



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23K 10/18 (2016.01) A23K 50/10 (2016.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2015/056033

(22) Fecha de presentación internacional:
7 de agosto de 2015 (07.08.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante: **CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA-CORPOICA** [CO/CO]; Km 14 vía Mosquera - Cundinamarca, Mosquera (CO).

(72) Inventores: **RODRÍGUEZ VILLAMIZAR, Fernando**; Km 14 vía Mosquera - Cundinamarca, Mosquera (CO). **GÓMEZ ÁLVAREZ, Martha Isabel**; Km 14 vía Mosquera - Cundinamarca, Mosquera (CO). **GRIJALBA BERNAL, Erika Paola**; Km 14 vía Mosquera - Cundinamarca, Mosquera (CO).

(74) Mandatario: **OLARTE, Carlos R.**; Carrera 5 No. 34-03, La Merced, Bogotá, 110311 (CO).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

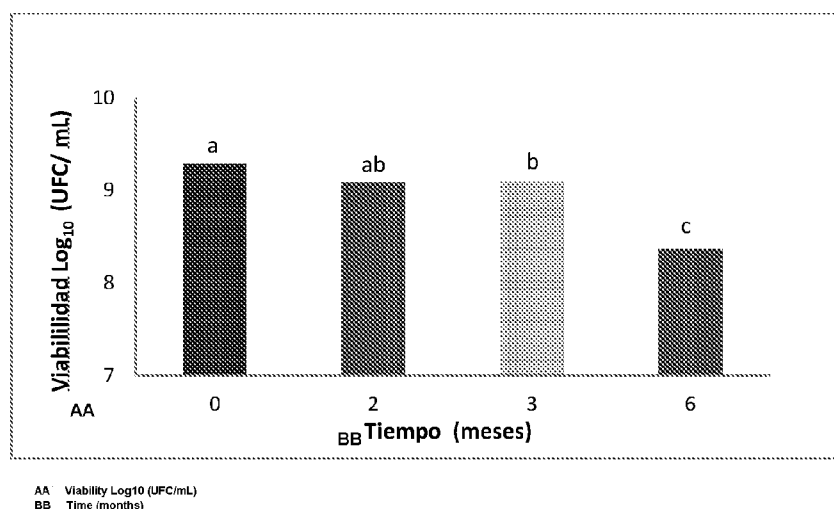
Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: MICROBIAL COMPOSITION

(54) Título : COMPOSICIÓN MICROBIANA

FIG 2



(57) Abstract: The invention relates to a microbial composition comprising, as an active ingredient, at least one probiotic microorganism selected from the group *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis* and *Butyrivibrio fibrisolvens*, together with adjuvants and an acceptable vehicle. The composition of the invention is stable and effective in reducing occurrences of diarrhoea in calves and also significantly increases the body weight thereof.

(57) Resumen: Composición microbiana que comprende, como ingrediente activo, al menos

[Continúa en la página siguiente]



un microorganismo probiótico seleccionado del grupo *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, junto con coadyuvantes y un vehículo aceptable. La composición de la invención es estable y eficaz en la reducción de la incidencia de diarrea en terneros y, además, logra un aumento significativo en su peso corporal.

COMPOSICIÓN MICROBIANA

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención pertenece al área farmacéutica, particularmente al campo de las composiciones medicinales de uso veterinario. La invención se refiere a una composición microbiana que comprende microorganismos probióticos para reducir la diarrea e incrementar la vitalidad de bovinos neonatos.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TECNICA

- La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), define los probióticos como microorganismos vivos que al administrarse en dosis adecuadas, producen efectos benéficos en la salud del ente receptor [1]. Un producto probiótico se compone de microorganismos que sobreviven y se pueden implantar en diferentes órganos del tracto digestivo como el estómago, el intestino delgado o el colon, con el objetivo de mejorar el funcionamiento de la flora intestinal del hospedero, ayudando a degradar completamente los alimentos para su posterior absorción [2].

- Adicionalmente, la presencia de probióticos en la flora intestinal puede inducir a que algunas proteínas sufran cambios conformacionales y con ello, activar mecanismos bioquímicos intracelulares que favorecen la producción de mediadores de inflamación, promoviendo la diferenciación celular o apoptosis celular y activar la respuesta inmune frente a cualquier posible infección [3].

- Los mamíferos rumiantes tienen una morfología y una fisiología digestiva muy particular. La capacidad de los rumiantes para aprovechar los carbohidratos fibrosos de la dieta se debe al rumen, al retículo y al omaso, que son los órganos que anteceden el abomaso [4]. El rumen es una cámara de fermentación con ambiente anaeróbico y pH variable que permite una retención alta de partículas largas de

forraje y estimula la rumia y el metabolismo corporal, manteniendo un ambiente apropiado para el crecimiento y reproducción de microorganismos.

Los microorganismos ruminales se ven favorecidos por la ausencia de oxígeno, producto de la hidrólisis de urea, proceso que requiere consumo de oxígeno por parte de las bacterias adheridas en la pared. Estos microorganismos tienen la capacidad de digerir polisacáridos complejos (v.g. celulosa, hemicelulosa, pectina) para producir carbohidratos y también aprovechan el nitrógeno no proteico para la síntesis de aminoácidos y proteínas [5].

