

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 481**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/46 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 36/45 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23L 19/00 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2008 PCT/GB2008/003459**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09047537**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2008 E 08806589 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2222310**

54 Título: **Preparación para tratar una infección intestinal que comprende oligosacáridos y material celular insoluble**

30 Prioridad:

11.10.2007 GB 0719882
02.06.2008 GB 0810006
08.09.2008 GB 0816361

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2017

73 Titular/es:

PROMOVITA INGREDIENTS LIMITED (100.0%)
Claygate House, Littleworth Road, Esher
Surrey KT10 9PN, GB

72 Inventor/es:

PRIEST, LESLIE;
FOWLER, VERNON y
HILLMAN, KEVIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 600 481 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

Preparación para tratar una infección intestinal que comprende oligosacáridos y material celular insoluble

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al tratamiento de patógenos intestinales. Tres de los patógenos mejor conocidos que son perjudiciales para los seres humanos incluyen *Salmonella*, *Clostridium difficile* ("*C. difficile*") y ciertas cepas de *Escherichia coli* ("*E. coli*"). La infección por *C. difficile* está aumentando actualmente en los hospitales, dando como resultado un aumento considerable de casos de pacientes con síntomas graves y, en algunos casos, pelagra su vida. Los protocolos de tratamiento presentes implican el tratamiento basado principalmente en el uso de
10 antibióticos, tales como metronidazol, vancomicina y linezolid. Sin embargo, *C. difficile*, es resistente a muchos antibióticos. Además es una bacteria comensal (por ejemplo una bacteria que vive dentro del intestino de su huésped sin perjudicarlo) en una parte de la población. Los pacientes que son portadores asintomáticos de *C. difficile* pueden, por lo tanto, si se tratan con antibióticos "de amplio espectro" conjuntamente con otras enfermedades, mostrar, desarrollo repentino de muchos síntomas graves de una infección por *C. difficile*, tales como
15 colitis pseudomembranosa. Esto ocurre porque los antibióticos de amplio espectro reducen los niveles normales de la flora intestinal mientras que crece la que no tiene efecto sobre *C. difficile*, lo que significa que *C. difficile* tiene una competencia reducida.

La infección por *Salmonella* se aprecia muy frecuentemente como una enfermedad transmitida por los alimentos. El
20 tratamiento de la *Salmonella* ha sido mediante antibiótico. Tal tratamiento puede, sin embargo, dar lugar a los problemas referidos anteriormente en relación a la infección de *C. difficile*, mientras que el uso de antibióticos a largo plazo en industrias avícolas y de ganado puede haber creado una cepa de *Salmonella* que es potencialmente resistente a antibióticos.

Las vías de infección por cepas patógenas de *E. coli* son variadas. Este organismo se dispersa normalmente por
25 contaminación fecal y se puede transmitir a través de la comida, del agua, o del ambiente. Un tratamiento que suprime la actividad del grupo de bacteria coliforme en el intestino aumentaría la resistencia del huésped a la infección por estos patógenos.

2. Descripción de la técnica relacionada

Es conocido que el intestino humano, y en particular el colon, contiene mucha microflora que se piensa que tiene
30 una relación simbiótica con el hospedador humano ayudando a la digestión y previniendo el crecimiento de especies perjudiciales. Un grupo particular de tales organismos útiles, que se piensa que tienen un efecto beneficioso en la ayuda en la lucha de un huésped humano de muchas formas de infección, es el grupo de bacterias del ácido láctico, aquí en lo sucesivo referido por sus miembros primarios, *Lactobacillus spp.*. Se piensa que *Lactobacillus* ayuda en la
35 lucha de bacterias infecciosas, tales como *C. difficile*, de diversas maneras. En primer lugar, *Lactobacillus*, cuando actúa sobre determinados sustratos fermentables, causa un descenso del pH de los contenidos intestinales que inhibe el crecimiento del patógeno. En cambio *C. difficile* crece en un ambiente con un pH más neutro, lo que significa que la presencia de *Lactobacillus* dará como resultado un ambiente que es perjudicial para *C. difficile*. En segundo lugar, *Lactobacillus* puede tener un efecto antibacteriano que actúa contra la bacteria competente tal como *C. difficile*. Un aumento de *Lactobacillus* en el intestino de un huésped que está infectado con *C. difficile* puede, por lo tanto, dar como resultado una disminución de los síntomas asociados con la infección por *C. difficile*. Una solución
40 atractiva superficialmente al problema de la lucha de la infección intestinal es, por lo tanto, introducir *Lactobacillus* adicional. Sin embargo, se ha encontrado que esto es raramente eficaz por la razón de que tales cantidades adicionales de bacteria no son sostenibles, y que las especies añadidas podrían no adaptarse para sobrevivir en el intestino del huésped. Una población de *Lactobacillus* del huésped depende principalmente de las condiciones que son adecuadas para crecer. Los tratamientos descritos aquí actúan para mejorar la propia población de *Lactobacillus*
45 *spp.* del huésped, que está ya adaptada para sobrevivir en el intestino y aumentará por lo tanto rápidamente en número y actividad si se le proporciona nutrientes adecuados.

Los *Lactobacillus* se conocen por crecer en medios que son ricos en azúcares específicos. Los azúcares simples,
50 sin embargo, son difíciles de transportar a las últimas partes del intestino porque se absorben en gran parte y se consumen muy pronto en el proceso digestivo. Por tanto, para cuando un bolo de comida ha alcanzado el colon -la localización donde la infección diana está mayormente localizada- es improbable contener azúcares en grandes cantidades. La alimentación de azúcar a un huésped no proporcionará, por lo tanto, las condiciones requeridas para *Lactobacillus* en el intestino grueso. Ciertos oligosacáridos, que son polímeros que contienen normalmente entre tres y diez azúcares simples, sin embargo son más difíciles para la descomposición temprana en la digestión. La administración de oligosacáridos particulares se presenta para proporcionar un incremento en la cantidad de
55 bacterias 'amigables' y la reducción simultánea en la población de bacterias perjudiciales.

Compendio de la invención

5 Un aspecto de la presente invención proporciona un ambiente apropiado para el cultivo de *Lactobacillus* en el intestino grueso mediante el uso de oligosacáridos. Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de oligosacárido y pulpa de material hemi-celular a partir de arándano en la creación de una preparación para uso en el tratamiento de *Clostridium difficile* y *Salmonella*.

10 La preparación se puede crear como una preparación alimentaria de duración relativamente larga que permite el fácil transporte y consumo, tal como fruta envasada, seca o en barritas de fruta (si está contenida dentro de un envase hermético o de otra manera), por ejemplo. Alternativamente, la preparación puede ser fresca y en forma de una bebida (tal como, por ejemplo, los tipos de bebida que están actualmente de moda bajo el epíteto 'smoothie') o una bebida de yogurt. La preparación puede usarse, en una realización, en el tratamiento (bien para la profilaxis o como remedio de la infección) de la infección intestinal por *C. difficile* o *Salmonella*. Cuando se usa como un profiláctico, mejora la capacidad de la microflora intestinal para rechazar infecciones posteriores.

15 Cuando la preparación incluye una pulpa, según una realización, la pulpa se hace de arándanos enteros, molidos. La pulpa de la fruta, está en gran medida compuesta de componentes estructurales complejos químicamente de células vegetales que son por tanto más difíciles de descomponer en la digestión temprana, ayudando en el reparto de grandes cantidades de oligosacárido al intestino grueso.

Un aspecto preferido de la presente invención proporciona el uso de material hemi-celular a partir de arándanos en la creación de una preparación para el tratamiento de la enterotoxina liberada por *Clostridium difficile* en el canal alimentario humano.

20 La presente invención preferiblemente proporciona además una preparación para el tratamiento de la bacteria intestinal perjudicial que comprende uno o más del *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, cada uno de los cuales se ha encontrado que crecen provechosamente en presencia de galacto-oligosacárido. En una realización preferida, la preparación es para el tratamiento de *Salmonella*.

Breve descripción de los dibujos

25 Las realizaciones de la presente invención serán a continuación descritas, por medio de ejemplos, y con referencia a los dibujos que se acompañan en los que:

Fig. 1 es una representación esquemática de la fermentación en un vaso del intestino de un cerdo usado para ensayar los efectos de varias sustancias para el reparto de oligosacáridos; y

Fig. 2 es un diagrama de flujo de los ensayos realizados con el vaso de la Fig. 1.

30 Descripción de realizaciones preferidas

El tratamiento (y dentro de esta memoria, el término 'tratamiento' se entiende por incluir dentro de su alcance, el tratamiento profiláctico así como tratamiento curativo, a menos que se requiera un contexto específico) de la infección intestinal puede variar dependiendo de la naturaleza del patógeno. En cada caso, sin embargo, un paciente es probable que se beneficie de un incremento de la población de *Lactobacillus* spp..

