

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 289**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/IB2012/000897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12731649 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2707478**

54 Título: **Cepas bacterianas probióticas y composición simbiótica que las contiene destinada a alimento para lactantes**

30 Prioridad:

**09.05.2011 IT MI20110793**

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

**08.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOGNA, GIOVANNI;  
STROZZI, GIAN PAOLO y  
MOGNA, LUCA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 641 289 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

Cepas bacterianas probióticas y composición simbiótica que las contiene destinada a alimento para lactantes

5 La presente invención se refiere a una selección de cepas probióticas que pertenecen al género *Bifidobacterium* y a una composición simbiótica que las contiene y destinada a alimento para lactantes.

10 Los lactantes alimentados con una dieta artificial muestran diferencias considerables en la composición de la microbiota intestinal en comparación con lactantes amamantados: en particular, puede observarse una reducción en la concentración de bifidobacterias a costa de otros microorganismos potencialmente patógenos, tales como *Escherichia coli* y *Clostridium* spp. La colonización de microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* tiene lugar en lactantes amamantados en los primeros 4 días tras el nacimiento y las bifidobacterias se convierten muy pronto en el grupo microbiano prevalente. Con la alimentación por fórmula, por otro lado, se desarrolla una flora más heterogénea compuesta por coliformes, bacteroides, clostridios y estreptococos. Precisamente por estos  
15 motivos, los lactantes alimentados con fórmula presentan un mayor riesgo de contraer infecciones intestinales.

Además, una producción excesiva de gas intestinal parece ser la causa del denominado "cólico", que afecta a numerosos lactantes durante los primeros meses de vida.

20 Por tanto, existe la profunda necesidad de poder obtener, en lactantes, el efecto fisiológicamente bifidogénico obtenido a través de la alimentación con leche materna. En particular, es deseable ser capaz de garantizar a los lactantes alimentados con fórmula una flora intestinal de manera que se eviten los cólicos.

25 Se divulgan cepas bacterianas que pertenecen al género *Bifidobacterium* y que tienen actividades antimicrobianas en, por ejemplo, Likotrafiti *et al.* (Microbial ecology in health and disease 2004 16:105-112) y Jeong-Weon *et al.* (Food Science and Technology 2002 11(1): 89-92).

30 El solicitante ha proporcionado una respuesta a las necesidades mencionadas anteriormente tras una intensa actividad de investigación, al final de la cual se identificó una selección de cepas bacterianas que pertenecen al género *Bifidobacterium*.

La materia de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece al género *Bifidobacterium* y que tiene las características divulgadas en la reivindicación independiente adjunta.

35 La materia de la presente invención también se refiere a una composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica que contiene dichas cepas bacterianas, tal como se divulga en la reivindicación independiente adjunta. Dichas composiciones tienen aplicación válida para su uso en el tratamiento del cólico, la diarrea y los trastornos intestinales, preferiblemente en sujetos en edad pediátrica.

40 Se ilustrarán realizaciones preferidas de la presente invención en la descripción detallada que sigue.

45 Las cepas bacterianas seleccionadas por el solicitante tienen características probióticas y pueden administrarse a lactantes, puesto que cumplen directrices específicas (FAO/OMS, 2002) que requieren: una evaluación de la actividad antimicrobiana hacia bacterias antagonistas, la no toxicidad y no patogenicidad de la cepa, una identificación taxonómica exacta de la misma, adhesión al epitelio intestinal, resistencia al tracto gastrointestinal (bilis y jugos gástricos), estabilidad genética, con referencia particular a la transmisibilidad de resistencia a antibióticos, y propiedades tecnológicas y sensoriales deseables cuando se usan en un proceso industrial. Además, es de particular importancia el estudio de la citotoxicidad de los probióticos frente a células humanas y la verificación de su capacidad para adherirse a la mucosa intestinal y la capacidad para bloquear la adhesión de los patógenos a las  
50 propias células intestinales.

El solicitante seleccionó las cepas de la presente invención únicamente tras haber verificado experimentalmente las especificaciones mencionadas anteriormente.

55 Las cepas bacterianas seleccionadas por el solicitante pertenecen al género *Bifidobacterium* y tienen una actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. Además, dichas cepas tienen adicionalmente una actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* y *Campilobacter jejunii*.

60 Las cepas seleccionadas pertenecen a las especies *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium longum subsp. longum*. Las cepas seleccionadas por el solicitante son:

(i) *Bifidobacterium breve* B632, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24706.

65 (ii) *Bifidobacterium breve* B2274, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24707.

(iii) *Bifidobacterium breve* B7840, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24708.

5 (iv) *Bifidobacterium longum subsp. longum* B1975, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24709.

