

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 430**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/24 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2016** **PCT/SE2016/050787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017** **WO17034460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2016** **E 16839703 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.12.2021** **EP 3341001**

54 Título: **Composición y método para el tratamiento y profilaxis de la infección e inflamación intestinal**

30 Prioridad:

25.08.2015 SE 1551099

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

06.05.2022

73 Titular/es:

**IMMUNEBIOTECH MEDICAL SWEDEN AB
(100.0%)
Korsåkersvägen 53
226 50 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**AGHAIBEIK-LAVASANI, SHAHRAM y
NOURI, MEHRNAZ**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 909 430 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y método para el tratamiento y profilaxis de la infección e inflamación intestinal

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se relaciona con una composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una condición gastrointestinal, que comprende una combinación de cepas de *Lactobacillus*. La afección gastrointestinal puede ser una infección bacteriana por *Clostridium difficile*, *Salmonella* o *Escherichia coli*.

10

Antecedentes

15

El intestino de los mamíferos está colonizado por aproximadamente 100 billones de bacterias, que han coevolucionado con el huésped en una relación simbiótica. Esta colección de poblaciones microbianas en el huésped se denomina microbiota. La microbiota puede proteger eficazmente el intestino contra la colonización por patógenos exógenos y microorganismos autóctonos potencialmente dañinos (patobiontes). Las respuestas inmunitarias de la mucosa a las bacterias intestinales normales también son importantes para el desarrollo y la fisiología del huésped. La falla en la tolerancia inmunológica a la microbiota conduce a respuestas inmunitarias locales y sistémicas inapropiadas a las comunidades bacterianas intestinales que pueden contribuir a múltiples estados patológicos, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y el síndrome del intestino irritable (SII). Se ha sugerido que la mayor prevalencia de estas afecciones crónicas está influenciada por factores que incluyen infecciones bacterianas, exposición a antibióticos, así como factores dietéticos, estrés y grado de higiene.

20

25

La alteración en el equilibrio de la microbiota intestinal da como resultado una alteración de la homeostasis intestinal, lo que aumenta el riesgo de infección por patógenos y el crecimiento excesivo de patobiontes, particularmente en huéspedes inmunocomprometidos. Los patobiontes son típicamente colitogénicos en el sentido de que pueden desencadenar inflamación intestinal. La colitis pseudomembranosa, que produce diarrea intensa, fiebre y dolor abdominal, es causada por el crecimiento excesivo de *Clostridium difficile* (CD), una bacteria anaeróbica Gram-positiva, después de un tratamiento a largo plazo con antibióticos de amplio espectro.

30

La hospitalización a largo plazo, el tratamiento con antibióticos, la inmunodeficiencia, las enfermedades cancerosas, la quimioterapia y el tratamiento con esteroides son las principales causas de las infecciones diarreicas nosocomiales desencadenadas generalmente por CD, pero también por otros patógenos bacterianos entéricos como *Salmonella*, *Shigella*, *Camphylobacter*, y *Yersinia*.

35

El CD se ha convertido en una de las causas más graves de diarrea asociada a antibióticos. El tratamiento convencional incluye vancomicina o metronidazol durante diez días. Sin embargo, la recurrencia (ocurre en 10 a 25% de los casos) es cada vez más común y representa el mayor desafío asociado con las infecciones por CD (ICD).

40

Se han informado tasas crecientes de ICD en Canadá y los Estados Unidos, con una mayor proporción de casos graves y recurrentes que los informados anteriormente. En EE. UU., las tasas de altas hospitalarias con ICD enumeradas como cualquier diagnóstico aumentaron de 3,82 por 1000 altas en 2000 a 8,75 por 1000 altas en 2008; los aumentos fueron especialmente prominentes entre los mayores de ≥65 años. Datos preliminares indican que el número de certificados de defunción con enterocolitis por ICD aumentó de 793 en 1999 a 7483 en 2008 en EE.UU. La tasa de hospitalizaciones pediátricas relacionadas con ICD también aumentó entre 1997 y 2006, de 0,724 a 1,28 por 1000 hospitalizaciones. La incidencia más alta se informó en niños de 1 a 4 años de edad. La mayor incidencia y virulencia de la ICD ha coincidido con la propagación de la CD hipervirulenta denominada NAP1/027, también conocida como CD BI/NAP1/027 (un grupo de análisis de endonucleasas de restricción BI, electroforesis en gel de campo pulsado tipo NAP1 y polimerasa reacción en cadena ribotipo 027). La cepa NAP 1/027 produce una toxina binaria y hasta 16 veces más toxinas que la mayoría de las otras cepas asociadas a brotes hospitalarios. Posteriormente, se han reconocido epidemias de ICD causadas por CD NAP1/027 en hospitales de países europeos, por ejemplo, Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Austria y Suecia. Los grandes cambios en la epidemiología de la ICD durante los últimos años, con aumentos en la incidencia y gravedad de la enfermedad, la han convertido en un desafío de salud pública mundial.

45

50

55

Los únicos productos que se usan para tratar la ICD son los antibióticos, como el metronidazol, la vancomicina y el recientemente aprobado Difidid. A pesar de sus altas tasas de curación clínica, el 15-30% de los pacientes todavía experimentan una recurrencia, y cada recurrencia aumenta el riesgo de infecciones adicionales. Tanto el uso adecuado como el inadecuado de los antibióticos también se asocian con el aumento de la resistencia a los antibióticos, la aparición de nuevos biotipos resistentes a la vancomicina *Clostridium difficile*, y la creciente incidencia de afecciones inflamatorias crónicas.

60

65

Las tasas de casos graves de ICD han aumentado durante los últimos años y el hipervirulento CD NAP 1/027 se ha asociado con brotes recientes en todo el mundo. El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) encontró (en 2011) que la prevalencia de CD NAP1/027 era del 5% en los 34 países europeos. También se han informado grandes brotes de colitis grave, a menudo mortal, en América del Norte y Europa. Tal infección puede, como última opción cuando ningún otro tratamiento ha sido eficaz, tratarse mediante el trasplante de heces de un individuo

sano. Dicho trasplante, además de la posible incomodidad psicológica, también puede presentar el riesgo de trasplantar microorganismos potencialmente dañinos del donante. Por lo tanto, aunque el trasplante de microbiota fecal ha demostrado algunos resultados prometedores para el tratamiento de la ICD, los médicos están preocupados por los posibles riesgos de infección y la seguridad a largo plazo. Los informes recientes sobre el inicio de la obesidad después de un trasplante fecal indican riesgos y problemas de seguridad a largo plazo. Además, los engorrosos procedimientos asociados con la tecnología limitan su uso rutinario. No existen protocolos y procedimientos estándar con respecto a la detección/selección de donantes, la preparación de materiales fecales, los problemas de saneamiento, la preparación del receptor y la vía de administración.

Por tanto, existe la necesidad de opciones de tratamiento terapéutico más eficaces, así como tratamientos preventivos para la ICD.

Una composición alterada de la microbiota interfiere con las funciones intestinales normales a diversos niveles. Además de activar el sistema inmunitario y las citoquinas proinflamatorias, también puede inducir la liberación de metabolitos microbianos, la activación del eje hipotálamo-hipófisis suprarrenal (HPA por sus siglas en inglés) con aumento de cortisol, lo que lleva a alteraciones de la motilidad y sensibilidad intestinales, interrupción de la barrera intestinal y disminución de la producción de neurotransmisores con una mayor respuesta a eventos estresantes. Estas complicaciones pueden causar el SII, que es un trastorno funcional crónico del sistema gastrointestinal y una de las causas más comunes de enfermedad y ausentismo laboral. No hay cura disponible y los pacientes con SII tienen que depender de tratamientos para revivir síntomas como dolor, diarrea y estreñimiento, asociados con efectos secundarios. Se desconoce la causa del SII, pero cada vez hay más pruebas que muestran cambios en la composición de la microbiota luminal y de la mucosa entre los pacientes con SII en comparación con los individuos sanos. Ejemplos de estas modificaciones son una menor cantidad de lactobacilos y bifidobacterias junto con una mayor cantidad de *Clostridium* en pacientes con SII. Las investigaciones de la microbiota intestinal de los niños diagnosticados con SII también indican una disbiosis dominada principalmente por *Clostridium*.

Por lo tanto, las intervenciones terapéuticas que utilizan lactobacilos son atractivas en el SII. Varios estudios han concluido que los lactobacilos, en general, benefician a los pacientes con SII, pero ha sido difícil definir los beneficios relativos de las diferentes cepas bacterianas. Los efectos débiles y los resultados mixtos se deben principalmente a la falta de una selección adecuada de la cepa bacteriana y, a menudo, a la mala calidad de los estudios.