35 Según una realización de la presente invención, un oligosacárido se digiere como parte de una mezcla que incluye un material celular comestible, insoluble. En el contexto de esta memoria, el término 'insoluble' se refiere al contexto de transmisión a través del canal alimentario hasta el colon. Por tanto, si un material es insoluble en las condiciones presentes en el canal alimentario anterior al colon durante un período de tiempo en el que ocurriría la transmisión común a través del canal alimentario hasta el colon, (por tanto, normalmente, aunque no se limita a entre uno y diez días), entonces este es un material insoluble para los objetivos de esta memoria. El material comestible, en el presente ejemplo, es una pulpa fibrosa de material comestible de origen vegetal. El oligosacárido es galacto-oligosacárido (GOS). El GOS puede estar bien infundido en la pulpa o ser administrado simplemente en conjunto. La pulpa puede incluir preferiblemente, aunque no esencialmente, un residuo de fruta, tal como el que se puede obtener a partir de hacer jugo o una operación de prensado. Por tanto la pulpa puede ser las pieles, semillas y otros materiales que contienen celulosa que permanece en el prensado o al hacer jugo de los arándanos. Además, la pulpa vegetal, se puede usar, bien si se obtiene como un residuo al hacer jugo o una operación de prensado, tal como puede ser el caso con, por ejemplo, zanahorias, o bien generarse por maceración o licuación. Ejemplos de vegetales que pueden servir para crear una pulpa práctica incluyen, pero no se limitan a, patatas (por ejemplo, las pieles de una patata horneada), zanahorias, remolachas, apio, puerros, pimientos, brasicas tales como brócoli, brotes, coliflor y col.

50 La infusión del oligosacárido se puede realizar en una variedad de maneras. Por ejemplo mediante el mezclado del oligosacárido GOS, en forma de polvo o sirope, con una pulpa de arándano comestible para crear una mezcla a razones apropiadas. Preferiblemente, la razón estará en la región de 50:50 (por peso seco) de pulpa fibrosa de oligosacárido. La razón puede variar dependiendo de la naturaleza de la infección que se esté tratando, entre 10:90

y 90:10 ya que en experimentos *in vitro*, que se describen con más detalle posteriormente, se han encontrado que proporcionan efectos diferentes dependiendo de la naturaleza del patógeno que se esté tratando.

Los oligosacáridos, son polímeros, que tienen una mayor capacidad para endurecerse en una forma que puede ser beneficiosa para los *Lactobacillus* residentes en el intestino grueso que los azúcares simples tales como glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, siendo estos más susceptibles inmediatamente para la absorción por el huésped y para la digestión bacteriana que tiene lugar en el intestino delgado. Se formula la hipótesis de que las realizaciones de la invención proporcionan para una mejora del reparto de oligosacáridos al intestino grueso y, relacionada, una reducción en su asimilación más adelante en el canal alimentario, en el estómago, duodeno o íleon. Se cree que tal mejora del reparto ocurre porque el material celular 'insoluble', dentro del cual se localizan los oligosacáridos cuando se mezclan juntos, mientras que es difícil de descomponer en el canal superior alimentario, es fácil de descomponer en el colon y más soluble para la bacteria. La descomposición del material celular libera el oligosacárido que hasta ese momento se ha atrapado en su estructura celular durante su paso a través del canal, y la posterior liberación de oligosacárido por los *Lactobacillus* para que se desarrolle. Por tanto, se pueden repartir mayores niveles de oligosacárido al colon que sería el caso si los oligosacáridos fuesen introducidos por sí solos y dará como resultado un aumento correspondiente de *Lactobacillus*. Un incremento en la población de otras bacterias que producen ácido láctico tales como, por ejemplo, *Streptococcus* y *Bacteroides* pueden ser también beneficiosas para el tratamiento de la infección intestinal perjudicial, y tales grupos de bacterias pueden proporcionar también un resultado de dicho tratamiento.

Salmonella

Una infección patógena simulada en la fermentación *in vitro* en un vaso del intestino de un cerdo con *Salmonella poona* se trató con una mezcla de GOS y puré de arándano. El resultado que se encontró fue que, después de dos días, se obtuvo una reducción de mil veces en la población de *Salmonella*. Se formula la hipótesis de que, en el caso de *Salmonella* una combinación de al menos dos mecanismos proporcionan un resultado beneficioso. En primer lugar, la presencia de GOS (cuyo material vegetal se piensa, que proporcionará *in vivo*, para el reparto al intestino grueso mayores cantidades que en el caso donde se administra GOS oralmente por sí solo) proporciona un ambiente favorable para la población de *Lactobacillus*, dando como resultado un menor pH y, posiblemente también un efecto antibacteriano contra la *Salmonella*. En segundo lugar, se piensa que *Salmonella* ataca mecánicamente a la pulpa. Esto tiene el efecto de que la eliminación de la pulpa durante el curso del flujo peristáltico normal en el intestino eliminará asimismo la *Salmonella* unida, con el resultado del descenso de la población de *Salmonella*. Cuando este tratamiento se aplicó como un profiláctico *in vitro*, con posterior infección, los niveles de *Salmonella* disminuyeron a niveles indetectables dentro de los tres días, mientras que se mantuvieron dentro de la población del vaso sin tratar.

Clostridium difficile

Una infección simulada por *C. difficile* en la fermentación *in vitro* en un vaso del intestino de cerdo, cuando se trató con una mezcla de GOS y puré de arándano, dio como resultado una reducción significativa estadísticamente en el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *C. difficile* en 48 horas. Esta es la hipótesis que es atribuible a un aumento en las cantidades de *Lactobacillus*, que disminuyen el pH y, posiblemente, tienen también un efecto anti-bacteriano sobre el *C. difficile*, que podría ser el caso con GOS en solitario. El papel hipotético de GOS es que proporciona un ambiente favorable para *Lactobacillus* mientras que el puré de arándano proporciona que se pueda pensar como un mecanismo de reparto para transportar mayores niveles de GOS –y por lo tanto azúcares sin digerir- al área al que un incremento en la población de *Lactobacillus* podría ser beneficiosa para el tratamiento de *C. difficile*. Aunque la población de *C. difficile* no se erradicó por completo, se piensa que la reducción podría ser de un nivel suficientemente significativo como para permitir métodos dirigidos de tratamiento usando antibióticos específicos que surten efecto en proporcionar una cura, posiblemente en conjunto con otras terapias de reemplazo de la microflora. Esta hipótesis se soporta por la evidencia anecdótica, discutida posteriormente.

Los experimentos realizados hasta el momento podrían parecer indicar que, en relación al tratamiento por infección de *Salmonella*, la mezcla del componente de arándano fue la más eficaz. En cambio, en relación al tratamiento de *C. difficile*, GOS parece ser el agente más activo y que tiene un mejor efecto en la reducción de los niveles de población de *C. difficile*.

Sin embargo, fuera del alcance de la presente invención reivindicada, una combinación de arándano –u otro material comestible que incluye un material celular insoluble, tal como una pulpa fibrosa de diferente tipo- y GOS produce una preparación que probablemente abarque un amplio rango de bacterias patogénicas, ya que las dos que se discuten aquí son de grupos taxonómicos ampliamente diferentes. Se halló que la mezcla arándano/GOS no sólo mejora la razón de *Lactobacillus* para bacterias coliformes a un mayor grado sino que también en el sustrato en solitario. La posterior observación indica que, para uso profiláctico general una mezcla de pulpa comestible de oligosacárido, tal como arándano y GOS, es mejor que los componentes individuales.

