(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 734 204**

(51) Int. CI.:

C12R 1/225 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/NL2014/050890**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093963**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14828344 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3084009**

(54) Título: **Lactobacillus salivarius para el tratamiento de la mastitis**

(30) Prioridad:

19.12.2013 WO PCT/NL2013/050924

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2019

(73) Titular/es:

N.V. NUTRICIA (100.0%)
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL

(72) Inventor/es:

MARTIN, ROCIO;
KNOL, JAN;
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, LEONIDES;
ESPINOSA MARTOS, IRENE;
JIMÉNEZ QUINTANA, ESTHER ANTONIA y
RODRÍGUEZ GÓMEZ, JUAN MIGUEL

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus salivarius para el tratamiento de la mastitis

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención pertenece al campo de la terapia para la mastitis, en particular basada en probióticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La mastitis es una inflamación o infección del tejido mamario o de la ubre, y se puede clasificar como mastitis puerperal y no puerperal. La mastitis puerperal está asociada con el embarazo, la lactancia materna o el destete, y se presenta con frecuencia en mamíferos lactantes, tanto en animales como en humanos. La mastitis no puerperal no tiene relación con la lactancia, pero tiene síntomas muy similares y puede ocurrir, por ejemplo, después de la perforación del pezón. Se estima que hasta el 33% de las mujeres lactantes padecen mastitis. Aunque la mastitis puede aparecer en cualquier momento durante la lactancia, los casos se dan principalmente durante la segunda y tercera semana después del parto. La mayoría de las mastitis son causadas por infecciones de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus* y *S. epidermidis.* El tratamiento a menudo conlleva la administración de antibióticos. La mastitis es altamente indeseable, ya que la composición de la leche materna se altera durante la mastitis, por ejemplo, hay un mayor contenido de sodio y mediadores inflamatorios, que pueden interferir con la nutrición óptima que la leche materna proporciona al bebé. Además, durante la mastitis, la continuación de la lactancia materna puede no ser posible o la madre puede no desearla. Arroyo et al. (2010, CID 50 (12), p1551-1558) describe el uso de una cepa bacteriana de *Lactobacillus salivarius* CECT5713 para el tratamiento de la mastitis.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0003] Ahora se ha descubierto sorprendentemente que una cepa de *Lactobacillus salivarius* designada como PS2 o una composición que comprende *Lactobacillus salivarius* PS2 reduce de manera eficaz la mastitis y/o los síntomas asociados con la mastitis. La cepa de *Lactobacillus salivarius* PS2 se ha depositado y se le ha asignado el número de acceso LMG P-27027.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0004] La invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus salivarius,* a composiciones que comprenden esta nueva cepa y a un uso para el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre, en particular la mastitis.

[0005] En un primer aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus salivarius,* con número de acceso LMG P-27027.

[0006] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus salivarius* según la invención y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Preferiblemente, la composición comprende de 10^8 a 10^{10} ufc de *Lactobacillus salivarius* por gramo de materia seca. Preferiblemente, la composición comprende además al menos uno seleccionado del grupo de oligosacáridos no digeribles, LC-PUFA, otros probióticos y micronutrientes. Preferiblemente, la composición es un polvo.

[0007] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus salivarius* según la invención para su uso como medicamento.

[0008] En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a la composición según la invención para su uso como medicamento.

[0009] En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus salivarius* según la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero. Preferiblemente, la inflamación y/o infección del tejido mamario o de la ubre es mastitis. Preferiblemente, el mamífero es una hembra humana. Preferiblemente, la cepa de *Lactobacillus salivarius* según la invención se administra más de una vez al día, más preferiblemente dos o tres veces al día, de la manera más preferible tres veces al día, en una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por dosis.

[0010] En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición según la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero.

Preferiblemente, la inflamación y/o infección del tejido mamario o de la ubre es mastitis. Preferiblemente, el mamífero es una hembra humana. En una forma de realización, la hembra humana está en riesgo, en particular tiene un alto riesgo de desarrollar mastitis, y la composición según la invención es para la prevención de la mastitis en una hembra humana que esté en riesgo, en particular que tenga un alto riesgo, de desarrollar mastitis. De manera idónea, la hembra humana ha sufrido previamente inflamación y/o infección en el tejido mamario o de la ubre, en particular mastitis. Preferiblemente, la composición según la invención se administra más de una vez al día, más preferiblemente dos o tres veces al día, más preferiblemente tres veces al día, en una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por dosis. Preferiblemente, la composición comprende además al menos uno seleccionado del grupo de oligosacáridos no digeribles, LC-PUFA, probióticos adicionales y micronutrientes.

Lactobacillus salivarius

[0011] La cepa de *Lactobacillus salivarius* según la invención se conoce como *Lactobacillus salivarius* PS2 o *L. salivarius* PS2. *L. salivarius* PS2 ha sido depositada por Danone Research BV, Bosrandweg 20, 6704 PH Wageningen, Países Bajos, de conformidad con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes en el BCCM/LMG (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)), Universidad de Gante, KL Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, Bélgica) el 23 de mayo de 2012. A *L. salivarius* PS2 se le ha dado el número de acceso BCCM/LMG LMG P-27027. La depositante, Danone Research BV, ha autorizado a la solicitante a hacer referencia al material biológico depositado en esta solicitud de patente. En lo sucesivo también se hace referencia a *L. salivarius* PS2 como *Lactobacillus salivarius* LMG P-27027, o *L. salivarius* LMG P-27027.

Composición

[0012] Preferiblemente, la presente cepa de *L. salivarius* está comprendida en una composición, tal como una composición nutricional, un suplemento nutricional, una composición farmacéutica o una composición nutricéutica, preferiblemente una composición nutricional o un suplemento nutricional. Preferiblemente, la presente composición comprende la cepa de *L. salivarius* y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable y/o ingredientes adicionales como se describe más adelante. Preferiblemente, la cepa de *L. salivarius* según la invención está presente en forma liofilizada.

[0013] La composición según la invención comprende preferiblemente de 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc) de la presente cepa de *L. salivarius* por gramo de materia seca de la composición, preferiblemente de 10^4 a 10^{12}, más preferiblemente de 10^5 a 10^{11}, más preferiblemente de 10^5 a 10^{10} UFC de *L. salivarius* por gramo de materia seca de la composición. La cepa de *L. salivarius* según la invención se administra preferiblemente en una dosis diaria de 10^2 a 10^{13}, más preferiblemente de 10^5 a 10^{12}, más preferiblemente de 10^8 a 5×10^{10}, más preferiblemente de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc). La composición según la invención puede comprender *L. salivarius* viables y/o no viables según la invención, preferiblemente *L. salivarius* viables según la invención.

[0014] La presente composición que comprende la cepa de *L. salivarius* puede estar en cualquier forma conocida en la técnica, tal como en forma sólida, en forma semisólida o en forma líquida. Preferiblemente, la composición es una composición nutricional o un suplemento nutricional, preferiblemente en forma de polvo, cápsula o comprimido, de la manera más preferible un suplemento nutricional. Las composiciones nutricionales adecuadas incluyen cualquier bebida o producto alimenticio, tal como una bebida, una bebida a base de leche, un yogur, un producto lácteo, un producto de cereal, un producto de soja, un producto de fruta, un producto vegetal, un producto cárnico o combinaciones de los mismos, por ejemplo una comida completa. En una forma de realización preferida, la composición es un suplemento nutricional en forma de polvo, cápsula o comprimido, más preferiblemente en forma de polvo. Preferiblemente, la composición comprende la cepa de *L. salivarius* en forma liofilizada, lo cual es especialmente adecuado cuando la composición está en forma de polvo, cápsula o comprimido. La presente cepa o la presente composición pueden estar contenidas dentro de un envase, preferiblemente una barra o un *stick pack* o un sobre. Preferiblemente, la presente composición, cuando está en forma de polvo, cápsula o comprimido, especialmente cuando está en forma de polvo, está destinada a añadirse a una bebida o producto alimenticio antes de la ingestión. Preferiblemente, la presente composición, cuando está en forma de polvo, cápsula o comprimido, especialmente cuando está en forma de polvo, va acompañada de instrucciones para agregar la composición a una bebida o producto alimenticio antes de la ingestión. La bebida o el producto alimenticio al que se añade la presente composición puede ser cualquier bebida o producto alimenticio, como una bebida, una bebida a base de leche, un yogur, un producto lácteo, un producto de cereal, un producto de soja, un producto de fruta, un producto vegetal, un producto cárnico o combinaciones de los mismos, por ejemplo, una comida completa.

Otros componentes

[0015] La cepa de *L. salivarius* según la invención está presente preferiblemente en una composición, que puede comprender un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable y/o ingredientes adicionales. Se puede usar cualquier excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable como se conoce en la técnica. Los excipientes o vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, maltodextrina, almidón (resistente), celulosa o derivados de celulosa, por ejemplo metilcelulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares.

[0016] Preferiblemente, se incluyen ingredientes adicionales que son beneficiosos para las mujeres lactantes, más preferiblemente ingredientes que son beneficiosos para el sistema inmunitario y/o que fortalecen el sistema inmunitario. Esos ingredientes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, fibra alimentaria y oligosacáridos no digeribles, LC-PUFA y micronutrientes (por ejemplo, vitaminas y minerales). También se pueden incluir macronutrientes (por ejemplo, lípidos, proteínas, carbohidratos digeribles) en la composición según la invención.

Oligosacárido no digerible

[0017] La presente cepa está presente preferiblemente en una composición que también comprende oligosacáridos no digeribles. El término "no digerible" como se usa en la presente invención se refiere a sacáridos que no se digieren en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tubo digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que son fermentados por la flora intestinal humana. Los mono y disacáridos como la glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa y lactosa son digeribles.

[0018] Preferiblemente, la presente composición comprende oligosacáridos no digeribles con un grado de polimerización (GP) de 2 a 250, más preferiblemente de 3 a 60. Preferiblemente, los oligosacáridos no digeribles comprenden al menos un oligosacárido seleccionado del grupo de fructooligosacáridos (tales como inulina), galacto-oligosacáridos (como los transgalacto-oligosacáridos o beta-galacto-oligosacáridos), gluco-oligosacáridos (como gentio-, nigero- y ciclodextrina-oligosacáridos), arabino-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, glucomano-oligosacáridos, galactomano-oligosacáridos, oligosacáridos del ácido siálico y oligosacáridos del ácido urónico, seleccionado más preferiblemente del grupo de los fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y oligosacáridos de ácido urónico, seleccionado más preferiblemente del grupo de los fructo-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos. Preferiblemente, la composición comprende galacto-oligosacáridos, más preferiblemente transgalacto-oligosacáridos. En una forma de realización preferida, la composición comprende una mezcla de galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos.

[0019] Los galacto-oligosacáridos tienen preferiblemente un GP de 2 a 10. Preferiblemente, los galacto-oligosacáridos tienen un GP medio inferior a 6. El galacto-oligosacárido se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en transgalacto-oligosacáridos, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (neo-LNT), fucosil-lactosa, LNT fucosilada y neo-LNT fucosilada. Los transgalacto-oligosacáridos (TOS) se venden, por ejemplo, bajo la marca registrada Vivinal ™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos). Preferiblemente, los sacáridos de los transgalactooligosacáridos están unidos por enlaces β. El fructooligosacárido tiene preferiblemente un GP de 2 a 250, más preferiblemente de 2 a 100, de la manera más preferible de 5 a 60. Preferiblemente, los fructooligosacáridos tienen un GP promedio de más de 10. Los fructooligosacáridos incluyen inulina, levano y/o un tipo mixto de polifructano. Un fructooligosacárido especialmente preferido es la inulina. El fructooligosacárido adecuado para su uso en las composiciones está disponible comercialmente, por ejemplo como Raftiline®HP (Orafti). Preferiblemente, la presente composición comprende galactooligosacáridos y fructooligosacáridos en una relación en peso de galactooligosacáridos a fructooligosacáridos de 99:1 a 1:99, más preferiblemente de 20:1 a 1:1, más preferiblemente de 12:1 a 7:1.