Todas las cepas anteriores están disponibles y son accesibles para el público según las condiciones establecidas por el Tratado de Budapest.

10 La composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica de la presente invención comprende una mezcla bacteriana que a su vez comprende al menos una cepa bacteriana mencionada anteriormente, para su uso en el tratamiento de cólico, diarrea y trastornos intestinales, preferiblemente en sujetos en edad pediátrica. En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) o (ii) o (iii) o (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (ii). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (iii). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (ii) y (iii). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (ii) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (iii) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (ii) y (iii). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (ii) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (ii) y (iii) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (iii) y (iv). En una realización, la mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas (i) y (ii) y (iii) y (iv). Además, la materia de la presente invención se refiere a una composición simbiótica que comprende al menos una de las cepas bacterianas probióticas mencionadas anteriormente en asociación con al menos una fibra prebiótica. Dicha asociación permite ventajosamente una multiplicación selectiva de las bacterias beneficiosas existentes que van a obtenerse, induciendo, por tanto, efectos sistémicos y locales ventajosos para el huésped. La composición simbiótica está destinada a lactantes.

30 En particular, varios "oligosacáridos no digeribles" seleccionados del grupo que comprende galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS) e inulina tienen aplicación válida como fibras en el contexto de la presente invención.

35 Una realización preferida se refiere a una composición que comprende una fórmula para alimentar lactantes, al menos una cepa bacteriana de la presente invención y al menos una fibra prebiótica seleccionada de entre las mencionadas anteriormente. Ventajosamente, dicha composición es capaz de proporcionar al lactante un marcado efecto "bifidogénico" muy similar al de la leche humana.

40 El objeto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium longum subsp. longum* y que tiene una actividad antimicrobiana frente a los patógenos *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* y *Campilobacter jejunii*. El patógeno *E. coli* comprende el biotipo *E. coli* O157:H7. La cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve* B2274, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24707 y *Bifidobacterium breve* B7840, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24708. La cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum subsp. longum* B1975, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24709.

50 El objeto de la presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium breve* B632, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24706, en asociación con *Bifidobacterium breve* BR03, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 16604.

55 La materia de la presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium breve* BR03, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 16604, en asociación con *Lactobacillus plantarum* LP01 depositada por la empresa Mofin Srl de Novara (Italia) en la Institución depositaria BCCM-LMG el 16/10/2001 y que tiene el número de depósito LMG P-21021. Ventajosamente, la cepa *Lactobacillus plantarum* LP01 muestra una gran actividad de inhibición frente a cepas patógenas, tal como se demuestra en la parte experimental que sigue a continuación (figuras 1-5).

65 La presente invención se refiere a una composición alimentaria o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una mezcla bacteriana, dicha mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium longum subsp. longum*, tal como se describió anteriormente, para su uso

en el tratamiento de cólico, diarrea y trastornos intestinales; preferiblemente en sujetos en edad pediátrica. Dicha mezcla bacteriana comprende o, alternativamente, consiste en las cepas *Bifidobacterium breve* B632 en asociación con *Bifidobacterium breve* BR03 o, alternativamente, *Bifidobacterium breve* BR03 en asociación con *Lactobacillus plantarum* LP01. Dicha composición alimentaria o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica comprende una mezcla bacteriana, tal como se describió anteriormente, en la que dicha mezcla bacteriana se añade o se suspende o se dispersa en un aceite vegetal seleccionado de entre aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de semillas y aceite de palma. Preferiblemente es un aceite de maíz.

La composición alimentaria o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica puede estar en forma de una suspensión oleosa o gránulos, polvo, cápsulas, comprimidos y sobres.

El objeto de la presente invención se refiere a una composición alimentaria o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica como composición simbiótica. Dicha composición simbiótica comprende al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en esteroides o fitoesteroides, estanoles o fitoesteroides, glucomanano, goma konjac y/o al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende fructo-oligosacáridos -FOS, galacto-oligosacáridos -GOS, xilo-oligosacáridos -XOS, inulina, fibra de alerce o arabinogalactano y/o arroz rojo fermentado y/o betaglucanos de avenas, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y/o gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada. En una realización, dicha composición simbiótica comprende simeticona. En otra realización, dicha composición simbiótica comprende al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS) e inulina.

## Parte experimental

### 1. SELECCIÓN DE LAS BIFIDOBACTERIAS

Se estudiaron cuarenta y seis cepas de *Bifidobacterium spp.*; se aislaron predominantemente de heces de lactante y pertenecen a 5 especies diferentes (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum subsp. infantis*, *B. longum subsp. longum*, *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*). Los microorganismos considerados son parte de la colección BUSCoB (Colección Scardovi de bifidobacterias de la Universidad de Bolonia, Universidad de Bolonia, Italia) presente en el DiSTA.