Hell et al. (Beneficial Microbes 4:39-51, 2013) describe el uso de probióticos en el tratamiento de infecciones por *Clostridium difficile* (ICD) y sugiere que solo un cóctel de múltiples cepas que se asemeje a una microbiota humana sana puede ser la manera de abordar las ICD. Schoster et al. (Anaerobe, 20:36-41, 2013) describe la inhibición de *Clostridium perfringens* y *C. difficile* por varias cepas probióticas comerciales.

Resumen de la invención

Los anteriores y otros objetos de la invención se logran, en su totalidad o al menos en parte, mediante una composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una composición gastrointestinal que comprende una combinación de *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888).

El presente documento también está dirigido a una composición probiótica que comprende *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), y *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885). El presente documento también está dirigido a la composición que comprende *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888). Las bacterias en la composición pueden consistir en *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888) en combinación, pero la composición también puede comprender cepas bacterianas adicionales.

El presente documento también está dirigido a una composición probiótica que comprende una mezcla de cantidades iguales de bacterias de las cepas *L. plantarum* Y1An734 (LMG P28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888). Se debe entender que en el contexto del presente documento por el término "igual" y similares en relación con la cantidad de bacterias se pretende que el número de células bacterianas de las diferentes cepas bacterianas esté presente en una cantidad relativa entre sí de modo que ninguna cepa bacteriana esté presente en una cantidad superior a 5 veces la de la otra, y preferiblemente inferior a 4, 3 o 2 veces la de las otras cepas. Preferiblemente, cuando las bacterias están presentes en cantidades iguales, cada cepa bacteriana está presente en una cantidad tal que la relación entre cada cepa bacteriana es de aproximadamente 1:1.

El presente documento también está dirigido a una composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una condición gastrointestinal, en donde dicha composición comprende al menos una cepa de *Lactobacillus*, donde la cepa *Lactobacillus* se elige del grupo que consta de una cepa de *L. salivarius*, tres cepas de *L. plantarum* y una cepa de *L. brevis*, donde la cepa de *L. salivarius* es *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), donde las cepas de *L. plantarum* son *L. plantarum* Y1An734 (LMG P28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), y *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y donde

la cepa de *L. brevis* es *L. brevis* SH111 (LMG P-28888).

El tratamiento puede ser un tratamiento curativo, es decir, un tratamiento que restaura la salud del sujeto. Durante un tratamiento curativo, la composición puede administrarse como un enema. Cuando se administra como un enema, la composición se puede administrar un número limitado de veces, normalmente entre una y cinco veces, durante un período corto de tiempo, por ejemplo, durante el transcurso de un día a cinco semanas. Cuando se administra por vía oral, la composición puede administrarse diariamente durante, por ejemplo, 1 a 6 semanas.

Para ciertas condiciones o en ciertos pacientes, el tratamiento puede tener un carácter más de apoyo, donde la composición se administra varias veces durante períodos más largos, a veces de por vida. La composición se puede administrar con un intervalo de un día a dos semanas.

La composición también se puede usar como tratamiento profiláctico (preventivo), por ejemplo, durante períodos más largos de ingesta de antibióticos para apoyar y/o preservar y/o restaurar una flora bacteriana saludable del tracto gastrointestinal.

La composición puede comprender al menos una cepa de *L. salivarius*, donde la cepa de *L. salivarius* puede ser *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887). Una ventaja de esto es que *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) tiene un efecto antimicrobiano potencial. Por lo tanto, el presente documento también está dirigido a una composición donde la parte bacteriana de la composición comprende, o consiste en, *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887).

Además, la composición puede comprender al menos *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y al menos una de las cepas *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888). Por lo tanto, el presente documento también está dirigido a una composición donde la parte bacteriana de la composición comprende o consiste en *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y al menos una de las cepas *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888). Una ventaja de las cepas de *L. plantarum* *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885) es que estas cepas poseen propiedades antiinflamatorias. Además, estas cepas pueden prevenir y/o tratar la inflamación intestinal y mejorar la función de barrera intestinal. Además, estas cepas de *L. plantarum* pueden actuar en sinergia con *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888) en actividad inhibitoria contra una gama más amplia de bacterias patógenas asociadas con complicaciones gastrointestinales. Esto da como resultado la corrección terapéutica de la disbiosis de la microbiota intestinal promoviendo la restauración de la homeostasis del sistema inmunológico. Una ventaja de *L. brevis* SH111 (LMG P-28888) es que tiene un potencial antibacteriano sinérgico. Esta cepa ha demostrado tener una amplia actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias patógenas Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas, como *Escherichia coli*.

La composición puede comprender alternativamente al menos *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), y *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885). Por lo tanto, el presente documento también está dirigido a una composición donde la parte bacteriana de la composición comprende o consiste en *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), y *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885). Esta composición puede comprender además *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888).

La afección gastrointestinal puede ser diarrea, diarrea asociada a antibióticos (DAA), gastroenteritis, gastroenteritis aguda y/o diarrea infecciosa.

Además, la afección gastrointestinal puede ser una infección bacteriana por *Clostridium difficile*, *Salmonella* y/o *Escherichia coli*. La condición gastrointestinal también puede ser causada por una enfermedad diarreica debido a bacterias como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteropatógena (EPEC por sus siglas en inglés), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC por sus siglas en inglés), *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Bacillus cereus*. La afección gastrointestinal también puede deberse a una infección viral, como la diarrea asociada al rotavirus. La afección gastrointestinal también puede ser diarrea posinfecciosa.

Especialmente, la condición gastrointestinal puede ser una infección por *Clostridium difficile* NAP 1/027. Una ventaja de la presente invención es que resuelve rápidamente la enfermedad dirigiéndose a las bacterias patógenas y restableciendo la tolerancia inmunológica y la homeostasis intestinal. Una segunda ventaja es que el uso de cepas purificadas de *Lactobacillus* con efectos beneficiosos para la salud bien definidos evita el uso de heces u otras composiciones que implican problemas críticos de seguridad y salud.

La afección gastrointestinal puede ser el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye, entre otras condiciones, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

La afección gastrointestinal también puede ser reservoritis o colitis posinfecciosa.

La composición se puede administrar por vía oral, como en una bebida o producto alimenticio. La composición puede

- administrarse como una bebida, en cuyo caso la(s) cepa(s) de *Lactobacillus* están suspendidas en un líquido. El líquido puede, por ejemplo, ser agua, leche, una solución de sal y azúcar o un engrudo. Alternativamente, la composición se puede administrar como gachas o pudín. La composición se puede incluir en una píldora, que el paciente puede tragar. Una ventaja de estas vías de administración es que no requieren ningún equipo médico avanzado. Otra ventaja de administrar la composición como bebida, gachas, pudín o píldora es que el paciente puede controlar cuándo traga la bebida, gachas, pudín o píldora.
- La composición se puede administrar como un enema. Una ventaja de esta vía de administración es que se puede realizar utilizando equipos que se utilizan habitualmente en hospitales. Una ventaja de esta vía de administración es que la composición puede administrarse en el lugar del tracto gastrointestinal donde es más eficaz. Otra ventaja es que lo realizan profesionales sanitarios; los pacientes pueden contentarse con algunos tratamientos y serán evaluados regularmente por los proveedores de atención.
- La composición se puede administrar como una infusión en el tracto gastrointestinal superior. La composición se puede administrar a través de un dispositivo médico, como un tubo nasoduodenal. Una ventaja de esta vía de administración es que se puede realizar utilizando equipos que se utilizan habitualmente en hospitales. Otra ventaja de esta vía de administración es que la composición puede administrarse en el lugar del tracto gastrointestinal donde es más eficaz. Otra ventaja es que la composición bacteriana pasa por alto el estómago y su entorno ácido y se infunde directamente en el intestino.
- La composición se puede administrar a través de un dispositivo médico, como una sonda nasogástrica. La composición se puede administrar por colonoscopia.
- La cantidad total de *Lactobacillus* puede ser de 10^9 a 10^{13} UFC por tratamiento, por ejemplo, 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} UFC por tratamiento. En el caso de la infusión nasoduodenal, el tratamiento puede repetirse al cabo de un día, unos días o una semana al menos dos veces.
- La composición se puede liofilizar. Una ventaja de esto es que las bacterias pueden conservarse para almacenamiento a largo plazo y no se necesitan instalaciones de almacenamiento avanzadas para manejar las bacterias.
- La composición liofilizada puede estar contenida en una bolsa, un tarro, una cápsula o cualquier otro tipo de recipiente como una pastilla. La composición liofilizada puede ser uno de varios componentes en una mezcla. Además, la composición liofilizada también puede ser uno de varios componentes de una píldora. Se pueden añadir naturalmente otros aditivos convencionales a las composiciones liofilizadas o a cualquiera de las otras composiciones mencionadas como se describe en el presente documento para proporcionar composiciones estables con una vida útil adecuada. Un experto en la materia conocería dichos aditivos convencionales y la cantidad a utilizar en las composiciones.
- La composición puede comprender además un componente de fibra.
- El componente de fibra puede elegirse del grupo formado por fibra de avena, fibra de trigo, fibra de centeno, fibra de chía, fibra de maíz, fibra de cebada, fibra de patata, fibra de fruta, fibra vegetal, fibra de cereal y fibra de algas.
- Otros ejemplos de fibras adecuadas incluyen diferentes tipos de fibras solubles e insolubles. Por ejemplo, se pueden utilizar fibras procedentes de semillas (por ejemplo, semillas de lino y semillas de zaragatona) o de frutos secos (como nueces, cocos, almendras). Se pueden utilizar fibras dietéticas como la inulina. Se pueden añadir otros aditivos convencionales a las composiciones que contienen fibra.
- La bacteria puede estar suspendida en un engrudo, una papilla, gachas o un pudín.
- El engrudo puede ser engrudo de avena. Otros engrudos que se pueden usar incluyen engrudo de trigo, engrudo de cebada, engrudo de centeno o engrudo de elote o maíz.
- Antes de la administración de la composición según la presente invención, la composición bacteriana fresca o liofilizada se puede suspender en un líquido adecuado. El líquido puede ser un componente líquido farmacéuticamente aceptable o cualquier tipo de medio adecuado, por ejemplo, uno de los medios descritos anteriormente. Preferiblemente, se utilizan agua destilada o medios acuosos tamponados, que contienen sales y tampones farmacéuticamente aceptables. Las soluciones salinas adecuadas son PBS (*Solución salina tamponada con fosfato*, por sus siglas en inglés), GBSS (*Solución Salina Equilibrada de Gey*, por sus siglas en inglés), EBSS (*solución salina equilibrada de Earle*, por sus siglas en inglés), HBSS (*solución salina equilibrada de Hank*, por sus siglas en inglés), y SBF (*Fluido Corporal Sintético/Simulado*, por sus siglas en inglés). El componente líquido también puede ser de naturaleza más hidrofóbica dependiendo de la aplicación.
- En el caso de la administración oral, se pueden añadir diferentes aromas para hacer más agradable al gusto la mezcla que comprende la composición.
- La composición puede estar lista para usar después de la reactivación en el medio adecuado durante 24 h a temperatura ambiente o hasta una semana a 4 °C. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el período de tiempo y la temperatura