[0020] En otra forma de realización preferida, la composición comprende una mezcla de fructooligosacáridos de cadena corta y de cadena larga. Preferiblemente, una mezcla de fructooligosacáridos con un GP promedio inferior a 10 y fructooligosacáridos con un GP promedio superior a 10. Un fructooligosacárido con un GP promedio inferior a 10 adecuado para su uso en las composiciones está disponible comercialmente, por ejemplo como Raftilose®. Un fructooligosacárido con un GP promedio superior a 10 adecuado para su uso en las composiciones está disponible comercialmente, por ejemplo como Raftiline®HP. Preferiblemente, la presente composición comprende fructooligosacáridos con un GP promedio inferior a 10 y fructooligosacáridos con un GP promedio superior a 10 en una relación en peso de 20:1 a 1:20, más preferiblemente de 10:1 a 1:10, más preferiblemente de 5:1 a 1:5 o en una proporción de aproximadamente 1:1.

[0021] Preferiblemente, la composición comprende del 0,25% en peso al 50% en peso de oligosacáridos no digeribles, más preferiblemente del 0,5% en peso al 30% en peso, incluso más preferiblemente del 1,0% en peso al 20% en peso de oligosacáridos no digeribles en base a la materia seca. Cuando está en forma líquida, la composición comprende preferiblemente de 50 mg a 5 g de oligosacáridos no digeribles por 100 ml, más preferiblemente de 250 mg a 2 g, incluso más preferiblemente de 500 mg a 1 g por 100 ml. Expresado en términos de dosificación, el contenido de

oligosacáridos no digeribles es preferiblemente de 0,1 a 50 g al día, más preferiblemente de 1 a 35 g al día, incluso más preferiblemente de 5 a 25 g al día, de la manera más preferible de 10 a 20 g al día.

Acidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA)

[0022] Preferiblemente, la presente composición comprende adicionalmente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y/o cadenas de acilos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). El término LC-PUFA en la presente invención se refiere a una cadena de ácidos grasos o acilos grasos con una longitud de 20 átomos de carbono o más y al menos dos enlaces insaturados. Preferiblemente, la composición comprende un LC-PUFA seleccionado del grupo que consiste en cadena de acilo y/o ácidos eicosapentaenoicos (EPA), cadena de acilo y/o ácido docosahexaenoico (DHA) y cadena de acilo y/o ácido araquidónico (AA). En una forma de realización, la composición comprende DHA. En otra forma de realización, la composición comprende EPA. Más preferiblemente, la composición comprende DHA y EPA. Los LC-PUFA fortalecen ventajosamente el sistema inmunitario. Por lo tanto, la administración de una composición que comprende tanto fibra alimentaria como LC-PUFA a mujeres en período de lactancia tendrá un efecto mejorado en el sistema inmunitario.

[0023] Preferiblemente, la composición comprende de 50 a 3000 mg de LC-PUFA por dosis diaria, más preferiblemente de 100 a 1500 mg, de la manera más preferible de 200 a 700 mg.

Micronutrientes

[0024] Preferiblemente, la presente cepa está presente en una composición que comprende además micronutrientes, más preferiblemente vitaminas y minerales. Los micronutrientes preferidos son aquellos que son beneficiosos para las mujeres lactantes, en particular aquellos que son beneficiosos para el sistema inmunitario y/o que fortalecen el sistema inmunitario. Esos ingredientes son ampliamente conocidos en la técnica y generalmente se incluyen en suplementos destinados a mujeres lactantes o madres jóvenes. La inclusión de vitaminas y minerales en la presente composición reduce convenientemente la cantidad de composiciones o suplementos que deben tomar las mujeres lactantes.

[0025] Las vitaminas preferidas son las vitaminas solubles en agua; vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina), ácido fólico, vitamina B12 (cianocobalamina), biotina, colina y vitamina C, y vitaminas solubles en grasa; vitamina D3, vitamina E y vitamina K. Las vitaminas más preferidas son el ácido fólico, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la vitamina B12, la colina y la vitamina C.

[0026] Los minerales preferidos son calcio, fósforo, zinc, yodo, hierro, manganeso, selenio, cobre y magnesio. Los minerales más preferidos son calcio, yodo, zinc y hierro.

Otros probióticos

[0027] La composición según la invención puede comprender probióticos adicionales, aparte de la presente cepa de *L. salivarius* como se ha descrito anteriormente.

[0028] Los probióticos de la presente invención se refieren a microorganismos que, tras su administración, ejercen un efecto beneficioso sobre el hospedador. Los probióticos tienen efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario de las mujeres lactantes, por lo que la combinación con probióticos tendrá un efecto superior sobre el sistema inmunitario. Preferiblemente, los probióticos se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium.* Más preferiblemente, el probiótico se selecciona del grupo que consiste en el grupo *Lactobacillus accidophilus*, *L. rhamnosus, L. casei, L. paracasei, L. plantarum, L. reuteri, L. fermentum, Bifidobacterium infantis, B. animalis subsp. lactis, B. breve, B. longum* y *B. bifidum.* Preferiblemente, los probióticos están presentes en una dosis diaria de $1x10^6$ unidades formadoras de colonias (ufc) a $1x10^{13}$ ufc, más preferiblemente $1x10^7$ a $1x10^{11}$, de la manera más preferible $1x10^8$ a $1x10^{10}$ de cada probiótico individual.

[0029] En una forma de realización preferida, la composición solo comprende una única cepa activa para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis, es decir, la cepa de *L. salivarius* según la invención. En una forma de realización, la composición no comprende una cepa de *Lactobacillus gasseri.*

Macronutrientes

[0030] La presente composición también puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres macronutrientes seleccionados de proteínas, grasas y carbohidratos digeribles. Esto es especialmente preferido en el caso de que la cepa según la invención esté comprendida en una composición nutricional.

En una forma de realización ventajosa, las presentes composiciones nutricionales comprenden al menos una seleccionada del grupo de oligosacáridos no digeribles, LC-PUFA, probióticos y micronutrientes adicionales, como se ha descrito anteriormente.

Solicitud

[0031] La presente cepa y/o composición es adecuada como medicamento, en particular para el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero, más en particular para el tratamiento y/o prevención de la mastitis y/o de los síntomas asociados con la mastitis. Preferiblemente, la presente cepa y/o composición es particularmente adecuada para el tratamiento de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero, especialmente para el tratamiento de mastitis y/o los síntomas asociados con la mastitis. En una forma de realización, preferiblemente la presente cepa y/o composición es particularmente adecuada para la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero, especialmente para la prevención de la mastitis y/o los síntomas asociados con la mastitis. En el contexto de la presente invención, "prevención" también puede expresarse como "reducción del riesgo de aparición". Como se usa en el presente documento, la frase "tratamiento y/o prevención de la mastitis y/o la mastalgia y de otros síntomas asociados con la mastitis" (y similares) incluye reducir la cantidad de tiempo durante la cual una persona padece mastitis, reducir el nivel de dolor experimentado por la persona que padece la mastitis, reducir el tiempo de recuperación de la persona que padece la mastitis, reducir el tiempo durante el que la persona deja de amamantar a su bebé debido a la mastitis, lo que reduce el riesgo de que la persona elija dejar de amamantar debido a la mastitis, prolongar el tiempo durante el que la persona amamanta a su bebé y/o reducir el riesgo de que la persona deje de amamantar a su bebé debido a la mastitis.

[0032] La mastitis que se vaya a tratar y/o prevenir puede ser puerperal o no puerperal, preferiblemente la mastitis es puerperal. Los síntomas asociados con la mastitis incluyen mastalgia (local), enrojecimiento, hinchazón, congestión mamaria y calor en la(s) mama(s), estasis de la leche, fiebre, síntomas gripales y el desarrollo de abscesos mamarios. La presente cepa y/o composición puede administrarse a una mujer que padezca mastitis o a una mujer que esté en riesgo, preferiblemente en alto riesgo, de desarrollar mastitis. Las mujeres con alto riesgo de desarrollar mastitis incluyen, entre otras, mujeres que estén amamantando o tengan la intención de comenzar a amamantar y que tengan pezones adoloridos o agrietados, que hayan sufrido mastitis anteriormente (por ejemplo, cuando amamantaban a otro bebé), que estén amamantando a intervalos irregulares, que estén tomando o que hayan tomado antibióticos recientemente (para otras infecciones), que padezcan diabetes, enfermedades crónicas, infección por VIH, SIDA o que tengan un sistema inmunitario debilitado. En una forma de realización, la presente cepa y/o composición se administrará a mujeres que hayan padecido mastitis anteriormente. En el contexto de la presente invención, "mujeres" y "hembras humanas" se usan indistintamente.

[0033] La presente cepa y/o composición puede administrarse a una mujer que vaya a comenzar a amamantar en unas pocas semanas (por ejemplo, cuatro semanas antes del inicio planificado de la lactancia), que esté en período de lactancia o que haya dejado de amamantar recientemente. Particularmente, se prefiere administrar la presente cepa y/o composición siempre que los síntomas de la mastitis se prolonguen o, más preferiblemente, mientras continúe la lactancia. En algunas formas de realización, la presente cepa y/o composición pueden administrarse a una mujer en el último trimestre del embarazo (es decir, antes de que comience a amamantar a su bebé), en las primeras semanas después del parto, o durante el tiempo que continúe la lactancia. De manera adecuada, la presente cepa y/o composición puede administrarse a una mujer desde la semana 29 de su embarazo, desde la semana 30, desde la semana 31, desde la semana 32, desde la semana 32, desde la semana 33, desde la semana 34, desde la semana 35 , desde la semana 36, desde la semana 37, desde la semana 38, desde la semana 39, desde la semana 40, desde la semana 41, desde la semana 42, desde el nacimiento, o desde cualquier momento después del parto mientras continúe la lactancia antes o después de la aparición de cualquier síntoma de mastitis, en adelante.

Modo de administración

[0034] La composición utilizada en el presente método se administra preferiblemente por vía enteral, más preferiblemente por vía oral. La composición según la invención puede administrarse en una sola dosis diaria o múltiples dosis al día, tal como al menos 2 dosis al día, al menos 3 dosis al día, al menos 4 dosis al día. Preferiblemente, la composición según la invención se administra más de una vez al día. En una forma de realización especialmente preferida, la composición según la invención se administra en 2 o 3 dosis al día, más preferiblemente en 3 dosis al día. En una forma de realización preferida, la composición según la invención es una composición nutricional o un suplemento nutricional. El suplemento según la invención puede estar en forma de un polvo, un comprimido (incluyendo un comprimido masticable) o una cápsula. La composición nutricional según la invención puede ser cualquier producto alimenticio o bebida. Preferiblemente, la composición, especialmente el suplemento nutricional, según la invención comprende además un excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable. En una forma de realización preferida, la

composición o el suplemento es un polvo envasado en un recipiente (preferiblemente un sobre) que comprende de 1 a 10 g, más preferiblemente de 1,5 a 7 g, de la manera más preferible de 2 a 5 g. Preferiblemente, cada envase contiene una sola dosis.

