(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 651**

(21) Número de solicitud: 200603055

(51) Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **29.11.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2009**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.11.2009**

(71) Solicitante/s:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Mayo Pérez, Baltasar;**
Flórez García, Ana Belén y
Delgado Palacio, Susana

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Cepa probiótica resistente a antibióticos, producto probiótico que la contiene y sus aplicaciones.**

(57) Resumen:
Cepa probiótica resistente a antibióticos, producto probiótico que la contiene y sus aplicaciones.
La presente invención describe una cepa probiótica resistente a antibióticos aislada del tracto intestinal humano y que presenta una resistencia intrínseca y no transmisible a antibióticos del tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, (fenotipo MLS) porque presenta una mutación de transición de A a G en la posición 2058 (según la numeración del gen 23S de *E. coli*), en la secuencia del gen ARNr 23S.

ES 2 328 651 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa probiótica resistente a antibióticos, producto probiótico que la contiene y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención está relacionada con el sector de la industria agroalimentaria y de la biomedicina y, más concretamente, con la utilización de microorganismos probióticos.

Estado de la técnica

Los alimentos funcionales son alimentos modificados o ingredientes alimentarios que proveen un beneficio para la salud además de satisfacer los requerimientos nutritivos tradicionales, dentro de los cuales se encuentran los probióticos y prebióticos.

Los probióticos son un preparado o producto que contiene microorganismos definidos, viables y en número suficiente para modificar la microbiota de un ecosistema del hospedador ejerciendo como consecuencia efectos beneficiosos sobre la salud (Schrezenmeir J, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics; approaching a definition. Am J Clin Nutr 73 (2 Suppl): 361S-364S.). Son muchos los efectos beneficiosos sobre la salud de los microorganismos probióticos que están bien documentados científicamente (Marteau P, Seksik P, Jian R. 2002. Probiotics and health: new facts and ideas. Curr Opin Biotechnol 13: 486-489; Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 82: 279-289). Entre los principales podemos citar su contribución metabólica, la inhibición de patógenos y la inmunomodulación.

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no asimilables por nuestro organismo que promueven la proliferación selectiva de bacterias intestinales beneficiosas entre los que podemos destacar fructooligosacáridos, inulina, lactulosa y galactooligosacáridos.

En la actualidad existe en el mercado una importante y variada oferta de productos suplementados con prebióticos y/o prebióticos. El principal vehículo de administración de éstos son los productos lácteos, especialmente las leches fermentadas, aunque se pueden encontrar en muchos otros productos como helados, quesos, embutidos, zumos e incluso bizcochos, chocolate o cereales.

El espectro de microorganismos utilizados como probióticos en humanos es muy amplio e incluye especies de muchos géneros diferentes como *Lactobacillus, Bifidobacterium, Propionibacterium, Bacillus, Escherichia, Enterococcus, Streptococcus* y algunas levaduras del género *Saccharomyces*. En la Tabla 1 se muestran algunos de los microorganismos empleados de forma habitual como probióticos. Los más utilizados pertenecen al grupo de las Bacterias del Ácido Láctico (BAL), incluyendo en un sentido amplio a las bifidobacterias.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Lactobacilos	Bifidobacterias	Otras BAL	No BAL
Lactobacillus johnsonii (NCC 533)	Bifidobacterium bifidum	Enterococcus faecium	Propionibacerium freudenreichii
Lactobacillus casei (Shirota)	Bifidobacterium breve	Streptococcus thermophilus	Escherichia coli (Nissle)
Lactobacillus delbrueckii	Bifidobacterium longum		Bacillus cereus (Toyoi)
Lactobacillus rhamnosus (GG)	Bifidobacterium lactis (Bb 12)		Saccharomyces cerevisiae (Boulardii)
Lactobacillus reuteri	Bifidobacterium adolescentis		
Lactobacillus plantarum (299v)			
Lactobacillus gasseri			

Compilado de Collins y cols. (1998), Fooks y cols. (1999) y Salminen (2001).

Las BAL, ya mencionadas en los postulados de Metchnikoff (1907), son miembros habituales de la microbiota intestinal normal del hombre y de otros muchos animales. Además, forman parte de la dieta a través de diversos productos fermentados, entre los que se incluyen muchos productos lácteos. Por estas razones poseen un privilegiado status de microorganismos saludables (GRAS, "Generally Regarded As Safe") y sus efectos positivos sobre la salud se admiten de un modo generalizado. La utilización de las BAL como probióticos se remonta a principios del siglo XX. Desde entonces, ha aparecido un interés creciente por productos probióticos elaborados con estos microorganismos, sobre todo de los géneros Lactobacillus y Bifidobacterium.

La utilización de especies seleccionadas de lactobacilos como cultivo iniciador industrial en las fermentaciones de alimentos para el hombre y otros animales tiene una larga tradición (Bernardeau, M., M. Gueguen, and P. Vernoux. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol. Rev. 30:487-513.). Además, aunque no son microorganismos mayoritarios en el intestino humano, se cree que las bifidobacterias y los lactobacilos tienen un papel importante en el mantenimiento del equilibrio microbiano intestinal necesario para la salud (Vaughan, E. E., M.-C. de Vries, E. G. Zoetendal, K. Ben-Amor, A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos. 2002. The intestinal LABs. Antonie van Leeuwenhoek 82:341-352). De esta forma, bacterias seleccionadas de estos tipos se incluyen en diversos alimentos y otros preparados farmacéuticos para mantener este equilibrio, o para restaurarlo cuando se rompe (infección intestinal, tratamiento prolongado con antibióticos, etc.), ejercitando una serie de acciones beneficiosas, incluyendo la inhibición de patógenos, la mejora de la tolerancia a la lactosa, el disparo de la respuesta inmune y la bajada de los niveles de colesterol. Otros beneficios podrían derivarse de sus posibles efectos anticarcinogénicos y antimutagénicos (Antonie van Leeuwenhoek 82:279-289; Sanders, M. E. 2003. Probiotics: considerations for human health. Nutr. Rev. 61:91-99).