pueden variar dependiendo, por ejemplo, del medio utilizado.

La composición puede comprometer además uno o más agentes terapéuticos, como un agente contra la infección inducida por bacterias y/o el estado inflamatorio.

La composición puede comprender las cinco cepas mencionadas anteriormente o incluso más, siempre que esté presente al menos una de las cepas bacterianas mencionadas anteriormente.

Una composición como la descrita anteriormente puede estar comprendida en un enema. Una ventaja de dicho enema es que la vía de administración se puede realizar usando un equipo que se usa comúnmente en los hospitales. Otra ventaja de esta vía de administración es que la composición se puede administrar en el lugar del tracto gastrointestinal donde es más eficaz, es decir, en el colon.

El volumen de composición administrado variará dependiendo de la edad y el tamaño de la persona que recibe el enema. Sin embargo, las pautas generales serían: Infantil: 250 ml o menos, niño en edad escolar: 200-500 ml, Adulto: 200-1000 ml.

La composición puede ser una formulación farmacéutica.

El presente documento también proporciona una cepa aislada elegida del grupo que consiste de *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* (LMG P-28888). Las cepas bacterianas son biológicamente puras.

El presente documento también proporciona una cepa aislada de *L. salivarius* para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección por *Clostridium difficile* NAP 1/027, donde la cepa es *L. salivarius* CW30 (LMG P28887).

El presente documento también está dirigido a un método para el tratamiento y/o prevención de una afección gastrointestinal, comprendiendo dicho método el paso de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste en *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* (LMG P-28888), un enema que comprende una o más de estas bacterias, o una o más de una cepa bacteriana aislada seleccionada del grupo que consiste en *L. salivarius* CW30 (LMG P28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* (LMG P-28888), a un sujeto que lo necesite. Dicho gastrointestinal es una afección gastrointestinal como se describe en otra parte del presente documento.

Uso de una composición que comprende una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste en *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* (LMG P-28888), un enema que comprende una o más de estas bacterias, o una o más de una cepa bacteriana aislada seleccionada del grupo que consiste en *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y *L. brevis* (LMG P-28888) para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una afección gastrointestinal. Dicho gastrointestinal es una afección gastrointestinal como se describe en otra parte del presente documento.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención aparecerán a partir de la descripción detallada siguiente, de las reivindicaciones adjuntas, así como de las figuras.

En general, todos los términos utilizados en las reivindicaciones deben interpretarse de acuerdo con su significado corriente en el campo técnico, a menos que se defina explícitamente lo contrario en este documento. Todas las referencias a "un/una/el [elemento, dispositivo, componente, medio, paso, etc.]" deben interpretarse abiertamente como referentes a al menos una instancia de dicho elemento, dispositivo, componente, medio, paso, etc., a menos que se indique explícitamente lo contrario. Los pasos de cualquier método descrito en este documento no tienen que realizarse en el orden exacto descrito, a menos que se indique explícitamente.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" y las variaciones de ese término no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o pasos.

Definición de cepas

Todas las cepas se depositaron en BCCM/LMG (Colecciones coordinadas belgas de microorganismos/Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent)), Gante, Bélgica, el 19 de mayo de 2015. El depositante es Shahram Aghaibeik-Lavasani, Department of Biology, Sölvegatan 35, Building C, 223 62 Lund, Suecia.

Los números de depósito son los siguientes.

	<i>L. plantarum</i> SH1313	LMG P-28884
	<i>L. plantarum</i> KS11	LMG P-28885
	<i>L. plantarum</i> Y1An734	LMG P-28886
	<i>L. salivarius</i> CW30	LMG P-28887
5	<i>L. brevis</i> SH111	LMG P-28888

Las cepas son biológicamente puras.

Definición de cepas y términos

10

UFC = unidades formadoras de colonias

Descripción de las tablas y la figura.

15 La Figura 1 muestra el porcentaje de células T CD4⁺Foxp3⁺ después de la incubación conjunta de lactobacilos con células inmunitarias recién aisladas de tejidos linfoides intestinales murinos. Se incubaron 1x10⁶ células inmunitarias con una sola *Lactobacillus* sp. o en combinación con dos o varios. * representa un valor de p≤0,05, ** un valor de p≤0,01 y *** un valor de p≤0.001 en comparación con el control.

20 La Figura 2 muestra el porcentaje de células T CD4⁺Foxp3⁺ después de la incubación conjunta de lactobacilos con células inmunes de tejidos linfoides intestinales murinos como se describe anteriormente. Se incubaron 1x10⁶ células inmunitarias con una sola especie de *Lactobacillus* que incluyen cinco cepas de lactobacilos LMG P-28884 P28888 y cuatro cepas de lactobacilos aisladas de diferentes productos alimenticios disponibles comercialmente (*L. paracasei* CNCM I-1518, *L. plantarum* DSM 9843, *L. acidophilus* DSM 13241 y *L. rhamnosus* ATCC 53103). * representa un valor de p≤0,05, ** un valor de p≤0,01 y *** un valor de p≤0.001 en comparación con el *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884).

25 La Figura 3 La Tabla 1 muestra la actividad antagónica de diferentes especies de lactobacilos contra *Clostridium difficile* incluyendo cepas NAP1/027 hipervirulentas; - indicando que no hay inhibición, + indica inhibición o que no hay crecimiento alrededor de las estrías de lactobacilos.

30

La Figura 4 La Tabla 2 muestra un método de estrías cruzadas para investigar la inhibición entre especies de cinco diferentes cepas de *Lactobacillus*. Para cada grupo, las cepas en la parte superior de la tabla fueron la cepa de prueba (primera estría); - indicando que no hay inhibición, + indica inhibición o que no hay crecimiento en la zona donde las estrías de *Lactobacillus* convergieron.

35

La Figura 5 La Tabla 3 muestra la prueba de susceptibilidad antibiótica de cepas de *Lactobacillus*.