[0035] Preferiblemente, la composición nutricional es un líquido a base de leche, que comprende grasas, proteínas y carbohidratos digeribles. Preferiblemente, este líquido a base de leche se envasa en una botella o tetrapack con un volumen de 50 a 1000 ml, más preferiblemente de 60 a 500, de la manera más preferible de 75 a 125 ml.

[0036] Preferiblemente, la composición es un polvo, envasado en un recipiente, preferiblemente un sobre, que comprende de 1 a 10 g, más preferiblemente de 1,5 a 7 g, de la manera más preferible de 2 a 5 g.

[0037] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que haya más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “una” generalmente significa "al menos uno/a”.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0038]

La Figura 1 muestra los análisis con RAPD de 18 cepas diferentes de *Lactobacillus salivarius.* Los carriles corresponden a: (1) ZH17-05; (2) CELA-2; (3) PS2; (4) CECT 5713; (5) CTC 2197; (6) FI 9810; (7) FI 9789; (8) CECT 4062; (9) CECT 4063; (10) V3-III-1; (11) V4-II-90; (12) V7-II-1; (13) V7-II-62; (14) V7-IV-1; (15) V7-IV-60; (16) V8-III-62; (17) V11-1-60; (18) V11-III-60; (L) HyperLadder ™ II (50 pb - 2000 pb) (Bioline).
La Figura 2 muestra diagramas de caja de recuentos bacterianos totales de muestras de leche materna, obtenidas en el ensayo clínico del Ejemplo 2, el día 0, el día 7 y el día 14; figura 2a = grupo de tratamiento 1, figura 2b = grupo de tratamiento 2, figura 2c = grupo de tratamiento 3, figura 2d = grupo de referencia.
La Figura 3 muestra diagramas de caja de las puntuaciones de dolor, obtenidas en el ensayo clínico del ejemplo 2, en el día 0 (figura 3a) y en el día 14 (figura 3b).

EJEMPLOS

Ejemplo 1*: Análisis con ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)*

[0039] Un total de 28 cepas de *Lactobacillus salivarius* se sometieron a un análisis con ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Los perfiles de RAPD se obtuvieron utilizando el cebador OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3 ') (Veyrat, A., Miralles, M. C. y Perez-Martinez, G. A. en J. Appl. Microbiol. 1999, 87: 49-61.). El análisis asistido por ordenador se realizó con el software InfoQuest FP (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

[0040] Las 28 cepas analizadas incluyeron once cepas aisladas a partir de leche humana (PS2; HN6; FN 74 M1; LA 105 Te-1; WN 70 M1; AP 141 Me-2; AP 141 Me-11; TM 142 M1; TA 143 Ma- 1; TA 143 Te-1; MV 144 M1), una cepa aislada a partir de heces infantiles (ZH17-05), una cepa aislada a partir de leche porcina (CELA-2), una cepa aislada a partir de aves de corral (CTC 2197), diez cepas obtenidas de exudados vaginales humanos (V3-III-1; V4-II-90; V7-II-1; V7-II-62; V7-IV-1; V7-IV-60; V8-III-62; V11-I -60; V11-III-60; V11-IV-60), cinco cepas procedentes de colecciones conocidas (FI 9810; FI 9789; CECT 4062; CECT 4063; CECT 5713).

[0041] El análisis reveló que el perfil de RAPD de *Lactobacillus salivarius* PS2 (carril 3) era diferente de los de las otras cepas estudiadas en este caso, véase la figura 1 para una comparación seleccionada (no se muestran otros perfiles de RPAD).

[0042] Arroyo et al. en Clin. Infect. Dis. 2010, 50 (12), 1551-1558, describe el uso de una cepa bacteriana de *Lactobacillus salivarius* CECT5713 para el tratamiento de la mastitis. La cepa de *Lactobacillus salivarius* PS2 que es el objeto de la presente invención demostró aquí tener un perfil de RAPD diferente a la cepa CECT5713, y también tener propiedades mejoradas en comparación con la cepa CECT5713, como el aumento de la estabilidad y la ausencia de profagos en su genoma (Langa et al. en apl. Microbiol. Biotecnol. 2012, 94, 1279-87).

Ejemplo 2*: Ensayo clínico I - Tratamiento de la mastitis*

[0043] Métodos: Se realizó un estudio abierto con un total de 108 mujeres lactantes con síntomas de mastitis. Todas cumplían con los siguientes criterios: inflamación de las mamas, amamantamiento doloroso, recuento de bacterias en la leche> 1×10^4 ufc/mL. Las mujeres lactantes recibieron 1 (grupo de tratamiento 1, n = 25), 2 (grupo de tratamiento 2, n = 25) o 3 (grupo de tratamiento 3, n = 25) cápsulas que contenían un suplemento probiótico liofilizado que comprendía 1×10^9 ufc de *L. salivarius* PS2 por g al día durante 14 días. El grupo de referencia (n = 33) recibió tratamiento con antibióticos durante 14 días según lo prescrito en sus centros de atención primaria. Ninguna de las mujeres ingirió alimentos o suplementos comerciales probióticos durante el estudio. Se excluyeron las mujeres con abscesos mamarios, síndrome de Raynaud o cualquier otra patología mamaria.

[0044] Se tomaron muestras de leche materna antes de comenzar la suplementación o el tratamiento (día 0) y cada semana hasta el final del estudio (día 7 y día 14). La evolución de los síntomas la evaluaron las matronas de sus centros de atención primaria en los mismos puntos temporales; se pidió a las voluntarias que puntuaran el dolor en las mamas de 0 (dolor extremo) a 10 (sin dolor).

[0045] El recuento de bacterias se midió en las muestras de leche de la siguiente manera. Las muestras se diseminaron en placas de agar de dextrosa con clorafenicol Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey y Sabouraud para el aislamiento selectivo y la cuantificación de los principales agentes involucrados en la mastitis infecciosa y, paralelamente, en placas de agar de MRS (Oxoid) suplementadas con L-cisteína (0,5 g/L) (MRS-Cys) para el aislamiento de lactobacilos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en condiciones aeróbicas, a excepción de las placas MRS-Cys, que se incubaron anaeróbicamente.

[0046] Las bacterias aisladas de la leche se identificaron inicialmente a nivel de especie mediante pruebas morfológicas y bioquímicas clásicas. La identificación de bacterias pertenecientes a la especie *S. epidermidis* o *S. aureus* se confirmó mediante un método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) multiplex basado en genes *dnaJ.* La identificación de los estreptococos se realizó mediante amplificación parcial y secuenciación del gen *tuf.* Los aislamientos restantes se identificaron mediante secuenciación de ARNr 16S. Su identidad se determinó sobre la base de las puntuaciones más altas (> 99%) entre las secuencias depositadas en la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular.

[0047] La identificación de *L. salivarius* PS2 en las muestras de leche se realizó mediante un ensayo de hibridación de colonias ADN-ADN. Para este propósito, se diseñaron 2 sondas específicas de especies en función de secuencias de ARNr 16S únicas. Las colonias obtenidas en placas de MRS-Cys a partir de muestras de leche (día 14) se observaron en una matriz regular en 2 conjuntos de placas de réplica de MRS-Cys. Luego, se colocaron discos de nylon Hybond-N + (GE Healthcare) directamente sobre las superficies de cultivo y se mantuvieron ahí durante 1 minuto. Tanto la hibridación como la detección se realizaron como se ha descrito anteriormente (Jiménez et al. en apl. Environ. Microbiol. 2008, 74: 4650-4655). La identidad de los aislados que dieron una señal positiva después de la hibridación de colonias se confirmó mediante la secuenciación del ARNr 16S como se ha descrito anteriormente y se sometieron a un genotipado de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) como se ha descrito anteriormente (Jiménez *et al.* 2008). Sus perfiles se compararon con los de *L. salivarius* CECT4062 *L. salivarius* CECT4063, *L. salivarius* DSM 20492 y *L. salivarius* CECT5713.

[0048] Análisis estadístico: Los datos microbiológicos, registrados como número de ufc por ml de leche, se transformaron en valores logarítmicos antes del análisis estadístico. Los valores recogidos de recuentos de bacterias son los valores medios de las determinaciones por duplicado o triplicado. Las variables continuas "recuentos de bacterias" y "puntuación de mastalgia" no se distribuyeron normalmente. Se realizaron pruebas de Mann Whitney para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos bacterianos (especies bacterianas totales y principales) y entre las puntuaciones de mastalgia en diferentes puntos temporales del ensayo.

[0049] Recuentos bacterianos en las muestras de leche: en el día 0, los valores medios del recuento total de bacterias en la leche fueron muy similares en los 4 grupos y variaron de 8,5 a $1,2 \times 10^4$ ufc/mL (Tabla 1). En el día 7, los valores medios de los recuentos bacterianos totales en los grupos de tratamiento 2 y 3, que recibieron 2 o 3 dosis al día, fueron significativamente más bajos ($p < 0,001$) que el valor correspondiente en el grupo de tratamiento 1, que recibió una dosis al día. Este parámetro no se analizó en el grupo de referencia a los 7 días. En el día 14, los valores medios de los recuentos bacterianos totales en el grupo de referencia tendieron a ser significativamente más bajos que en el grupo de tratamiento 1. Sin embargo, los grupos de tratamiento 2 y 3 tuvieron valores medios significativamente más bajos del recuento total de bacterias que el grupo de referencia, véase la Tabla 1 y la Figura 2.

Tabla 1: Recuentos bacterianos totales (RBT) medios en los grupos de tratamiento y de referencia.

	RBT en 10^3 ufc/mL (desviación estándar)		
	día 0	día 7	día 14
grupo de tratamiento 1	97,5 (8,0)	74,3 (11,5)	49,8 (16,1)
grupo de tratamiento 2	99,0 (4,1)	38,4 (12,8)	15,9 (7,7)

grupo de tratamiento 3	97,7 (4,8)	8,2 (7,5)	2,1 (2,3)
grupo de referencia	98,6 (8,0)	n.d,	40,1 (34,0)
n.d. = no determinado			

[0050] Evolución de los síntomas clínicos.: La puntuación media de mastalgia indicada por las mujeres fue similar en el día 0 en los 4 grupos, con un rango de 0 a 3, véase la Tabla 2 y la Figura 3a. En el día 14, la puntuación de mastalgia había mejorado en la mayoría de los participantes. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las puntuaciones de mastalgia en el grupo de tratamiento 2 y 3, que recbieron 2 y 3 dosis al día (puntuación media de 6,5 y 8,2 respectivamente) y la puntuación de mastalgia en el grupo de tratamiento 1 (puntuación media de 4,08 y 5,03, respectivamente) en el día 14, consulte la Tabla 2 y la Figura 3b.

Tabla 2: Puntuaciones medias de mastalgia (BPS) en los grupos de tratamiento y de referencia.