Los lactobacilos es un género muy amplio en el que se incluyen más de 100 especies con propiedades heterogéneas. Desde el punto de vista fenotípico y atendiendo a sus características metabólicas se pueden clasificar en tres grupos en función de la presencia o ausencia de los enzimas fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfocetolasa siendo homofermentadores estrictos, heterofermentadores estrictos y facultativos.

Los lactobacilos se encuentran presentes en una amplia variedad de nichos ecológicos, siempre que en ellos exista abundante fuente de carbohidratos hidrosolubles, productos de degradación de proteínas, vitaminas y una tensión de oxígeno reducida. Se pueden encontrar en hábitats tan variados como la leche y sus derivados, vegetales frescos y fermentados, carne y sus derivados, pescados, panes ácidos, bebidas fermentadas y formando parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria del hombre y los animales. En general, los lactobacilos son las Bacterias del Ácido Láctico que mejor toleran la acidez y muchas de sus especies se utilizan habitualmente en la industria alimentaria.

La capacidad de las bacterias para sobrevivir y crecer en un nicho microbiológico depende de las condiciones biológicas y físico-químicas del ecosistema en particular. En el caso de las bacterias intestinales, y en concreto de los probióticos, para mantener la viabilidad en el ambiente del Tracto gastrointestinal (TGI) han de ser resistentes a la acidez estomacal y a la presencia de sales biliares intestinales que tienen una importante actividad antibacteriana. Además, han de ser capaces de colonizar la mucosa intestinal, y competir por espacio y nutrientes con otros muchos microorganismos. A esta competencia contribuyen la capacidad de adhesión al epitelio intestinal y la facultad para producir sustancias antimicrobianas. Además, es deseable que las cepas a utilizar sean de origen humano y estén libres de factores de patogenicidad.

Por otro lado, la hipótesis del reservorio de genes de resistencia sugiere que las poblaciones comensales y beneficiosas de los alimentos y el tracto gastrointestinal (TGI) del hombre y los animales puede jugar un papel destacado en la transferencia de las resistencias a antibióticos a los microorganismos patógenos (Salyers, A. A., A. Gupta, and Y. Wang. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics resistance genes. Trends Microbiol. 12:412-416). Para reducir la diseminación de estas resistencias, es importante una utilización racional de los antibióticos y también el análisis de resistencia a antibióticos en bacterias que se utilizarán en sistemas alimentarios (European Commission. 2005. Opinion of the FEEDAP Panel on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA J. 223:1-12). La distinción entre resistencias intrínsecas y adquiridas es esencial y en el caso de las resistencias adquiridas es muy importante distinguir entre las debidas a mutaciones cromosómicas y aquellas causadas por la adquisición horizontal de genes, puesto que sólo estas resistencias tienen un algo riesgo de transmisión (Normark, B. H., Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. J. Intern. Med. 252:91-106).

La eritromicina y otros antibióticos macrólidos son la mejor alternativa para el tratamiento de las infecciones en los pacientes alérgicos a la penicilina. Sin embargo, la eficacia de estos antibióticos se ve frenada por la extendida diseminación de resistencias. La resistencia a antibióticos del tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (fenotipo MLS) se debe, de forma frecuente, a la presencia de sistemas de bombeo del antibiótico fuera de las células, a metilasas, enzimas inactivantes de los antibióticos, etc., sistemas para los que se han caracterizado más de 40 genes. Sin embargo, la resistencia puede deberse también a mutaciones en proteínas ribosomales (como L4 y L22) o a mutaciones en el gen que codifica la propia molécula del ARNr 23S (Leclercq, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis. 34:482-492). De hecho, mutaciones cromosomales que alteran la unión de la eritromicina a su sitio de unión al ribosoma en el dominio V del ARNr 23S (en la posición 2058, siguiendo la numeración de *Escherichia coli*, o en sitios adyacentes) se han demostrado en una serie de aislados clínicos, incluyendo cepas de *Mycoplasma* spp. (Meier *et al*., 1994; Lucier *et al*., 1995), *Helicobacter pylori* (Versalovic *et al*., 1996), *Propionibacterium* spp. (Ross *et al*., 1997), y *Bordetella pertussis* (Bartkus *et al*., 2003), entre otras.

En este sentido, y para salvaguardar el efecto de los antibióticos sobre las cepas probióticas que se usan en la industria alimentaria se han planteado el desarrollo de preparaciones farmacéuticas en forma de cápsulas (Microencapsulated lactobacilli for medical applications. WO 96/38159) que las protejan de dicho efecto o se ha pretendido utilizar el uso de cepas bacterianas poco sensibles a antibióticos escasamente caracterizadas (Strain of bacteria *Lactobacillus rhamnosus* L2l for the preparation of the biologically active additives, which regulate microflora of bowels in the children of early age. RU20010135344, Korshunov VM) aunque no se han conocido por el momento sus aplicaciones reales.

En este sentido, no se han identificado hasta la fecha cepas probióticas, o más preferentemente lactobacilos, que presenten determinadas resistencias a antibióticos bien caracterizadas, no transmisibles, y que pudieran ser utilizadas como alimentos funcionales, preferentemente en personas en tratamiento con antibióticos.