Los experimentos y sus resultados, en los que se basa la hipótesis descrita anteriormente, serán descritos a continuación. Refiriéndonos ahora a la Fig. 1, una simulación *in vitro* de la fermentación del intestino de cerdo, provista de un vaso de fermentación 10 de intestino de cerdo se llenó, en su base, con perlas 12 de vidrio, aquí

- 5 ilustradas esquemáticamente mediante un nivel en el vaso 10 por debajo del cual se asientan. Las perlas 12 simulan frondas dentro del intestino grueso, conocidas como vellosidades, y dentro de las cuales se acumulan bacterias coliformes y otras bacterias evitando de ese modo ser fácilmente eliminadas en el intestino durante la digestión y el peristaltismo. El vaso tiene dos entradas, 14, 16. La entrada 14 lleva los medios designados a simular las condiciones digestivas normales, dentro del intestino grueso. Los vasos se inocularon con heces porcinas para proporcionar la microflora base para los experimentos. De esta forma la entrada de medios 14 lleva almidones, pectinas, xilano y similares. La entrada 16 que es conocida como el sustrato de ensayo, lleva por ejemplo la mezcla o preparación cuya eficacia en el tratamiento de la bacteria patógena se desea ensayar.
- 10 El vaso 10 tiene también dos salidas, 18, 20. La salida 18 proporciona el residuo eliminado de una combinación del medio y el sustrato, de ese modo simula la acción normal del tracto del intestino grueso, donde los contenidos pasan continuamente a través del peristaltismo. La eliminación de este residuo se añade como medio fresco que mantiene el volumen constante del vaso durante todo el experimento. La salida 20 es la vía de salida de las muestras del medio de ensayo que se recogen en varios momentos durante el curso del experimento. Además para simular la acción intestinal, un agitador 22, en forma de un eje 24 de rotación, propulsado por un motor (no mostrado) y que
- 15 rota a una tasa de aproximadamente 60 rpm, junto con una pala 26 que se encuentra en el final distal del eje 24, mejora la acción simulada del intestino grueso.
- Refiriéndonos a continuación a la Fig. 2, la simulación del vaso se operó para proporcionar la simulación de una infección patógena del intestino grueso porcino de la manera siguiente.
- 20 Para examinar los efectos del tratamiento en una infección existente, los vasos se cebaron con un inóculo fecal para proporcionar la microflora, el medio fresco y los patógenos que se examinarán en la etapa 200. Los patógenos se añadieron en esta etapa para permitirles incorporarse en la microflora, incrementando de ese modo la exposición a los sustratos de ensayo. A los contenidos se les permitió a continuación multiplicarse y estabilizarse en la etapa 202 (tres días) antes de añadir otra dosis de patógenos, seguido del sustrato o sustratos de ensayo, que en los ejemplos presentes comprenden residuo de arándano y GOS, en la etapa 204.
- 25 Cuando se examina un efecto profiláctico, los sustratos se añadieron en la etapa 200 y después diariamente. Los patógenos se introdujeron a continuación en la etapa 204.
- Se ha publicado una descripción detallada de un sistema similar en las referencias siguientes, que proporcionan más detalle en relación a la operación del sistema.
- 30 Hillman, K., Murdoch, T.A., Spencer, R.J. y Stewart, C.S. (1994) Inhibición de *Escherichia coli* enterotoxigénica por la microflora del íleon porcino, en un sistema de cultivo semicontinuo *in vitro*. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 294-300.
- Hillman, K., Spencer, R.J., Murdoch T.A, y Stewart, C.S. (1995) El efecto de mezclas de *Lactobacillus* spp. en la supervivencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en un cultivo continuo *in vitro* de bacteria intestinal porcina. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 130-133.
- 35 Khaddour, R., Reid, C-A. y Hillman, K. (1998) Mantenimiento *in vitro* de la microflora y modelos de fermentación del intestino porcino. *Pig News and Information* 19: 111N-114N.
- Blake, D.P., Hillman, K. y Fenlon, D.R. (2003). Uso de un modelo de íleon para investigar los efectos de antimicrobianos nuevos y existentes en la microflora gastrointestinal porcina indígena: usando vancomicina como un ejemplo. *Animal Feed Science and Technology* 103: 123-139.
- 40 El inóculo inicial podría contener patógenos en un nivel bajo (las muestras se toman de individuos sanos) pero cualquier patógeno existente se sobresaturará por los altos niveles añadidos como parte del experimento y, en cualquier caso, será sujeto a los efectos de los sustratos de ensayo.
- El efecto del flujo a través del intestino se simula a continuación mediante reposición de los contenidos del vaso con medio estéril fresco (etapa 206). Esto se realiza durante tres días añadiendo el 80% de los contenidos del vaso a intervalos de ocho horas, mientras las bombas de residuo mantienen constante el volumen total del vaso. Después de permitir al vaso repoblarse durante un tiempo corto en la etapa 208, se retiran las muestras en la etapa 210 y se determina las cantidades de grupos bacterianos específicos.
- 45 El experimento continua en este ciclo hasta que se obtienen datos suficientes, después se retira una muestra final en la etapa 212 y termina el experimento.
- 50 Actualmente, se operan cuatro vasos simultáneamente permitiendo tres combinaciones de sustratos de ensayo y uno de control. Todos los vasos se suministraron con medio a partir de una única fuente para garantizar que no haya diferencias debido a la fuente de alimentación, y los sustratos de ensayo se introdujeron manualmente a través del puerto 16 (figura 1).

EXPERIMENTO 1-Tratamiento profiláctico de *Salmonella* con GOS y puré de arándano

Materiales y métodos

Residuo de arándano y GOS

5 El arándano se trituró mediante un molinillo manual antes de su uso, para reducir la posibilidad de obstruir la tubería durante la operación del fermentador. No se incluyó arándano en el medio ya que el sustrato podría no mezclarse eficazmente, pero se añadió diariamente a través de un puerto separado en la tapa del vaso. Por coherencia, se añadieron GOS y una mezcla de arándano/GOS 70:30 a los respectivos vasos de la misma manera, todo en una concentración final del 1% de los contenidos en el fermentador. Ni el arándano ni el GOS se esterilizaron o trataron químicamente de ninguna manera antes de la adición.

Simulación In Vitro

10 Se emplearon cuatro vasos de fermentación. El volumen de trabajo de cada vaso era de 300 ml y la tasa de dilución era de 2,4 d⁻¹ (720 ml d⁻¹). Se calentaron todos los vasos al baño maría para proporcionar 37 (±1)°C en los contenidos del vaso. Se extrajeron las muestras mediante un tubo de salida de desagüe, que se extiende hasta aproximadamente dos-tercios de la profundidad del fluido.

El medio comprendía (g l⁻¹):

15 xilano, 0,6; pectina, 0,6; almidón de patata, 5,0; caseína, 3,0; peptona, 3,0; K₂HPO₄, 2,0; NaHCO₃, 1,0; NaCl, 4,5; MgSO₄·7H₂O, 0,5; CaCl₂·2H₂O, 0,45; Haemin, 0,01; Sales biliares (Oxoid), 0,05; Antifoam A (0,5 ml l⁻¹) y Tween 80 (2 ml l⁻¹). Todos los componentes se obtuvieron a partir del grupo Sigma excepto donde se indica.

20 El medio se preparó en un depósito de 5 l que contiene aproximadamente 2 l de agua destilada con agitación constante (magnética) para reducir la formación de agregados. El medio completo estaba compuesto hasta 5 l con agua destilada, se instalaron los tubos de reparto y se tapó el depósito con algodón hidrófilo antes de la esterilización por autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Después del autoclave, los depósitos se volvieron a colocar en los agitadores magnéticos en estado caliente (75-80°C), y se dejaron enfriar con agitación constante. Esto previene la formación de un gel de carbohidrato en la base del depósito, y rompe los agregados formados durante el autoclave.

25 Cuando el medio se ha colado, se añaden una solución de oligoelementos (2 ml l⁻¹) y una solución de vitamina (1 ml l⁻¹). Se proporcionó agitación continuamente en los depósitos durante todo el experimento.

La solución de oligoelementos comprendía (mg l⁻¹):

EDTA, 500; FeSO₄·7H₂O, 200; ZnSO₄·7H₂O, 10; MnCl₂·4H₂O, 3; H₃BO₃, 30; CoCl₂·6H₂O, 20; CuCl₂·2H₂O, 1; NiCl₂·6H₂O, 2; Na₂MoO₄·2H₂O, 3.

30 La solución de vitamina comprendía (mg l⁻¹):

menadiona, 1; biotina, 2; pantotenato sódico, 10; nicotinamida, 5; vitamina B₁₂, 0,5; tiamina, 4; ácido para-aminobenzoico, 5.

35 La naturaleza particular del medio requiere el uso de un tubo de calibre ancho, y la operación de bombeo discontinuo resultaría en la instalación de un medio dentro de tubos, conduciendo a una dispensación inexacta y posible obstrucción. El medio se bombeó por lo tanto continuamente en un circuito recirculante, y se desvió (mediante válvulas solenoides) a los vasos durante 15 minutos cada 8 horas para proporcionar la reposición y la tasa de dilución requeridas diariamente.

40 Los vasos se accionaron durante tres días antes del comienzo del experimento para garantizar la estabilidad del sistema. Los sustratos de ensayo se incorporaron a los vasos durante el periodo de estabilización, excepto para el control (sin adición), junto con un inóculo de heces porcinas frescas, se diluyeron 1:1 con diluyente de máxima recuperación (Oxoid) precalentado para proporcionar la microflora de origen de un colon saludable. La disposición de los ensayos en los vasos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Protocolo de operación del fermentador.