### 2. SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS OBJETIVO

Se tuvieron en cuenta diversas cepas de *Escherichia coli*: 1 cepa de *E. coli* de una colección (ATCC 11105), 1 cepa de *E. coli* aislada de heces durante una infección de las vías urinarias (cepa M85), que había demostrado ser un buen microorganismo objetivo en estudios previos, y dos cepas de *E. coli* aisladas de lactantes afectados por cólico (cepa GC6a y GC23a). *E. coli* es un agente etiológico principal de diarrea aguda en niños. Además, se hizo un examen de una cepa de *Salmonella enteritidis*, el principal microorganismo responsable de diarreas de origen bacteriano en niños en Italia (Infante Pina *et al.*, 2008); una cepa de *Clostridium difficile*, un agente etiológico principal de diarrea aguda en niños (Infante Pina *et al.*, 2008); y una cepa de *Campilobacter jejuni*, que es asimismo una causa de diarrea aguda en niños (Infante Pina *et al.*, 2008).

### 3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

Se analizaron los 46 microorganismos para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 11105TM, M85, GC 6a, GC 23a y *S. enteritidis* M94. Se realizó un examen preliminar para determinar la actividad antimicrobiana usando la "prueba de la gota en agar", según el protocolo brevemente resumido en el presente documento.

PRUEBA DE LA GOTA EN AGAR: Se hace uso de un cultivo cultivado durante la noche (o.n., *overnight*) de cada cepa de *Bifidobacterium*, que tenía una absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) de aproximadamente 0,7-1, correspondiente a una fase exponencial completa. Se usa una placa de TPY-agar; se divide la placa en 4 y se inocula cada cuadrante con 10  $\mu$ l del cultivo o.n. de cada cepa. Se incuba la placa 24 h a 37°C en anaerobiosis. Una vez que se ha producido el crecimiento, se cubre la superficie con una capa de 7-8 ml de medio de agar blando para *E. coli* (NB + 0,7% de agar), inoculado con 100  $\mu$ l de un cultivo o.n. de la cepa marcadora. Se incuba la placa en condiciones que permiten el crecimiento de la cepa marcadora. Tras 24-48 horas de incubación, dependiendo de la cepa marcadora usada, puede observarse la presencia de un halo de inhibición alrededor del inóculo de cada cepa de *Bifidobacterium*. Se mide este halo con una regla. Se repite la prueba al menos dos veces. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos (el promedio de dos experimentos). La tabla 1 muestra los halos de inhibición producidos por las 5 cepas marcadoras para sólo 16 de las 46 cepas sometidas a prueba.

Tabla 1

Cepa	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>E. coli</i> M85	<i>E. coli</i> GC 6a	<i>E. coli</i> GC 23a	<i>S. enteritidis</i> M94
B 2274	0,8	0,8	1	1	1,3

B 632	1,2	1,2	0,8	0,9	1,2
B 1975	0,9	0,7	0,7	0,6	1,2
B7840	0,7	0,7	1	0,6	1
B 2091	0,4	0,3	0,6	0,6	0,7
B 2021	0,6	0,6	0,9	0,9	1
B 2150	0,6	0,6	1	0,8	1
B 2195	0,5	0,7	0,9	0,7	1,1
Re 12	0,9	0,6	0,8	0,8	1
B2101	0,9	1	0,9	1	1
B 8452	0,5	0,6	0,1	0,4	0,2
B 2192	0,9	0,7	1	0,7	1,5
B 2055	0,7	0,9	0,3	0,5	0,5
B 7958	0,7	0,7	0,6	0,8	1,1
B 7947	0,7	0,7	0,4	0,3	0,5
B1412	1,2	1,2	1,3	0,9	1

Tal como puede observarse a partir del examen de la tabla 1, este estudio reveló la presencia de cepas con una buena actividad antagonista sobre todo frente a las dos cepas de *E. coli* aisladas de lactantes con cólico y *Salmonella enteritidis*. Sólo se seleccionaron las cepas que presentaron globalmente halos de inhibición de mayor tamaño.

Se valoró entonces la actividad antagonista de las 16 cepas seleccionadas frente a *Clostridium difficile* M216 y *Campilobacter jejuni* LMG8841. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos (el promedio de dos experimentos).

Tabla 2. Tamaño de los halos de inhibición (en cm) producidos por *Clostridium difficile* M216 y *Campilobacter jejuni* LMG8841 para las 16 cepas seleccionadas de *Bifidobacterium*.