40 La Figura 6 muestra la capacidad de las cepas de lactobacilos para adherirse a las células epiteliales colorrectales humanas. Las especies de *Lactobacillus* que incluyen las cinco cepas de lactobacilos LMG P-28884 P28888 y cuatro cepas de lactobacilos aisladas de diferentes productos alimenticios disponibles comercialmente (*L. paracasei* CNCM I-1518, *L. plantarum* DSM 9843, *L. acidophilus* DSM 13241 y *L. rhamnosus* ATCC 53103) se utilizaron para la comparación. Un número igual de células para cada cepa (5x10⁸) se incubó de forma independiente (1 h a 37 °C) con una monocapa de células Caco-2 completamente diferenciadas. Las células se lavaron y tiñeron con solución de tinción de Giemsa. Se contaron y promediaron las bacterias adherentes en campos microscópicos seleccionados al azar. * representa un valor de p ≤0,05, ** un valor de p ≤0,01 y *** un valor de p≤0,001 en comparación con el *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884).

45

La Figura 7 La Tabla 4 muestra la actividad antagónica de la combinación de cinco diferentes cepas de *Lactobacillus* contra cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli*; +++ indica una buena inhibición (zona de inhibición >5-10 mm). ++++ indica una fuerte inhibición (zona de inhibición >10 mm).

50

La Figura 8 Perfil de carbohidratos de *Lactobacillus salivarius* CW30 (LMG P-28887), *Lactobacillus brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), respectivamente. Las puntuaciones están relacionadas con la intensidad del color. Una prueba positiva se indica mediante un cambio de color de púrpura a amarillo (1-3) debido a una producción anaeróbica de ácido (= sin cambio).

55

Descripción detallada de la invención

60 En el presente contexto e invención se aplica la siguiente definición: El término infección e inflamación intestinal pretende significar gastroenteritis, un aumento de la inflamación del tracto gastrointestinal causado por infecciones víricas, bacterianas o parasitarias. También puede significar otra afección gastrointestinal, por ejemplo, síndrome del intestino irritable (SII), enfermedades inflamatorias del intestino (EII), reservoritis o colitis postinfecciosa. El término diarrea asociada a antibióticos (DAA) pretende referirse a la diarrea que se desarrolla en una persona que está tomando antibióticos o los tomó recientemente. Una de las causas más graves de la DAA es la infección por una bacteria, *Clostridium difficile* (CD) una bacteria anaeróbica Grampositiva. Además, las infecciones diarreicas nosocomiales se desencadenan principalmente por CD, pero también por otros patógenos bacterianos entéricos como *Salmonella*, *Shigella*, *Camphylobacter*, y *Yersinia*.

65

También se describe aquí una composición simbiótica, que comprende una cantidad efectiva de bacterias *Lactobacillus* elegidas del grupo que comprende o consiste en uno o más de *Lactobacillus salivarius* CW30 (LMG P-28887), *Lactobacillus brevis* SH111 (LMG P-28888), *Lactobacillus plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *Lactobacillus plantarum* KS11 (LMG P-28885) y *Lactobacillus plantarum* Y1An734 (LMG P-28886). Las cepas bacterianas se seleccionan de nuevas cepas bacterianas de ácido láctico aisladas de diferentes fuentes vegetales. Muestras de diferentes plantas vegetales, crudas y después de la fermentación, se sembraron en agar Ragasa y se incubaron durante 24-72 h a 35-42 °C en condiciones anaeróbicas. Se eligieron aleatoriamente clones individuales. Se comprobaron las propiedades probióticas de todos los clones con bacterias grampositivas en forma de bacilo, como la resistencia al pH ácido (pH 3) y las sales biliares. Las bacterias aisladas se identificaron a través del perfil de fermentación de carbohidratos (consulte la Tabla 5 en la Figura 8) y la secuenciación del ARNr 16S. Las cepas bacterianas de ácido láctico se seleccionaron además por su capacidad para adherirse al intestino e inhibir el crecimiento de patógenos gastrointestinales, pero no el crecimiento entre sí. Normalmente, cuando una composición comprende más de una de estas cepas bacterianas, el número de células bacterianas de las diferentes cepas bacterianas es aproximadamente igual (es decir, aproximadamente el mismo número de células bacterianas, por ejemplo, determinado midiendo el número de UFC o mediante cálculo microscópico del número de bacterias). Una composición que comprende una o más de estas cepas bacterianas puede denominarse composición probiótica.

También se describen en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una cepa como se describe en este documento, es decir, al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus salivarius* CW30 (LMG P-28887), *Lactobacillus brevis* SH111 (LMG P-28888), *Lactobacillus plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *Lactobacillus plantarum* KS11 (LMG P-28885) y *Lactobacillus plantarum* Y1An734 (LMG P-28886). También se describe aquí un cultivo, una composición o un producto que comprende una o más de dichas cepas bacterianas para uso en la prevención y/o tratamiento de condiciones gastrointestinales, tales como una condición causada por CD.

En el presente estudio, se examinaron y caracterizaron más de 18 cepas de lactobacilos diferentes y novedosas con respecto a las actividades antimicrobianas contra 21 cepas patógenas de CD. Curiosamente, resultó que estas propiedades son específicas de la cepa y no generales para todas las cepas de un género. Una composición terapéutica de la invención que comprende bacterias de todas las cepas de *Lactobacillus salivarius* CW30 (LMG P-28887), *Lactobacillus brevis* SH111 (LMG P-28888), *Lactobacillus plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *Lactobacillus plantarum* KS11 (LMG P-28885) y *Lactobacillus plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) ha demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de todas las cepas de CD, pero no el crecimiento de las demás. Demuestra la sinergia exhibida entre las cepas de la composición de la presente invención.

Como se demuestra en los datos experimentales proporcionados en este documento *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), y *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) tiene una mayor capacidad de colonización (como se demuestra al unirse a las células Caco-2) que *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885) y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), aunque estas últimas todavía muestran una buena capacidad de colonización. *L. plantarum* SH1313, KS11 y Y1An734, por otro lado, demostraron tener el mayor efecto antiinflamatorio (medido por el potencial para inducir Tregs). Una composición que comprende *L. plantarum* SH1313, KS11 e Y1An734 por lo tanto, puede ser particularmente útil en el tratamiento y/o prevención de un trastorno inflamatorio crónico como, entre otros, la EII, que incluye, entre otras afecciones, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, reservoritis o colitis posinfección. *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), y *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) muestran el efecto antimicrobiano más fuerte de las cinco cepas de lactobacilos aisladas. Una composición que comprende *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), y *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) puede ser particularmente útil para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección gastrointestinal microbiana, como una infección causada por *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Estafilococo*, *Listeria*, *Vibrio*, y/o *Bacillus cereus*. La infección gastrointestinal puede deberse a una infección viral, como el rotavirus.

Debido a las propiedades inhibitorias de las cepas de lactobacilos elegidas sobre las cepas patógenas de CD y/u otros patógenos intestinales y el efecto terapéutico en pacientes con diarrea asociada a antibióticos (DAA), la presente invención se relaciona con el uso médico de combinaciones de *Lactobacillus* simbióticas para la preparación de composiciones farmacéuticas para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de una afección gastrointestinal seleccionada de, entre otros, DAA, gastroenteritis, gastroenteritis aguda o diarrea infecciosa. La condición gastrointestinal puede ser una infección bacteriana causada por, pero no limitada a, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Estafilococo*, *Listeria*, *Vibrio*, o *Bacillus cereus*. La afección gastrointestinal puede deberse a una infección viral, como la diarrea asociada al rotavirus o una diarrea posinfecciosa.

Las composiciones del presente documento también se pueden usar de manera efectiva en el tratamiento de gastroenteritis causada por *Salmonella* o *Escherichia coli*. *Salmonella* spp. causar una de las formas más comunes de intoxicación alimentaria en todo el mundo. Los experimentos demostraron claramente que la composición simbiótica de esta invención inhibió fuertemente el crecimiento de cepas patógenas de *Salmonella* (*S. enteritidis* y *S. typhimurium*) y *Escherichia coli*.

La presente invención también se relaciona con el uso profiláctico (preventivo) contra las infecciones por CD. Los pacientes con infección por CD generalmente se tratan con antibióticos, como metronidazol y vancomicina. La composición de esta invención se probó experimentalmente y no reveló sensibilidad contra el metronidazol y la

vancomicina, lo que demuestra su potencial para usarse como tratamiento profiláctico (preventivo), por ejemplo, durante períodos más largos de ingesta de antibióticos para apoyar y/o preservar y/o restaurar una flora bacteriana saludable del tracto gastrointestinal. También se puede usar para inhibir la recurrencia que es común y representa el mayor desafío asociado con las infecciones por CD.

La presente invención también se relaciona con el tratamiento de infecciones causadas por la CD hipervirulenta denominada NAP1/027. La mayor incidencia y virulencia de las infecciones por CD ha coincidido con la propagación de CD NAP1/027. La evaluación de los lactobacilos novedosos reveló que sólo unas pocas cepas de *Lactobacillus* tenían el potencial de inhibir el crecimiento de las 2 cepas hipervirulentas CD NAP1/027 diferentes. Estas cepas terapéuticas están incluidas en la composición simbiótica presentada por esta invención.

