. Por lo tanto, se localizaron centros que proporcionan, en general, cantidades similares de presente-escolares admitidos, personal disponible, precios de los servicios de guardería, e instalaciones de refrigeración en cada centro. Se usaron cuestionarios para reunir información respecto a las instalaciones, incluyendo cuestiones respecto a la cantidad de pre-escolares, cantidad de empleados, clasificación de clientela (ingresos), coste por pre-escolar, sean o no los pre-escolares alimentados por el centro o lleven su propia comida, el tiempo habitual que los pre-escolares se dejan y recogen, etc. Los cuestionarios completados se devolvieron a través del servicio postal, por los directos de las guarderías infantiles. Antes de la selección, cada centro se evaluó para la limpieza es higiene por el investigador médico o la enfermera nombrada por el investigador médico. Antes del inicio del estudio, el investigador médico se reunió con los propietarios de las guarderías y el personal para validar si las cuestiones eran significativas o no y para obtener respuesta y evaluar los métodos y herramientas de seguimiento, tales como contacto de seguimiento con los padres respecto al absentismo. Para asegurar adicionalmente que los cuestionarios proporcionaban los datos apropiados, el investigador médico se aseguró de que el estadístico realizaba el análisis estadístico durante todo el estudio, de modo que pudiera identificarse y rectificarse cualquier problema con el diseño del estudio para cumplir las necesidades del estudio.

#### C. Documentación de formularios de asistencia

Cada día, el representante de la guardería completaba una hoja de asistencia. Cada hoja enumeraba la localización, persona a cargo (es decir, quién recoge la información), el tamaño de la clase o grupo, y el nombre del participante. El segmento de control pregunta si el participante estaba presente (sí/no), si el participante parecía enfermo o no (sí/no), si el participante estaba mostrando síntomas de tipo gripe u otros síntomas relacionados con enfermedad (sí/no), si el participante tenía un episodio de diarrea (sí/no). Si había un episodio de diarrea, había una pregunta en cuanto a si el participante tenía más de 2 episodios de diarrea en un día (sí/no), si se tomó la primera dosis de producto o no (sí/no), y si se tomó la segunda dosis de producto o no (sí/no). Si un niño estaba ausente, tras su regreso, se rellenaban secciones respecto a si el niño fue al doctor (sí/no), recibió algún antimicrobiano (sí/no) y si el niño recibió cualquier otro tratamiento relacionado con la enfermedad (sí/no). Para validar la recogida de datos, se hicieron vistas aleatorias por el médico (o la enfermera nombrada por el médico) a las guarderías infantiles, para revisar los registros y asegurar la realización diaria de los registros. El directos de cada guardería aseguró que el representante de la guardería infantil recogía todos los cuestionarios y cualquier otro formulario relacionado del estudio para el investigador médico, y el director de la guardería aseguró que esta información se proporcionaba al investigador médico. Los padres de los participantes usaron una lista de comprobación de síntomas para documentar los síntomas de enfermedad y si la enfermedad estaba relacionada o no con absentismo.

El absentismo se consideró como un factor de medición correlacionado con los síntomas. Por lo tanto, se evaluó el efecto del absentismo sobre los síntomas encontrados en los niños. Los datos de absentismo se recogieron de un modo sistemático y completo, sin depender de las capacidades de recuerdo del progenitor o instructor, sino más bien información de registros escolares oficiales solamente. Los datos reales de ausencia se siguieron para cada uno de los síntomas de tipo gripe, otras enfermedades, y razones personales o desconocidas.