Cepa	<i>C. jejuni</i> LMG8841	<i>C. difficile</i> M216
B2091	0,8	0,4
B2274	1	0,5
B2021	1	0,4
B 632	0,8	0,5
B2150	0,8	0,4
B2195	1,2	0,5
B1412	1,1	0,5
Re 12	1,1	0,4
B2101	0,8	0
B1975	0,8	0,5
B8452	0,8	0,4
B2192	1	0,4
B2055	1	0,3
B7958	1,1	0,4
B7947	0,3	0,3
B7840	1,4	0,3

Los resultados obtenidos revelaron una alta actividad inhibidora hacia *C. jejuni* LMG8846 y una actividad más débil (aunque claramente presente en la mayoría de las cepas) frente a *C. difficile* M216.

Se realizó entonces una valoración del poder antimicrobiano del sobrenadante obtenido de cultivos o.n. de los 16 microorganismos seleccionados hacia dos cepas aisladas de lactantes afectados por cólico y hacia *S. enteritidis*. El sobrenadante, que tenía un pH comprendido en el intervalo de 5,5-6,2, se llevó a pH 6,5 antes de que se realizara la prueba. Se realizó el ensayo usando dos métodos brevemente descritos en el presente documento: "ensayo de difusión en pocillos" y "prueba de disco en blanco".

**ENSAYO DE DIFUSIÓN EN POCILLOS:** Se hace uso de un cultivo cultivado durante la noche (o.n.) de cada cepa de *Bifidobacterium*, que tenía una  $A_{600}$  de aproximadamente 0,7-1, correspondiente una fase exponencial completa. Se centrifuga el cultivo a 10.000 rpm durante 10 minutos; vuelve a centrifugarse el sobrenadante a 14.000 rpm durante 15 minutos y vuelve a centrifugarse inmediatamente. Se lleva entonces a pH 6,5 con NaOH 1 N. Se aplica una capa de agar blando inoculado con 500  $\mu$ l de una suspensión de *E. coli*  $10^6$  UFC/ml (o de cualquier otra cepa marcadora usada) sobre una placa. Después de que el agar se haya solidificado, se preparan pocillos con una pipeta Pasteur estéril y se introducen 50-80  $\mu$ l de sobrenadante neutralizado de *Bifidobacterium* spp. en los pocillos. Se incuba la placa o.n. a 37°C en condiciones que permiten el crecimiento de la cepa marcadora (37°C en aerobiosis para *E. coli*).

MÉTODO DE DISCO EN BLANCO: Se llevaron a cabo la centrifugación del cultivo de *Bifidobacterium* y neutralización del sobrenadante como antes. Se hace uso de una placa de agar nutritivo (NA) en el caso de *E. coli* u otros medios si se usan cepas diferentes. Se inoçula la cepa marcadora en la superficie partiendo de una suspensión que tiene una concentración celular de  $10^6$  UFC/ml. Se empapa un disco (previamente esterilizado) que tienen un diámetro de un cm con 0,1 ml de sobrenadante (tanto neutralizado como no neutralizado) y se deja reposar sobre la placa. Se incuba la placa en condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa marcadora. El efecto inhibitor de los microorganismos sobre los microorganismos marcadores tal como revela la prueba de la gota en agar parece deberse principalmente, pero no únicamente, a la producción de metabolitos ácidos que, al reducir el pH del entorno circundante, provocan una inhibición de los patógenos. Sin embargo, parece posible la producción de bacteriocinas.

No obstante, con el fin de caracterizar mejor la actividad antimicrobiana del sobrenadante de los microorganismos usados en este estudio, se realizó una valoración de la cinética de crecimiento de algunas cepas marcadoras (*E. coli* ATCC11105™, *S. enteritidis* M94, *E. coli* GC 6a y *E. coli* GC 23a) en presencia de cantidades conocidas del sobrenadante de cada cepa de *Bifidobacterium*. Se inoçuló la cepa marcadora en el medio de NB (caldo nutritivo) sin adición (esto representa el control) y en presencia de cantidades conocidas de sobrenadante derivado de un cultivo o.n. de *Bifidobacterium* spp. El sobrenadante se usó tanto como tal como después de la neutralización a tres concentraciones diferentes: el 12,5% (v/v), el 25% (v/v) y el 50% (v/v). A intervalos de tiempo definidos, se realizó una medición de  $A_{620}$  de la cepa marcadora, que indica el crecimiento del microorganismo. Se eliminó la concentración de sobrenadante más alta tras los primeros intentos, porque impedía completamente el crecimiento del microorganismo marcador. Los datos obtenidos confirman las conclusiones expuestas anteriormente.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD O RESISTENCIA DE LAS BIFIDOBACTERIAS SELECCIONADAS A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBIDORA MÍNIMA (MIC, MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION)