	BPS (desviación estándar)		
	día 0	día 7	día 14
grupo de tratamiento 1	1,2 (0,8)	2,9 (0,9)	4,8 (1,1)
grupo de tratamiento 2	1,1 (0,7)	4,8 (1,1)	6,5 (0,9)
grupo de tratamiento 3	1,0 (0,8)	6,8 (1,4)	8,2 (1,2)
grupo de referencia	1,1 (0,8)	n.d.	5,0 (2,5)
n.d. = no determinado			

[0051] Conclusión: Estos resultados indican que la suplementación con *L. salivarius* PS2 produjo una reducción en el recuento de bacterias en la leche materna y una mejoría de los síntomas clínicos (puntuación del dolor) de las mujeres que padecen mastitis. Los resultados obtenidos con una dosis diaria de 10^9 ufc/mL de *L. salivarius* PS2 son comparables con los obtenidas con antibióticos, mientras que dos o tres dosis diarias de 10^9 ufc/mL de *L. salivarius* PS2 claramente tienen un resultado mejor que el tratamiento regular con antibióticos. La suplementación con dos o tres dosis, en particular con tres dosis, de esta cepa al día resultó en una reducción significativamente mayor del recuento de bacterias en comparación con el tratamiento antibiótico estándar.

***Ejemplo 3**: Ensayo clínico II - Prevención de la mastitis en sujetos de alto riesgo.*

[0052] Métodos: Se realizó un estudio de intervención aleatorizado doble ciego controlado con placebo con un total de 108 mujeres embarazadas sanas, de 25 a 35 años de edad, que tenían intención de amamantar a sus bebés. Todas cumplían con los siguientes criterios: embarazo normal, estado saludable y antecedentes de mastitis lactacional después de, al menos, un embarazo previo. Las mujeres se asignaron al azar a un grupo de prueba (n = 55) y un grupo de placebo (n = 53). El grupo de prueba ingirió 1 sobre que contenía un suplemento en polvo probiótico liofilizado que comprendía 1 × 10^9 ufc de *L. salivarius* PS2 por g al día, y el grupo de placebo ingirió 1 sobre que contenía un suplemento de placebo, a partir de la 30ª semana de embarazo hasta 12 semanas después del parto. Ninguna de las mujeres ingirió alimentos probióticos o suplementos comerciales durante el tercer trimestre del embarazo y durante el estudio. Se excluyeron las mujeres que ingerían alimentos o suplementos probióticos comerciales o que habían recibido un tratamiento con antibióticos en los últimos 30 días, y las mujeres con alergia a la proteína de la leche de vaca o intolerancia a la lactosa y las mujeres con abscesos mamarios, síndrome de Raynaud o cualquier otra patología mamaria.

[0053] Los síntomas de la mastitis los evaluaron las matronas de los centros de atención primaria de salud durante los primeros 3 meses después del nacimiento. Siguiendo criterios recientes para la clasificación de la mastitis infecciosa [Fernández et al., Benef. Microbes 2014, 5 (2), 169-83], la "mastitis aguda" se definió como una inflamación aguda de la mama con síntomas locales (ingurgitación, dolor, enrojecimiento, secreción reducida) y síntomas sistémicos (similares a la gripe), mientras que la "mastitis subaguda" se definió como una inflamación de la mama caracterizada por la presencia de síntomas locales (ingurgitación, dolor punzante y/o ardor, reducción de la secreción) y ausencia de síntomas sistémicos. Ambas definiciones solo incluyen aquellos casos asociados a un alto recuento de bacterias en la leche (> 10^3 ufc/ml), determinado como se explica a continuación, y un alto recuento de leucocitos en la leche (> 10^4 células/mL). La cuantificación de leucocitos se realizó mediante microscopía óptica después de la tinción diferencial de May-Grünwald-Giemsa.
En los casos en los que apareció la mastitis, se les pidió a las voluntarias que puntuaran su sensación de dolor en las mamas de 0 (dolor extremo) a 10 (sin dolor), siguiendo un procedimiento estándar de puntuación de dolor [Jensen and Karoly, Handbook of Pain Assessment, 2nd edition, New York: Guilford Press, 2001, pp 15-34; Jensen, Pain assessment in clinical trials. In H. Wittink and D. Carr (eds.), Pain Management: Evidence, Outcomes, and Quality of life. Amsterdam: Elsevier, 2008**]**

[0054] Se recogieron muestras de leche materna (10 ml) entre 91 y 100 días después del parto en el caso de las mujeres que no sufrieron mastitis durante el período de seguimiento de 3 meses. En el caso de las mujeres que

sufrieron tal afección, se recogió una muestra de leche inmediatamente después del diagnóstico. El recuento de bacterias se mide en las muestras de leche de la siguiente manera. Las muestras se diseminan en placas de agar de dextrosa con clorafenicol Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey y Sabouraud para el aislamiento selectivo y la cuantificación de los principales agentes involucrados en la mastitis infecciosa y, paralelamente, en placas de agar de MRS (Oxoid) suplementadas con L-cisteína (0,5 g/L) (MRS-Cys) para el aislamiento de lactobacilos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en condiciones aeróbicas, a excepción de las placas MRS-Cys, que se incubaron anaeróbicamente. Las bacterias aisladas de la leche se identifican inicialmente en cuanto a su especie mediante pruebas morfológicas y bioquímicas clásicas. Después del recuento bacteriano, los representantes de cada tipo de morfología de colonia se identificaron mediante MALDI-TOF mediante sembrado de una parte de una colonia bacteriana (1 µL) en una placa de muestra MALDI. Luego, se cubrió con 1 µl de una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo (28%) y se dejó secar a temperatura ambiente. Para cada aislado, se construyó un espectro medio con perfiles de espectros de al menos 50 m/z y se usó para la identificación por comparación con los espectros contenidos en la base de datos de Myla (Biomerieux). La identificación se definió como una coincidencia del 99-100% con los valores de m/z específicos para la especie en la base de datos.

[0055] Análisis estadístico: Los datos microbiológicos, registrados como número de ufc por ml de leche, se transformaron en valores logarítmicos antes del análisis estadístico. Las variables continuas se expresaron como medias y el intervalo de confianza (IC) del 95% de las medias después de verificar la normalidad. Se utilizó un análisis ANOVA de un factor seguido de un post-test de Bonferroni para comparar la edad y el tiempo de inicio (semana de embarazo) del estudio entre los grupos de probióticos y placebo, y para verificar el efecto de la intervención de probióticos y el tipo de mastitis. (subaguda y aguda) en las puntuaciones de mastalgia. Se utilizó un análisis ANOVA de dos factores para investigar el efecto del tratamiento y el estado de salud de la glándula mamaria en los recuentos de estafilococos/estreptococos, así como el efecto del tratamiento y el tipo de mastitis en la puntuación de la mastalgia y para estudiar la posible interacción de las dos variables investigadas. Las proporciones se compararon usando pruebas de χ^2 o de probabilidad exacta de Fisher cuando sea necesario. Se realizó un análisis de correlación para probar la relación entre los recuentos de estafilococos/estreptococos en la leche materna y la puntuación de la mastalgia. La significación estadística se estableció en $P < ,05$.

[0056] Resultados: No hubo diferencias significativas entre el grupo de probióticos y el grupo de placebo con respecto a la edad (media: 31,18 años, IC del 95%: 30,70 a 31,66 para el grupo de probióticos y media: 30,51 años, IC del 95%: 30,02 a 31,00 para el grupo de placebo ; $P = ,1699$, ANOVA de un factor) y la semana de embarazo (media: 29,82 semana, IC 95%: 29,49 - 30,15 para el grupo probiótico y media: 30,06 semana, IC 95%: 29,74 - 30,37 para el grupo control; $P = ,2953$, ANOVA de un factor) al inicio del estudio. No se registraron efectos adversos o efectos secundarios/eventos relacionados con la ingestión del probiótico a lo largo del estudio.
La aparición de la mastitis se evaluó durante los primeros 3 meses después del parto. A nivel mundial, 44 mujeres de 108 (59,26%) sufrieron mastitis; El 77,27% de los casos se clasificaron como subagudos, mientras que los casos agudos representaron el 22,73% restante. Los resultados de la incidencia de la mastitis (subaguda o aguda) dentro de los primeros tres meses después del parto se presentan en la Tabla 3, así como los recuentos bacterianos totales medios (RBT) en las puntuaciones de la leche materna y de mastalgia (BPS, por sus siglas en inglés). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de probióticos y el grupo de control en relación con la frecuencia de mastitis. El porcentaje de mujeres que sufrieron mastitis en el grupo de probióticos fue significativamente menor que en el grupo de control ($P = ,0010$, prueba χ^2). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de mujeres que habían estado recibiendo *L. salivarius* PS2 durante el embarazo y el grupo de control que recibió un placebo con respecto al tipo de mastitis. En el grupo de probióticos, la frecuencia de las mastitis subaguda y aguda fueron del 79% y el 21%, respectivamente, mientras que en el grupo de control estos porcentajes fueron del 77% y el 23%, respectivamente ($P = 1,000$, prueba de probabilidad exacta de Fisher).

[0057] El recuento bacteriano medio en las muestras de leche proporcionadas por todas las participantes fue de $2,63 \times 10^3$ ufc/ml (IC 95%: $1,74 \times 10^3$ - $3,98 \times 10^3$). Tanto el consumo de probióticos o de placebo como el estado saludable de la glándula mamaria (mastitis sana, subaguda o mastitis aguda) tuvieron un efecto significativo ($P = ,000$ para ambos factores principales, ANOVA de dos factores) en los recuentos bacterianos detectados en la leche materna. Además, la interacción entre estos dos factores también fue altamente significativa ($P = ,000$, ANOVA de dos factores), lo que indica que los recuentos bacterianos medios encontrados en la leche materna de mujeres sanas y mujeres con mastitis dependían en gran medida del tratamiento con probióticos.
Cuando los recuentos bacterianos registrados en muestras de leche de mujeres sanas que habían recibido el probiótico (n = 41) se compararon con los de las mujeres sanas incluidas en el grupo de control que recibió placebo (n = 23), se observó una diferencia pequeña pero significativa. ($P = ,0005$, prueba t). Las diferencias observadas entre ambos grupos en el recuento bacteriano de leche obtenida de mujeres con mastitis subaguda y aguda fueron mayores: el recuento bacteriano medio en los grupos subagudo probiótico (n = 11) y agudo (n = 3) fue de $6,76 \times 10^3$ ufc/mL y $6,17 \times 10^3$ ufc/ml respectivamente, mientras que los recuentos bacterianos medios en los grupos subagudo con placebo (n = 23) y agudo (n = 7) ascendieron a $4,07 \times 10^4$ ufc/mL subagudo (n = 11) y $1,05 \times 10^5$ UFC/mL respectivamente ($P =$

,0001 y ,0064 respectivamente, prueba t) (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas cuando los recuentos bacterianos de muestras de leche materna se obtuvieron de casos subagudos en comparación con los de casos agudos tanto en el grupo probiótico (*P* = ,770, prueba t) como en el de placebo (*P* = ,0939, prueba t).

Tabla 3: Resultados del ensayo clínico II

	grupo de prueba (n = 55)	grupo de placebo (n = 53)	*P*
incidencia de no mastitis	n = 41 (75%)	n = 23 (43%)	
incidencia de mastitis (total)	n = 14 (25%)	n = 30 (57%)	,0010 [b]
incidencia de mastitis subaguda	n = 11 (79%)	n = 23 (77%)	1,000 [c]
incidencia de mastitis aguda	n = 3 (21%)	n = 7 (23%)	1,000 [c]
RBT [a] (no mastitis)	0.50	0,69	,0005 [d]
RBT [a] (mastitis subaguda)	6,76 (5,01-9,33)	40,7 (24,0-70,8)	,0001 [d]
RBT [a] (mastitis aguda)	6,17 (1,95-19,5)	105 (32,4-339)	,0064 [d]
BPS (subaguda + mastitis aguda)	2,77 (2,16-3,38)	1,40 (0,93-1,87)	,0012 [e]

[a] media e intervalo de confianza del 95% en 10^3 ufc/mL; [b] prueba χ^2; [c] prueba de probabilidad exacta de Fisher; [re] prueba t; [e] ANOVA de un factor.