10

La alimentación del ganado a base de pastos, provoca que las bacterias presentes en el rumen sean del tipo fibrolítico tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* [5]. En contraste, si el ganado es alimentado con un alto porcentaje de concentrados, se favorece el crecimiento de bacterias acidolácticas tales como *Lactobacillus sp* y *Streptococcus bovis* [6].

15

Al momento de nacer, el tracto gastrointestinal de los terneros es estéril y los microorganismos de la flora intestinal solo son introducidos a partir del contacto con sus madres. Sin embargo, en los nuevos sistemas de producción bovina, los terneros son separados de sus madres al nacer y alimentados con sustitutos de la leche, sin permitirles ni siquiera alimentarse del calostro, lo que altera notablemente el desarrollo de su flora intestinal. En consecuencia, en estos sistemas de producción, la principal causa de enfermedad en terneros hasta los tres meses de vida es la diarrea.

20

Para el tratamiento de la diarrea en bovinos, se pueden utilizar bien sea agentes antibióticos, los cuales pueden generar un fenómeno indeseable de resistencia antimicrobiana, o se pueden emplear productos probióticos a base microorganismos. Algunos productos comerciales de probióticos para ganado como Prokura®, Provita®, BioBoost® y Probios Calf®, contienen microorganismos aerobios no ruminales, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Bacillus subtilis* [7].

25

30

El documento US 3956482 describe una composición de microorganismos ruminales que comprende *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Bacteroides ruminicola* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, los cuales son adaptados en un medio nutritivo y administrados al animal durante las primeras 24 horas y/o en el período comprendido entre 80 y 140 días de nacido.

El documento WO 2012147044 divulga un método para reducir la producción de metano en rumiantes que comprende administrarle una mezcla de cepas de bacterias del género *Propionibacterium* y *Lactobacillus*, preferiblemente *Propionibacterium jensenii* P63, *Lactobacillus plantarum* Lp115 y *Lactobacillus rhamnosus* Lr32. De igual forma, el documento señala que la administración de estos microorganismos también puede estimular el crecimiento del animal.

La publicación “*Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action*” describe los efectos benéficos de la administración de composiciones de microorganismos tales como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* en la alimentación de animales bovinos [8]. Entre los efectos favorables, se mencionan la generación de una microflora intestinal adecuada, la prevención del establecimiento de organismos enteropatógenos y la ganancia diaria de peso.

Con el fin de mejorar la competitividad de los sistemas de lechería y de producción de carne bovina, es necesario desarrollar alternativas funcionales para el tratamiento de las diarreas y el reemplazo de los antibióticos. Indiscutiblemente, una buena alternativa es el desarrollo de productos probióticos que puedan ser administrados a los bovinos para prevenir enfermedades e incrementar la vitalidad.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición microbiana que comprende al menos un microorganismo probiótico seleccionado del grupo que consiste de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, junto con coadyuvantes y un vehículo aceptable. La
5 composición de la invención exhibe una eficacia adecuada en la reducción de incidencia de diarreas y promueve la ganancia de peso en los bovinos neonatos.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10

FIG 1. Corresponde a resultados de la viabilidad Log (UFC/ml) de la composición microbiana del Ejemplo 2 almacenada a 4°C +/- 2°C durante 6 meses. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

15

FIG 2. Corresponde a resultados de la viabilidad Log (UFC/ml) de la composición microbiana del Ejemplo 2 almacenada a 18°C +/- 2°C durante 6 meses. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

20

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Las composiciones microbianas de la invención comprenden al menos un
25 microorganismo probiótico como ingrediente activo, coadyuvantes y un vehículo aceptable. Los microorganismos probióticos de acuerdo a la presente invención, pueden ser, entre otros, bacterias anaerobias facultativas o bacterias anaerobias estrictas. La definición, características y propiedades de cada una de ellas se pueden encontrar detalladamente en el texto *Manual of Determinative Bacteriology* [9] el
30 cual se incorpora en su totalidad como referencia.

- En una modalidad preferida de la invención, las composiciones comprenden, como ingrediente activo, microorganismos anaerobios seleccionados del grupo que consiste de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, los cuáles pueden ser cuantificados, sirviendo como
- 5 unidades de medida, la concentración y viabilidad de los mismos. Preferiblemente, la concentración de cada uno de dichos microorganismos del ingrediente activo de la presente invención está entre 1×10^3 y 1×10^{11} UFC/ml, más preferiblemente entre 1×10^6 y 1×10^{10} UFC/ml, y aún más preferiblemente, 1×10^9 UFC/ml.
- 10 El ingrediente activo puede estar contenido en agua, en un disolvente, en una mezcla de disolventes, en un medio de cultivo líquido, en un liofilizado, en una suspensión acuosa o en una pasta concentrada, bien sea en cantidades iguales o diferentes de cada uno de los microorganismos probióticos.
- 15 Las composiciones de la invención incluyen, además del ingrediente activo, diferentes coadyuvantes con funciones específicas para darle forma y características propias a la presentación final (v.g. formar emulsiones, regular el pH, mejorar la estabilidad y aumentar la vida útil durante el almacenamiento). La concentración del ingrediente activo en las composiciones de la invención está preferiblemente entre
- 20 0,1% y 99,9 % (p/p), más preferiblemente entre 20,0% y 60,0 % (p/p) y aún más preferiblemente, al 40,0% (p/p).
- Como coadyuvantes se incluyen todos aquellos conocidos en el campo técnico, entre los que se pueden mencionar, agua, solventes orgánicos, aceites minerales, aceites
- 25 vegetales tales como aceite de soya, aceite de maíz, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de coco, aceite de germen de trigo y sus mezclas, polisorbatos, polioles, polímeros, lípidos, lípidos saponificables, sustancias de soporte (v.g. caolines, talco, bentonitas, silicatos), diluyentes, agentes emulsionantes, agentes viscosantes, surfactantes, reguladores de pH, estabilizantes y colorantes. La concentración de los
- 30 coadyuvantes en las composiciones de la invención, bien sea de manera individual o en su conjunto, está preferiblemente entre 0,01% y 99,99% (p/p) y más preferiblemente, entre 0,1% y 60,0 % (p/p).