Las pruebas de resistencia o sensibilidad a antibiòticos es uno de los estudios básicos para evaluar la posibilidad de usar un microorganismo en pruebas *in vivo*. Es importante que el microorganismo sea lo más sensible posible a los antibiòticos principales usados en la terapia con el fin de evitar el riesgo de transmitir resistencia a antibiòticos a otros microorganismos intestinales; por otro lado, a menudo se administran probiòticos junto con una terapia con antibiòticos y, por tanto, la resistencia a antibiòticos se vuelve un requisito fundamental para la coadministración (Ouba *et al*, 2008). En este estudio, se tuvieron en cuenta 10 antibiòticos usados tradicionalmente para evaluar la resistencia a antibiòticos en cepas probiòticas (ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, vancomicina, kanamicina, estreptomocina, trimetoprima, cefuroxima y gentamicina); se sometieron a prueba en un intervalo de concentración de 2-1024 µg/ml. Además, se determinó la MIC de otros tres antibiòticos usados frecuentemente en terapia neonatal (amoxicilina, ceftriaxona y claritromicina), sometidos a prueba a las mismas concentraciones. Se evaluó la MIC analizando el crecimiento de las bifidobacterias seleccionadas en presencia de concentraciones crecientes de antibiòtico; se evaluó el crecimiento midiendo la  $A_{620}$ . Se evaluó la resistencia o sensibilidad a antibiòticos usando las directrices publicadas por la Comisión Europea (Comisión UE, 2002) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2005).

Los resultados obtenidos indican que las cepas seleccionadas muestran resistencia a ampicilina, kanamicina y amoxicilina, mientras que, en general, muchas de las cepas sometidas a prueba mostraron ser sensibles a los otros antibiòticos tenidos en cuenta.

Los resultados obtenidos permitieron la selección de las 4 cepas de *Bifidobacterium* spp., a las cuales se refiere la presente invención, puesto que presentan actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de *E. coli* (bacterias productoras de gases presentes en mayores concentraciones en lactantes que padecen cólico que en lactantes que no lo padecen). Además, dichas cepas muestran una actividad antimicrobiana interesante frente a bacterias que son con la mayor frecuencia la causa de diarrea de origen bacteriano en lactantes (*Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* y *Campilobacter jejunii*) así como resistencia a únicamente un número limitado de antibiòticos. Ninguna de las 4 cepas seleccionadas demostró ser capaz de transferir los genes de la resistencia a antibiòticos a bifidobacterias o lactobacilos, incluso en los casos en los que se identificaron los genes mediante PCR en el ADN cromosómico de las bifidobacterias.

#### 5. MÉTODO PARA SOMETER A PRUEBA LA INHIBICIÓN SOBRE PLACAS

##### Bacteria con acción inhibitora

a. La bacteria cuya actividad inhibitora frente a bacterias fecales se pretende verificar se somete a al menos dos trasplantes secuenciales en medio de caldo MRS (tubos de prueba que contienen 15 ml).

i. Si la bacteria pertenece al género *Bifidobacterium*, el caldo MRS se complementará con clorhidrato de cisteína al 1% (dis. al 5%).

b. Se centrifuga el cultivo de caldo recién preparado (cultivado 22+/- 2 horas) y se lavan las células una vez en agua estéril.

c. Entonces, se centrifugan y resuspenden las células en 5 ml de medio de cultivo MRS recién preparado.

5

## 2. Bacteria fecal sensible

a. La bacteria que va a someterse a inhibición se somete a al menos dos trasplantes secuenciales en medio de caldo MacConkey (tubos de prueba que contienen 10 ml).

10

b. El cultivo de caldo recién preparado se diluye en agua para obtener una densidad óptica de 0,600 - 0,700 a una longitud de onda de 600 nm.

15

c. Se aplican 100 µl de esta suspensión bacteriana sobre una placa de agar MacConkey y se distribuyen uniformemente sobre toda la superficie usando una espátula estéril adecuada hasta que el líquido se haya absorbido completamente.

3. Se coloca un disco de papel de 11 mm de diámetro (disco de antibiograma) sobre la superficie de la placa, que se hace que absorba 100 µl de la suspensión bacteriana de la cepa que va a someterse a prueba (véase la etapa 1-c).

20

4. Se incuba la placa en un termostato a 37°C durante 24 horas. Resultados: si la bacteria inhibe, será visible un halo alrededor del disco que indica que no hay crecimiento. Las dimensiones del halo serán proporcionales a la capacidad de la cepa para producir sustancias con una acción bacteriostática/bactericida que se extiende a través del agar.