[0058] La mayoría de las participantes que sufrieron mastitis (43 de 44) puntuaron su mastalgia entre 0 y 4 en una escala que va desde 0 (dolor extremo) a 10 (sin dolor). Hubo una fuerte correlación entre la BPS indicada y los recuentos bacterianos encontrados en la leche (*r* = -,814, *P*= ,000, correlación producto-momento de Pearson). Una prueba ANOVA de dos factores que contrastó todas las observaciones registradas para la mastalgia indicadas por las mujeres participantes con mastitis mostró que el consumo de *L. salivarius* PS2 tuvo un efecto significativo sobre la intensidad del dolor, en contraste con el tipo de mastitis (Tabla 8). Las mujeres en el grupo de probióticos (n = 13) indicaron valores más altos de BPS, que indican un dolor menos intenso, que aquellas en el grupo de placebo (n = 30). En general, el tipo de mastitis no causó diferencias significativas en la puntuación de la mastalgia (BPS media = 1,97; IC del 95%: 1,50 a 2,44 en 33 mujeres con mastitis subaguda versus BPS media = 1,30; IC del 95%: .40 a 2,20 en 10 mujeres con mastitis aguda; *P* = ,1663, ANOVA de un factor). Entre todas las mujeres con mastitis, las que indicaron sufrir una mastalgia más intensa (BPS más baja) se encontraron con más frecuencia en el grupo de placebo que en el grupo de probióticos (*P* = ,0327, prueba χ^2). De hecho, todas las mujeres (n = 9) que indicaron notar las mamas extremadamente dolorosas (BPS = 0) no tomaron *L. salivarius* PS2 y estaban incluidas en el grupo de placebo.

[0059] Conclusión: La administración de *L. salivarius* PS2 causa una reducción significativa en la aparición de la mastitis, los recuentos bacterianos totales de la leche materna (para mujeres sanas, mujeres que sufren de mastitis subaguda y aguda) y las puntuaciones de mastalgia de mujeres que padecen mastitis, incluso para el grupo elegido como objetivo de mujeres con alto riesgo de desarrollar mastitis. La cepa según la invención, por lo tanto, es capaz de prevenir la mastitis.

Ejemplo 4*: ensayo clínico III - tratamiento de la mastitis*

[0060] Métodos: Un total de 23 mujeres con síntomas de mastitis participaron en el estudio. Todas cumplían con los siguientes criterios: inflamación de las mamas, amamantamiento doloroso, recuento de estafilococos/estreptococos en la leche > 3 $\log_{10}$ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, y recuento de leucocitos en la eche> 4 $\log_{10}$ células/mL. Todas las mujeres consumieron diariamente, durante 21 días, 9.5 $\log_{10}$ ufc de *Lactobacillus salivarius* PS2. Ninguna de las mujeres ingirió alimentos probióticos o suplementos comerciales durante el estudio. Se excluyeron las mujeres con abscesos mamarios, síndrome de Raynaud o cualquier otra patología mamaria.

[0061] Los síntomas de la mastitis los evaluaron en los días 0 y 21 las matronas de los centros de salud primaria. Se obtuvieron muestras de leche materna, sangre y orina al principio y al final del estudio. Las muestras de leche (30 ml) se recogieron entre las 7-9 a.m. y al menos 2 h después de la última alimentación. Los primeros 2 ml se recolectaron mediante expresión manual para el análisis microbiológico y el recuento de células somáticas, mientras que el resto de la leche se obtuvo utilizando un extractor de leche para los análisis bioquímicos e inmunológicos. La primera fracción de 22 ml de las muestras de sangre se recogió en un tubo de Na-heparina para analizar la composición de ácidos grasos (AG) de la fracción celular y los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (EO) en plasma. Se recogió una segunda fracción de 8 ml en tubos de EDTA para hematología estándar y análisis inmunológico. Los últimos 4 ml se usaron para obtener suero para la bioquímica estándar y la cuantificación de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR-as). La primera orina de la mañana se recolectó para un análisis de orina estándar (densidad, pH, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, nitritos, urobilinógeno, glóbulos rojos y leucocitos).

[0062] El recuento de bacterias se midió en las muestras de leche de la siguiente manera. Las muestras se sembraron en placas de agar de dextrosa con clorafenicol Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey y Sabouraud y se incubaron durante 48 h a 37 °C en condiciones aeróbicas para el aislamiento selectivo y la cuantificación de los principales

agentes involucrados en la mastitis infecciosa. Después del recuento de bacterias, los representantes de cada tipo de morfología de colonias se identificaron mediante MALDI-TOF. Se utilizaron muestras de leche fresca para el recuento de células somáticas (RCS) utilizando un contador automático de células. El análisis de los subconjuntos de células somáticas se realizó mediante microscopía óptica después de la tinción diferencial de May-Grünwald-Giemsa de la leche fresca. El análisis se realizó por duplicado por dos observadores diferentes y se contó un mínimo de 100 células para cada muestra. Las concentraciones de grasa, proteína, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos (SNG) de las muestras de leche se determinaron utilizando un instrumento MilkoScan Minor, previamente calibrado y validado para el análisis de la leche materna. Las concentraciones de sodio, potasio y cloruro se determinaron en muestras de leche desgrasada utilizando electrodos selectivos de iones en un analizador Spotlyte. Después de la descongelación, se añadieron 0,5 ml de cada muestra de leche con 0,5 ml de una solución de NaCl 40 mM. Cada medición se repitió tres veces.

[0063] Los ácidos grasos (AG) presentes en las muestras de leche y en la fracción de células sanguíneas se derivaron directamente a ésteres metílicos de AG (EMAG) y se analizaron como se ha descrito anteriormente [Rodríguez-Alcalá et al, Innov. Food sci. Emerger Tecnol. 2009, 10, 32-36]. Los análisis se llevaron a cabo al menos por duplicado. Las concentraciones de un amplio espectro de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas en muestras de leche y sangre se determinaron por duplicado utilizando un instrumento del sistema Bioplex 200 o por ELISA como se ha descrito anteriormente [Espinosa-Martos el tal, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2013, 56, 560-8]. Los antígenos Lewis de la sangre también se analizaron en muestras de plasma. Los metabolitos relacionados con el estrés osmótico y los productos finales del metabolismo del óxido nítrico (NOx) en sangre se midieron por duplicado como se ha descrito anteriormente [Codoñer-Franch et al., Atherosclerosis 2011, 215, 475-480 y Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2012, 22, 237-243].

[0064] Análisis estadístico: Los datos microbiológicos, registrados como número de ufc por ml de leche, se transformaron en valores logarítmicos antes del análisis estadístico. Se usaron las pruebas de Shapiro-Wilk para el control de normalidad. Las concentraciones se expresaron como media e intervalo de confianza (IC) del 95% en datos normalmente distribuidos o como medianas y rango intercuartílico (RIC) cuando no lo estaban. El efecto de la intervención de los probióticos se analizó mediante pruebas t de Student pareadas o pruebas de rango con signo de Wilcoxon. Las diferencias en las frecuencias de detección de los parámetros analíticos se analizaron utilizando pruebas de $\chi 2$ con corrección de Yates cuando fue necesario. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$.

[0065] Análisis de la leche: Los análisis de las muestras de leche se resumen en las Tablas 4 y 5. En el día 0, el recuento bacteriano total promedio en las muestras de leche fue de 4,08 $\log_{10}$ ufc/mL; este valor disminuyó significativamente al final del estudio (3,09 $\log_{10}$ ufc/mL; *P*<,000) (Tabla 4). Es importante destacar que los recuentos de todos los microorganismos involucrados en la mastitis (*Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus,* estreptococos del grupo *viridans* y las corinebacterias disminuyeron significativamente el día 21 (Tabla 4), mientras que los lactobacilos, que no pudieron detectarse en las muestras de leche recogidas el día 0, se aislaron en más de la mitad de las mujeres el día 21 (datos no mostrados). Los síntomas clínicos desaparecieron o mejoraron notablemente entre todas las mujeres al final del estudio (datos no mostrados). A nivel mundial, los valores de SCC no cambiaron, aunque hubo una disminución significativa en el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (*P*= ,018) y se observó una tendencia descendente en el porcentaje de células epiteliales después del tratamiento con probióticos (Tabla 4). Las concentraciones de grasa, lactosa, sólidos totales y no grasos de la leche materna no cambiaron a lo largo del período de estudio y, aunque el contenido de proteína se redujo el día 21, todavía estaba dentro de los valores fisiológicos normales (datos no mostrados). Los niveles de potasio en la leche se redujeron (*P*= ,000) y los de cloruro aumentaron (*P*= ,002) después de la intervención con probióticos, mientras que las concentraciones de sodio en la leche y la relación Na/K no se modificaron (Tabla 4). El principal ácido graso encontrado en las muestras de leche materna fue el ácido oleico (C18: 1 c9, 40%), seguido de los ácidos palmítico (C16, 15-17%), linoleico (C18: 2 c9, c12, 13-14%), y láurico (C12, 10%) (datos no mostrados). No se encontraron cambios en la composición de AG de la leche después del tratamiento, excepto por un pequeño aumento observado en el ácido palmítico (1,9%, *P*=,018).
IgA, IgG1, IgG3, IgG4 e IgM fueron las inmunoglobulinas detectadas con mayor frecuencia en las muestras de leche. Se detectó IgA en todas las muestras y en las concentraciones más altas (Tabla 5). Después del tratamiento con probióticos, los niveles de IgE e IgG3 aumentaron significativamente (*P*= ,041 y ,020, respectivamente) (Tabla 5). Se encontraron citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en muestras de leche materna a frecuencias sustancialmente diferentes: IL-1β, TGF-β_2, GRO-α, IL-8, MCP-1, MIP-1β y EGF se pudieron detectar en más del 90% de las muestras, IL-6, IL-7 y GM-CSF en 57-87%, y el resto de estos compuestos se encuentran en menos del 50% de ellos (Tabla 5). La ingesta de probióticos no modificó ni sus frecuencias observadas de detección ni sus concentraciones, a excepción de IL-7 y EGF, que aumentaron significativamente (*P*= ,070 y ,061, respectivamente) (Tabla 5). Curiosamente, la concentración media de las citoquinas IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 (p70) y TNF-α, y las quimiocinas IL-8, MCP-1 y MIP-1β fueron menores y sus valores de intervalo de confianza más estrechos después de la intervención, aunque estos cambios no alcanzaron significación estadística (Tabla 5).