El presente documento también está dirigido al uso de la composición simbiótica establecida en esta invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de trastornos inflamatorios crónicos tales como, entre otros, EII que incluye, entre otras afecciones, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, reservoritis o colitis postinfecciosa. La interacción de patógenos bacterianos con las células epiteliales intestinales inicia una cascada de procesos inflamatorios que contribuyen a una condición gastrointestinal. Una microbiota intestinal alterada y la inflamación interrumpen la función de barrera intestinal, lo que permite que los patógenos se multipliquen y colonicen aún más el intestino. Las células T reguladoras Foxp3⁺ (Tregs) son esenciales en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en el intestino, suprimiendo las respuestas inflamatorias dañinas. Con base en nuestras experiencias, las combinaciones de lactobacilos se han examinado aún más para detectar el potencial de desencadenar Tregs. La composición terapéutica de la invención ha mostrado el mayor potencial para desencadenar estas células antiinflamatorias en comparación con otras combinaciones ensayadas. Indicó una vez más la sinergia desplegada entre las cepas de la composición de la presente invención.

El presente documento también está dirigido al uso de la composición simbiótica indicada en esta invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de afecciones intestinales asociadas con malestar o dolor abdominal tales como, pero sin limitarse a, el síndrome del intestino irritable (SII). Se ha sugerido que el papel de la microbiota intestinal y la influencia del estrés son cruciales para el desarrollo del SII. La composición terapéutica presentada en esta invención ha mostrado un gran éxito en el tratamiento del SII.

La composición se puede administrar por vía oral. Todas las cepas de la composición de la presente invención se seleccionan debido a sus capacidades únicas y superiores para sobrevivir en el bajo pH del estómago y en el alto contenido de ácidos biliares del intestino delgado, y la capacidad de adherirse a la mucosa colónica y a la colonizar el intestino grueso. La composición se puede administrar como una bebida, en cuyo caso la(s) cepa(s) bacteriana(s) se suspende(n) en un líquido. El líquido puede ser agua, leche, una solución de sal y azúcar o un engrudo. Alternativamente, la composición se puede administrar como gachas o pudín. La composición se puede incluir en una píldora, que el paciente puede tragar.

La composición se puede administrar como un enema. Una ventaja de esta vía de administración es que la composición puede administrarse en el lugar del tracto gastrointestinal donde es más eficaz. El trasplante de microbiota fecal administrado por enema se ha utilizado para el tratamiento de pacientes. Aunque el uso de enema se considera seguro y la técnica demostró algunos resultados prometedores para el tratamiento de infecciones por CD, los médicos están preocupados por los posibles riesgos de infección y la seguridad a largo plazo debido al contenido de la terapia, que consiste en bacterias fecales de donantes voluntarios. Sin embargo, la composición terapéutica presentada en esta invención consiste en cepas de *Lactobacillus* elegidas a partir de extensos estudios que han sido probados en pacientes con gran éxito. Otra ventaja del método es que lo realizan profesionales sanitarios; los pacientes pueden contentarse con algunos tratamientos y serán evaluados regularmente por los proveedores de atención.

La composición se puede administrar como una infusión en el tracto gastrointestinal superior. La composición se puede administrar a través de un dispositivo médico, como un tubo nasoduodenal. Una ventaja de esta vía de administración es que la composición puede administrarse en el lugar del tracto gastrointestinal en condiciones gastrointestinales donde es más eficaz.

La combinación bacteriana se puede administrar junto con un componente líquido farmacéuticamente aceptable, pero también en forma de polvo. Preferiblemente, se utilizan agua destilada o medios acuosos tamponados, que contienen sales y tampones farmacéuticamente aceptables. Las cepas bacterianas pueden estar presentes de manera que se administre una concentración total de bacterias de al menos 10⁹ a 10¹³ UFC por tratamiento. Si se va a administrar más de una de las cepas bacterianas, normalmente se administra la misma cantidad de todas las cepas diferentes.

La composición puede comprender además un componente de fibra. Los beneficios para la salud de la fibra dietética se han apreciado durante mucho tiempo. También se sabe que algunos de ellos estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias comensales en el colon, mejorando así la salud del huésped.

Pueden ser necesarios uno o más componentes líquidos farmacéuticamente aceptables. Dichos componentes son bien conocidos por los expertos en la materia.

La composición puede comprender además un componente de fibra. El componente de fibra puede elegirse del grupo

que consiste, entre otros, en fibra de avena, fibra de trigo, fibra de centeno, fibra de chí, fibra de maíz, fibra de cebada, fibra de patata, fibra de fruta, fibra vegetal, fibra de cereal y fibra de algas. La combinación bacteriana también se puede suspender en un engrudo, una papilla, gachas o un pudín.

5 Para preparar una composición de acuerdo con el presente documento, las cepas bacterianas que se incluirán en la composición se pueden cultivar por separado o en combinación con una o más cepas. Si se cultivan por separado y se pretende administrar más de una cepa bacteriana, típicamente las diferentes cepas bacterianas se mezclan para que la composición resultante comprenda la misma cantidad de bacterias (UFC). Las cepas de lactobacilos descritas en el presente documento pueden cultivarse en cualquier medio comúnmente utilizado para cultivar lactobacilos, como
10 caldo/agar de Man-RogosaSharpe (MRS) y agar Rogosa. Las bacterias se cultivan típicamente a una temperatura de alrededor de 25 a 42°C, tal como de 30 a 37°C, en particular alrededor de 37°C. Las bacterias pueden crecer en cultivo líquido con o sin agitación o en medios sólidos. Normalmente, las bacterias se cultivan durante un período de tiempo de 24 a 72 horas. El tiempo de crecimiento dependerá, como sabe el experto en la materia, de diferentes factores, como la temperatura, la cantidad de bacterias inoculadas, el contenido de nutrientes del medio, etc. Normalmente, las bacterias crecen hasta la fase estacionaria.
15 Antes de que las bacterias se administren a un sujeto que las necesite, las bacterias normalmente se aíslan de su medio de crecimiento usado por ejemplo centrifugando o filtrando el cultivo bacteriano. Las bacterias pueden lavarse una o más veces, por ejemplo, en una solución de tampón o sal, como en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) o NaCl al 0,9 %. Antes de su uso, las bacterias se resuspenden en el medio que se utilizará para la administración. Las bacterias también se pueden liofilizar para prolongar su capacidad de almacenamiento. Las bacterias liofilizadas pueden administrarse en su estado seco o pueden disolverse en un líquido o medio que contiene líquido antes de la administración. También es posible reactivar las bacterias liofilizadas en un medio adecuado durante 24 h a temperatura ambiente o hasta una semana a 4 °C. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el período de tiempo y la temperatura para dicha reactivación pueden variar dependiendo, por ejemplo, del medio utilizado. También es posible utilizar los cultivos bacterianos directamente sin separarlos del medio de cultivo utilizado. También es posible separar las bacterias de su medio de crecimiento usado y administrar el medio de crecimiento usado en lugar de las propias bacterias.
25

La invención se describirá ahora con más detalle en las siguientes secciones. Sin embargo, los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Experimentos

Evaluación de la interacción entre lactobacilos y Clostridium difficile: Para evaluar la interacción *in vitro* entre los lactobacilos y *Clostridium difficile*, se determinó la actividad antagónica de 18 cepas de *Lactobacillus* contra 21 *C. difficile* patógenos incluyendo dos cepas hipervirulentas de CD NAP1/027 (también conocidas como CD BI/NAP1/027 o CD NAP1/027). Las cepas CD pertenecían a diferentes genotipos y se aislaron previamente de heces de pacientes hospitalizados en Suecia, principalmente en el Hospital Universitario de Skåne en Malmö, y se incluyeron casos aleatorios de diarrea asociada a antibióticos. La actividad antagónica de los lactobacilos se detectó en placas de agar como inhibición de crecimiento de *C. difficile*. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron 48 h en caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) a 37°C. Las cepas de *C. difficile* se cultivaron 24 h en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) a 37 °C en un ambiente anaeróbico. Todos los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4°C y los sedimentos se suspendieron en una solución de NaCl al 0,9 % para preparar una concentración igual a 0,5 en la escala de turbidez de McFarland. Se inocularon 100 µl de la suspensión de *C. difficile* y se extendió sobre placas de agar sangre Wilkins-Chalgren. 10 µl de cada suspensión de *Lactobacillus* se sembraron en diferentes líneas (alrededor de 2 cm). Las placas se incubaron en un ambiente anaeróbico a 37°C durante 48 h, y las zonas de inhibición de crecimiento de *Lactobacillus* en estría de *C. difficile* fueron investigados.
45