25

## 6. PRUEBAS DE INHIBICIÓN SOBRE PLACAS

Para cada probiótico potencialmente inhibidor, se prepara un cultivo y se incuba durante 24 horas en caldo MRS. Entonces, se lavan las células y se resuspenden en medio de cultivo MRS recién preparado. Se extiende uniformemente un cultivo de caldo recién preparado de la bacteria patógena sobre la superficie de placas que contienen el medio con agar, específico para las especies patógenas que se pretenden inhibir, en una cantidad de 100 µl por placa de la primera dilución decimal. Las células así tratadas se adsorben sobre un disco de papel, en una cantidad de 100 µl por disco. Tras incubación a 37°C durante 24 horas, se realiza una medición del halo de inhibición, representado por el área que se extiende entre el borde del disco y el borde de crecimiento del patógeno sometido a prueba.

30

35

Se indican las pruebas de la actividad de inhibición de los seis probióticos frente a los cinco patógenos y se representan a continuación. Los resultados se notifican como halos de inhibición expresados en milímetros.

40 6.1 Para *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, los resultados se proporcionan en la figura 1. La figura 1 muestra:

Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684, 0 mm

45

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878, 0 mm

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva), 0 mm

50

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 5 mm

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01, 2 mm

55

6. *L. pentosus* PCB 101, 4 mm

6.2 Para *Enterococcus sp.* (de heces de lactante), los resultados se proporcionan en la figura 2. La figura 2 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - parte trasera de la placa):

Cepas probióticas, mm:

60

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

65

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

5 6. *L. pentosus* PCB 101

La figura 2 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - interior de la placa):

Cepas probióticas, mm:

10

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

15

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

20

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

6. *L. pentosus* PCB 101

Resultados: Halos de inhibición expresados en milímetros

25 Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684, 3 mm

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878, 3 mm

30

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva), 3 mm

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 5 mm

35

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01, 4 mm

6. *L. pentosus* PCB 101, 2 mm

6.3 Para *Escherichia coli* ATCC 8739, los resultados se proporcionan en la figura 3. La figura 3 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - parte trasera de la placa):

40

Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

45

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

50

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

55

6. *L. pentosus* PCB 101

La figura 3 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - interior de la placa):

Cepas probióticas, mm:

60

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

65

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

6. *L. pentosus* PCB 101

5

Resultados: Halos de inhibición expresados en milímetros

Cepas probióticas, mm:

10

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684, 0 mm

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878, 1 mm

15

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva), 2 mm

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 4 mm

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01, 2 mm

20

6. *L. pentosus* PCB 101, 1 mm

6.4 Para *Escherichia coli* ATCC 35218, los resultados se proporcionan en la figura 4. La figura 4 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - parte trasera de la placa):

25

Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

30

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

35

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

6. *L. pentosus* PCB 101

La figura 4 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - interior de la placa):

40

Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

45

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

50

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

6. *L. pentosus* PCB 101

55

Resultados: Halos de inhibición expresados en milímetros

Cepas probióticas, mm:

60

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684, 4 mm

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878, 2 mm

3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva), 5 mm

65

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 5 mm

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01, 2 mm

6. *L. pentosus* PCB 101, 1 mm

5 6.5 Para *Klebsiella sp* (de heces de lactante), los resultados se proporcionan en la figura 5. La figura 5 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - parte trasera de la placa):

Cepas probióticas, mm:

10 1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

15 3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

20 6. *L. pentosus* PCB 101

La figura 5 muestra (en sentido horario, partiendo de la flecha - interior de la placa):

Cepas probióticas, mm:

25 1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878

30 3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva)