#### D. Medición de resultados

Las mediciones incluyeron la cantidad de días con síntomas relacionados con enfermedad o de tipo gripe, la cantidad de ausencias de la guardería a causa de enfermedad o fiebre, la "gripe", enfermedad o síntomas "de tipo gripe" diagnosticados por un doctor y cualquier factor de pre-disposición, tal como un curso prescrito de antimicrobianos. Otros síntomas registrados incluyeron la frecuencia y duración de diarrea y cualquier otro síntoma relacionado con enfermedad. Por ejemplo, se anotaron otros síntomas tales como infecciones de oído o cefaleas o razones que provocan la ausencia de los participantes. Se determinó un valor de bien estar general para cada participante. La separación de datos de participantes que toman antimicrobianos y probióticos permitió el seguimiento separado de estos participantes de aquellos participantes que tomaron solamente probióticos, con el fin de garantizar que los resultados no estaban sesgados debido a la administración de antimicrobianos. Además, se documentó la administración de antimicrobianos a participantes en el grupo de control debido a síntomas "de tipo gripe", ya que los antimicrobianos puede haber disminuido la cantidad de días de ausencia debido a enfermedad. Además, como se ha indicado anteriormente, se midió el peso de los participantes antes del estudio y tras completarse el estudio.

Durante el curso del estudio, se evaluaron ocho (8) síntomas determinados como síntomas "de tipo gripe" según la siguiente tabla de síntomas, que incluían náuseas, vómitos/diarrea, acné corporal, cefalea, dolor de laringe (irritación de garganta), secreción nasal, cefalea, y fiebre. Los vómitos y la diarrea se trataron como una categoría pero se siguieron registros separados de vómitos, y solamente seis (6) niños durante todo el curso del estudio experimentaron vómitos. No se anotaron síntomas secundarios durante el curso del estudio.

Los niños que visitaron el hospital (el sitio habitual para una visita al doctor), típicamente recibieron tratamiento según protocolos de medicina occidental, además de la medicina tradicional. Estas visitas típicamente incluyeron el registro de la temperatura del niño y la prescripción de antimicrobianos según lo apropiado. Se apreció que el uso de antimicrobiano era más prevalente en el grupo de placebo.

La relación entre la cantidad consumida de probiótico y la cantidad de días con síntomas se enumeró en la hoja de valoración de síntomas. Además, se anotó la cantidad de días de ausencia debida a fiebre, y síntomas de resfriado, cantidad de episodios de diarrea (incidencia y duración), y documentación de prescripciones de antimicrobianos (tipo de medicación y cantidad de dosificación), así como la ingesta de otras medicaciones que se están tomando debido a síntomas relacionados con enfermedad. La hoja de registro de la cantidad de probiótico tomado se registró diariamente, y se marcó una ingesta de menos de 200 ml por día para el coordinador clínico. Se usó la hoja de valoración de síntomas para determinar el grafo de síntomas de enfermedad después de cada medición secundaria.

#### E. Análisis estadísticos

El plan de análisis incluyó determinar el equilibrio entre los tres grupos de estudio con respecto a la edad, género, y peso; el cálculo de las tasas de síntomas por factores de influencia incluyendo la edad y el grupo del estudio; y la determinación de una variable y múltiples variables de y el ensayo de la magnitud y significancia de diferencias entre los grupos en términos de tasas y duración de síntomas. El ensayo de una variable de una diferencia significativa entre los grupos para variables continuas como la edad y el peso (para ensayar su equilibrio), empleó técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). Para el absentismo, se proporcionaron estadísticas resumidas para los tres grupos de estudio, y se incluyeron las medias, desviaciones típicas, los puntos de corte de percentil 25, 50 (mediana), y 75, así como los valores máximo y mínimo (es decir, valores atípicos). Se investigaron los análisis iniciales de la diferencia de absentismo entre los grupos de estudio usando técnicas ANOVA. Se realizaron comparaciones de grupos de una sola cepa y doble cepa frente al placebo usando ensayos de Dunnett para múltiples comparaciones.