Los resultados demuestran claramente que las cepas de *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), KS11 (LMG P-28885) y Y1An734 (LMG P-28886), así como *S. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888) inhiben el crecimiento de varios de las cepas de *C. difficile* probadas. En particular, una mezcla de estas cinco cepas inhibió el crecimiento de todas las cepas de *C. difficile* probadas. Adicionalmente, *S. salivarius* CW30 (LMG P-28887) y *L. brevis* SH111 (LMG P-28888) y también *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885) inhibieron el crecimiento de las cepas CD NAP1/027. En particular, una mezcla de estas cinco cepas inhibió el crecimiento de las dos cepas CD NAP1/027 analizadas. En particular, otras cepas probadas de Lactobacilli no inhibieron el crecimiento de *C. difficile* en la misma medida.
55

Interacciones de los lactobacilos y las células inmunitarias: Se ha demostrado que la interacción directa de *C. difficile* con las células epiteliales intestinales inicia una cascada de procesos inflamatorios que contribuyen a enfermedades intestinales como la diarrea y la colitis pseudomembranosa. Una composición alterada de la microbiota intestinal y la inflamación interrumpen la función de barrera intestinal, lo que permite que *C. difficile* se multiplique aún más y colonice el intestino. Las células T CD4⁺ que expresan Foxp3 (células T reguladoras; Tregs) son esenciales en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en el intestino, suprimiendo las respuestas inflamatorias dañinas. Basándonos en experiencias previas, hemos aislado tejidos linfoides intestinales (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) de ratones. Se agruparon y se proporcionaron suspensiones de células individuales de células inmunitarias *in vitro*. A continuación, las células se coincubaron con cinco lactobacilos diferentes; *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) solos o combinados. Se sembró un total de 1x10⁶ células inmunitarias/pocillo en una placa de
65

- 96 pocillos (en el medio de cultivo celular RPMI 1640). Se añadieron a las células 1×10^7 UFC/ml (100 μ l) de bacterias (suspendidas en RPMI 1640) y el cocultivo se incubó durante 20 h (37°C, atmósfera humidificada con 5% de CO₂). Al día siguiente, las células se lavaron y analizaron para determinar la prevalencia de Tregs usando citometría de flujo. Se detectaron Tregs que expresaban el receptor CD4, el factor de transcripción (forkhead box P3; Foxp3) y la citocina intracelular IL-10. Las bacterias se usaron en forma individual o en combinaciones de dos, tres, cuatro o cinco cepas. Las combinaciones contenían cantidades iguales de cada cepa (añadidas el mismo día del experimento), todas hasta una concentración final de 1×10^7 UFC/ml. Las muestras de control contenían únicamente medio de cultivo celular. Los resultados se muestran en la Figura 1. Los datos representan la frecuencia de células T CD4⁺Foxp3⁺ en porcentaje.
- Era claramente evidente a partir de los resultados que solo se seleccionaron cepas individuales de *L. plantarum* (SH1313, KS11 o Y1An734), tienen el potencial de inducir un perfil antiinflamatorio y activar Tregs entre las células de tejidos linfoides intestinales recién aislados. *L. salivarius* CW30, *L. brevis* SH111 pueden desencadenar Tregs solo en combinación con cepas cuidadosamente seleccionadas de *L. plantarum*. Los resultados también demostraron que la *L. plantarum* SH1313, *L. plantarum* KS11, *L. plantarum* Y1 An734, *L. salivarius* CW30, y *L. brevis* SH111 trabajan sinérgicamente para activar y aumentar las Tregs. El efecto antiinflamatorio más significativo y profundo se logra mediante el uso de una combinación de las cinco cepas.
- Utilizando el mismo ensayo, hemos comparado aún más el potencial de diferentes lactobacilos para inducir Tregs. Hemos usado *L. plantarum* SH1313 (LMG P28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y cuatro cepas de lactobacilos aisladas de diferentes productos alimenticios disponibles comercialmente; *L. paracasei* CNCM I-1518 (Actimel), *L. plantarum* DSM 9843 (ProViva), *L. acidophilus* DSM 13241 (Aria A-fil) y *L. rhamnosus* ATCC 53103 (yogur Valio). Se cocultivaron 1×10^7 UFC/ml (100 μ l) de cada cepa con células inmunitarias durante 20 h a 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los datos representan la frecuencia de células T CD4⁺Foxp3⁺ en porcentaje.
- Los resultados revelaron que *L. plantarum* (SH1313, KS11 y Y1An734) tienen un potencial significativamente más fuerte para inducir Tregs que otras cepas, incluida la *L. paracasei* CNCM I-1518, *L. plantarum* DSM 9843, *L. acidophilus* DSM 13241 y *L. rhamnosus* ATCC 53103, es decir, que estas cepas de *L. plantarum* (*L. plantarum* (SH1313, KS11 y Y1An734)) tienen un pronunciado efecto antiinflamatorio.
- Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron con StatView y los datos se evaluaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.
- Inhibición entre especies de cinco cepas diferentes de *Lactobacillus*:** Cada vez hay más evidencia que muestra que ciertas mezclas de *Lactobacillus* especies tienen más efectos beneficiosos que sus cepas componentes. Los diversos efectos sinérgicos o aditivos *in vivo* se ha sugerido que está influenciados por la posible inhibición mutua de las cepas componentes. Investigamos si los cinco lactobacilos diferentes; *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) puede inhibir el crecimiento de los demás *in vitro*. Para este propósito se utilizó un ensayo de estrías cruzadas. Cada cepa se sembró en agar MRS usando un asa de 1 ml (3 líneas paralelas). Después de que las líneas se secaron, otras cepas se sembraron perpendicularmente a estas cepas creando 3 zonas potenciales de inhibición para cada combinación de cepas. Si la cepa de prueba obstaculizaba el crecimiento de la segunda cepa, implicaba una inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 2.
- Los resultados revelaron claramente que *L. salivarius* CW30, y *L. brevis* SH111, tienen muy poca, y el *L. plantarum* SH1313, *L. plantarum* KS11, *L. plantarum* Y1An734, no tienen capacidad para inhibir el crecimiento de las otras cepas bacterianas seleccionadas. A pesar de que el preparado de lactobacilos multicepa propuesto (que consta de *L. salivarius* CW30, y *L. brevis* SH111, *L. plantarum* SH1313, *L. plantarum* KS11, y *L. plantarum* Y1An734) puede mantener la inhibición de una gama de *C. difficile*, no hay inhibición entre las cepas componentes que influyan en la eficacia terapéutica de la mezcla bacteriana.
- Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *Lactobacillus*:** Se ha demostrado que las susceptibilidades a los antibióticos de los lactobacilos dependen de la especie y la cepa. Por lo tanto, la susceptibilidad a los antibióticos de los cinco lactobacilos diferentes; *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) se examinaron mediante la prueba de difusión en disco. Se inocularon placas de Agar Rogosa con bacterias de cultivos recién preparados de cepas de *Lactobacillus*. Se realizaron pruebas de difusión en disco para eritromicina (disco de 15 μ g), vancomicina (disco de 30 μ g) y metronidazol (disco de 5 μ g). Los resultados se muestran en la Tabla 3. "S", significa sensible y "R", significa resistente.
- Los datos del perfil antibiótico revelan que *L. salivarius* CW30, y *L. brevis* SH111, *L. plantarum* SH1313, *L. plantarum* KS11, y *L. plantarum* Y1An734 son todos sensibles a la eritromicina, que es un tipo de medicamento conocido como antibiótico macrólido, y ninguna de las cepas es sensible a la vancomicina o al metronidazol.
- Adhesión de cepas de lactobacilos a células Caco-2 similares a enterocitos humanos: La adhesión de las cepas de lactobacilos a la mucosa intestinal es una de las propiedades apropiadas para su colonización en el tracto intestinal, donde

compiten con otras bacterias. La línea de células intestinales humanas Caco-2 (de adenocarcinoma de colon) es un modelo celular bien caracterizado que desarrolla características de enterocitos maduros con microvellosidades funcionales en el borde en cepillo cuando se diferencia completamente. La línea celular Caco-2 se ha utilizado ampliamente para estudiar la adhesión e invasión bacteriana.

En el presente estudio, la adhesión de los diversos *Lactobacillus* se compararon las cepas con las células Caco-2. Las células Caco-2 se cultivaron en placas Petri de plástico de 100 mm. Las células se sembraron a aproximadamente 5×10^5 en una placa de 35 mm y se usaron dos semanas después de la confluencia (células completamente diferenciadas). Se añadieron células bacterianas (5×10^8) a monocapas de células lavadas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Hemos usado *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) y cuatro cepas de lactobacilos aisladas de diferentes productos alimenticios disponibles comercialmente; *L. paracasei* CNCM I-1518, *L. plantarum* DSM 9843, *L. acidophilus* DSM 13241, y *L. rhamnosus* ATCC 53103.