Tabla 4. Contenidos de bacterias, células somáticas y electrolitos en la leche

	Inicial (día 0)		Final (día 21)		*P* [a]
	n	media (IC 95%) [b])	n	media (IC 95%) [b])	
Recuento de bacterias (log_{10}UFC/mL)					
S. epidermidis	23	3,59 (3.33-3.85)	23	2,83 (2,59-3,06)	,000
S, aureus	10	0,87 (0,33-1,41)	6	0,22 (-0,13-0,56)	,002
Streptococus sp,	21	2,99 (2,53-3,46)	20	1,97 (1,61-2,33)	,000
Corynebacterium sp.	11	0,45 (0,08-0,82)	5	0,03 (-0,23-0,28)	,001
Recuento total de bacterias	23	4,08 (3,89-4,28)	23	3,09 (2,90-3,28)	,000
Recuento de células somáticas (log_{10} célula/mL)					
Recuento total de células		7,94 (7,77-8,11)		8,04 (7,92-8,16)	,689
Recuento de células vivas		7,30 (7,14-7,46)		7,30 (7,17-7,43)	,648
Viabilidad (%)		21,32 (18,74-23,91)		19,65 (17,17-22,12)	,600
Subtipo de células somáticas (%)					
Monoc./Macróf. [c]		13,84 (9,90-17,77)		17,49 (11,98-23,00)	,163
Linfocitos		77,36 (72,11-82,61)		77,98 (72,77-83,20)	,346
Leucocitos PMN		6,11 (4,93-7,28)		2,62 (0,78-4,46)	,018
Células epiteliales		2,63 (0,87-4,29)		1,83 (0,63-3,03)	,102
Concentración de electrolitos (mM)					
Sodio (Na)		14,54 (12,34-16,75)		14,16 (12,40-15,93)	,665
Potasio (K)		13,77 (13,14-14,41)		12,70 (12,19-13,21)	,000
Cloruro		21,94 (18,14-25,73)		28,40 (23,44-33,36)	,002
Relación Na/K		1,08 (0,90-1,25)		1,13 (0,98-1,28)	,447

[a] prueba t pareada; [b] intervalo de confianza del 95%; [c] Monocitos/Macrófagos.

Tabla 5. Concentraciones de inmunoglobulinas y citoquinas en la leche

	Inicial (día 0)		Final (día 21)		*P* [a]
	n	media (IC 95%) [b])	n	media (IC 95%) [b])	
Inmunoglobulinas (mg/L) [c]					
IgA (× 10^3)	23	3,90 (3,31-4,49)	23	3,77 (3,32-4,20)	,543
IgE	11	0,29 (0,12-0,45)	12	0,50 (0,27-0,73)	,041
IgG1	21	52,24 (41,42-63,06)	21	50,10 (36,66-63,54)	,788
IgG2	9	282,85 (83,89-481,82)	10	285,93 (109,87-461,98)	,441
IgG3	17	17,54 (11,39-23,68)	17	25,50 (17,61-33,39)	,020
IgG4	17	427,57 (295,82-559,32)	19	426,80 (323,42-530,18)	,261
IgM	22	14,97 (9,49-20,45)	22	14,30 (9,99-18,61)	,654
Inmunidad innata (ng/L) [c]					
IFN-γ	4	56,06 (-98,47-210,58)	3	14,52 (-1,59-30,63)	,475
IL-1β	23	40,70 (-38,51-119,90)	21	14,10 (-10,77-38,98)	,499
IL-6	16	3,42 (0,82- 6,01)	15	1,64 (0,19- 3,10)	,572
IL-12 (p70)	4	2,43 (-2,97-7,84)	5	0,70 (0,07-1,33)	,500
TNF-α	8	14,25 (-11,44-39,93)	13	4,03 (2,18-5,89)	,899
Inmunidad adquirida (ng/L) [c]					
IL-2	1	2,24	1	0,20	
IL-4	6	0,76 (-0,47-2,00)	4	0,49 (-0,05-1,03)	,210
IL-10	5	2,39 (-1,24-6,02)	8	0,90 (0,29-1,51)	,298
IL-13	3	2,90 (-5,49-11,29)	8	3,72 (-0,49-7,93)	,166
IL-17	2	53,17 (-590,08-696,43)	2	7,01 (-26,79-40,81)	
TGF-β_2(×10^3)	21	7,86(4,60-11,13)	22	8,23 (4,42-12,04)	,646
Quimiocinas (ng/L) [c]					
GRO-α	21	899,78 (419,07-1380,49)	21	1936,48 (398,10-3473,98)	,185
IL-8	23	134,40 (46,94-221,86)	23	56,73 (31,66-81,81)	,067
MCP-1	22	165,41 (45,78-285,05)	22	98,97 (38,39-159,55)	,288
MIP-1β	23	54,49 (-16,49-125,48)	22	25,61 (13,90-37,31)	,405
Factores de crecimiento (ng/L) [c]					
EGF (× 10^3)	23	24,14 (21,15-27,13)	23	26,86 (23,57-30,15)	,061
G-CSF	3	10,14 (-8,14-28,42)	5	12,85 (-1,89-27,60)	1,000
GM-CSF	15	22,73 (8,55-36,91)	13	26,58 (6,92-46,23)	,347
IL-5	3	3,57 (-4,35-11,49)	0	-	

IL-7	20	1,23 (0,79-1,68)	16	12,61 (0,10-25,12)	,070

[a] prueba t pareada; [b] intervalo de confianza del 95%; [c] Abreviaturas: EGF = factor de crecimiento epitelial; G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; GRO-α = oncogén α relacionado con el crecimiento; Ig = inmunoglobulina; IL = interleucina; IFN-γ = interferón γ; MCP-1 = proteína quimioatrayente de monocitos; MIP-1β = proteína inflamatoria de macrófagos 1β; TGF-β_2 = factor de crecimiento transformante β_2; TNF-α = factor de necrosis tumoral α.

[0066] Análisis de sangre: Los análisis de las muestras de sangre se resumen en las Tablas 6 y 7. Tres de los cuatro fenotipos del antígeno de Lewis A/B se detectaron entre las participantes, pero ninguna de ellas mostró el fenotipo A +/B + (datos no mostrados). En general, los valores obtenidos para los parámetros hematológicos y bioquímicos probados estuvieron dentro de los rangos fisiológicos en ambos muestreos. Se observó una disminución significativa en la proporción de linfocitos (*P* = ,004) y un aumento en la de las células PMN (*P* = ,011) después del tratamiento con probióticos (Tabla 6). Curiosamente, se detectaron cambios importantes en el perfil de lípidos en sangre de las participantes, ya que los niveles de triglicéridos (*P*= ,012) así como de colesterol total (*P* = ,003), LDL (*P*= ,006) y VLDL (*P*= ,010) en las muestras de sangre fueron significativamente más bajos después del tratamiento con probióticos (datos no mostrados). No se observaron cambios sustanciales en los AG detectados en la fracción celular de la sangre, excepto en el ácido adrénico (C22: 4 n6) que fue ligeramente inferior (*P*= ,047) (datos no mostrados).

El análisis de los marcadores de estrés oxidativo mostró una ligera reducción de la mayoría de ellos después de la intervención con probióticos, aunque solo la reducción en los productos de proteínas de oxidación avanzada (AOPP), cuando se expresó tanto en términos de concentración absoluta como después de la normalización del contenido de proteínas, fue estadísticamente significativa (*P*= ,008 y *P*= ,003, respectivamente; Tabla 6). El análisis de correlación entre los parámetros de estrés oxidativo mostró que, después de la intervención con probióticos, las AOPP se correlacionaron positivamente con los niveles de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM). *r*=,346, *P*= ,004) y de nitritos (*r*=,400; *P*= ,001) y negativamente con isoprostanos (*r*=-,254; *P*= ,035). También se observaron correlaciones negativas entre grupos SH y TBARM (*r*=-,427; *P*= ,000) y entre isoprostanos y nitritos (*r*=-,318; *P*= ,008). Los niveles en sangre de los diferentes compuestos inmunológicos también estaban dentro de sus rangos fisiológicos (Tabla 7). Todas las Ig estaban presentes en todas las muestras de sangre con la excepción de la IgE, que no se detectó en dos muestras recogidas en el día 21. IL-4, IFN-γ, TNF-α y todas las quimiocinas se detectaron en más del 87% de las muestras; IL-6, IL-12 (p70), IL-7 y G-CSF se detectaron en un 52-74% y el resto de estos compuestos se pudieron medir en menos del 50% de ellos. Se observaron concentraciones disminuidas de IgA (*P*= ,047), IgG1 (*P*= ,066), IL-2 (*P*= ,098) y MCP-1 (*P*= ,062) en muestras de sangre después del tratamiento con probióticos (Tabla 7).

Tabla 6. Parámetros hematológicos y bioquímicos de la sangre

	Inicial (día 0)	Final (día 21)	*P* [a]
	media (IC 95%) [b])	media (IC 95%) [b])	
Parametros hematológicos[c]			
Leucocitos $(10)^3$ células/μL)	6,33 (5,74-6,92)	6,63 (5,93-7,33)	,293
Glóbulos rojos (10^6 células/μL)	4,61 (4,45-4,76)	4,62 (4,51-4,72)	,883
Hemoglobina (g/dL)	13,00 (12,56-13,44)	13,05 (12,69-13,41)	,730
Hematocrito (%)	40,16 (38,94-41,38)	40,10 (39,08-41,13)	,901
VCM (fL)	87,35 (84,77-89,93)	87,03 (84,46-89,60)	,548
HCM (pg)	28,29 (27,25-29,33)	28,32 (27,45-29,18)	,883
CHCM (g/dL)	32,38 (31,78-32,97)	32,56 (31,93-33,18)	,606
ADE (%)	14,43 (13,85-15,01)	14,55 (14,01-15,09)	,419
Plaquetas (10^5 células/μL)	2,69 (2,42-2,96)	2,57 (2,34-2,80)	,260
VPM (fL)	8,32 (7,82-8,81)	8,28 (7,79-8,76)	,863
Linfocitos (%)	34,45 (31,51-37,38)	31,06 (28,23-33,89)	,004
Monocitos (%)	5,22 (4,64-5,80)	5,04 (4,49-5,59)	,367
PMN (%)	55,64 (52,20-59,08)	58,85 (55,37-62,32)	,011
Eosinófilos (%)	4,11 (2,47-5,76)	4,06 (1,76-6,35)	,923
Basófilos (%)	0,57 (0,45-0,69)	0,53 (0,42-0,64)	,297
Parámetros de estrés oxidativo y metabolismo del óxido nítrico [c]			
AOPP (μmol/L)	60,81 (55,85-65,77)	52,52 (47,39-57,66)	,003
AOPP (nmol/mg pr.)	0,78 (0,72-0,84)	0,68 (0,61-0,75)	,008
Grupos SH (μmol/L)	428,00 (412,00-444,00)	422,00 (405,00-440,00)	,430
Grupos SH (nmol/mg pr.)	5,60 (5,19-6,00)	5,48 (5,10-5,85)	,499
TBARM (μmol/L)[d]	24,40 (22,80-29,60)	23,80 (22,40-30,80)	,697
MDA (μmol/L)	2,02 (1,76-2,28)	2,02 (1,69-2,35)	,983
8-iso PG $F_{2\alpha}$ (pg/mL)	180,00 (155,00-206,00)	166,00 (142,00-190,00)	,175

NOx (µmol/L) [d]	22,14 (18,88-28,65)	26,04 (17,58-34,51)	,438
Nitrito (µmol/L)	2,00 (1,72-2,27)	1,99 (1,70-2,28)	,970
Nitrato (µmol/L) [d]	19,71 (15,89-27,11)	23,21 (15,40-33,21)	,386

[a] prueba t pareada [b] Intervalo de confianza del 95% para datos distribuidos normalmente y prueba de rango con signo de Wilcoxon cuando no lo estaban 1; [c] Abreviaturas: HCM = hemoglobina corpuscular media; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; VCM = volumen corpuscular medio; VPM = volumen plaquetario medio; PMN = células polimorfonucleares; ADE = amplitud de distribución eritrocitaria; AOPP = productos de proteínas de oxidación avanzada; TBARM = material reactivo al ácido tiobarbitúrico; MDA = malondialdehído; NOx = productos finales del metabolismo del óxido nítrico; PG = prostaglandina; pr. = proteína; SH = sulfhidrilo; [d] No hay distribución normal.