Los agentes emulsionantes incluyen, pero no se limitan a polisorbatos, ésteres de sorbitán, nonifenol, laurilsulfato de sodio y sus mezclas. Los agentes viscosantes incluyen, pero no se limitan a polímeros, gomas, hidrocoloides, sólidos finamente
5 divididos, ceras y sus mezclas. Los agentes reguladores de pH incluyen pero no se limitan a carbonatos, fosfatos, citratos y boratos.

El término “vehículo aceptable” para efectos de la presente invención, se puede definir como una mezcla de sustancias (v.g. disolventes, soluciones, emulsiones y
10 suspensiones) capaces de contener el ingrediente activo y/o los coadyuvantes, sin que se afecte su capacidad para realizar la función deseada.

Las composiciones de la invención pueden ser en forma de polvos, granulado soluble, granulado dispersable, tabletas dispersables, suspensión o emulsión. El
15 término “granulado soluble” se pretende que incluya gránulos para aplicación luego de la disolución del ingrediente activo en agua en forma de solución, conteniendo opcionalmente auxiliares de formulación insolubles. El término “granulado dispersable” se refiere a gránulos para aplicación en forma de suspensión, luego de su desintegración y dispersión en agua u otro solvente acuoso.

20 Para efectos de la presente invención, el término “tableta dispersable” se refiere a una formulación en forma de tabletas para ser usadas individualmente para formar una suspensión del ingrediente activo después de su desintegración en agua. El término “suspensión” se refiere a líquidos que contienen el ingrediente activo y los
25 coadyuvantes suspendidos de manera estable, bien sea para ser aplicado directamente o diluido en agua. El término “emulsión” se pretende que incluya sistemas heterodispersos con diferentes grados de viscosidad, que dan lugar a sistemas líquidos o semisólidos, que pueden ser encapsulados o no, y utilizados para generar formas farmacéuticas sólidas.

30 Para preparar las composiciones de la invención se puede recurrir a cualquier método convencional descrito en el estado de la técnica de acuerdo a la forma farmacéutica

deseada, los cuales se pueden encontrar detalladamente en los textos “Tecnología Farmacéutica industrial” o en “The Science and Practice of Pharmacy”, los cuales se incorporan en su totalidad como referencia [10, 11]. En una modalidad preferida, se puede preparar una composición tipo emulsión mezclando una fase acuosa que
5 contiene el ingrediente activo, con una fase oleosa que contiene agentes emulsificantes. Una vez mezcladas las dos fases, se gasifica la emulsión con CO₂ y se adicionan los reguladores de pH y los agentes estabilizantes.

Para determinar la concentración y/o viabilidad de los microorganismos probióticos
10 presentes en las composiciones de la presente invención, se puede emplear cualquier técnica convencional conocida por un técnico en la materia. Una de ellas, es la técnica denominada “Roll tube” descrita en Rodríguez y cols., [12], la cual es específica para microorganismos anaerobios.

15 En una modalidad preferida, la composición microbiana de la invención está en forma de emulsión, tiene como ingrediente activo microorganismos probióticos anaerobios y coadyuvantes tales como emulsificantes, polímeros y reguladores de pH que mejoran la viabilidad, eficacia y vida útil del producto.

20 En una modalidad aún más preferida, la composición microbiana de la invención es una emulsión agua-aceite (W/O), donde los microorganismos anaerobios se encuentran en la fase acuosa de la emulsión (fase interna), recubiertos por la fase oleosa (fase externa) que les brinda protección frente al oxígeno del medio externo. La fase acuosa de la emulsión es un medio de cultivo adecuado que contiene los
25 microorganismos, en tanto que la fase oleosa de la emulsión puede estar conformada, entre otros, por aceites vegetales, polisorbatos y lípidos saponificables que favorezcan la formación de la emulsión W/O.