Días	Nº de vaso			
	1	2	3	4
1-3 (sin muestra)	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control
4-6 (serie de muestras 1)	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control
7-9 (sin muestra)	Control	Arándano	GOS	Arándano/GOS

Días	Nº de vaso			
	1	2	3	4
10-12 (serie de muestras 2)	Control	Arándano	GOS	Arándano/GOS
13-15 (Sin muestra)	Arándano/GOS	Control	Arándano	GOS
16-18 (serie de muestras 3)	Arándano/GOS	Control	Arándano	GOS

Todos los vasos se dosificaron durante la noche con un cultivo de *Salmonella poona* al comienzo de cada una de las series de muestras.

Análisis bacteriológico.

5 Se tomaron muestras (5 ml) diariamente durante tres días de las series de muestras. Las muestras se retiraron inmediatamente antes de introducir el medio fresco para que no se maximizara ninguna diferencia en la fermentación. Después de la retirada de la muestra y de la dosificación con medio fresco, se realizó la inoculación diaria del sustrato de ensayo. Al inicio de cada serie de datos, se retiró una muestra para evaluar la concentración inicial de *Salmonella poona* y el pH de los vasos inmediatamente después de la adición del medio fresco.

10 Después de la medición del pH, se añadió 1 ml de cada muestra a 9 ml del diluyente de máxima recuperación (MRD: Oxoid) y se diluyeron en serie hasta 10^6 . Estas diluciones se recubrieron después e incubaron como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones del medio e incubación para la enumeración de poblaciones bacterianas.

Grupo bacteriano	Medio	Incubación
Total de bacterias aeróbicas	Columbia agar sangre.	24 h aeróbico
Total de bacterias anaeróbicas	Columbia agar sangre.	48 h anaeróbico
Coliformes	Agar MacConkey Nº 3.	24 h aeróbico
Total de <i>Lactobacillus</i>	Agar MRS	48 h anaeróbico
<i>Lactobacillus</i> aerotolerante	Agar MRS	24 h aeróbico
<i>Salmonella</i>	Agar XLD	24 h aeróbico

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C. Las condiciones anaeróbicas se obtuvieron usando un frasco anaeróbico y sobres de Oxoid Anaerógeno.

15 Resultados

Las muestras se retiraron inmediatamente después de la alimentación y dosificación con *Salmonella*, al inicio de cada serie, se analizaron sólo para el pH y enumeración de *Salmonella*. Éstas se representaron en los resultados como datos 'Día 0'.

20 La muestra se recogió al inicio de la segunda serie de datos y se analizó por completo. Esto se hizo para examinar el efecto de la introducción de la alimentación en la población, y no con intenciones de un análisis estadístico. Los resultados de este singlete se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Una muestra única de la población tomada al inicio de la serie de datos 2 (log 10 ufc/ml).

	Total de aerobios	Coliformes	<i>Lactobacillus</i> aerotolerantes	Total de <i>Lactobacillus</i>	Total de anaerobios	Lac:coli
Arándano	8,78	8,60	7,16	7,85	8,74	0,91
GOS	8,48	8,30	8,06	8,32	8,88	1,00
Arándano/GOS	8,65	8,18	7,65	8,08	8,65	0,99
Control	8,88	8,40	7,54	7,48	8,88	0,89

Parece que existe una pequeña diferencia entre los vasos inmediatamente después de la alimentación, por tanto se puede asumir que los efectos mostrados después se debieron a los sustratos añadidos.

Se determinaron los valores iniciales de pH para el crecimiento del medio y para el 10% de las suspensiones/disoluciones de arándano, GOS y la mezcla 70:30 en agua destilada. Éstos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Medición del pH del medio de crecimiento fresco y de los sustratos.

Componente	Condición del ensayo	pH
Medio del fermentador	Sin diluir	6,91
Arándano	10% (p/v) suspensión en H ₂ O.d	3,00
GOS	10% (p/v) disolución en H ₂ O.d	4,05
70:30 Arándano:GOS	10% (p/v) suspensión/disolución en H ₂ O.d	3,34
Agua destilada	N/A	6,55

5 El pH de los contenidos del fermentador a cada tiempo de la muestra se muestra en la Tabla 5. Estos son los medios de los datos triplicados, y muestran una caída inmediata en el pH después de la adición de los sustratos de ensayo, los cuales aumentaron a lo largo del tiempo. El control de la fermentación no muestra un cambio significativo en el pH a lo largo del período de incubación, indicando que para una simulación normal, la mayor amortiguación es insuficiente.

10 Tabla 5. pH de las muestras retiradas de los vasos de fermentación.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
0	5,39 ^a _a	5,05 ^a _b	5,70 ^a _c	6,51 _d	0,086	0,05
1	4,63 ^b _a	3,61 ^b _b	4,81 ^b _a	6,21 _c	0,093	0,05
2	4,51 ^b _a	3,47 ^{bc} _b	4,45 ^c _a	6,51 _c	0,175	0,05
3	4,54 ^b _a	3,31 ^c _b	4,38 ^c _a	6,41 _c	0,137	0,05
SEM	0,143	0,089	0,134	0,170		
P	0,001	0,05	0,05	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P > 0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Las enumeraciones bacterianas se muestran en las Tablas 6 a 11, y las razones de *Lactobacillus*:coliformes derivados de los recuentos coliformes y de los recuentos totales de *Lactobacillus* se muestran en la Tabla 12. Todos los recuentos bacterianos se presentan como log₁₀ ufc/ml, y en todos los datos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos de estas tablas se consideran en la sección de Discusión.

15 Tabla 6. Total de bacterias aeróbicas.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	7,72 _a	7,85 _a	8,06 _{ab}	8,71 _a	0,288	0,05
2	7,90 _a	7,58 _a	8,03 _a	8,84 _b	0,331	0,05
3	7,93	7,68	7,89	8,62	0,457	ns
SEM	0,230	0,599	0,080	0,341		
P	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P > 0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 7. Total de bacterias anaeróbicas.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	8,69 ^a _a	8,65 _a	8,60 _a	9,14 _b	0,133	0,05
2	8,87 ^{ab} _{ab}	8,95 _b	8,63 _a	9,24 _c	0,107	0,05
3	8,99 ^b _{ac}	8,79 _{ab}	8,61 _b	9,22 _c	0,136	0,05
SEM	0,113	0,128	0,148	0,110		
P	0,05	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 8. Total de *Lactobacillus*.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	8,33 _a	8,39 _a	8,20 _{ab}	7,84 _b	0,189	0,05
2	8,45	8,47	8,24	7,92	0,336	ns
3	8,54 _a	8,44 _a	8,55 _a	7,75 _b	0,214	0,05
SEM	0,245	0,155	0,175	0,380		
P	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 9. *Lactobacillus* aerotolerantes.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	7,65 _a	8,31 _b	8,33 _b	7,59 _a	0,249	0,05
2	7,75 _{ab}	8,42 _a	8,22 _{ab}	7,67 _b	0,320	0,05
3	7,92	8,27	8,20	7,82	0,337	ns
SEM	0,229	0,075	0,117	0,547		
P	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 10. Bacterias coliformes.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	7,52 _{ac}	5,96 _b	6,62 ^a _{ab}	8,45 _c	0,417	0,05
2	6,95 _{ac}	4,80 _b	5,39 ^b _{ab}	8,78 _c	0,805	0,05
3	7,09 _a	3,11 _b	3,97 ^c _b	8,23 _a	1,172	0,05
SEM	0,837	1,390	0,482	0,260		
P	ns	ns	0,05	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 11. *Salmonella poona*.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
0	7,23 ^a	7,18 ^a	7,26 ^a	7,22 ^a	0,047	ns
1	5,97 ^b _a	4,79 ^b _b	5,68 ^b _a	6,93 ^a _c	0,279	0,05
2	ND ^c _a	3,79 ^c _b	3,55 ^c _b	6,77 ^a _c	0,335	0,001
3	ND ^c _a	ND ^d _a	ND ^d _a	5,95 ^b _b	0,062	0,001
SEM	0,155	0,186	0,240	0,284		
P	0,001	0,001	0,001	0,05		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 12. Razón *Lactobacillus*:coliforme.