Se usó estadística descriptiva para variables demográficas (por ejemplo, edad, género, y peso corporal inicial), entorno de vida, cantidad de consumo de probióticos, frecuencia de síntomas, etc. Se midieron las cantidades de días con enfermedad, síntomas "de tipo gripe", otros síntomas relacionados con enfermedad, o ausencias totales debidas a enfermedad, de forma continua por ensayo t, para permitir múltiples comparaciones de diferentes grupos. Estos análisis se hicieron después de completar el ensayo ANOVA. Se realizaron análisis de Cox o un método similar de análisis de regresión para ajustar los factores de confusión (tales como la edad). Se dicotomizaron la cantidad de síntomas "de tipo gripe" y la ingesta de probióticos (ninguno/uno o más) y se analizaron con el ensayo exacto de Fisher o ensayo similar. Se calcularon las correlaciones parciales entre el consumo de leche (o producto designado) y la cantidad de días con enfermedad. ANOVA.

Se hicieron múltiples comparaciones de los diferentes grupos usando el ensayo t para variables de resultado principal. Una vez determinados los datos y diferencias estadísticas, entonces se usó en ensayo t para determinar los grupos que diferían y se ajustó alfa para evitar la inflación de errores tipo I. No se esperaba que sucediera un error tipo I ya que había 3 grupos, sucediendo el ensayo de los grupos durante un periodo de tiempo (6 meses). Al final del estudio, se usó el ensayo de ji cuadrado de la independencia cuando había un punto final, para ver los resultados de comparar participantes tratados y no tratados en base a la cantidad de participantes que experimentaron y no experimentaron síntomas de tipo gripe o relacionados con enfermedad. Para estos análisis, se necesitó un total de 105 participantes totales para asegurar una potencia del 90% y un nivel alfa de 0,05. Sin embargo, se contempla que en otras realizaciones, encontrará uso una potencia y/o nivel alfa diferentes (por ejemplo, nivel alfa de 0,05). Se realizaron análisis estadísticos con SPSS u otro paquete estadístico informatizado.

El ensayo entre los grupos para variables dicotómicas, incluyendo la medición de resultados (presencia de síntomas) y género, se realizó usando métodos de ji cuadrado y/o exacto de Fisher. En aras de ajustar los factores de influencia (por ejemplo, "de confusión") sobre la medición de resultados, tales como edad y peso, se usaron análisis de regresión lógica para uno modelo del log de la posibilidad de presencia de un síntoma como una función lineal de la edad, peso y género del grupo de estudio. La posibilidad de tener un síntoma fue igual a la probabilidad de contraer el síntoma dividida por la probabilidad de no contraer el síntoma.

Por ejemplo si 10 de 100 individuos desarrollaron fiebre, entonces la probabilidad del síntoma es 0,10 y la posibilidad del síntoma es 1/9 (0,10/0,90). La presentación de los análisis de múltiples variables usa el concepto de la proporción de probabilidades. Por ejemplo, se evaluó el riesgo de contraer un síntoma específico para niños asignados a un grupo (por ejemplo, las cepas de combinación) respecto a niños asignados a otro grupo (por ejemplo, el placebo). Si la proporción de probabilidades es la unidad (1,0) o cerca de 1,0, entonces los dos grupos analizados son probablemente similares con respecto al riesgo para los síntomas. Si la proporción de probabilidades es mayor de uno entonces existe un aumento potencial en el riesgo, mientras que si el riesgo es menor de uno entonces hay una disminución potencial en el riesgo. Los resultados se presentan usando estimaciones para la proporción de probabilidades con límites de confianza del 95%. Por ejemplo si la proporción de probabilidades de fiebre para el grupo de la cepa de combinación respecto al grupo de placebo es 0,33 y el correspondiente límite de confianza no incluye el valor "1"; por ejemplo (0,15, 0,70) entonces se desprende que el riesgo de fiebre para el grupo de la cepa de combinación es de aproximadamente 1/3 la del grupo de placebo. En otras palabras, el riesgo para fiebre se ha disminuido en un 67% debido a la afiliación con el grupo de la cepa de combinación.