Descripción

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye una cepa probiótica resistente a antibióticos, en adelante cepa probiótica de la invención, aislada del tracto intestinal humano y que presenta una resistencia intrínseca y no transmisible a antibióticos del tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (fenotipo MLS) porque presenta una mutación de

transición de A a G en la posición 2058 (según la numeración del gen 23S de *E. coli*), en la secuencia del gen ARNr 23S.

Una realización particular de la invención lo constituye la cepa probiótica de la invención constituida por la cepa *Lactobacillus rhamnosus* E41, depositada en la colección de cultivos DMSZ-Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMS) con el número de acceso DSM 18791.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la cepa probiótica de la invención, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un producto probiótico.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un producto probiótico que comprende la cepa probiótica de la invención y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: una composición alimentaria y alimento funcional.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han aislado e identificado una nueva cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus*, cepa *L. rhamnosus* E41, procedente de la flora intestinal normal de individuos sanos, que es resistente a antibióticos del tipo macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) y estreptograminas (fenotipo MLS) y, más concretamente, han identificado la causa de dicha resistencia: una mutación puntual de transición (A-a-G) en la posición 2058 (referida a la numeración del gen de *Escherichia coli*) tras el análisis de restricción y secuenciación de un amplicón de AND obtenido por PCR del gen que codifica el ARNr 23S (Ejemplo 1, SEQ ID NO3). Esta cepa constituye la primera descripción de una mutación de ese tipo en bacterias del ácido láctico. Por otro lado, la cepa se mostró heterocigótica, incluyendo copias del gen original y mutado, constituyéndose como la primera descripción de una mutación de este tipo en una bacteria del grupo de las Bacterias de Ácido Láctico. Además, dado que este tipo de resistencia adquirida no presenta riesgo de diseminación horizontal a otras colonias de bacterias presentes en el tracto intestinal humano convierte a la cepa aceptable para su utilización tecnológica o para su uso como probiótico.

Los macrólidos, cetólidos y estreptograminas (fenotipo MLS) son tres familias de antibióticos de estructura química muy diferente que comparten el mismo mecanismo de acción. Los tres se unen a distintas bases del centro peptidil transferasa del ARNr 23S. Su espectro antibacteriano es prácticamente superponible; sin embargo, desigualdades en la afinidad y/o el número de lugares de unión determinan diferencias en la intensidad del efecto antibacteriano (bacteriostático/bactericida) y en la actividad frente a cepas con mecanismos de resistencia adquiridos. Son activos frente a la mayoría de microorganismos grampositivos y muchos microorganismos de crecimiento intracelular. En nuestro país, durante los últimos 5 años, el porcentaje de cepas de neumococo y *Streptococcus pyogenes* resistentes a los macrólidos ha aumentado sensiblemente. Telitromicina (cetólido) y Synercid (estreptogramina) mantienen la actividad frente a estas cepas. Desde el surgimiento de la familia de los macrólidos (compuestos constituidos por un anillo de lactosa macrocíclico formado por muchos miembros, al que se van a unir uno o más desoxiazúcares) con el descubrimiento de la eritromicina, se han venido sumando a este grupo nuevos compuestos, hasta contar en la actualidad con más de 10 productos en el mercado. No obstante, los más representativos por su efectividad, costos y dosis lo constituyen la claritromicina, la azitromicina y la roxitromicina. Tal como se utiliza en la presente invención el término "macrólido" se refiere, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a los siguientes antibióticos: eritromicina, oleandomicina, espiromicina, josamicina, diritromicina, fluritromicina, claritromicina, midecamicina, telitromicina y azitromicina; o futuros miembros de esta familia.

Por otro lado, el grupo de antibióticos "lincosamida" tal como se utiliza en la presente invención incluye a la lincomicina (antibiótico aislado a partir de una cepa de *Streptomyces lincolnensis* en 1962) y a la clindamicina (de mejor biodisponibilidad y actividad antimicrobiana, por lo que es en la actualidad la única lincosamida de que disponemos en la práctica clínica). Finalmente, las estreptograminas, es un modelo de antibiótico compuesta por la asociación de dos sustancias químicamente no relacionadas, quinupristina (estreptogramina A) y dalfopristina (estreptogramina B), que actúan de forma sinérgica.

De esta forma la cepa *L. rhamnosus* E41 puede usarse como probiótico, preferentemente, en personas sujetas a tratamiento, preferentemente continuado, con estos antibióticos, puesto que dicha cepa presenta además las características de probiosis "*in vitro*" más importantes (resistencia al ácido, resistencia a sales biliares, inhibición de patógenos intestinales, unión a células intestinales, etc.) y la ausencia de características no deseables (ciertas actividades enzimáticas, presencia de resistencias a antibióticos transmisibles, etc.) (Ejemplo 1).

Por otro lado, el aislamiento de otras cepas BAL merced a la información descrita en la presente invención puede ser utilizada y llevada a cabo por un experto en la materia fácilmente, ampliando de esa manera las cepas con estas mismas características que pueden utilizarse comercialmente y que forman parte de la presente invención.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye una cepa probiótica resistente a antibióticos, en adelante cepa probiótica de la invención, aislada del tracto intestinal humano y que presenta una resistencia intrínseca y no transmisible a antibióticos del tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (fenotipo MLS) porque presenta una mutación de transición de A a G en la posición 2058 (según la numeración del gen 23S de *E. coli*), en la secuencia del gen ARNr 23S.

Un objeto particular de la invención lo constituye la cepa probiótica de la invención en el que dicha cepa probiótica es una cepa tipo Bacteria del Acido Láctico (SAL), preferentemente perteneciente a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y más preferente a la especie *Lactobacillus rhamnosus*.