El término “medio de cultivo adecuado” de acuerdo a la presente invención, se
30 refiere a cualquier medio de cultivo que contenga las fuentes de nutrientes y oligoelementos necesarios para el crecimiento de los microorganismos anaerobios. En una modalidad preferida, el medio de cultivo adecuado comprende, glucosa,

extracto de levadura, un indicador de anaerobiosis, bicarbonato de sodio, cisteína-HCl, ácidos grasos volátiles, KHPO_4 , KH_2PO_4 , sulfato de amonio, NaCl, MgSO_4 y CaCl_2 en concentraciones entre 0,0001 y 100,0 g/L de cada uno de ellos.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo limitado a los mismos.

EJEMPLOS

10

EJEMPLO 1: Obtención de cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* (B9), *Streptococcus bovis* (C2), *Ruminococcus flavefaciens* (Rf) y *Fibrobacter succinogenes* (Fs) del ingrediente activo de la Composición Microbiana

- 15 Se aislaron bacterias probióticas del rumen de bovinos de razas criollas Colombianas y foráneas y de un herbívoro salvaje. *Butyrivibrio fibrisolvens* (B9) fue aislado de un bovino de la raza Holstein-Friesand, *Streptococcus bovis* (C2) fue aislado de un bovino de la Región del valle del cauca de la raza hartón del valle, *Ruminococcus flavefaciens* (Rf) fue aislado de un bovino de la raza Lucerna y *Fibrobacter*
- 20 *succinogenes* (Fs) fue aislado del ciego de un Chigüiro de la región del Casanare (Colombia). Las cepas se reactivaron en un medio de cultivo rico en celobiosa-glucosa y se incubaron a 39°C durante 3 días.

- Las cepas se encuentran almacenadas en el Banco de Germoplasma de
- 25 Microorganismos con Interés en Nutrición animal de CORPOICA (BGMINA).

EJEMPLO 2. Preparación de una Composición Microbiana tipo emulsión

- Se preparó una composición en forma de emulsión W/O con una mezcla de
- 30 *Butyrivibrio fibrisolvens* (B9), *Streptococcus bovis* (C2), *Ruminococcus flavefaciens* (Rf) y *Fibrobacter succinogenes* (Fs), como ingrediente activo.

Los microorganismos se obtuvieron de acuerdo al Ejemplo 1. Se dispusieron componentes de la fase oleosa (aceite de girasol, polisorbato 20 y lecitina) a una
 5 marmita, se mezcló con ayuda de un homogenizador Dynamic® y se gasificó con CO₂ durante 10 minutos. Después de este tiempo, esta fase oleosa se mezcló con la fase acuosa (medio de cultivo de cada bacteria en relación 1:1) con ayuda de un homogenizador Dynamic® en el máximo nivel de agitación durante 5 minutos. La emulsión formada también se gasificó con CO₂. La Tabla 1 muestra las concentraciones de cada componente.

Tabla 1.

| COMPONENTE | CONCENTRACION (% P/P) |
|--|-----------------------|
| Medio de cultivo con bacterias (1x10 ⁹ UFC/mL) | 40,00 |
| Aceite de girasol | 49,96 |
| Polisorbato 20 | 1,84 |
| Lecitina líquida | 5,95 |
| Hidrocoloide | 1,50 |
| Bicarbonato de sodio | 0,75 |

10

EJEMPLO 3. Determinación de parámetros de calidad de la Composición Microbiana

A una composición microbiana obtenida de acuerdo al Ejemplo 2, se le determinaron
 15 parámetros de calidad tales como concentración (expresada como UFC/mL), pH y contenido de contaminantes.

Para determinar la concentración se tomó 1 ml de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas. A partir de las diluciones 1x10⁻⁷, 1x10⁻⁸ y 1x10⁻⁹, se inocularon
 20 tubos con agar celobiosa fundido. A cada tubo sembrado se le realizó un “Rolling”. Posteriormente, se dejó en incubación por 72 horas a una temperatura de 39°C y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Para evaluar el pH se utilizó un analizador electroquímico Consort C931®, previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7.

- Para establecer el contenido de contaminantes se tomó 1 ml de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-2}) en solución salina al 4%. Posteriormente, 0,1 ml de la dilución 1×10^{-2} se inocularon en cajas de Petri con medio Agar
- 5 Nutritivo durante 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para determinar las bacterias aerobias presentes y en medio PDA por 7 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y determinar los mohos filamentosos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

| Composición Microbiana | Concentración (UFC/mL) | pH | Contenido de contaminantes | |
|------------------------|------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Bacterias aerobias (UFC/mL) | Mohos filamentosos (UFC/mL) |
| Muestra 1 | $1,0 \times 10^9$ | 7,16 | $< 10^3$ | $< 10^3$ |
| Muestra 2 | $3,2 \times 10^9$ | 7,20 | $< 10^3$ | $< 10^3$ |
| Muestra 3 | $2,30 \times 10^9$ | 7,20 | $< 10^3$ | $< 10^3$ |

10

Ejemplo 4. Ensayo de Estabilidad de la Composición Microbiana.

- A una composición microbiana obtenida de acuerdo al Ejemplo 2, se le determinó su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento. Las muestras fueron almacenadas a una Temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T1) y de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T2), durante 6 meses. Para
- 15 llevar a cabo el ensayo, se envasaron 12 ml de la composición microbiana en una jeringa dosificadora de polipropileno de alta densidad, las cuales correspondieron a la unidad experimental de cada tratamiento.