También se investigó la interacción de la edad con el grupo de estudio en el ámbito de los modelos de regresión lógica. Como indicó el análisis, la edad fue un posible factor de interacción, aunque en algunos casos su capacidad

de actuar como factor de interacción no alcanzó significancia estadística debido a la disminución del tamaño de muestra cuando se examinaron subgrupos de cepas (y placebo) por edad con respecto a la presencia de síntomas. Por lo tanto, los resultados se presentan globalmente (independientemente de la edad como factor de interacción), aunque los resultados del modelo de regresión lógica se presentan por edad, en reconocimiento de su efecto como factor de interacción. Además, las comparaciones de grupos por pares se sometieron adicionalmente a múltiples normas y penalizaciones de comparación. En resumen, se realizó la evaluación de diferencias entre los grupos de estudio con respecto a la duración de los síntomas usando múltiples análisis de regresión lineal para el modelo de la duración como una función del grupo de estudio, la edad, el género y el peso.

## F. Resultados

La Tabla 1 proporciona la distribución de edad, peso y género entre los tres grupos de estudio. Es evidente que los grupos están equilibrados con respecto al género y en algún grado, al peso. Sin embargo, parece que los niños asignados al grupo de placebo eran en promedio más mayores que los asignados a los grupos de cepa individual o de combinación en aproximadamente 4-5 meses. Se consideró que este hallazgo requería inclusión (ajuste) para la edad sobre todos los posteriores análisis.

| Tabla 1. Características iniciales por grupo de estudio |                   |                                      |                                                                 |         |
|---------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------|
|                                                         | Grupo de estudio  |                                      |                                                                 |         |
|                                                         | Placebo (grupo 3) | <i>L. acidophilus</i> NCFM (grupo 1) | <i>L. acidophilus</i> NCFM con <i>B. lactis</i> Bi-07 (grupo 2) | Valor P |
| EDAD (años)                                             |                   |                                      |                                                                 |         |
| N                                                       | 104               | 110                                  | 112                                                             |         |
| Media + DT                                              | 4,1 + 0,54        | 3,7 + 0,7                            | 3,8 + 0,6                                                       | <0,001  |
| Percentil 25                                            | 3,9               | 3,1                                  | 3,3                                                             |         |
| Mediana                                                 | 4,2               | 3,5                                  | 4,1                                                             |         |
| Percentil 75                                            | 4,5               | 4,3                                  | 4,1                                                             |         |
| PESO (kg)                                               |                   |                                      |                                                                 |         |
| N                                                       | 104               | 110                                  | 112                                                             |         |
| Media + DT                                              | 7,76 + 1,04       | 8,16 + 2,45                          | 7,67 + 0,91                                                     | 0,06    |
| Percentil 25                                            | 6,94              | 7,03                                 | 6,80                                                            |         |
| Mediana                                                 | 7,71              | 7,71                                 | 7,71                                                            |         |
| Percentil 75                                            | 8,39              | 8,16                                 | 8,16                                                            |         |
| GÉNERO                                                  |                   |                                      |                                                                 |         |
| N                                                       | 104               | 110                                  | 112                                                             |         |
| Chicos (%)                                              | 44(42,3)          | 47(42,0)                             | 53(48,2)                                                        | 0,58    |

Aunque las tasas de síntomas se evaluaron por género y peso, se descubrió que ninguno tenía un efecto apreciable sobre la probabilidad de contraer síntomas (fiebre, tos, secreción nasal o cualquier síntoma). Sin embargo, pareció que la edad tenía un efecto significativo (independiente del grupo de estudio) sobre la probabilidad de la presencia de síntomas así como la duración (los valores p para todos los meses fueron de forma constante < 0,05).