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021

35 5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01

6. *L. pentosus* PCB 101

Resultados: Halos de inhibición expresados en milímetros

40 Cepas probióticas, mm:

1. *L. reuteri* DLLRE08, DSM 25684, 0 mm

2. *L. reuteri* ID 1774 LRE 02, DSM 23878, 2 mm

45 3. *L. reuteri* DSM 17938 (ref. positiva), 2 mm

4. *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 3 mm

50 5. *L. delbr. susp. bulgaricus* LDD01, 1 mm

6. *L. pentosus* PCB 101, 0 mm

## REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve* B2274, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24707; *Bifidobacterium breve* B7840, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24708, que tiene una actividad antimicrobiana frente a los patógenos *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* y *Campilobacter jejunii*.
2. Cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* que es *Bifidobacterium longum subsp. longum* B1975, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24709 que tiene una actividad antimicrobiana frente a los patógenos *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile* y *Campilobacter jejunii*.
3. Cepa bacteriana según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el patógeno *E. coli* consiste en el biotipo *E. coli* O157:H7.
4. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica que comprende una mezcla bacteriana, comprendiendo dicha mezcla bacteriana al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium longum subsp. longum* seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve* B632, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24706; *Bifidobacterium breve* B2274, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24707; *Bifidobacterium breve* B7840, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24708 y *Bifidobacterium longum subsp. longum* B1975, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) en la Institución depositaria DSMZ el 07/04/2011 y que tiene el número de depósito DSM 24709, para su uso en el tratamiento de cólico, diarrea y trastornos intestinales.
5. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica según la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de cólico, diarrea y trastornos intestinales en sujetos en edad pediátrica.
6. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica que comprende una mezcla bacteriana para su uso según las reivindicaciones 4-5, en la que dicha mezcla bacteriana se añade o se suspende o se dispersa en un aceite vegetal seleccionado de entre aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de semillas y aceite de palma; preferiblemente es un aceite de maíz.
7. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 4-6, en la que dicha composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica es una composición simbiótica que comprende al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en esteroides o fitoesteroides, estanoles o fitoestanoles, glucomanano, goma konjac y/o al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende fructo-oligosacáridos -FOS, galacto-oligosacáridos -GOS, xilo-oligosacáridos -XOS, inulina, fibra de alerce o arabinogalactano y/o arroz rojo fermentado y/o betaglucanos de avenas, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y/o gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada.
8. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 4-7, en la que dicha composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica comprende simeticona.
9. Composición alimentaria o producto de complemento o composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 7-8, en la que dicha al menos una sustancia vegetal se selecciona del grupo que comprende galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS) e inulina.

Figura 1

*Listeria monocytogenes* ATCC 19112

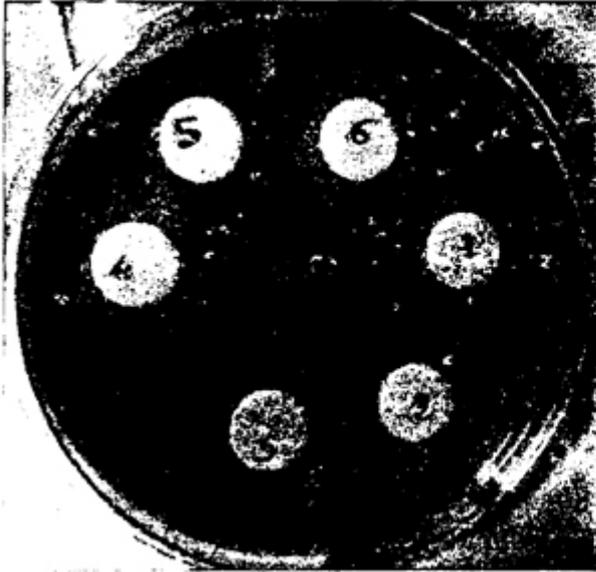
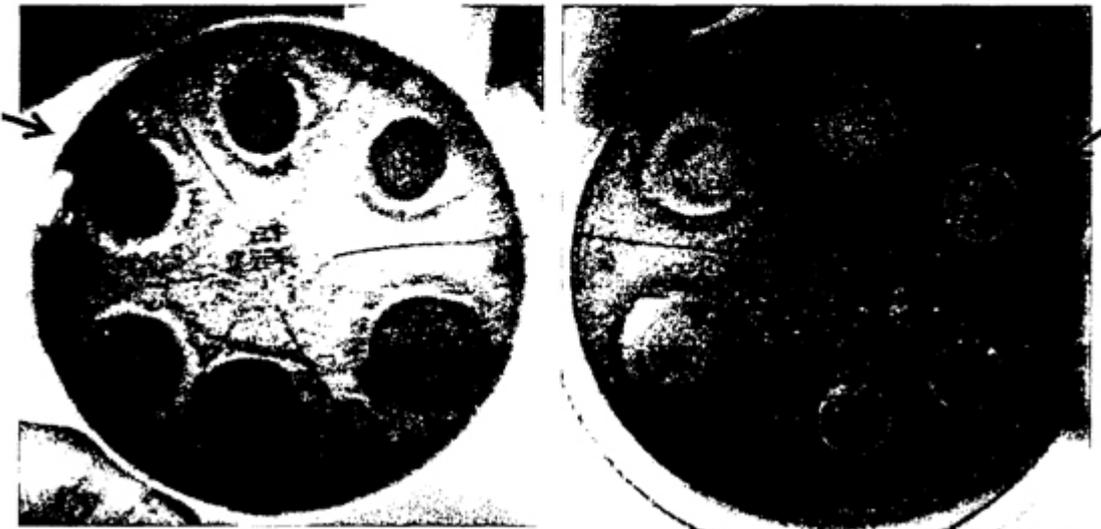