A continuación, todas las monocapas se lavaron 3 veces con PBS para liberar las bacterias no unidas y se tiñeron con solución de tinción de Giemsa. A continuación, las placas se lavaron, se secaron durante 1 h y se examinaron al microscopio (aumento de $\times 100$) bajo inmersión en aceite. Las cepas de *Lactobacillus* se contaron y promediaron en 20 campos microscópicos seleccionados al azar.

Como se indica en la Figura 6, hubo variaciones significativas en la adherencia de diferentes cepas de lactobacilos a las células Caco-2, lo que indica que las propiedades adhesivas no son una característica universal de los lactobacilos. *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), y *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887) mostraron la mayor eficiencia de adhesión a las células Caco-2. Aunque las propiedades adhesivas de *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), y *L. paracasei* CNCM I-1518 son un poco más débiles, su adherencia a las células Caco-2 aún parece más prominente que las propiedades de adhesión de *L. plantarum* DSM 9843, *L. acidophilus* DSM 13241, y *L. rhamnosus* ATCC 53103.

Actividad antagonista de una combinación de cepas de Lactobacillus frente a cepas de Salmonella y Escherichia coli: Hemos evaluado aún más la capacidad de la combinación de cinco lactobacilos; *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, y *Escherichia coli*. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron 48 h en caldo de Man-RogosaSharpe (MRS) a 37°C. Las cepas de *Salmonella* y *E. coli* se cultivaron 24 h en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) a 37 °C. Todos los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4°C y los sedimentos se suspendieron en una solución de NaCl al 0,9 % para preparar una concentración igual a 0,5 en la escala de turbidez de McFarland. Se inocularon 100 µl de suspensiones celulares de las cepas de *Salmonella* o *E. coli* y se extendieron sobre placas de agar sangre Wilkins-Chalgren. Una mezcla que contiene cantidades iguales de cada cinco cepas de *Lactobacillus* (añadidas el mismo día del experimento), se prepararon hasta una concentración final de 1×10^7 UFC/ml. Se sembraron 10 µl de suspensión de *Lactobacillus* en diferentes líneas (alrededor de 2 cm). Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C (con 5 % de CO₂). A continuación, se midieron las zonas de inhibición del crecimiento.

Como se indica en la Tabla 4, los resultados demuestran claramente que una combinación de *L. salivarius* CW30, y *L. brevis* SH111, *L. plantarum* SH1313, *L. plantarum* KS11, y *L. plantarum* Y1An734 es capaz de inhibir fuertemente el crecimiento del *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, y *Escherichia coli*. Los datos demuestran aún más el potencial antimicrobiano de la mezcla de lactobacilos contra las bacterias patógenas gastrointestinales.

Casos clínicos

La presente invención se demuestra mediante los siguientes ejemplos de ensayos clínicos que se realizaron en el Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Skåne en Malmö, Suecia (durante 2013-2014). Los ejemplos, materiales y procedimientos implicados deben entenderse ampliamente con el alcance y el espíritu de la invención tal como se establece en este documento.

Caso 1: La infección por *Clostridium difficile* es una complicación comúnmente asociada con la terapia con antibióticos en pacientes hospitalizados. Una paciente de 70 años con cáncer anal en curso y cirugía de estoma recibe varios ciclos de antibióticos debido a problemas con la herida. Mostró colitis recurrente por *C. difficile* durante un año y fueron tratados varias veces con metronidazol y luego vancomicina con una estrategia de desescalada de menos de seis semanas. Una vez más, desarrolló infección recurrente por *C. difficile* (ICD). Método: Se proporcionó una combinación de cinco lactobacilos; *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886) (cantidades iguales de cada cepa). Se combinaron 1×10^{12} UFC con un engrudo estéril rico en fibra. A continuación, la composición se mezcló con una solución de enema y se realizó una infusión colónica mediante un tubo rectal. El tratamiento se repitió cinco veces con un intervalo de 3-5 días.

Resultado: El paciente se curó clínica y bacteriológicamente después de 3 meses y no mostró signos de infección recurrente hasta un año después del último tratamiento.

- 5 Caso 2: Paciente masculino de 75 años con pluripatología. Mostró colitis recurrente por *C. difficile* después de un tratamiento a largo plazo con Dalacin, que contiene el antibiótico llamado clorhidrato de clindamicina, el año anterior. Recibió dos ciclos de metronidazol, seguidos de 10 días de tratamiento con vancomicina. Tras seis semanas bajo estrategia de desescalada, presenta ICD recurrente. Recibió un trasplante de microbiota fecal que contenía heces de donantes sanos preparadas por los investigadores clínicos del hospital. Después de un nuevo curso del tratamiento con antibióticos, desarrolló ICD recurrente una vez más.
- 10 *Método:* Se proporcionó una composición de cinco lactobacilos como se describe anteriormente y se infundió la solución de enema. El tratamiento se repitió tres veces con un intervalo de 7 días.
- Resultado:* El paciente se curó clínicamente después de unos días y no mostró signos de infección recurrente hasta un año después del último tratamiento.
- 15 Caso 3: Una paciente de 55 años presentó colitis recurrente por *C. difficile* después de tratamientos antibióticos a largo plazo. Recibió dos ciclos de metronidazol, seguidos de 10 días de tratamiento con vancomicina. Tras seis semanas bajo estrategia de desescalada, presenta ICD recurrente.
- 20 *Método:* Se proporcionó una composición de cinco lactobacilos como se describe anteriormente y se infundió la solución de enema. El tratamiento se repitió tres veces con un intervalo de 7 días.
- Resultado:* El paciente se curó clínicamente después de unos días y no mostró signos de infección recurrente hasta un año después del último tratamiento.
- 25 Caso 4: Un hombre joven, de 20 años, desarrolló el síndrome del intestino irritable (SII) después de una gastroenteritis anterior. Recibió trasplante de microbiota fecal con heces de donantes sanos (preparadas por los investigadores clínicos del hospital) en dos ocasiones sin signos de mejoría de su estado.
- 30 *Método:* Se proporcionó una composición de cinco lactobacilos como se describe anteriormente y se infundió la solución de enema. El tratamiento se repitió tres veces con un intervalo de 7 días.
- Resultado:* El paciente mostró una mejoría significativa en la sintomatología del SII. No ha mostrado ningún signo de deterioro clínico hasta un año después del último tratamiento.
- 35 Los resultados de las investigaciones clínicas demuestran que una composición bacteriana que consta de *L. plantarum* SH1313 (LMG P-28884), *L. salivarius* CW30 (LMG P-28887), *L. brevis* SH111 (LMG P-28888), *L. plantarum* KS11 (LMG P-28885), y *L. plantarum* Y1An734 (LMG P-28886), es efectivo y relativamente seguro para el tratamiento de pacientes que padecen afecciones gastrointestinales graves.

REIVINDICACIONES

1. Composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una condición gastrointestinal, que comprende una combinación de *L. salivarius* CW30, depositado como LMG P-28887, *L. plantarum* Y1An734 depositado como LMG P-28886, *L. plantarum* SH1313, depositado como LMG P-28884, *L. plantarum* KS11, depositado como LMG P-28885, y *L. brevis* SH111, depositado como LMG P-28888.
5
2. Composición para uso según la reivindicación 1, donde dicha afección gastrointestinal implica inflamación.
3. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la afección gastrointestinal es una diarrea, diarrea asociada a antibióticos (DAA), gastroenteritis, gastroenteritis aguda y diarrea infecciosa.
10
4. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la afección gastrointestinal es una infección bacteriana por *Clostridium difficile*, *Salmonella* o *Escherichia coli*.
15
5. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la afección gastrointestinal es una infección por *Clostridium difficile* NAP1/027.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la afección gastrointestinal es el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria del intestino (EII).
20
7. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición se administra por vía oral o como un enema o como una infusión en el tracto gastrointestinal superior.
8. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad total de *Lactobacillus* es de 10^9 a 10^{13} UFC por tratamiento.
25
9. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición está liofilizada.
10. Composición para uso según la reivindicación 9, donde la composición comprende además un componente de fibra.
30
11. Un enema que comprende una composición según la reivindicación 1.