Días	Arándano	GOS	Arándano/GOS	Control	SEM	P
1	1,11 _{ac}	1,41 _b	1,25 ^a _{bc}	0,93 _a	0,080	0,05
2	1,26 _{ac}	1,83 _b	1,55 ^a _{bc}	0,90 _a	0,242	0,05
3	1,21 _a	1,81 _b	2,17 ^b _c	0,94 _a	0,125	0,05
SEM	0,175	0,226	0,172	0,044		
P	ns	ns	0,05	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Discusión

- Se mejoró la razón de bacterias totales de *Lactobacillus* para bacterias coliformes (Tabla 12) mediante la adición de arándano, aunque ésta no alcanzó significancia estadística. Se observaron mejoras significativas con GOS, que apareció con un máximo después del segundo día. Este resultado se afectó por un valor coliforme de ND (<500 ufc/ml) en el día 3 de la segunda serie de datos; la aparente eliminación de bacterias coliformes mediante GOS en este punto no permitió el cálculo de la razón lac:coli. Es probable que el valor de GOS en el día tres pudiera ser mayor que el que se indica aquí. La adición de arándano, GOS o una combinación de éstos en los fermentadores dieron como resultado una caída inmediata en el pH alrededor de 5,0–5,7, todos significativamente menores que el control, y con el mayor efecto inmediato mostrado por la adición de GOS (Tabla 5). Esto parece inusual, ya que el pH del arándano es una unidad menos que la de GOS (Tabla 4) pero probablemente ocurre porque el GOS se fermenta rápidamente al entrar en el vaso, mientras que el arándano podría usarse más lentamente. Esta rápida fermentación puede explicar el aumento de la acidez vista en el vaso tratado con GOS.
- Después de la incubación, tanto GOS como la combinación de GOS/arándano mostraron un descenso en el pH a lo largo de tres días. Aún cuando el acto de carga de los vasos con medio fresco parecía ‘restablecer’ las poblaciones (Tabla 3), la influencia de GOS y el sustrato combinado es acumulativo. Cuanto más se alimentaban los sustratos, mayor era su efecto. El efecto máximo para GOS y GOS/arándano no se alcanzó en este experimento, aunque el efecto del arándano en solitario no difirió significativamente a lo largo del tiempo, y es probablemente máximo a los dos días. Es probable que la población se adapte al sustrato, algo que es probable que ocurra en los intestinos del ser humano o animal. Para un estudio en seres humanos, podría ser ventajoso para el sujeto consumir las comidas preparadas durante una semana para permitir a sus poblaciones intestinales adaptarse antes de medir los efectos.
- El total de bacterias aeróbicas (Tabla 6) y el total de bacterias anaeróbicas (Tabla 7) mostraron una pequeña diferencia en los vasos a lo largo del tiempo, pero todos los tratamientos mostraron reducciones significativas en estas poblaciones totales en comparación con el control. Es probable que el total recupere los niveles sin tratamiento, proporcionando el tiempo suficiente, pero serían dominados por diferentes especies que en la población original. En los vasos tratados con arándano, el total de anaerobios se recuperó a lo largo de tres días hasta el punto de que esta población no difiere significativamente del control (Tabla 7) y todas las poblaciones de bacterias aeróbicas alcanzaron una equivalencia estadística en el día 3 (Tabla 6). Es por lo tanto probable que estos tratamientos modifiquen y no que reduzcan el total de la población del colon.

5 Se incrementó significativamente el total de *Lactobacillus* tanto con arándano como por GOS después de un día de fermentación (Tabla 8), pero no mostraron un incremento progresivo a lo largo del tiempo. Los efectos de estos aditivos fueron inmediatos. El tratamiento con arándano/GOS aumentó también el total de *Lactobacillus*, alcanzando significancia después de tres días. Los *Lactobacillus* aerotolerantes, un subgrupo del total de *Lactobacillus*, mostró incrementos significativos en poblaciones donde sólo se incluyó GOS (Tabla 9). Es probable que las especies que utilizan primero GOS sea este subgrupo, mientras que aquellas especies estimuladas por la adición de arándano sean del subgrupo de los *Lactobacillus* anaeróbicos. GOS y arándano parecen mejorar el crecimiento de diferentes especies de *Lactobacillus*.

10 El arándano redujo la concentración de bacterias coliformes pero no alcanzó significancia (Tabla 10). Cuando se incluyó GOS, las bacterias coliformes se redujeron significativamente, y la reducción fue progresiva a lo largo de los tres días de muestreo. Esta reducción progresiva era significativa estadísticamente en el tratamiento de arándano/GOS, sugiriendo que la combinación era más eficaz que el tratamiento en solitario.

15 Se dosificó *Salmonella poona* en cada vaso al inicio de cada serie cada tres días, a una concentración de 10^7 ufc/ml (Tabla 11). En el control, este patógeno sobrevivió cerca de 10^6 por ml después de tres días, pero era indetectable (<500 /ml) en los vasos dosificados con cualquiera de los tres sustratos de ensayo después de este tiempo. El arándano probó más eficacia para eliminar la *Salmonella*, con niveles que caían por debajo de la detectabilidad después de dos días. Es posible que haya una acción de unión implicada: la capacidad del arándano para unirse a este patógeno no se ha investigado. Si este fuese el caso, la unión del patógeno aceleraría su eliminación del intestino. Todos los sustratos de ensayo proporcionaron una eliminación eficaz de *Salmonella poona* en tres días.

20 Con la combinación de arándano/GOS, la razón lac:coli mostró un incremento progresivo a lo largo de tres días, culminando en un valor de 2,17, mayor que el observado con arándano o GOS usados individualmente. Es posible un efecto sinérgico, aunque los puntos de datos que faltan en los resultados de GOS podrían afectar esta conclusión.

25 Parece que, entonces, mientras que tanto el arándano como GOS mejoran los *Lactobacillus*, mejoran diferentes grupos. Por lo tanto su uso en combinación tiende a ser más eficaz que su uso como sustratos individuales. El arándano parece particularmente eficaz en la eliminación de *Salmonella*, mientras que GOS es más eficaz en la supresión de la población coliforme general. Juntos, presentan una razón de *Lactobacillus*:coliformes significativamente mayor que la que pudieran presentar en solitario. Ambos dieron como resultado la acidificación de la fermentación intestinal que desfavorecerá al grupo coliforme mientras que mejorará la actividad de los *Lactobacillus*.

30 Los resultados que se presentan aquí sugieren que el uso del arándano y de GOS en combinación es probable que se sea más eficaz para mejorar la salud intestinal que el uso de cualquiera de los aditivos en solitario.

EXPERIMENTO 2. Tratamiento curativo de *Clostridium difficile* y *Salmonella poona* con GOS y Puré de Arándano

Métodos y Materiales

35 Se incorporó Galacto-oligosacárido (GOS) una vez al día en los vasos de fermentación a una concentración del 1% (del producto). Se preparó una disolución de GOS al 50% (p/v) en agua estéril destilada para un fácil manejo. El pH de esta disolución de GOS era 3,94.

Se molieron parcialmente pieles de arándano (aproximadamente un 12% DM) antes de su uso, utilizando un molinillo manual. Se añadió diariamente al vaso el 1% (peso húmedo) del tratamiento de arándano.

40 Una mezcla de GOS/arándano compuesta de una mezcla 70:30 de arándano y GOS, proporcionando una adición diaria del 0,7% de las pieles de arándano y el 0,3% de GOS.

Patógenos.

45 La simulación se sembró con *Clostridium difficile* fresco y con cultivos de *Salmonella poona* durante su fase de estabilización inicial, para permitir a estos patógenos la mejor oportunidad de estabilización en la población. Además, las dosis de patógenos se añadieron en el primer día (día 0) de cada serie, mientras que los tratamientos no se aplicaron hasta el segundo día (día 1). El experimento se diseñó para hacer lo más difícil posible que los tratamientos afectaran a la estabilización de los patógenos.

Simulación In Vitro.

50 El protocolo de operación para el proyecto actual se muestra en la Tabla 1 e incluye el uso de cuatro vasos de fermentación. El promedio de pH del medio de crecimiento era 6,54 a lo largo del curso de trabajo.

Tabla 1: Protocolo de operación del fermentador.

Nº de vaso				
Días	1	2	3	4
1-3 (sin muestra)	Control	Arándano	GOS	GOS/arándano
4-7 (serie de muestras 1)	Control	Arándano	GOS	GOS/arándano
8-10 (sin muestra)	Arándano	GOS	GOS/arándano	Control
11-14 (serie de muestras 2)	Arándano	GOS	GOS/arándano	Control
15-17 (sin muestra)	GOS	GOS/arándano	Control	Arándano
18-21 (serie de muestras 3)	GOS	GOS/arándano	Control	Arándano

Análisis bacteriológico.

Se tomaron muestras (5 ml) diariamente durante tres días de las series de muestras. Las muestras se retiraron inmediatamente antes de introducir el medio fresco para que no se maximizara ninguna diferencia en la fermentación. Después de la retirada y de la dosificación con medio fresco, se realizó la inoculación diaria del sustrato de ensayo. Al inicio de cada serie de datos, se retiró una muestra para evaluar las concentraciones iniciales de *Salmonella poona* y de *Clostridium difficile* y el pH de los vasos inmediatamente después de la adición del medio fresco.

Después de la medición del pH, se añadió 1 ml de cada muestra a 9 ml del diluyente de máxima recuperación (MRD: Oxoid) y se diluyeron en serie hasta 10^6 . Estas diluciones se recubrieron después e incubaron como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones del medio e incubación para la enumeración de poblaciones bacterianas.