Una realización particular de la invención lo constituye la cepa probiótica de la invención constituida por la cepa *Lactobacillus rhamnosus* E41, depositada en la colección de cultivos DMSZ-Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMS) con el número de acceso DSM 18791.

La cepa probiótica de la invención puede ser utilizada para la elaboración de una composición alimentaria o terapéutica útil, ya sea como forma liofilizada o en forma de cápsulas, entre otros formatos.

Por otro lado, la cepa probiótica de la invención puede ser utilizada como aditivo o agente alimentario para la elaboración de diversos productos alimentarios: leches fermentadas incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos, para consumo directo o procesamiento ulterior, distintos tipos de quesos: frescos, duros, helados, productos de la industria de la bebida tales como zumos o de la pastelería, alimentos para niños tales como papillas productos promotores de la salud productos naturales, etc. En el contexto de la presente invención se prefieren productos que contengan la cepa de la invención, tales como productos lácteos fermentados tales como yogur, kéfir y otros; quesos y extensiones, alimentos para niños, zumos y sopas. En este sentido, pudiera formar parte (sola o en combinación con otros microorganismos incluyendo prebióticos) (Combination of probiotics EP1359816 Valio Ltd.) del cultivo acidificador o de cultivos adjuntos de un producto lácteo (leche acidificada, queso). Además puede incluirse en preparaciones farmacéuticas en forma de cápsulas (Micro-encapsulated lactobacilli for medical applications WO 96/38159), en forma liofilizada, líquida, en píldoras o geles.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la cepa probiótica de la invención, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un producto probiótico.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la cepa probiótica de la invención en el que el producto probiótico es una composición alimentaria que comprende la cepa prebiótica de la invención.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la cepa probiótica de la invención en el que el producto probiótico es un alimento funcional que comprende la cepa probiótica de la invención.

En este sentido, otro objeto de la presente invención lo constituye un producto probiótico que comprende la cepa probiótica de la invención y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: una composición alimentaria y alimento funcional.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición alimentaria que comprende la cepa probiótica de la invención en un formato, a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: cepa liofilizada, en cápsulas, píldoras, formato líquido o geles.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un alimento funcional que comprende la cepa probiótica de la invención perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: leches fermentadas incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos, para consumo directo o procesamiento ulterior, distintos tipos de quesos: frescos, duros, helados, productos de la industria de la bebida tales como zumos o de la pastelería, alimentos para niños tales como papillas y sopas.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el producto probiótico, ya sea una composición alimentaria o un alimento funcional, de la invención que comprende la cepa *Lactobacillus rhamnosus* E41 (DSM 18791).

En el contexto de la presente invención se prefieren productos que contengan la cepa de la invención, tales como productos lácteos fermentados tales como yogur, kéfir y otros; quesos y extensiones, alimentos para niños, zumos y sopas.

En este sentido, pudiera formar parte (sola o en combinación con otros microorganismos incluyendo prebióticos) (Combination of probiotics EP1359816 Valio Ltd.) del cultivo acidificador o de cultivos adjuntos de un producto lácteo (leche acidificada, queso).

Hay que señalar, además, que la eritromicina, como ejemplo de antibiótico MLS, se utiliza de forma frecuente para tratar infecciones en edades tempranas de la vida; momento en el que la microbiota intestinal no está asentada todavía, y su perturbación por la utilización crónica de antibióticos podría tener consecuencias para el resto de la vida, de tal forma que los productos probióticos de la invención pueden ser de gran utilidad en este sector de la población.

Para las correspondientes comparaciones puede ser utilizada la cepa *L. rhamnosus* E41 depositada en Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMS), Braunschweig, Alemania el día 16 de Noviembre de 2006 (número de acceso DSM 18791).

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis del polimorfismo de restricción de los fragmentos amplificado por PCR de segmentos del gen que codifica el ARNr 23S de la cepa resistente a macrólidos *Lactobacillus rhamnosus* E41 (línea 1) y una serie de cepas de *L. rhamnosus* sensibles a estos antibióticos (E41, G92, G94, E52, E57, F46 y LMG 18243; líneas 2 a 8, respectivamente). Digestión con los enzimas de restricción BbsI (izquierda) y *Hind*III (derecha). M, marcador de pesos moleculares.

Figura 2. Cromatograma representativo de las secuencias alrededor de la posición 2058 del gen que codifica el ARNr 23 de cepas sensibles a macrólidos, *L. rhamnosus* LMG 18243, cepa GG,(izquierda) y aquella de la cepa resistente *Lactobacillus rhamnosus* E41 (derecha). Las flechas indican los nucleótidos de la posición 2058 (de la numeración de *Escherichia coli*). Nótese la naturaleza heterocigótica (G/A) de la cepa E41 en esta posición.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de la cepa Lactobacillus rhamnosus E41 (DSM 18791)

Aislamiento y caracterización de la cepa Lactobacillus rhamnosus E41

La identificación de cepa de la presente invención se inició con la selección de una serie de donantes, 10 individuos sanos del Principado de Asturias (4 hombres y 6 mujeres) con edades comprendidas entre los 34 y los 66 años, con hábitos alimentarios normales y sin historial de tratamiento reciente con antibióticos. Se recogieron muestras de heces y se procesaron en las 2 horas siguientes a su deposición/extracción en una cabina de anaerobiosis "Mac 500" (Don Whitley Scientific) con atmósfera reductora controlada (10% H2, 10% CO2, 80% N2).