Figura 2

*Enterococcus* sp. (de heces de lactante)

Parte trasera de la placa

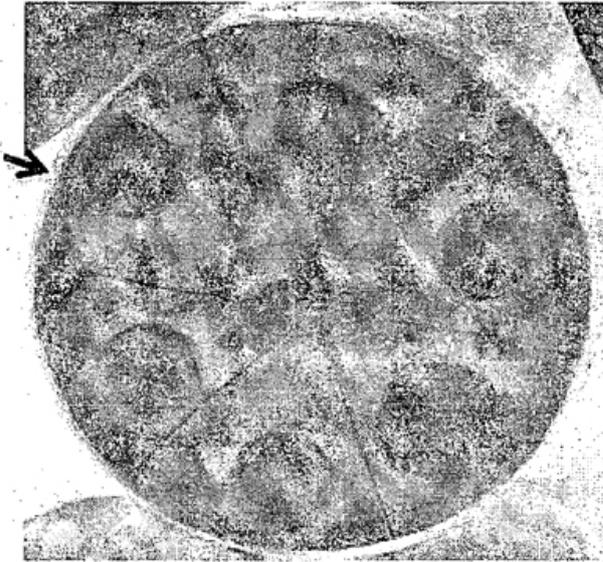
Interior de la placa



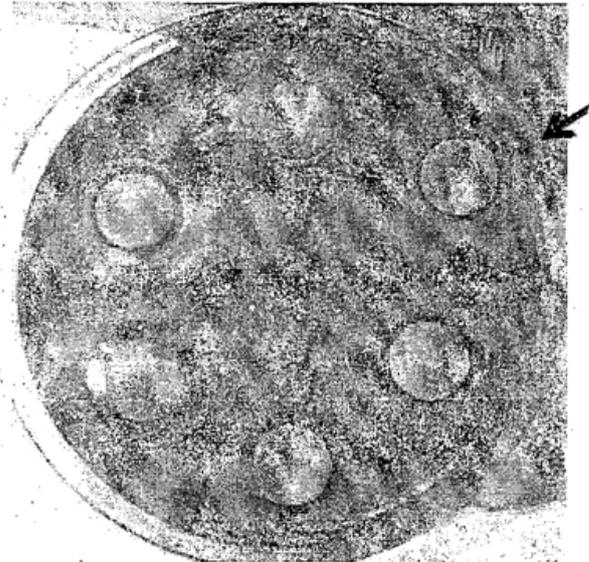
**Figura 3**

*Escherichia coli* ATCC 8739

Parte trasera de la placa



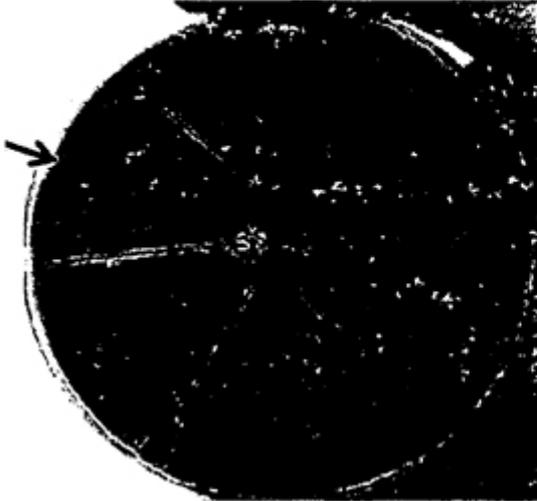
Interior de la placa



**Figura 4**

*Escherichia coli* ATCC 35218

Parte trasera de la placa



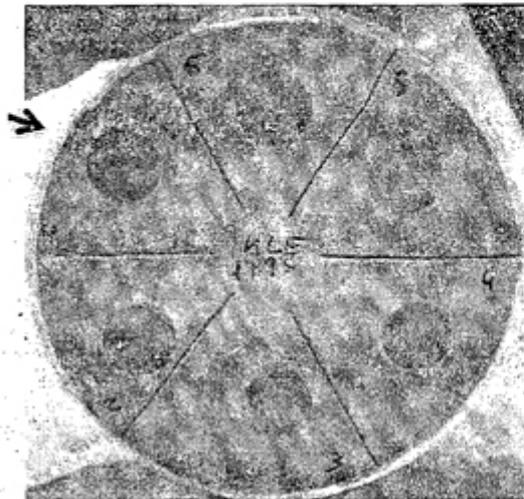
Interior de la placa



**Figura 5**

*Klebsiella* sp. (de heces de lactante)

Parte trasera de la placa



Interior de la placa