- 20 El estudio de estabilidad contó con un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados del estudio de estabilidad fueron sometidos a un análisis de varianza y posteriormente a comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (95%).

25

En el tiempo cero y después de seis meses de almacenamiento, se tomaron tres muestras de cada tratamiento y se evaluó su viabilidad, la contaminación (bacterias aerobias y mohos) y el pH de acuerdo al Ejemplo 3. En la tabla 3 se presentan los valores de pH obtenidos en las tres muestras evaluadas a cada temperatura, los cuales se encuentran cercanos a 7,0. [10].

10

Tabla 3.

| MUESTRA | pH | |
|---------|----------------|-----------------|
| | (T1) 4°C ± 2°C | (T2) 18°C ± 2°C |
| 1 | 7,33 | 7,57 |
| 2 | 7,32 | 7,65 |
| 3 | 7,31 | 7,72 |

Los resultados de viabilidad obtenidos para cada uno de los tratamientos se ilustran en la FIG 1 y en la FIG 2. En la FIG 1 se observan los resultados de los tratamientos almacenados a 4°C, donde se evidencia que después de 6 meses de almacenamiento se presentó una reducción significativa de la viabilidad con respecto al tiempo cero. Sin embargo, la concentración de los microorganismos no es inferior a 1×10^8 (Figura 1).

La viabilidad a 18°C también se redujo significativamente después de 6 meses de almacenamiento, pero tampoco fue inferior a 1×10^8 (Figura 2). A las dos temperaturas de almacenamiento evaluadas, la reducción en la viabilidad de los microorganismos fue de 1 Logaritmo después de los 6 meses de almacenamiento.

Inicialmente, en el tiempo cero, el contenido de bacterias aerobias y de hongos fue inferior a 10^3 UFC/mL para todos los tratamientos. Después de 2 meses de almacenamiento, a las dos temperaturas evaluadas, los tratamientos almacenados a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ presentaron un contenido de bacterias aerobias contaminantes y hongos inferior a 1×10^4 UFC/mL. De igual manera a temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se encontró que el contenido de contaminantes fúngicos y bacterias se mantienen en un rango de 1×10^4 UFC/mL. En ninguno se encontró presencia de bacterias patógenas.

Ejemplo 4. Ensayo de actividad biológica de la Composición Microbiana bajo condiciones de campo

Ciento ochenta (180) terneras fueron asignadas al momento de su nacimiento de manera aleatoria a tres grupos experimentales:

- Grupo 1: Administración de composición microbiana fresca.
- Grupo 2: Administración de composición microbiana almacenada durante 6 meses.
- Grupo Control: No se le administró composición microbiana.

En un diseño completo al azar con un factorial 3×2 , se analizaron 2 variables: incidencia de diarrea y ganancia de peso corporal. Cada ternera de los grupos 1 y 2 recibió 12 dosis de 10 mL/día por vía oral de una composición microbiana según el Ejemplo 3. La composición microbiana se administró durante 10 días consecutivos, iniciando el día del nacimiento (D1), en tanto que las siguientes dos dosis se suministraron a los 15 y 30 días (D15 y D30).

Se determinó la ganancia de peso de las terneras mediante pesaje mensual con báscula electrónica, iniciando desde el D1 hasta los tres meses de edad. La presencia de diarreas se determinó por observación directa en cada animal y se registró la frecuencia. La composición microbiana ensayada demostró que reduce la incidencia

de diarreas y aumenta la ganancia de peso corporal en los animales evaluados. Los Resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

| Tratamiento | Peso promedio al destete (Kg) | Ganancia de Peso (g) | Promedio de Episodios de Diarreas/Animal | Significancia |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---|----------------------|
| Grupo 1 | 112 | 800-900 | 2 | P < 0.01 |
| Grupo 2 | 105 | 800-900 | 2 | P < 0.01 |
| Control | 99 | 500-600 | 7 | P < 0.01 |

REFERENCIAS

1. Hume, M.E. 2011. Food safety symposium: Potential impact of reduced antibiotic use and the roles of prebiotics, probiotics, and other alternatives in antibiotic-free broiler production. Historic perspectives: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poultry Science. 90: 2663-2669.
2. Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Signorini, M.L. 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. Animal Feed Science and Technology. 169: 147-156.
3. Patel, S. Shukla, R., Goyal, A. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. Journal of functional foods. 14: 549-561.
4. Lean, I.J., Golder, H.M., Hall, M.B. 2014. Feeding, evaluating, and controlling rumen function. Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice. 30: 539-575.
5. Ospina, C.A. y F. Rodríguez. 2011. El ecosistema ruminal y los microorganismos con potencial probiótico. Pp. 41-59. En: Desarrollo de Probióticos para Ganaderías Productoras de Leche. F. Rodríguez y F.O. Carvajal. (Eds.). Bogotá, Produmedios. 98 p.
6. Minuti, A., Ahmed, S., Trevisi, E., Piccioli-Cappelli, F., Bertoni, G., Jahan, N., Bani, P. 2014. Experimental acute rumen acidosis in sheep: Consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. Journal of Animal Science. 92: 3966-3977.