Tabla 7. Concentraciones de inmunoglobulinas y citoquinas en sangre

	Inicial (día 0)		Final (día 21)		*P* [a]
	n	media (IC 95%) [b])	n	media (IC 95%) [b])	
Inmunoglobulinas (g/L) [c]					
IgA	23	2,51 (1,83-3,19)	23	1,96 (1,72-2,20)	,047
IgE (× 10^3)	23	0,82 (0,58-1,07)	21	0,88 (0,58-1,18)	,486
IgG1	23	10,18 (8,70-11,67)	23	9,15 (8,11-10,19)	,066
IgG2	23	5,12 (3,83-6,41)	23	4,63 (3,77-5,48)	,259
IgG3	23	1,12 (0,87-1,38)	23	1,03 (0,79-1,27)	,191
IgG4	23	0,44 (0,24-0,65)	23	0,41 (0,23-0,59)	,353
IgM	23	0,90 (0,40-1,39)	23	0,70 (0,46-0,94)	,144
Inmunidad innata (ng/L) [c]					
IFN-γ	21	125,99 (79,50-172,47)	20	127,08 (92,18-161,97)	,588
IL-1β	11	6,44 (-5,46-18,34)	10^3	6,36 (-5,27-17,99)	,411
IL-6	13	7,75 (5,08-10,42)	15	7,65 (4,91-10,38)	,292
IL-12 (p70)	14	586,52 (-661,38-1834,43)	13	370,19 (-416,88-1157,26)	,336
TNF-α	22	21,06 (12,54-29,58)	22	20,09 (13,13-27,06)	,799
Inmunidad adquirida (ng/L) [c]					
IL-2	7	4,48 (2,26-6,70)	8	2,59 (0,59-4,59)	,098
IL-4	20	2,93 (1,78-4,08)	20	3,35 (2,31-4,39)	,196
IL-10	4	20,10 (-35,19-75,39)	3	23,63 (-67,56-114,81)	,685
IL-13	2	317,00 (-3640,47-4274,47)	2	287,09 (-3280,43-3854,61)	,508
IL-17	9	37,73 (5,69-69,77)	13	29,40 (4,59-54,21)	,906
Quimiocinas (ng/L) [c]					
IL-8	21	9,09 (5,96-12,21)	19	10,35 (7,07-13,62)	,818
MCP-1	23	57,36 (45,19-69,53)	23	52,52 (39,88-65,16)	,062
MIP-1β	23	75,24 (65,57-84,90)	23	74,12 (64,55-83,69)	,691
Factores de crecimiento (ng/L) [c]					
G-CSF	17	49,85 (32,25-67,46)	15	45,43 (35,42-55,44)	,650
GM-CSF	6	2,86 (-32,66-38,37)	5	190,10 (-321,27-701,47)	,344
IL-5	7	6,50 (1,54-11,46)	7	5,90 (-2,53-14,34)	,752
IL-7	12	30,73 (22,57-38,89)	13	30,95 (22,18-39,73)	,424

[a] prueba t pareada; [b] intervalo de confianza del 95%; [c] Abreviaturas: G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; Ig = inmunoglobulina; IL = interleucina; IFN-γ = interferón γ; MCP-1 = proteína quimioatrayente de monocitos; MIP-1β = proteína inflamatoria de macrófagos 1β; TNF-α = factor de necrosis tumoral α.

[0067] Análisis de orina: Los valores obtenidos para los parámetros de la orina estaban dentro de los rangos fisiológicos y no se observaron diferencias asociadas al tratamiento con probióticos (datos no mostrados).

[0068] Conclusiones: *L. salivarius* PS2 resultó ser efectiva para mejorar el recuento total de bacterias en la leche materna, y se observó una relación directa entre la disminución de los recuentos de estafilococos y estreptococos y el resultado clínico. Las mujeres reclutadas en este estudio indicaron una mejoría completa o notable después del tratamiento. Estos resultados son indicativos de la capacidad de *L. salivarius* PS2 para el tratamiento de la mastitis.

[0069] La administración del probiótico no afectó al contenido de macronutrientes de la leche materna, que estuvo dentro de los rangos normales durante el estudio. Los electrolitos presentes en la leche reflejan la integridad epitelial mamaria, que se logra gradualmente después del parto a través del cierre de las uniones estrechas, y se controlan mediante mecanismos de transporte [Neville et al., Enm. J. Clin. Nutr. 1991, 54, 81-92]. La reducción de los niveles de

potasio y el aumento de los niveles de IgG3 después del tratamiento con *L. salivarius* PS2 sugiere un beneficio para la integridad epitelial de la glándula mamaria. El transporte de IgG1 e IgG3 es un mecanismo competitivo mediado por un receptor que favorece la subclase IgG3 en la leche, que tiene capacidades efectoras más altas [Stapleton et al., Nature Commun. 2011, 2, 599] y reduce la tasa de infección en individuos inmunodeficientes [Shapiro, Immunotherapy 2012, 4, 1835-9.].

Los niveles de IL-8 y otras citoquinas y quimioquinas (como IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12 (p70), TNF-α, MCP-1 y MIP-1β) se redujeron en la leche como consecuencia del tratamiento con probióticos, que puede ser responsable de la mejora del estado de inflamación asociado a la mastitis. Los intervalos de confianza del 95% de los diferentes parámetros fueron notablemente menores después del tratamiento con probióticos, lo que indica una menor dispersión de los datos y sugiere niveles más normalizados.

El aumento de los factores tróficos EGF y TGF-β_2 puede haber contribuido a la inmunomodulación en el epitelio mamario, lo que también puede beneficiar al bebé. El TGF-β_2 es un factor inmunorregulador mamario clave, que promueve la producción local de IgA e induce mecanismos de tolerancia oral en lactantes [Stavnezer, J. Immunol. 1995, 155, 1647-1651; Oddy and Rosales, Pediatr. Allergy Immunol. 2010, 21, 47-59]. En contraste, la suplementación oral con una cepa de *L. reuteri* a las mujeres embarazadas redujo los niveles de TGF-β_2 niveles en el calostro [Böttcher et al., Pediatr. Allergy Immunol. 2008, 19, 497-504]. Este aparente resultado contradictorio es indicativo de respuestas inmunitarias diferenciales ejercidas por diferentes cepas bacterianas, y puede explicar por qué diferentes cepas probióticas tienen diferentes aplicaciones.

Ejemplo 5: *Composición líquida*

[0070] 100mL de una composición líquida a base de leche envasada en una botella de 100 mL que contiene 8,1 g de transgalactooligosacárido, 0,9 g de fructopolisacárido, 750 µL de aceite de pescado y 10 ml^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) de la cepa de *Lactobacillus salivarius* de la presente invención, que opcionalmente también contiene micronutrientes recomendados para la lactancia (por ejemplo, ácido fólico, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, colina, vitamina C, calcio, yodo, zinc y hierro), en donde la composición incluye instrucciones para agregue el contenido de la barra o stickpack o sobres en una bebida o alimento, que se consumirá una o dos veces al día para prevenir y/o tratar los síntomas de mastitis o mastitis.

Ejemplo 6*: Suplemento*

[0071] Una barra o un *stick pack* o un sobre que comprende de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) de la cepa de *Lactobacillus salivarius* de la presente invención, con instrucciones para agregar el contenido de la barra o *stick pack* o sobre a una bebida o alimento, para ser consumidos una o dos veces al día para prevenir y/o tratar la mastitis o los síntomas de la mastitis. De manera adecuada, la bebida es una bebida fría o una bebida caliente.

Ejemplo 7*: Barra de cereales*

[0072] Una barra de cereales que comprende cereales (por ejemplo, avena, trigo, maíz, arroz), que incluye adecuadamente cereales en forma de copos, cereales extruidos, etc., y la cepa de *Lactobacillus salivarius* según la presente invención en el rango de 10^8 - 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc), y opcionalmente también contiene:

- frutas (por ejemplo, arándano, pasas, mora, grosella negra, cereza, frambuesa, fresa, etc.), que incluyen adecuadamente frutas secas o liofilizadas;
- semillas y/o nueces;
- jarabes y/o aceites;
- prebióticos (por ejemplo, transgalactooligosacárido, fructopolisacárido);
- micronutrientes recomendados para la lactancia (por ejemplo, ácido fólico, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, colina, vitamina C, calcio, yodo, zinc y hierro).

[0073] La barra de cereales puede incluir instrucciones que indiquen que la barra de cereal debe consumirse una o dos veces al día para prevenir y/o tratar la mastitis o los síntomas de la mastitis.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0074]

<110> N.V. Nutricia

<120> Lactobacillus salivarius para el tratamiento de la mastitis

<130> P6044464PCT1/EP

<140> EP14828344.3
<141> 2014-12-19

<150> PCT/NL2013/050924
<151> 2013-12-19

<160> 1

<170> versión de PatentIn 3.3

<210> 1
<211> 10
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 1
acgcaggcac 10

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus salivarius* con número de acceso LMG P-27027.

2. Cepa de *Lactobacillus salivarius* con número de acceso LMG P-27027 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero.

3. Cepa de *Lactobacillus salivarius* para su uso según la reivindicación 2, en donde dicho uso es el tratamiento y/o la prevención de la mastitis en una hembra humana.

4. Cepa de *Lactobacillus salivarius* para su uso según las reivindicaciones 2 o 3, en donde la cepa de *Lactobacillus salivarius* se administra más de una vez al día en una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por dosis.

5. Cepa de *Lactobacillus salivarius* para su uso según la reivindicación 4, en donde la cepa de *Lactobacillus salivarius* se administra tres veces al día en una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por dosis.

6. Composición que comprende una cepa de *Lactobacillus salivarius* con el número de acceso LMG P-27027 y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

7. Composición según la reivindicación 6, que comprende de 10^8 a 10^{10} ufc de la *Lactobacillus salivarius* por gramo de materia seca.

8. Composición según la reivindicación 6 o 7, que comprende además al menos uno seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos no digeribles, LC-PUFA, probióticos adicionales y micronutrientes.

9. Cepa de *Lactobacillus salivarius* según la reivindicación 1 o composición según la reivindicación 6 o 7 para su uso como medicamento.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o la infección del tejido mamario o de la ubre en un mamífero.

11. Composición para su uso según la reivindicación 10, para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis en una hembra humana.