Los lactobacilos se aislaron en placas de agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), con 0,25% L-cisteína (MRSC), y se cultivaron en cabina de anaerobiosis a 37°C durante 48-72 horas. Colonias aisladas se crecieron nuevamente en placas de MRSC y a partir de colonias aisladas se obtuvo biomasa que se lavó y resuspendió en 0,1 ml de Tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) con 0,9% de NaCl. La suspensión celular se calentó a 98ºC durante 10 min. en un termociclador "Dualcycler LINUX" (Cultek) y posteriormente se centrifugó 10 min a 14.000 rpm para eliminar los restos de material celular. El ADN presente en los extractos de las cepas se utilizó para amplificar por PCR un fragmento del gen que codifica el ARNr 16S mediante los oligonucleótidos universales Y1 (5'-TGGCTCAGGAC GAACGCTGGCGGC-3'; SEQ ID NO1) e Y2 (5'-CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'; SEQ ID NO2) (Young JPW, Downer HL, Eardly BD. 1991 Phylogeny of the prototrophic Rhizobium strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. J Bacteriol 173: 2271-2277). Se identificaron 71 aislados de lactobacilos procedentes de siete individuos. Las especies encontradas fueron *L. paracasei, L. rhamnosus, L. brevis, L. johnsonii, L. parabuchneri, L. plantarum*, y *L. acidipiscis*, de ellas siete asilados pertenecían a la especie *L. rhamnosus*: E51, G92, G94, E52, E57, F46 y E41. La región que se amplifica, de unas 348 pares de bases (pb) aproximadamente, se extiende desde la base 50 a la 400 (según la numeración de *Escherichia coli*) y contiene las regiones variables V1 y V2 de la molécula del ARNr 16S. Finalmente, el amplicón se secuenció y las secuencias se compararon con las de las bases de datos de GenBank y RDP, La amplificación, secuenciación y comparación de secuencias de los genes ribosomales se utiliza frecuentemente para la identificación de los aislados; es una técnica más rápida, más barata y mucho más fiable que las técnicas bioquímicas y fenotípicas.

Concentración inhibitoria mínima (CIM) a macrólidos en L. rhamnosus E41 y en otros lactobacilos

La resistencia a antibióticos de estas cepas (E51, G92, G94, E52, E57, F46 y E41 y la cepa probiótica comercial *L. rhamnosus* LMG 18243 (cepa GG)) se estudió con el sistema Sensititre Anaero3 (kit comercial "Sensititre Anaero3", Treck Diagnostic Systems) determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). La CIM es la concentración más baja de antibiótico a partir de la cual no se observa crecimiento. Este método sigue las recomendaciones del NCCLS ("National Committee for Clinical Laboratory Standards") que establece las referencias estándar para la determinación de las CIMs de bacterias anaerobias (NCCLS, 1997). Los antibióticos analizados fueron: penicilina, amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina+tazobactam, cefoxitina, imipenem, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, metronidazol, moxifloxacino, tetraciclina y vancomicina. Para la siembra de las microplacas se siguieron las recomendaciones de la casa suministradora. La lectura de los resultados se realizó tras 48 h de incubación a 37ºC en cabina de anaerobiosis.

Dos aislados o cepas de la especie *L. rhamnosus* analizadas se consideraron resistentes a eritromicina porque presentaban una CIM de MIC 1024 μg ml^{-1} a este antibiótico y una CIM a clindamicina de 256 μg ml^{-1} mediante un ensayo de microdilución Sensititre Anaero3 (Delgado,S., A. B. Florez, and B. Mayo. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. Curr. Microbiol. 50:202-207). La resistencia a estos dos antibióticos se confirmó en el presente trabajo mediante el uso del sistema Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). En contraste con este nivel de resistencia, la CIM a eritromicina y clindamicina de cepas susceptibles analizadas en las mismas condiciones de esta especie *L. rhamnosus* (aislados E51, G92, G94, E52, E57, F46) y la de la cepa probiótica comercial *L. rhamnosus* LMG 18243 (cepa GG) fueron de 1 y 0.5 μg ml^{-1} respectivamente. La tipificación fenotípica mediante el sistema API50 CHL (bioMérieux, Montalieu-Vercieu, France) y el sistema

comercial Phene Plate (fermentación de 21 carbohidratos) y genética por medio de RADP con el oligonucleótido OPA 18: 5'-AGGTGACCGT-3') (random amplification of polymorphic DNA, RAPD; (Vincent D, Roy D, Mondou F, Dery C. 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. Int J Food Microbiol 43:185-193) de los aislados indicó que ambos pertenecían a una única cepa, la cual se definió como *L. rhamnosus* E41. Para las correspondientes comparaciones puede ser utilizada la cepa *L. rhamnosus* E41 depositada en Deutsch Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GMBH (DSMS), Braunschweig, Alemania (número de acceso DSM 18791).