7. Callaway, T., Carr, M.A., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years. *Current issues in molecular biology*. 11: 67-80.
- 5 8. Krehbiel, C.R., Rust, S.R., Zhang, G., Guilliland, S.E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *Journal of Animal Science* (E. Suppl.2): E120-E132.
9. Bergey D. et al, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, novena edición, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- 10 10. Salarzar, R. 2003. *Tecnología Farmacéutica industrial*. Tomo I y II. Fabricación industrial. Editorial Síntesis. Impreso en España. 1260 p.
- 15 11. REMINGTON, Joseph Price. *Remington: The science and practice of pharmacy*. 21th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA. 2006
12. Rodríguez, F., Martín, E., Laverde, C., Mayorga, O.L., Carvajal, F., Rodríguez, T.A., Rodríguez, J.A. 2011. *Manual de Laboratorio para el Estudio de Microorganismos Anaerobios Obligados*. Produmedios. 36 p.
- 20

Page intentionally left blank

REIVINDICACIONES

- 1) Una composición microbiana que comprende, como ingrediente activo, al menos un microorganismo probiótico seleccionado del grupo que consiste de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus Flavefaciens*, *Streptococcus bovis* y *Butytrivibrio fibrisolvens*, junto con coadyuvantes y un vehículo aceptable.
- 2) Una composición microbiana según la Reivindicación 1, donde la concentración del ingrediente activo en la composición está entre 10,0% y 70,0 % (p/p).
- 3) Una composición microbiana según la Reivindicación 1, donde la concentración de cada uno de los microorganismos del ingrediente activo está entre 1×10^6 y 1×10^{10} UFC/mL.
- 4) Una composición microbiana según la Reivindicación 1, en forma de polvo, granulado soluble, granulado dispersable, tabletas dispersables, encapsulados, emulsión o suspensión.
- 5) Una composición microbiana según la Reivindicación 1, en forma de emulsión W/O que comprende una fase acuosa, una fase oleosa, emulsificantes, viscosantes y reguladores de pH.
- 6) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, donde la fase oleosa incluye aceites de origen vegetal.
- 7) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, donde el aceite de origen vegetal se selecciona del grupo que consiste de aceite de girasol, aceite de soya, aceite de maíz, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de coco, aceite de germen de trigo y mezclas de los mismos.

- 8) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, donde el agente emulsificante se selecciona del grupo que consiste de lecitina, polisorbatos, ésteres de sorbitán, nonifenol, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos.
- 5 9) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, donde el agente regulador de pH se selecciona del grupo que consiste de fosfatos, citratos, boratos y carbonatos.
- 10 10) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, donde el agente viscosante se selecciona del grupo que consiste de polímeros, gomas, hidrocoloides, sólidos finamente divididos, ceras y mezclas de los mismos.
- 11) Una composición microbiana según la Reivindicación 5, que tiene la siguiente composición:

15

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN (%) |
|---|-------------------|
| Medio de cultivo adecuado que comprende microorganismos probióticos | 40,00 |
| Aceite de girasol | 49,96 |
| Polisorbato 20 | 1,84 |
| Lecitina líquida | 5,95 |
| Hidrocoloide | 1,50 |
| Bicarbonato de sodio | 0,75 |

- 12) Una composición microbiana según la Reivindicación 11, donde el medio de cultivo adecuado que comprende microorganismos probióticos tiene la
- 20 siguiente composición:

| Componente | Concentración (g/L) |
|---|---|
| Microorganismos anaerobios (<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus Flavefaciens</i> , <i>Streptococcus bovis</i> y <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>) | 1×10^6 - 1×10^{10} UFC/mL |
| Glucosa | 2,0 - 40,0 |
| Extracto de levadura | 2,0 - 5,0 |
| Indicador de Anaerobiosis | 0,5 – 2,0 |
| Bicarbonato de Sodio | 3,0 - 10,0 |
| Cisteína-HCl | 0,5 – 3,0 |
| Ácidos grasos volátiles | 0,2 – 0,6 |
| KHPO ₄ | 0,003 - 0,005 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 - 5,0 |
| Sulfato de amonio | 4,0 - 8,0 |
| NaCl | 4,0 - 6,0 |
| MgSO ₄ | 3,50 - 5,00 |
| CaCl ₂ | 0,5 - 1,0 |

- 13) Una composición microbiana según la Reivindicación 1, para prevenir diarreas neonatales e incrementar la ganancia de peso corporal en terneros.
- 5 14) Uso de una composición según la Reivindicación 1, para prevenir diarreas neonatales e incrementar la ganancia de peso corporal en terneros.