Grupo bacteriano	Medio	Incubación
Total de bacterias aeróbicas	Columbia agar sangre.	24 h aeróbico
Total de bacterias anaeróbicas	Columbia agar sangre.	48 h anaeróbico
Coliformes	Agar MacConkey N° 3.	24 h aeróbico
Total de <i>Lactobacillus</i>	Agar MRS	48 h anaeróbico
<i>Lactobacillus</i> aerotolerante	Agar MRS	24 h aeróbico
<i>Salmonella</i>	Agar XLD	24 h aeróbico
<i>Clostridium difficile</i>	Medio selectivo para <i>C.difficile</i>	48 h anaeróbico

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C. Las condiciones anaeróbicas se obtuvieron utilizando un frasco anaeróbico y sobres de Oxoid Anaerógeno. La anaerobiosis se confirmó mediante tiras indicadoras Oxoid.

Cuando la identidad de *C. difficile* no pudo determinarse definitivamente a ojo después de la incubación, las colonias se evaluaron usando anticuerpos en base a un ensayo de confirmación (Oxoid).

Resultados

El pH de todos los vasos tratados descendió a lo largo del curso del experimento hasta una mayor extensión que la observada en el vaso control (Tabla 3). Los tratamientos con GOS y GOS/arándano mostraron un pH significativamente reducido en comparación con el control el día 2 (después de un día de tratamiento) y el día 3, en los tres tratamientos se redujo significativamente el pH en comparación con el control.

Tabla 3. pH de los contenidos del fermentador en cada tiempo de la muestra.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	6,63 ^a	6,56 ^a	6,68 ^a	6,69 ^a	0,107	ns
1	6,33 ^a	6,32 ^a	6,36 ^b	6,51 ^{ab}	0,134	ns
2	4,73 ^b _a	5,54 ^b _{bc}	5,23 ^c _b	6,14 ^b _c	0,258	0,05
3	4,50 ^b _a	5,17 ^b _b	4,79 ^d _{ab}	6,03 ^b _c	0,158	0,01

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
SEM	0,169	0,189	0,099	0,216		
P<	0,001	0,01	0,01	0,05		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

No hubo diferencias significativas en los recuentos de bacterias aeróbicas totales (Tabla 4) o en el total de bacterias aeróbicas (Tabla 5) como resultado de cualquier tratamiento a lo largo del curso del experimento.

Tabla 4. Total de bacterias aeróbicas.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	8,39	8,37	8,48	8,63	0,317	ns
1	8,57	8,74	8,56	8,76	0,186	ns
2	8,56	8,68	8,68	8,82	0,217	ns
3	8,56	8,52	8,71	8,72	0,363	ns
SEM	0,252	0,337	0,288	0,234		
P<	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Tabla 5. Total de bacterias anaeróbicas.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	8,45	8,04	8,15	8,63	0,603	ns
1	8,38	8,40	8,35	8,46	0,388	ns
2	8,45	8,56	8,42	8,68	0,208	ns
3	8,49	8,20	8,45	8,56	0,345	ns
SEM	0,278	0,501	0,495	0,322		
P<	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

- 5 El total de *Lactobacillus* (Tabla 6) se presentó en mayores cantidades al inicio del experimento, que era probablemente debido a un mayor inóculo en el comienzo de la muestra. Sus cantidades disminuyeron en el vaso control a lo largo del tiempo, pero no hubo una reducción significativa a lo largo del tiempo en ningún vaso. GOS mostró un recuento significativamente mayor del total de *Lactobacillus* el día 2; los otros dos tratamientos fueron mayores que el valor control, aunque los datos no alcanzaron significancia estadística.

10

Tabla 6. Total de *Lactobacillus*.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	8,21	8,12	8,65	8,48	0,552	ns
1	8,32	8,43	8,36	8,37	0,320	ns
2	8,44 _a	8,25 _{ab}	8,02 _b	8,02 _b	0,162	0,05
3	8,47 _a	8,02 _{ab}	8,35 _{ab}	7,71 _b	0,340	0,05

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
SEM	0,247	0,410	0,362	0,435		
P<	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Aunque los *Lactobacillus* aerotolerantes (Tabla 7) muestran un modelo similar al del total de *Lactobacillus* (Tabla 6), hubo algunas diferencias significativas estadísticamente, debido a la amplia variación en esta población entre series. Los mayores recuentos iniciales de esta población también sirven para enmascarar cualquier incremento potencial debido a GOS o al arándano.

5

Tabla 7. *Lactobacillus* aerotolerantes.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	7,44	7,65	7,58	7,31	1,042	ns
1	8,02	7,59	7,69	7,77	0,810	ns
2	8,22 ^a	7,85 ^b	8,20 ^{ab}	8,07 ^{ab}	0,169	0,05
3	8,30	8,09	8,37	7,87	0,380	ns
SEM	0,684	0,581	0,721	0,771		
P<	ns	ns	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Se observaron disminuciones significativas en las bacterias coliformes (Tabla 8) en todos los tratamientos pero no en el control. El día 3, los tratamientos con GOS y arándano dieron como resultado una reducción significativa de las cantidades de coliformes en comparación con el control, mientras que la combinación de GOS/arándano no la tuvo.

Tabla 8. Bacterias coliformes.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	8,14 ^a	8,24 ^a	8,39 ^a	8,12	0,232	ns
1	8,11 ^a	8,24 ^a	8,00 ^{ab}	8,10	0,235	ns
2	8,06 ^a	8,19 ^a	7,78 ^b	8,09	0,224	ns
3	7,20 ^b _a	7,18 ^b _a	7,95 ^{ab} _b	7,85 _b	0,282	0,05
SEM	0,203	0,303	0,271	0,177		
P<	0,01	0,01	0,05	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

10 *Salmonella poona* (Tabla 9) descendió en todos los vasos a lo largo del tiempo. Aunque el descenso fue mayor en los vasos tratados que en el control, las diferencias no alcanzaron significancia estadística debido a la mayor variabilidad entre series.

Tabla 9. *Salmonella poona*.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	7,86 ^a	8,04 ^a	8,14 ^a	8,19 ^a	0,339	ns
1	7,05 ^a	7,49 ^a	7,21 ^{ab}	7,24 ^{ab}	0,891	ns

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
2	5,03 ^b	5,38 ^b	5,53 ^{ab}	6,83 ^{ab}	0,860	ns
3	4,63 ^b	5,07 ^b	4,90 ^b	5,81 ^b	1,042	ns
SEM	0,917	0,883	0,789	0,705		
P<	0,05	0,05	0,05	0,05		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Clostridium difficile (Tabla 10) demostró una reducción significativa en las cantidades de todos los vasos tratados, pero no en el control. Los tres tratamientos mostraron una reducción significativa de este patógeno comparado con el control en el día 2, aunque el tratamiento con arándano no fue significativamente diferente del control en el día 3.

Tabla 10. *Clostridium difficile*.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	5,81 ^a	5,70 ^a	5,44 ^a	5,58	0,356	ns
1	5,65 ^a	5,00 ^{ab}	5,05 ^{ab}	6,10	1,058	ns
2	3,70 ^b _a	4,37 ^{ab} _a	3,70 ^{ab} _a	5,76 _b	0,504	0,05
3	2,70 ^b _a	3,76 ^b _{ab}	3,37 ^b _a	4,96 _b	0,674	0,05
SEM	0,489	0,789	0,849	0,613		
P<	0,01	0,05	0,05	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

- 5 La razón de *Lactobacillus*:coliformes alcanzó significancia estadística el día 3, mejor con los tres tratamientos que el control. GOS generó la mayor razón, seguido del arándano.

Tabla 11. Razón *Lactobacillus*:coliformes.

Días	GOS	Arándano	GOS/Arándano	Control	SEM	P<
0	1,01 ^a	0,98 ^a	1,03	1,05	0,052	ns
1	1,03 ^a	1,02 ^a	1,04	1,03	0,030	ns
2	1,05 ^a	1,01 ^a	1,04	0,99	0,040	ns
3	1,18 ^b _a	1,12 ^b _b	1,05 _c	0,98 _d	0,026	0,05
SEM	0,033	0,032	0,043	0,043		
P<	0,05	0,05	ns	ns		

Los valores en la columna que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente ($P>0,05$). Los valores en la fila que marcan las mismas letras en superíndice no difieren significativamente. ns- diferencias no significativas.

Discusión

- 10 Está claro que este experimento debería continuarse durante otro día en cada una de las series por triplicado. En un trabajo futuro, el periodo de ensayo comenzará con la adición de tratamientos, el día 1 que se llevó a cabo este experimento. Los datos del día 0 y del día 1 no muestran diferencias materiales, ya que las muestras del día 1 se extrajeron después de exponer los vasos al tratamiento durante sólo una hora.