Identificación de determinantes de resistencia a eritromicina en L. rhamnosus E41

Genes como *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F) o *mef*(A), confieren de forma frecuente resistencia a macrólidos en microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos y están muy extendidos (Jensen, L. B., N. Frimodt-Moller, and F. M. Aarestrup. 1999. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. FEMS Microbiol. Lett. 170:151-158). Algunos de estos genes han sido identificados en plásmidos (Gfeller, K. Y., M. Roth, L. Meile, and M. Teuber. 2003. Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin- and dalfopristin-resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1. Plasmid. 50:190-201) y en el cromosoma (Flórez, A. B., M. S. Ammor, S. Delgado, and B. Mayo. 2006. Molecular analysis of a chromosomally-encoded erm(B) gene and its flanking insertion points in *Lactobacillus johnsonii* G41. Antimicrob. Agents Chemother. (In Press)) de cepas de lactobacilos resistentes a estos antibióticos. En la presente invención, la presencia de estos cinco genes de resistencia se analizó por medio de PCR utilizando ADN total de la cepa *L. rhamnosus* E41 como molde y cebadores (primers) específicos, siguiendo las recomendaciones descritas por Roberts *et al*. (Roberts, M. C., W. O. Chung, D. Roe, M. Xia, C. Marquez, G. Borthagaray, W. L. Whittington, and K. K. Holmes. 1999b. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. carry known rRNA methylase genes. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1367-1372). Sin embargo, no se obtuvo amplificación con ninguna de las parejas. De la misma forma, la hibridación en microarrays de más de 300 sondas oligonucleotídicas basadas en genes de resistencia a antibióticos, de los que 42 correspondían a genes involucrados en el fenotipo MLS no dio tampoco resultados positivos (Ammor, M. S., A. B. Flórez, A. H. A. M. Van Hoek, C. G. de los Reyes-Gavilán, H. J. M. Aarts, A. Margolles, and B. Mayo. 2006. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (In Press)).

Amplificación parcial por PCR y análisis de secuencias del gen que codifica el ARNr 23S

Después de descartar la presencia de genes adquiridos por transferencia horizontal como responsables del fenotipo MLS en la cepa *L. rhamnosus* E41, se llevó a cabo una búsqueda de mutaciones en componentes ribosomales. Las secuencias codificadoras de las proteínas L4 y L22 de los ribosomas de *L. rhamnosus* no están disponibles, motivo por el que el análisis se centró en la secuencia codificadora del ARNr 23S. Por tanto, para amplificar segmentos del gen del ARNr 23S, incluyendo el residuo crítico 2058 (según la numeración del gen 23S de *E. coli*), cuya mutación se ha involucrado en numerosas ocasiones en resistencia a macrólidos (ver Estado de la Técnica), se utilizaron los cebadores universales 1104f y 2241r descritos recientemente (Hunt, D. E., V. Mepac-Ceraj, S. G. Acinas, C. Gautier, S. Bertilsson, and M. F. Polz. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. Appl. Environ. Microbiol. 72:2221-2225). Para la comparación, se amplificó en las mismas condiciones el mismo segmento del gen del ARNr 23S rRNA de seis cepas (aislados E51, G92, G94, E52, E57, F46) sensibles a eritromicina y clindamicina, y de la cepa comercial *L. rhamnosus* LMG 18243 (cepa GG, ATCC 53103). En estas concisiones se logró amplificar un segmento de alrededor de 1200 pares de bases (pb) de todas las cepas. Este segmento fue purificado por medio del kit comercial Gen Elute PCR Clean Up kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) y digerido con diversas enzimas de restricción, para analizar el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP), y posteriormente se secuenció.

La presencia de una mutación de transición de A a G en la posición 2058 en la secuencia del gen ARNr 23S introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción T *Bbs*I (SEQ ID NO3). De esta forma, los amplicones fueron digeridos con este enzima, lo que anticipaba, caso de existir, la mutación antes de analizar la secuencia. Se encontraron fragmentos del tamaño esperado para la presencia de la mutación sólo en la cepa resistente a eritromicina (Figura 1, línea 1). Sin embargo, parte del amplicón aparece sin digerir, lo que sugiere que o bien la digestión fue parcial o la cepa presenta de forma simultánea la secuencia original y la mutada. Como control, los amplicones se digirieron también con el enzima *Hind*III, que corta en la mitad del segmento amplificado del gen codificador del ARNr 23S en muchas especies de lactobacilos. Con este enzima los amplicones se digirieron de forma completa, lo que sugiere la presencia de heterocigosis para los genes del ARNr 23S en la cepa *L. rhamnosus* E41.

Para confirmar estos resultados, todos los amplicones se secuenciaron en un secuenciador ABI PRISM 370 (Applied Biosystems, Foster City, Ca., USA) y las secuencias obtenidas se compararon entre sí y con las de las bases de datos. En la secuencia que correspondía a la cepa resistente (*L. rhamnosus* E41), se observó de nuevo la mutación de transición A a G .en la posición 2058; que no aparecía en las cepas sensibles a eritromicina (Figura 2). Los cromatogramas mostraban sin ningún género de duda una señal de fluorescencia de un residuo de adenina (A) en la cepa E41, tal y como aparecen en las cepas sensibles; indicando de nuevo un estado de heterocigosis (Figura 2). Aunque se desconoce el número de operones ribosómicos en *L. rhamnosus*, es esperable que el rango de éstos se sitúe entre cuatro y siete, tal y como aparecen en otras especies del género *Lactobacillus* (Klaenhammer, T., E. Alterman, F. Arigoni, A. Bolotin, F. Breidt, J. Broadbent, R. Cano, S. Chaillou, J. Deutscher, M. Gasson, M. van de Guchte, J. Guzzo, A. Haarte, T. Hawkins, P. Hols, R. Hutkins, M. Klerebeezem, J. Kok, O. Kuipers, M. Lubbers, M. Maguin, L. McKay, D. Mills, A. Nauta, R. Overbeek, H. Pel, D. Pridmore, M. Saier, D. van Sinderen, A. Sorokin, J. Steele,

D. O'Sullivan, W. de Vos, M. Zagorec, and R. Siezen. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie van Leeuwenhoek 82:29-58). Las secuencias obtenidas en el presente trabajo mostraron la máxima homología (97%) con secuencias del gen codificador del ARNr 23S de *L. casei* (Número de acceso en GenBank AF098107), así como homología significativa (93%) con secuencias de la misma molécula de otras especies de lactobacilos y enterococos. La comparación de la intensidad de las señales de los fragmentos de restricción con *Bbs*I y las señales de fluorescencia de la secuenciación, sugiere que más de una copia de los genes que codifican el ARNr 23S contienen más de una copia de la secuencia mutada en la cepa *L. rhamnosus* E41.