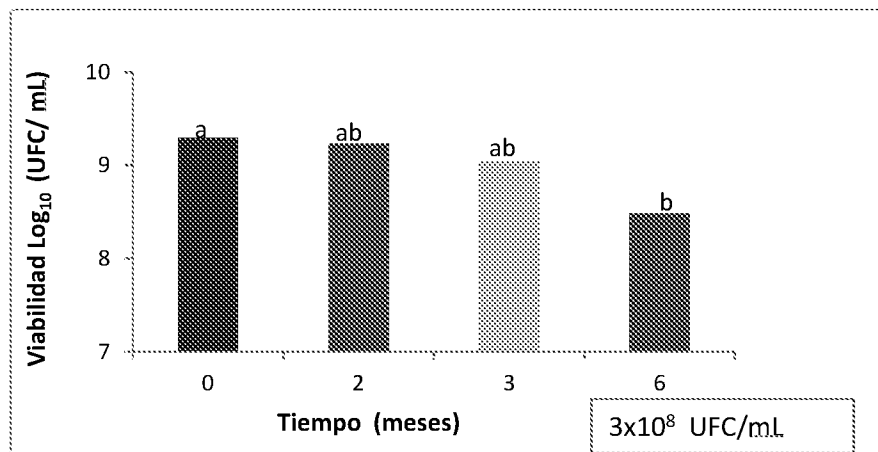
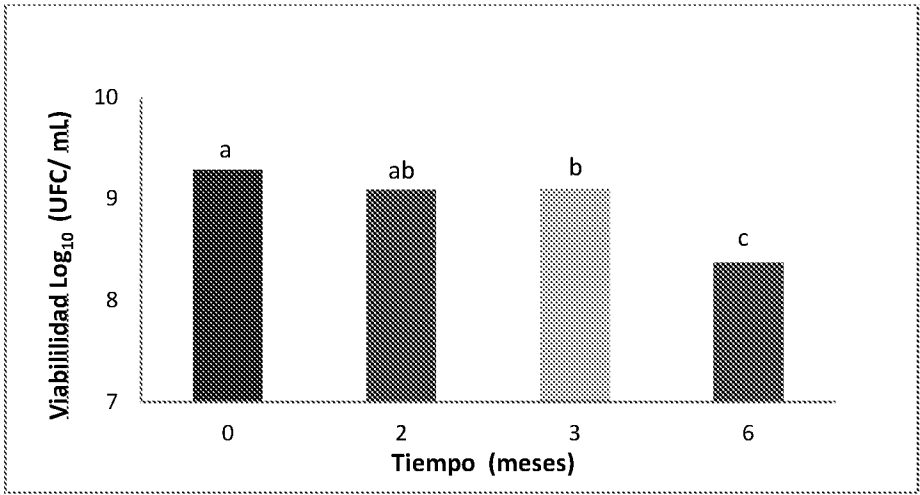
FIGURAS**FIG 1**

FIG 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2015/056033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K10/18 (2016.01)

A23K50/10 (2016.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS, BD-TXTE, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | YORGUIN LEONEL VILLARREAL SOLANO QUIM. Estudio de la estabilidad para la selección de una formulación de un producto probiótico. Tesis doctoral. 2013. Universidad Nacional de Colombia. http://www.bdigital.unal.edu.co/39572/1/1192597_2013.pdf abstract, paragraphs 3.2, 3.3.1, table 3-1 | 1-11, 13, 14 |
| X | OHYA, T. et al. Use of a trial probiotic product in calves experimentally infected with <i>Escherichia coli</i> O157. JARQ 35 2001 (3), pages 189-194. | 1, 3, 4, 13,14 |
| X | US 3956482 A (HAHN PETER A et al.) 11/05/1976, claims 1 and 2; column 14, line 1-column 15, line 45. | 1- 4, 13 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. | |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means. | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "&" document member of the same patent family |

Date of the actual completion of the international search
17/02/2016

Date of mailing of the international search report
(22/02/2016)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Polo Diez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495524

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2015/056033

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category * | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | RU 2003122575 A 20/02/2005, Abstract from DataBase WPI. Retrieved from EPOQUE. [on line] [retrieved 17/02/2016] | 1, 4, 13 |
| A | US 2013115328 A1 (MUSTAPHA AZLIN et al.) 09/05/2013, paragraphs 6, 28, examples 3 and 4 | 1-14 |
| A | VARGAS, E.M. et al. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte). Revista of Ingeniería, 2004, vol. 20, pages 23-33. | 1-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2015/056033

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 relates to a subject matter that is considered by this International Searching Authority to be affected by PCT Rule 67.1(iv), concerning a method for treatment of the human or animal body by therapy. Nevertheless, the search in respect of this claim has been carried out on the basis of the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(see additional sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The multiple compositions claimed in claim 1 (containing one, two, three or four of the cited microorganisms) share no common technical features, since they relate to microorganisms of different genera and species.

The application contains at least five inventions: four corresponding to the compositions with the four microorganisms separately, and one corresponding to the mixture of the four.