- 15 No obstante, incluso con sólo dos días eficaces del tratamiento, GOS, arándano y la mezcla combinada produjeron datos que mostraron diferencias significativas. Los tres tratamientos redujeron las cantidades de *C. difficile*, los tres mejoraron la razón de *Lactobacillus*:coliformes, y todos redujeron el pH total de los contenidos del vaso.

Salmonella poona se redujo también, aunque no a niveles significativos. El trabajo previo mostró un efecto profiláctico en el que los vasos pretratados con estos sustratos no soportaron el crecimiento de *S. poona*. La eliminación de una infección existente llevará más tiempo de los dos días que se aplicó aquí, pero la tendencia es clara.

- 5 Los mayores recuentos iniciales de ambos grupos de *Lactobacillus* fueron consecuencia de las muestras fecales usadas: las muestras naturales variarán, por supuesto, entre cerdos así como lo harán entre los seres humanos. Sin embargo, aún cuando las cantidades de *Lactobacillus* mostraron una pequeña variación, fue un cambio suficiente para permitir diferencias significativas en la razón de *Lactobacillus*:coliformes, y el rápido descenso en el pH sugiere que la actividad de estas poblaciones incrementó incluso aunque sus cantidades estuvieran ya, o se aproximaran, a su máximo.

10 El experimento ha mostrado que una infección existente de *C. difficile* puede ser rápidamente y significativamente reducida mediante la aplicación de estos tratamientos, particularmente cuando se incluye GOS, e indica que es probable que aparezca un efecto similar con una infección existente de *Salmonella*.

Evidencia Anecdótica que incluye el tratamiento

- 15 Un paciente, varón de aproximadamente 50 años de edad, padecía de síntomas graves de infección por *C. difficile*, a pesar de haber estado en tratamiento con un antibiótico de reducido espectro, durante un periodo de aproximadamente tres meses. Entonces se modificó el protocolo de tratamiento para incluir, adicionalmente, la administración oral de puré de arándano y GOS al menos una vez al día. El resultado, cinco días después de la modificación del tratamiento, fue que no era posible detectar la infección por *C. difficile*.
- 20 En otro paciente femenino, que presenta por segunda vez síntomas de *C. difficile* se trató inicialmente con metronidazol y después, posteriormente, con vancomicina. Ningún tratamiento estaba teniendo efecto. En el momento de administración de una mezcla de galacto-oligosacárido y puré de arándano, la paciente registraba 16 episodios de deposiciones en un periodo de 24 horas, padecía de deshidratación grave y estaba causando una significativa preocupación que podría dar como resultado una muerte inminente. En 48 horas de la administración oral tres veces al día de galacto-oligosacárido y puré de arándano, la paciente se estaba recuperando, con un número de episodios de deposiciones que se había reducido a tres en un periodo de 24 horas.

- Entre las cepas de *Lactobacillus*, algunas se afectan más beneficiosamente por oligosacáridos tales como galacto-oligosacárido que otras. Por lo tanto, dada la cantidad de cepas diferentes de *Lactobacillus*, no hay razón para suponer que cualquier individuo dado, tenga necesariamente algunas de las poblaciones de estas cepas que se afectan más beneficiosamente. Otro aspecto independiente de la presente divulgación, fuera del alcance de la invención tal como se reivindica, proporciona un método para generar una mezcla de probiótico y prebiótico que comprende las etapas de tratar una variedad de cepas *Lactobacillus* con un oligosacárido prebiótico, identificar una o más cepas de *Lactobacillus* que se afectan beneficiosamente e incorporar una población de una o más de las cepas de *Lactobacillus* que se afectan más beneficiosamente en un prebiótico. La mezcla resultante se puede administrar entonces a personas con el objetivo de mejorar su salud intestinal, garantizando así que posean una población de las bacterias que se afectan más beneficiosamente, por ejemplo, por un prebiótico galacto-oligosacárido.

- 40 Durante los ensayos para examinar el efecto del galacto-oligosacárido, en una población de *Salmonella* (realizado utilizando el aparato de simulación de la fermentación *in vitro* anteriormente ilustrada) se encontró que el efecto beneficioso de los *Lactobacillus* en la reducción de la población de *Salmonella* aumentó con mayores periodos de tiempo sobre los que se trató el vaso con galacto-oligosacárido. Por tanto, después de un periodo de tres semanas, la acción de *Lactobacillus* en la reducción de la población de *Salmonella* aumentó significativamente. Ensayos posteriores revelaron que una mejora en la eficacia de la acción de la población de *Lactobacillus* en la reducción de los niveles de *Salmonella* continuó produciéndose durante un periodo en el que la población de *Lactobacillus* permaneció estable-eliminando así la posibilidad de que este efecto resulte de un simple aumento en la cantidad de *Lactobacillus* presente a lo largo de este periodo de tiempo.

- Esto ha llevado a la conclusión de que esta acción mejorada se debe a una mejora de la eficacia en cepas específicas de la población de *Lactobacillus* debido a su tratamiento con el prebiótico, afectando así preferente y beneficiosamente a aquellas cepas que, a su vez, tienen una acción mejorada contra la *Salmonella*. De tales cepas de *Lactobacillus*, tres que se afectan preferentemente que, además, son también eficaces contra *Salmonella* son:

L. salivarius

L. brevis

L. buchneri

- 55 Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación proporciona el aislamiento de estas cepas de *Lactobacillus* que son por tanto eficaces probando su eficacia contra, por ejemplo, *Salmonella* y *Clostridium difficile*, y su recombinación con galacto-oligosacárido como prebiótico, proporcionando así un suplemento alimenticio eficaz que

tiene el efecto beneficioso de reducir la población de *Salmonella* y *Clostridium difficile*. Preferiblemente, esta mezcla se mezcla adicionalmente con una pulpa hemi-celular. Ejemplos de tal pulpa incluyen arándanos u otras frutas tales como: arándanos, fresas, frambuesas, moras, grosellas, grosellas negras, zarzamoras, manzanas, naranjas, fruta de kiwi, melocotones, nectarinas, ciruelas, albaricoques, uvas y similares, así como tomates, por ejemplo.

5 Alternativamente, o en adición, se puede usar pulpa vegetal, bien obtenida como un residuo al hacer jugo o una operación de presión, tal como puede ser el caso con, por ejemplo, zanahorias, o bien generado por maceración o licuación. Ejemplos de vegetales que pueden servir para crear una pulpa práctica incluyen, pero no se limitan a, patatas (por ejemplo, las pieles de una patata horneada), zanahorias, remolachas, apio, puerros, pimientos, brasicas tales como brócoli, brotes, coliflor y col.

10 Por tanto, otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método en el que cepas de las bacterias probióticas que se afectan más beneficiosamente, tales como las tres que se indicaron anteriormente, se pueden seleccionar por referencia a su crecimiento, y después de seleccionarse con referencia a su efecto sobre bacterias intestinales perjudiciales se recombinan con probiótico.

15 Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a los efectos de la infección por *C. difficile*. *Clostridium difficile* produce una variedad de toxinas. Una de estas, conocida como 'toxina A', es una enterotoxina y actúa directamente en la mucosa del intestino causando inflamación, haciendo que las células secreten fluido. La toxina B es una citotoxina y mata células. Aunque la toxina B es menos importante, sus efectos en presencia de la toxina A puede ser nociva debido a la susceptibilidad a sus efectos de las células mucosas inflamadas. La toxina A, sin embargo, es la más peligrosa de las dos ya que sus efectos son más idóneos para causar los síntomas que pueden, finalmente, dar como resultado una septicemia y la muerte.

20

En los ensayos de cultivos de *C. difficile* se encontró que, a lo largo de un periodo de 24 horas, la presencia de pulpa de arándano a una concentración del 20% en su diluyente tenía el efecto de reducir los niveles de toxina A detectables en un factor de al menos más de 100 veces que las del control (por ejemplo, un cultivo idéntico sin arándano), proporcionando una clara evidencia de los efectos beneficiosos del arándano para reducir la toxina A producida por *C. difficile*. Otro aspecto de la presente divulgación proporciona, por lo tanto, el uso del arándano para producir una preparación que se emplea en la reducción de los niveles de toxina A producida por *C. difficile*. Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un tratamiento para reducir los niveles de toxina A producidos por *C. difficile* que comprende la etapa de administrar oralmente el arándano en cuestión a un paciente.