Se observaron efectos protectores estadísticamente significativos para los grupos de cepa respecto a la aparición de fiebre, tos y secreción nasal. La Tabla 2 proporciona datos que muestran la distribución de la duración de los síntomas sobre el periodo de estudio de seguimiento de seis meses, por grupo aleatorizados. También evalúa las diferentes ajustadas a la edad entre los grupos de estudio. En base a esta Tabla, está claro que el grupo de placebo experimentó una duración más larga de los síntomas, en un promedio de 3,2 y 2,2 días respecto al grupo de cepas de combinación ( $p < 0,001$ ) y el grupo de cepa individual ( $p = 0,0023$ ), respectivamente. Por conveniencia al presentar estos datos, en esta Tabla, el grupo de placebo (grupo 3) se indica por el número "93", el grupo de cepa individual (grupo 1) por el número "94" y el grupo de cepas de combinación (grupo 2) por el número "95".

| Tabla 2. Distribución de la duración de los síntomas (días) por grupo de estudio sobre el periodo de seguimiento de seis meses |                |                                 |                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Estadística                                                                                                                    | Placebo (93)   | <i>L. acidophilus</i> NCFM (94) | <i>L. acidophilus</i> NCFM con <i>B. lactis</i> Bi-07 (95) |
| N                                                                                                                              | 104            | 110                             | 112                                                        |
| Media + Dt                                                                                                                     | 6,5 + 7,3      | 4,5 + 4,7                       | 3,4 + 3,7                                                  |
| Percentil 25                                                                                                                   | 1              | 1                               | 1                                                          |
| Percentil 50                                                                                                                   | 4              | 3                               | 2                                                          |
| Percentil 75                                                                                                                   | 10             | 6                               | 5                                                          |
| Diferencias ajustadas a la edad entre los grupos                                                                               |                |                                 |                                                            |
|                                                                                                                                | 95 frente a 93 | 94 frente a 93                  | 95 frente a 94                                             |
| Mean + Dt                                                                                                                      | -3,2 + 0,76    | -2,17 + 0,71                    | -1,06 + 0,81                                               |
| Valor P                                                                                                                        | < 0,001        | 0,0023                          | 0,195                                                      |

Para las diferencias ajustadas a la edad entre los grupos, se hicieron modelos de la duración cumulativa de los síntomas usando regresión lineal como una función del grupo de estudio y la edad. Estas diferencias reflejan los coeficientes de regresión en dichos modelos cuando se da cuenta de los efectos de la edad.

Los resultados también indicaron que durante el periodo de estudio de seis meses, los grupos de cepa individual (grupo 1) y cepas de combinación (grupo 2) mostraron una disminución significativa en el porcentaje de tiempo que los participantes experimentaron los síntomas de tipo gripe de fiebre, tos o secreción nasal. La siguiente tabla (Tabla 3) proporciona datos que compran los síntomas observados entre los grupos, así como la administración de antimicrobianos. En esta Tabla, se proporcionan las proporciones de probabilidad, el nivel de confianza del 95% y los valores P. En esta Tabla, una proporción de probabilidad de menos de 1 indica un efecto protector. Por ejemplo, una proporción de probabilidad de 0,52 en la comparación del grupo 94 y grupo 93 indica que los niños en el grupo 94 tienen aproximadamente la mitad del riesgo de desarrollar el síntoma en comparación con los del grupo 93. En esta Tabla, los valores en negrita indican resultados particularmente significativos.

| Tabla 3. Comparaciones en seis meses de la incidencia de síntomas y administración de antimicrobianos (proporciones de probabilidad, límites de confianza y valores P) |                                 |                                 |                                 |                                 |                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Comparaciones de grupo                                                                                                                                                 | Síntoma                         |                                 |                                 |                                 |                                  |
|                                                                                                                                                                        | Fiebre                          | Tos                             | Secreción nasal                 | Cualquier síntoma               | Antimicrobiano administrado      |
| 94 frente a 93                                                                                                                                                         | 0,52<br>(0,31, 0,88)<br>P=0,013 | 0,58<br>(0,36, 0,94)<br>P=0,027 | 0,91<br>(0,56, 1,46)<br>P=0,68  | 1,06<br>(0,54, 2,1)<br>P=0,86   | 0,32<br>(0,18, 0,59)<br>P=0,0002 |
| 95 frente a 93                                                                                                                                                         | 0,37<br>(0,20, 0,67)<br>P=0,01  | 0,46<br>(0,27, 0,79)<br>P=0,005 | 0,56<br>(0,33, 0,94)<br>P=0,03  | 0,52<br>(0,27, 0,99)<br>P=0,045 | 0,20<br>(0,09, 0,43)<br>P<0,0001 |
| 95 frente a 94                                                                                                                                                         | 0,71<br>(0,37, 1,36)<br>P=0,30  | 0,80<br>(0,46, 1,40)<br>P=0,43  | 0,62<br>(0,36, 1,10)<br>P=0,088 | 0,49<br>(0,24, 0,98)<br>P=0,04  | 0,63<br>(0,27, 1,47)<br>P=0,29   |