- Invention 1 (claims 1-11, 13 and 14 in part): Microbial composition comprising, as an active ingredient, the *Fibrobacter succinogenes* microorganism with an adjuvant and a suitable carrier, and use thereof in diarrhoea prevention.
- Invention 2 (claims 1-11, 13 and 14 in part): Microbial composition comprising, as an active ingredient, the *Ruminococcus flavefaciens* microorganism with an adjuvant and a suitable carrier, and use thereof in diarrhoea prevention.
- Invention 3 (claims 1-11, 13 and 14 in part): Microbial composition comprising, as an active ingredient, the *Streptococcus bovis* microorganism with an adjuvant and a suitable carrier, and use thereof in diarrhoea prevention.
- Invention 4 (claims 1-11, 13 and 14 in part): Microbial composition comprising, as an active ingredient, the *Butyrivibrio fibrisolvens* microorganism with an adjuvant and a suitable carrier, and use thereof in diarrhoea prevention.
- Invention 5 (claim 12): Microbial composition comprising the four microorganisms of the preceding inventions and other ingredients as outlined in claim 12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/IB2015/056033

| Patent document cited in the search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| US3956482 A | 11.05.1976 | SE393517 B SE7403150 A NL7403921 A GB1471373 A FR2233942 A1 DK338474 A DE2425929 A1 AU6692174 A | 27.12.1974 27.12.1974 30.12.1974 27.04.1977 17.01.1975 10.02.1975 30.01.1975 25.09.1975 |
| ----- RU2003122575 A | ----- 20.02.2005 | ----- RU2260043 C2 | ----- 10.09.2005 |
| ----- US2013115328 A1 | ----- 09.05.2013 | ----- NONE | ----- ----- |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/IB2015/056033

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23K10/18 (2016.01)

A23K50/10 (2016.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS, BD-TXTE, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|---|--|
| X | YORGUIN LEONEL VILLARREAL SOLANO QUIM. Estudio de la estabilidad para la selección de una formulación de un producto probiótico. Tesis doctoral. 2013. Universidad Nacional de Colombia. http://www.bdigital.unal.edu.co/39572/1/1192597.2013.pdf resumen, apartados 3.2, 3.3.1, tabla 3-1 | 1-11, 13, 14 |
| X | OHYA, T. et al. Use of a trial probiotic product in calves experimentally infected with <i>Escherichia coli</i> O157. JARQ 35 2001 (3), páginas 189-194. | 1, 3, 4, 13,14 |
| X | US 3956482 A (HAHN PETER A et al.) 11/05/1976, reivindicaciones 1 y 2; columna 14, línea 1-columna 15, línea 45. | 1- 4, 13 |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

| | |
|--|--|
| * Categorías especiales de documentos citados: | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes. |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. | |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. | |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/02/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de febrero de 2016 (22/02/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Polo Díez
Nº de teléfono 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/IB2015/056033

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
|--|---|--|
| Categoría * | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones n° |
| X | RU 2003122575 A 20/02/2005, Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE. [en línea] [recuperado 17/02/2016] | 1, 4, 13 |
| A | US 2013115328 A1 (MUSTAPHA AZLIN et al.) 09/05/2013, párrafos 6, 28, ejemplos 3 y 4 | 1-14 |
| A | VARGAS, E.M. et al. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte). Revista de Ingeniería, 2004, vol. 20, páginas 23-33. | 1-14 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/IB2015/056033

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: **14**
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

La reivindicación 14 se refiere a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para esta reivindicación basada en los efectos atribuidos a la composición.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

(ver hoja adicional)

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

HOJA ADICIONAL DE REC. III

Las múltiples composiciones reivindicadas en la reivindicación 1 (conteniendo uno, dos, tres o cuatro de los microorganismos citados) no presentan elementos técnicos comunes, ya que se trata de microorganismos de distinto género y especie.

La solicitud contiene, al menos, 5 invenciones: 4 que corresponden a las composiciones con los 4 microorganismos por separado y una que corresponde a la mezcla de los cuatro.

- Invención 1 (reivindicaciones 1-11, 13 y 14 parcialmente): Composición microbiana que comprende como ingrediente activo el microorganismo *Fibrinobacter succinogenes* con un coadyuvante y un vehículo aceptable y su uso para prevenir la diarrea.
- Invención 2 (reivindicaciones 1-11, 13 y 14 parcialmente): Composición microbiana que comprende como ingrediente activo el microorganismo *Ruminococcus flavefaciens* con un coadyuvante y un vehículo aceptable y su uso para prevenir la diarrea.
- Invención 3 (reivindicaciones 1-11, 13 y 14 parcialmente): Composición microbiana que comprende como ingrediente activo el microorganismo *Streptococcus bovis* con un coadyuvante y un vehículo aceptable y su uso para prevenir la diarrea.
- Invención 4 (reivindicaciones 1-11, 13 y 14 parcialmente): Composición microbiana que comprende como ingrediente activo el microorganismo *Butyrivibrio fibrisolvens* con un coadyuvante u un vehículo aceptable y su uso para prevenir la diarrea.
- Invención 5 (reivindicación 12): Composición microbiana que comprende los cuatro microorganismos de las invenciones anteriores y los demás ingredientes que detalla la reivindicación 12.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/IB2015/056033

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de Publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de Publicación |
|--|-------------------------|--|--|
| US3956482 A | 11.05.1976 | SE393517 B SE7403150 A NL7403921 A GB1471373 A FR2233942 A1 DK338474 A DE2425929 A1 AU6692174 A | 27.12.1974 27.12.1974 30.12.1974 27.04.1977 17.01.1975 10.02.1975 30.01.1975 25.09.1975 |
| ----- RU2003122575 A | ----- 20.02.2005 | ----- RU2260043 C2 | ----- 10.09.2005 |
| ----- US2013115328 A1 | ----- 09.05.2013 | ----- NINGUNO | ----- ----- |