L. rhamnosus E41 muestra propiedades probióticas prometedoras: capacidad de sobrevivir y crecer a pH 3, resistencia a una concentración superior al 1% de sales biliares, inhibición de patógenos intestinales, adhesión a células intestinales de las líneas Caco2 y HT29. Esta capa *L. rhamnosus* E41, puesto que la resistencia a antibióticos no es fácilmente transmisible, podría utilizarse con este propósito en aquellas personas que requieren un tratamiento prolongado a estos antibióticos. Con el objeto de caracterizar de forma más completa la cepa *L. rhamnosus* E41 se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Resistencia a sales biliares en placa (CIM) se determinó en placas de MRSC suplementadas con concentraciones gradualmente crecientes de bilis bovina ("Oxgall", Sigma). El rango de concentraciones utilizado fue entre un 0,06% y 2% de "Oxgall". La siembra de las placas se realizó mediante un inoculador de "Steers" utilizando cultivos activos de 24-36 h. Los resultados se evaluaron al cabo de 48 h de incubación a 37ºC en cabina de anaerobiosis.

- Resistencia a pH ácido en líquido (capacidad de crecer a pH 2, 3, 3, 5, 4, y 5) se ensayó por duplicado en placas "Microtiter" (Sterilin) con caldo MRSC acidificado con HCl (12 N) a pH 2, 5, 3, 3, 5, 4 y 4, 5. Como control se utilizó MRSC sin acidificar (pH 5,5). Las placas "Microtiter" se inocularon al 2% con cultivos activos de las cepas de de 24-36 h y se incubaron durante 48 h a 37ºC en cabina de anaerobiosis.

- Presencia de actividades enzimáticas del API ZYM (bioMérieux) se utilizaron las tiras reactivas "API ZYM" (bioMérieux). Cada pocillo de la galería se inoculó con 65 μl de una suspensión celular en agua destilada. Las tiras se incubaron a 37ºC durante 4 horas en cabina de anaerobiosis. Las reacciones se revelaron mediante la adición de los reactivos suministrados por la casa comercial. La actividad enzimática se expresó en nanomoles de sustrato hidrolizado. En esta prueba se busca que las cepas no presenten actividades enzimáticas que se consideran implicadas en el desarrollo de algunas enfermedades, incluso en cáncer; como la betaglucuronidasa, actividad tripsinásica, quimiotripsinásica, etc.

Como consecuencia de las pruebas anteriores se observó que la cepa *L. rhamnosus* E41 no presenta ninguna de estas actividades y, además, presenta otras actividades consideradas positivas: actividad aminopeptidásica elevada (maduración de productos lácteos), actividad betagalactosidasa, y elevada actividad betaglucosidasa (utilización de lactosa y polisacáridos).

REIVINDICACIONES

1. Cepa probiótica aislada del tracto intestinal humano **caracterizada** porque presenta una resistencia intrínseca y no transmisible a antibióticos del tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (fenotipo MLS) y porque presenta una mutación de transición de A a G en la posición 2058 (según la numeración del gen 23S de *E. coli*), en la secuencia del gen ARNr 23S.

2. Cepa probiótica según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es una cepa tipo Bacteria del Ácido Láctico (BAL), preferentemente perteneciente a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y más preferentemente a la especie *Lactobacillus rhamnosus*.

3. Cepa probiótica según la reivindicación 2 **caracterizado** porque es la cepa *Lactobacillus rhamnosus* E41 (DSM 18791).

4. Uso de la cepa probiótica según las reivindicaciones 1 a la 3 en la elaboración de un producto probiótico, ya sea una composición alimentaria o un alimento funcional que comprende la cepa probiótica de la invención.

5. Producto probiótico **caracterizado** porque comprende una cepa probiótica según las reivindicaciones 1 a la 3 y que pertenece al siguiente grupo: una composición alimentaria y alimento funcional.

6. Composición alimentaria según la reivindicación 5 **caracterizada** porque presenta un formato de administración perteneciente al siguiente grupo: cepa liofilizada, en cápsulas, píldoras, formato líquido o geles.

7. Alimento funcional según la reivindicación 5 **caracterizado** porque pertenece al siguiente grupo: leches fermentadas incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos, para consumo directo o procesamiento ulterior, distintos tipos de quesos: frescos, duros, helados, productos de la industria de la bebida tales como zumos o de la pastelería, alimentos para niños tales como papillas y sopas.

8. Producto prebiótico según las reivindicaciones 5 a la 7 **caracterizado** porque, ya sea una composición alimentaria o un alimento funcional, comprende la cepa *Lactobacillus rhamnosus* E41 (DSM 18791).