Fig. 1

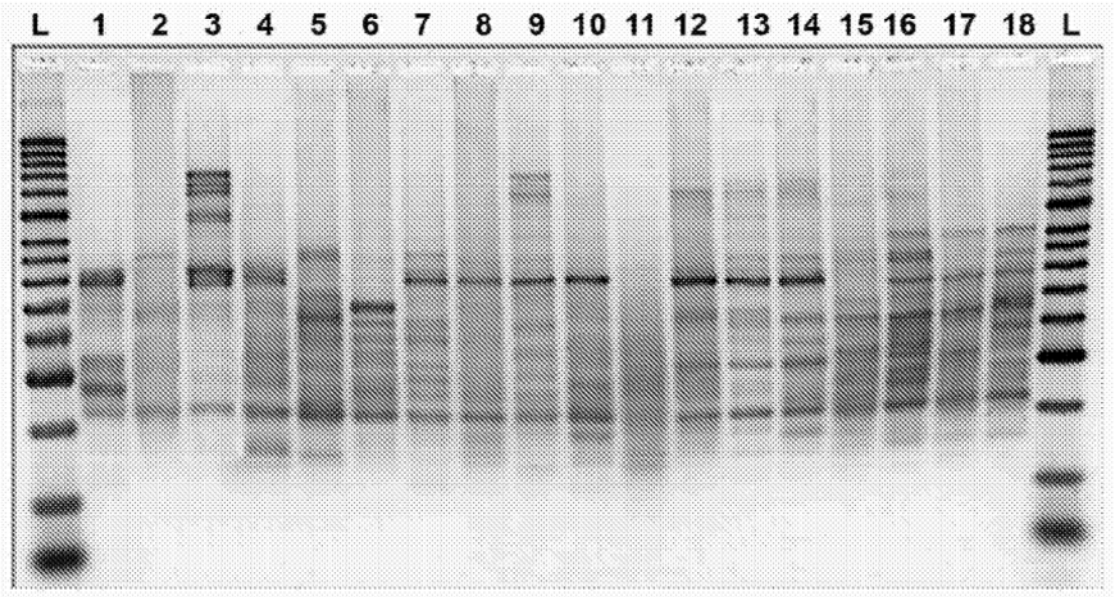


Fig. 2a

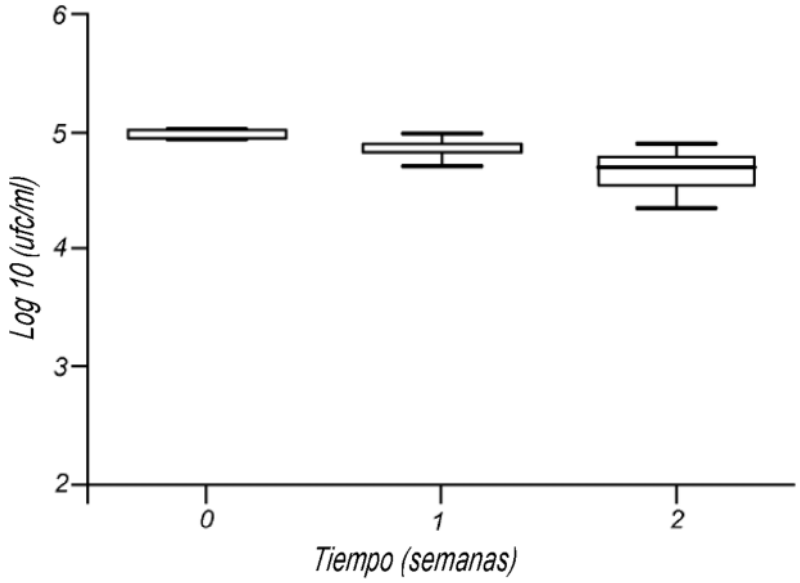

6
5
4
3
2
Log 10 (ufc/ml)
0
1
2
Tiempo (semanas)

Fig. 2b

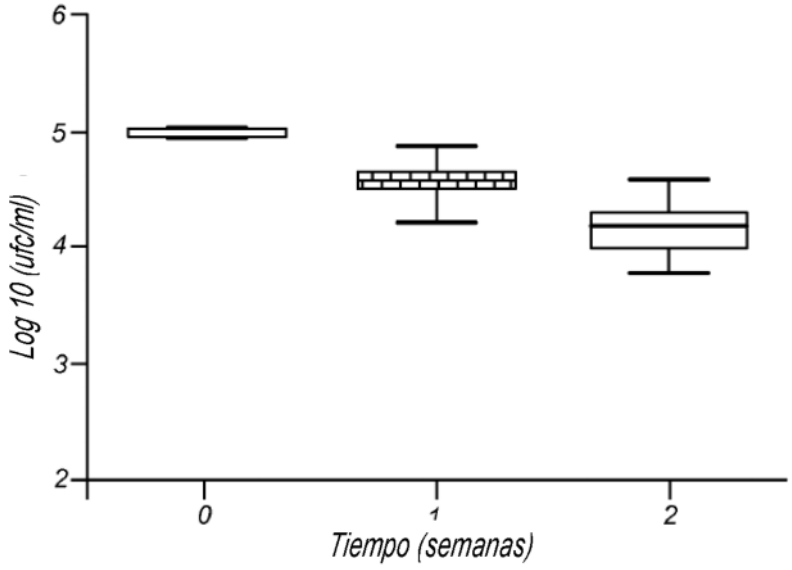

6
5
4
3
2
Log 10 (ufc/ml)
0
1
2
Tiempo (semanas)

Fig. 2c

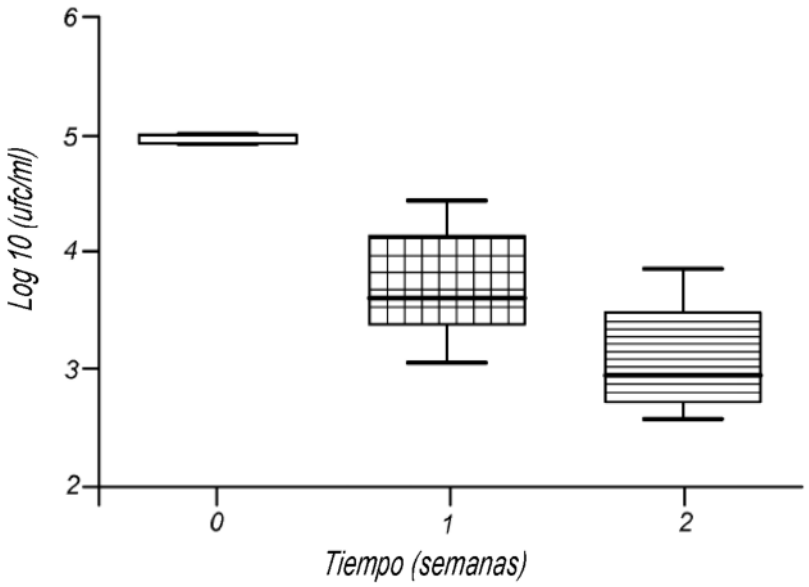

6
5
4
3
2
Log 10 (ufc/ml)
0
1
2
Tiempo (semanas)

Fig. 2d

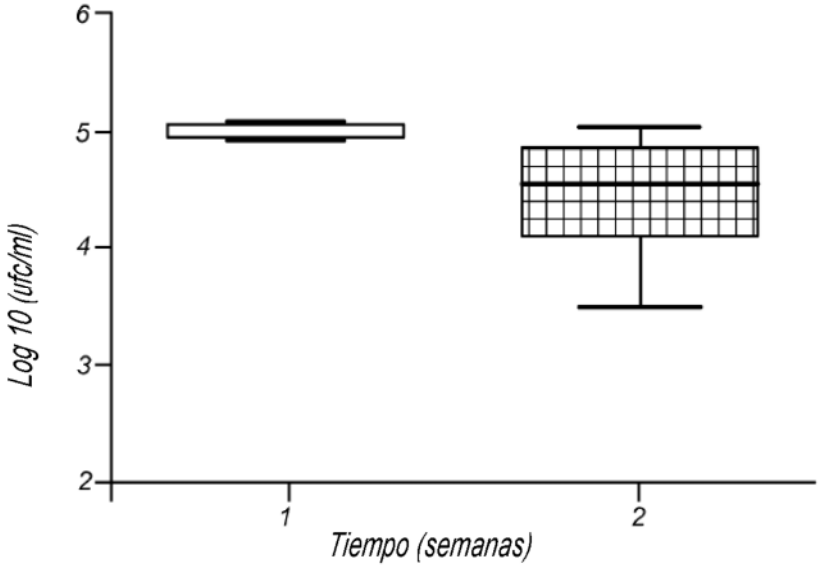

6
5
4
3
2
Log 10 (ufc/ml)
1
2
Tiempo (semanas)

Fig. 3a

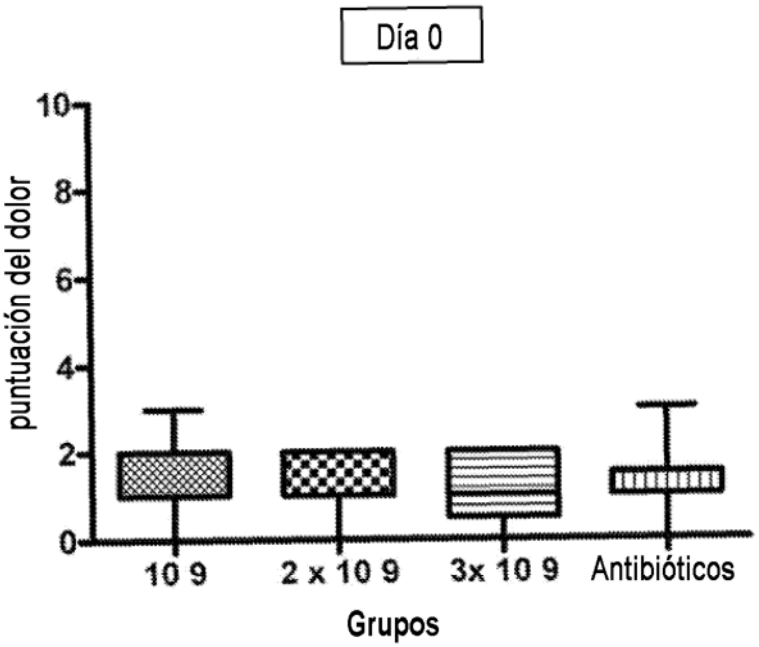
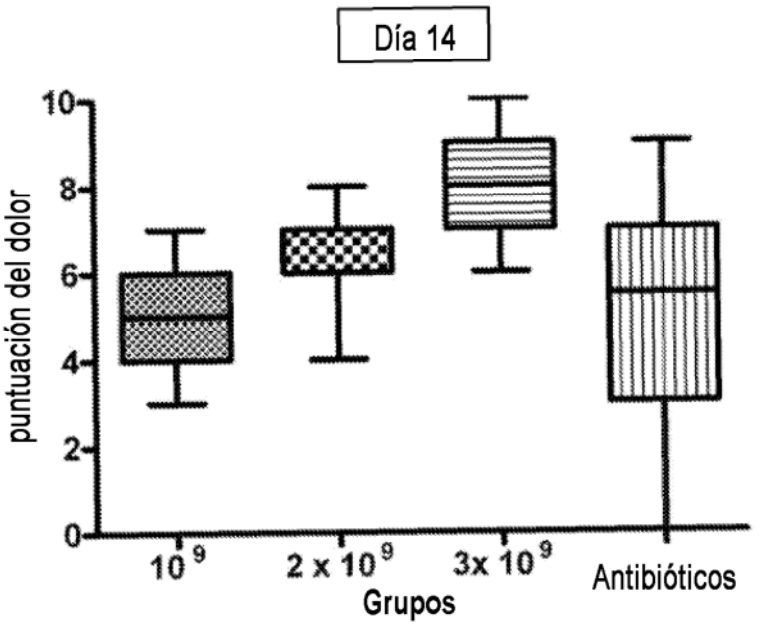

Día 0
puntuación del dolor
10
8
6
4
2
0
10 9
2 x 10 9
3x 10 9
Antibióticos
Grupos

Fig. 3b


Día 14
puntuación del dolor
10
8
6
4
2
0
10 9
2 x 10 9
3x 10 9
Antibióticos
Grupos