De 84 participantes a los que se administró antimicrobianos, la mayoría pertenecían al grupo de placebo (grupo 3), con un 67,9%. En contraste, para el grupo de cepa individual el porcentaje fue del 21,4%, y del 10,7% para el grupo de cepas de combinación.

Excepto para el inicio del estudio y posiblemente el mes de marzo, tanto el uso de antimicrobianos como las visitas al médico fueron más prevalente entre el grupo de placebo. Una posible interpretación de dicha tendencia podría ser como consecuencia de tener más prevalencia de síntomas de tipo gripe (u otros síntomas) que necesitaran una visita al médico. Además, los casos de diarrea fueron relativamente más prevalente al inicio del estudio, sin asociación clara al grupo de estudio.

Como se indica en la Tabla 1, el grupo de placebo tubo un porcentaje significativamente mayor (%) de niños mayores respecto a los otros dos grupos de cepa en todos los meses del estudio. Por lo tanto se esperaba en alguna medida que el grupo de placebo mostrara más resistencia a los síntomas de tipo gripe. Sin embargo, los niños mayores mostraron más susceptibilidad a los síntomas durante los meses de noviembre-enero, respecto a los niños más pequeños. Además, dicho efecto se revirtió o diluyó considerablemente a través de los meses restantes de febrero-mayo.

Una posible explicación de esta tendencia es que todos los niños (más pequeños o mayores) eran muy vulnerables a los síntomas de tipo gripe durante los meses más fríos (noviembre-enero) de la estación de invierno. Sin embargo, durante estos meses, los efectos de las cepas fueron significativamente protectores contra dichos síntomas. También es interesante observar que siguiendo esta coyuntura, la ausencia de equilibrio de edad entre los grupos de estudio puede haber influido negativamente en el beneficio potencial de las cepas.

En resumen, los resultados indicaron que hubo efectos protectores significativos de los grupos de cepa frente al placebo en prevenir los síntomas de tipo gripe de fiebre, tos y secreción nasal durante los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo, abril, y mayo (cualquier síntoma). Hubo una disminución en los efectos protectores observados durante los meses de abril-mayo. Sin embargo, se proporcionó alguna protección durante estos meses. De hecho, de forma global, significativamente menos niños sufrieron síntomas de tipo gripe de fiebre, tos o secreción nasal entre los grupos de cepa individual o de combinación en comparación con los niños asignados al grupo de placebo. Además, se prescribió antimicrobianos a tres veces más niños en el grupo de placebo en comparación con el grupo de cepa individual debido a síntomas de tipo gripe. Además, se prescribió antimicrobianos a cinco veces más niños en el grupo de placebo en comparación con el grupo de cepas de combinación debido a síntomas de tipo

gripe. Además, hubo significativamente menos días que los participantes en los grupos de cepa individual y de combinación mostraron síntomas, en comparación con el grupo de placebo. La combinación de *L. acidophilus* NCFM con *B. lactis* Bi-07 proporciona alguna superioridad sobre la cepa individual (*L. acidophilus* NCFM) en la prevención de los síntomas, aunque también se observó beneficio para la cepa individual.