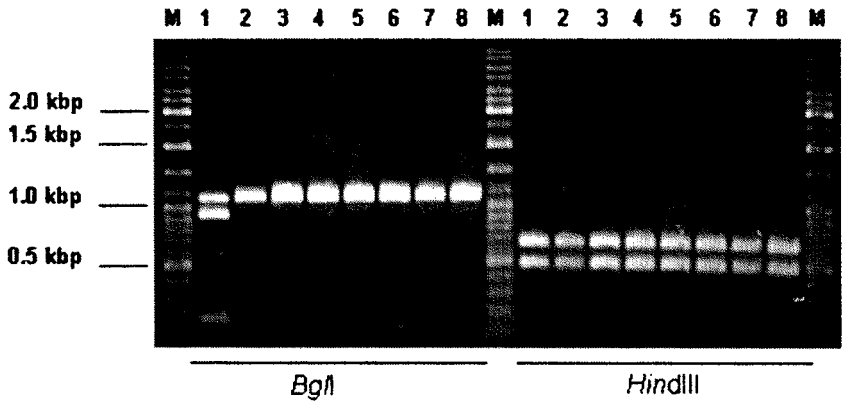

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M 1 2 3 4 5 6 7 8 M
2.0 kbp
1.5 kbp
1.0 kbp
0.5 kbp
BglI
HindIII

Figura 1

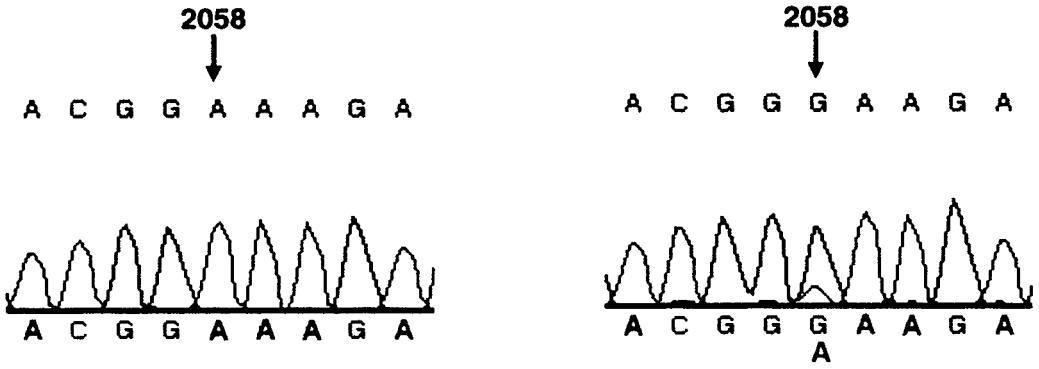


Figura 2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> CEPA PROBIÓTICA RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS, PRODUCTO PROBIÓTICO QUE LA CONTIENE Y SUS APLICACIONES

<130> Lacrha

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligo YY1

<400> 1

tggctcagga cgaacgctgg cggc 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligo Y2

<400> 2

cctactgctg cctcccgtag gagt 24

<210> 3
<211> 1045
<212> DNA
<213> *Lactobacillus rhamnosus*

<220>
<221> mutation
<222> (893)..(893)
<223> Mutación puntual de transición (A-a-G) en la posición 2058 referida a la numeración del gen de *Escherichia coli*

<400> 3

tagcataata ccgaaactgt gggtgcaccc gtcagggtgc gcggtaggag agcgttctaa 60

gggcgttgaa ggtcgatcgt gaggacggct ggagcgctta gaagtgagaa tgccggcatg 120

agtagcgaaa gatcagtgag aatctgatcc accgtatgac taaggtttcc tggggaaggc 180

tcgtcctccc agggttagtc gggatctaag gcgaggccgc aaggcgtagt cgatgacaag 240

caggttgaga ttcctgcact agtttatttt gtttaagcga tggagggacg caggaggcta 300

aggaaagcgc acggctggaa aagtgcgtcc aagcagtaag tccggtagcg agtgaaatgc 360

ttgccgcctt aaggacaagc tgtgatgggg agcgaaatta aagtagcgaa gttcctgatg 420

tcacactgcc aagaaaagct tctagtgaga aataaactac ccgtaccgca aaccgacaca 480

ggtagtcgag gagagtatcc tcaggtgagc gagcgaactc tcgttaagga actcggcaaa 540

atgaccccgt aacttcggaa gaaggggtgc tgaccgcaag gtcagccgca gtgaataggc 600

ccaaacaact gtttatcaaa aacacaggtc tctgctaaat cgtaagatga tgtatagggg 660

ctgacgcctg cccggtgctg gaaggttaag aggatgagtt agcgcaagcg aagcccagaa 720

ttgaagcccc agtaaacggc ggccgtaact ataacggtcc taaggtagcg aaattccttg 780

tcgggtaagt tccgacccgc acgaaaggcg taatgatttg ggcactgtct caacgagaga 840

ctcggtgaaa ttatagtacc cgtgaagatg cgggttaccc gcgacaggac gggaagaccc 900

catggagctt tactgtagct tgatattgag tgttggtacc gcttgtacag gataggtagg 960

agccgtagag atcggaacgc tagtttcgat ggaggcattg gtgggatact accctagctg 1020

tatgaacact ctaacccgcg ccact 1045

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 328 651

(21) Nº de solicitud: 200603055

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **29.11.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Base de Datos EPODOC. Resumen Recuperado de EPOQUE; PN: RU2215027.	1-8
A	Base de Datos EPODOC. Resumen Recuperado de EPOQUE; PN: RU2151797.	1-8
A	US 20060099197 A1 (FARMER) 11.05.2006, párrafos [0026],[0027],[0032],[0068]; figura 4.	1-8
A	HUMMEL, A.S. et al., "Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007 Feb, Vol. 73, No.3, páginas 730-739, [Epub.: 22.11.2006], todo el documento.	1-8
A	VESTER, B. et al., "Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA.", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2001, Vol. 45, No. 1, páginas 1-12, todo el documento.	1-8
A	ETTAYEBI, M. et al., "Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of Escherichia coli.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1985, Vol. 162, No. 2, página 551-557, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
02.11.2009	J.L. Vizán Arroyo	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)