25

La preparación combinada de un material comestible que contiene hemicelulosa u otros componentes celulares insolubles proporciona una preparación que tiene utilidad para tratar síntomas causados por un amplio rango de bacterias patógenas, ya que *Salmonella* y *Clostridium* son grupos taxonómicos ampliamente diferenciados. Cabe destacar que la mezcla de arándano/GOS mejoró la razón de *Lactobacillus*:coliformes en un mayor grado que el sustrato en solitario, que parecería indicar que, para el uso profiláctico general, esta mezcla es mejor que los componentes individuales. El efecto reductor del arándano en la toxina, unido con los muchos efectos significativos de la reducción de la población de *C. difficile* en los vasos *in vitro* mediante la administración de galacto-oligosacárido produce una preparación combinada adaptada para enfrentarse a los síntomas de la infección por *C. difficile* mediante la reducción de los niveles de toxina, y también la presencia de la bacteria *C. difficile* estimulan los niveles de *Lactobacillus* en el intestino. Además, hay una clara evidencia del beneficio del tratamiento profiláctico de *Salmonella* a partir del uso del arándano en solitario. Sin embargo, el uso en solitario del arándano no forma parte de la invención como se reivindica.

30

35

40

En una realización el arándano y el galacto-oligosacárido se pueden proporcionar ventajosamente a través de un sustrato en forma de una bebida a base de leche tal como un batido. Alternativamente se puede proporcionar en un sustrato que comprende yogurt o una bebida de yogurt. Todas las forma del sustrato pueden incluir adicionalmente una o más de las cepas de *Lactobacillus* especificados anteriormente.

45

REIVINDICACIONES

1. El uso de un galactooligosacárido y pulpa de un material hemi-celular de arándano en la creación de una preparación para uso en el tratamiento de infección por uno de *Clostridium difficile* y *Salmonella*.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento es para *Salmonella* y el uso incluye además el uso de al menos una de las siguientes cepas de bacteria en la creación de la preparación: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*.
3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tratamiento incluye el tratamiento de la enterotoxina producida por *Clostridium difficile*.
- 10 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tratamiento es un tratamiento profiláctico.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tratamiento es un tratamiento curativo.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la preparación tiene la forma de uno de: fruta desecada envasada o una barrita de fruta contenida en un envase hermético, o una bebida.

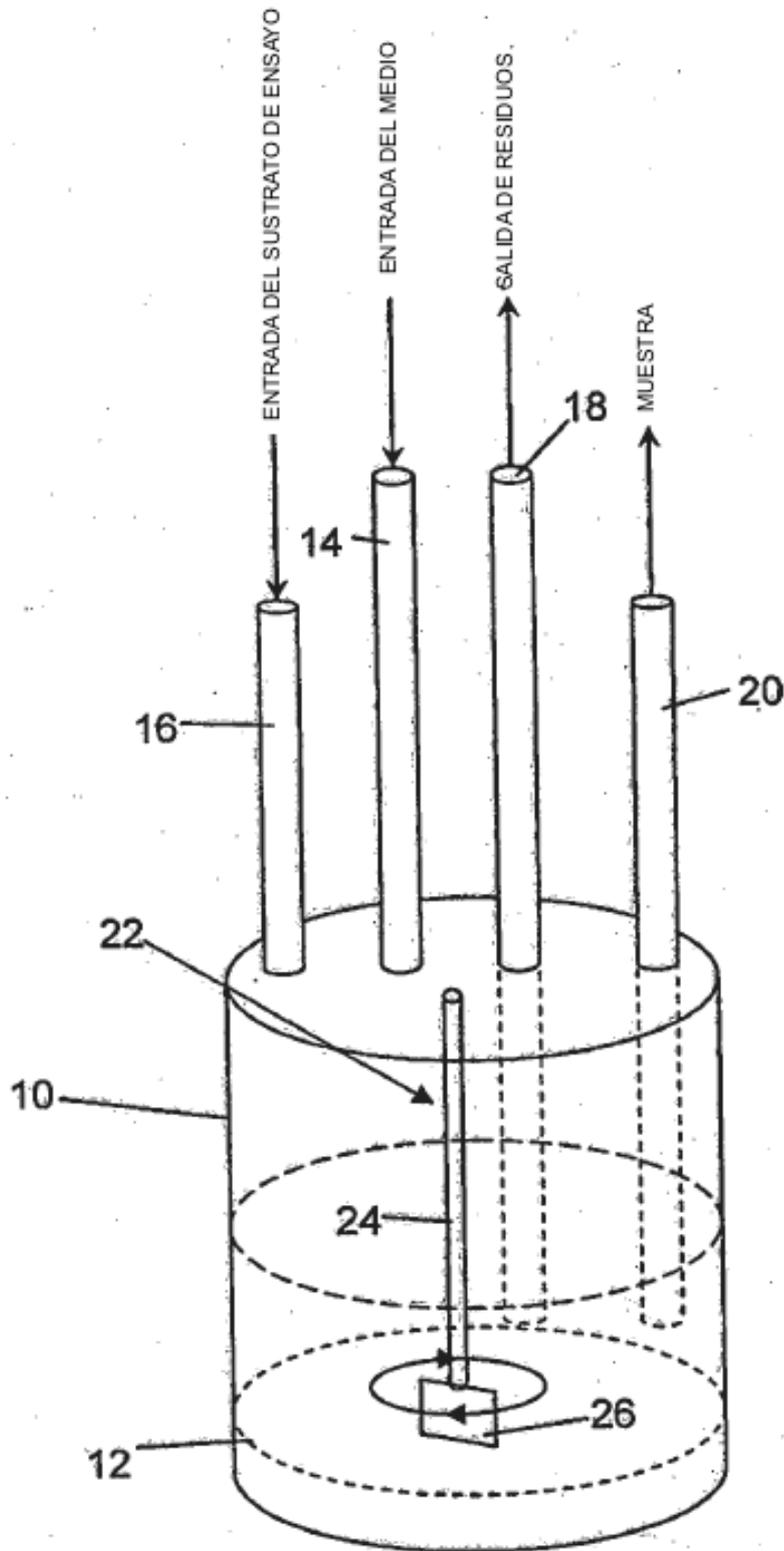


Fig. 1

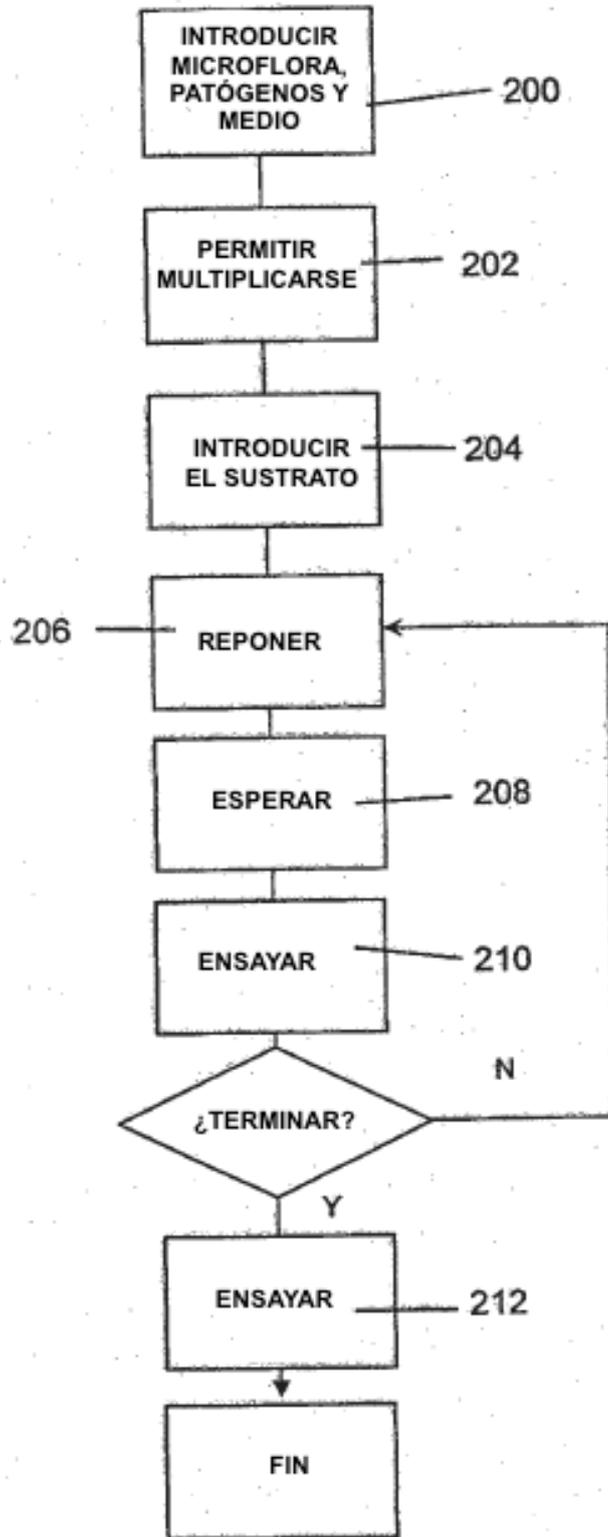


Fig. 2