Además, se descubrió que la presente invención proporciona beneficios en ambos grupos de cepa individual y cepa doble, reduciendo la cantidad de días de enfermedad en un 50%. Es evidente a partir de la Tabla 4, que los niños asignados al grupo de placebo tuvieron, de promedio, un 37% - 44% más de días total ausentes que los asignados a los grupos de cepa individual o doble.

| Tabla 4. Distribución de días ausentes totales por grupo de estudio sobre el seguimiento de seis meses |                    |                                       |                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Estadística                                                                                            | Placebo (grupo 93) | <i>L. acidophilus</i> NCFM (grupo 94) | <i>L. acidophilus</i> NCFM con <i>B. lactis</i> Bi-07 (grupo 95) |
| N                                                                                                      | 104                | 110                                   | 112                                                              |
| Media $\pm$ DT                                                                                         | 5,2 $\pm$ 5,7      | 3,6 $\pm$ 3,7                         | 3,8 $\pm$ 3,9                                                    |
| Mínimo                                                                                                 | 0                  | 0                                     | 0                                                                |
| Percentil 25                                                                                           | 1                  | 1                                     | 1                                                                |
| Percentil 50                                                                                           | 3                  | 3                                     | 3                                                                |
| Percentil 75                                                                                           | 8                  | 5                                     | 5                                                                |
| Máximo                                                                                                 | 26                 | 18                                    | 23                                                               |

De hecho, los datos indicaron que ambos grupos de cepa individual y doble demuestran una reducción significativa en la cantidad de días ausentes respecto al grupo de placebo.

La Tabla 5 presenta los resultados del ensayo de significancia estadística de las diferencias entre los grupos en días totales ausentes usando técnicas ANOVA que ajustan múltiples comparaciones usando el método de Dunnett. La diferencia entre el grupo de cepa individual o cepa doble frente al de placebo es estadísticamente significativa (valor  $p = 0,01$ ). Además, como se indica por los intervalos de confianza del 95% simultáneos que se han construido ajustando múltiples comparaciones, la diferencia que compara el grupo de cepa individual o doble con el placebo es estadísticamente significativa. Esta diferencia podría ser tan pequeña como de 0,1 o 0,24 días pero también podría ser tan grande como de 2,7 o 3,0 días en la cantidad de días totales ausentes.

| Tabla 5. Diferencias ajustadas* a múltiples comparaciones entre los tres grupos |                          |                          |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                                                                                 | 94 frente a 93**         | 95 frente a 93**         | 94 frente a 95          |
| Media                                                                           | -1,6                     | -1,5                     | -0,21                   |
| Intervalo de confianza del 95% simultáneo                                       | -2,9678 frente a -0,2489 | -2,7389 frente a -0,0569 | -1,1502 frente a 1,5711 |
| * Usando Dunnett para el ajuste de múltiples comparaciones                      |                          |                          |                         |
| **Estadísticamente significativo usando un nivel $\alpha$ global de 0,05.       |                          |                          |                         |

En resumen, los análisis de los días totales ausentes indican que probióticos de cepa individual o doble disminuyen significativamente la cantidad de días ausentes del jardín de infancia o escuela infantil.

Habiendo descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, parece ser que los especialistas en la técnica podrán hacer diversas modificaciones a las realizaciones descritas, y que dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un cultivo de *L. acidophilus* NCFM para su uso en:

- 5           (a) tratar o prevenir una infección del tracto respiratorio en un niño; y/o  
          (b) tratar o prevenir los síntomas de tipo gripe de una infección del tracto respiratorio en un niño.

2. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo comprende adicionalmente al menos una cepa bacteriana adicional, preferiblemente *B. lactis*.

10

3. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho niño es de edad pre-escolar.

4. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo se administra durante los meses de otoño o invierno.

15

5. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo se administra a dicho niño por vía oral.

6. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo se proporciona en un suplemento nutricional.

20

7. El cultivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho uso reduce la necesidad de administración de antimicrobianos para tratar dicha infección del tracto respiratorio en dicho niño, o evita el absentismo debido a dicha infección del tracto respiratorio de dicho niño.

25

**FIGURA 1**

Porcentaje de tiempo con síntomas notables por grupo de estudio durante el periodo de 6 meses