Figura 1:

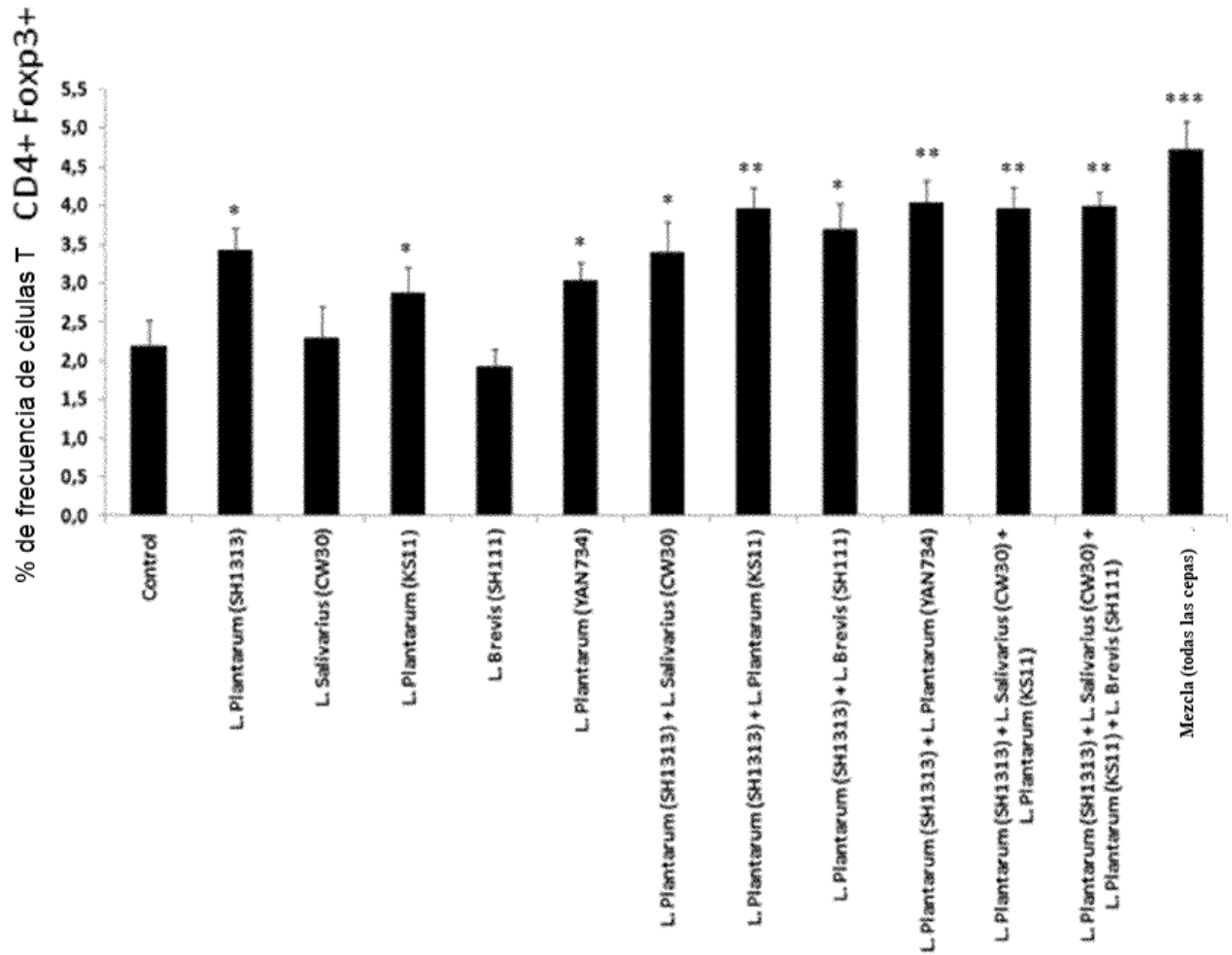


Figura 2:

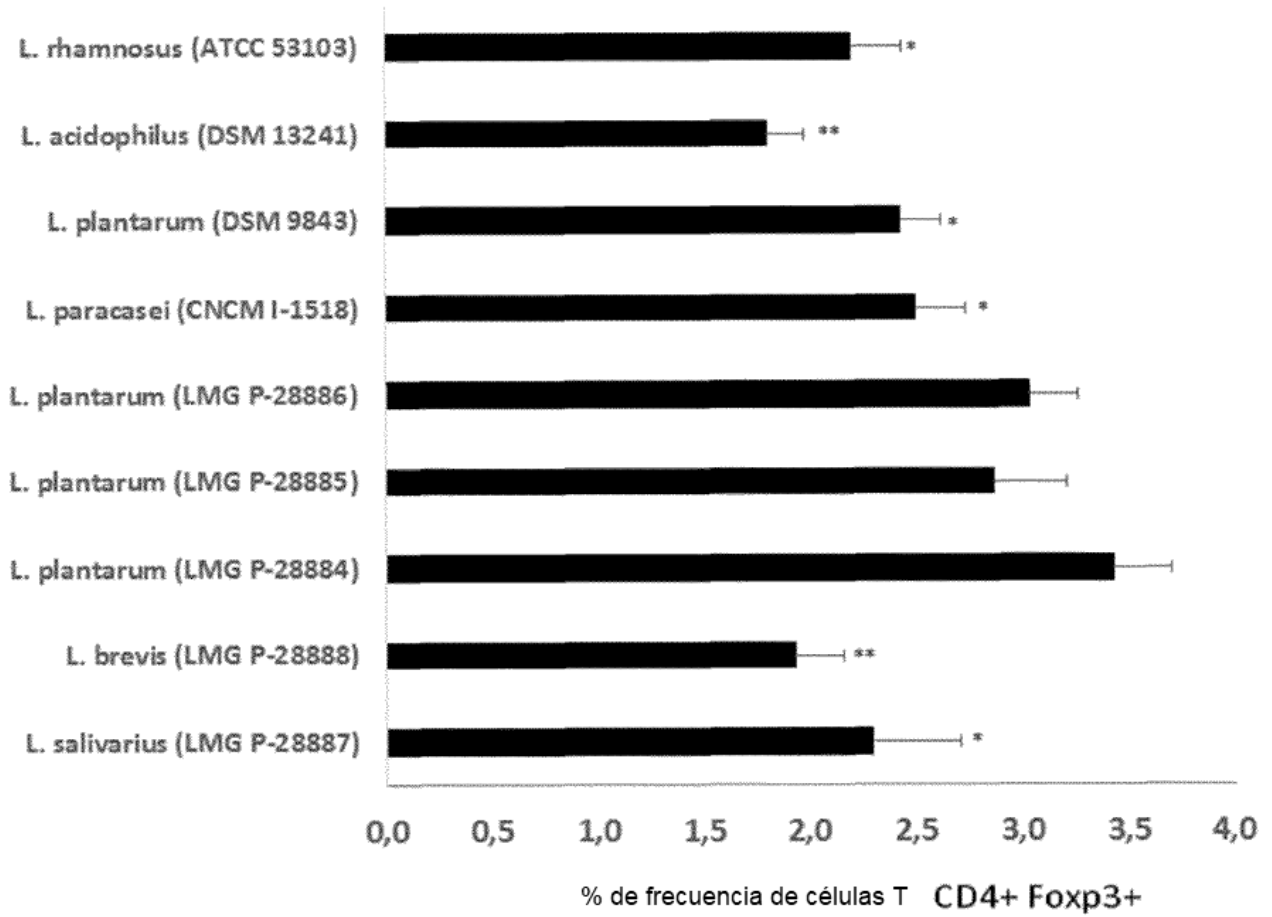


Figura 3:

Tabla 1

Número de cepa	<i>C. difficile</i>																			NAP1/027	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	1	2
<i>L. Plantarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Plantarum</i> (SH1313)	+	+	+	-	+		+		+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>L. Brevis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Salivarius</i> (CW30)	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>L. Paracasei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Vaginalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Reuteri</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Brevis</i> (SH111)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>L. Plantarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Plantarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. Plantarum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. Salivarius</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. Plantarum</i> (KS11)	+	+	+	-		+	+	-	-		+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. Brevis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. Casei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
<i>L. Plantarum</i> (YAN734)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Mezcla de SH1313+CW30+SH111+KS11 +YAN734	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 4:

Tabla 2

	L. Plantarum (SH1313)	L. Solivarius (CW30)	L. Brevis (SH111)	L. Plantarum (KS11)	L. Plantarum (VAN734)
L. Plantarum (SH1313)	-	-	+	-	-
L. Solivarius (CW30)	-	-	+	+	-
L. Brevis (SH111)	-	+	-	-	+
L. Plantarum (KS11)	-	-	-	-	-
L. Plantarum (VAN734)	-	+	-	-	-

Figura 5:

Tabla 3

	<i>L. Plantarum</i> (SH1313)	<i>L. Salivarius</i> (CW30)	<i>L. Brevis</i> (SH111)	<i>L. Plantarum</i> (KS11)	<i>L. Plantarum</i> (YAN734)
Eritromicina	S	S	S	S	S
Vancomicina	R	R	R	R	R
Metronidazol	R	R	R	R	R

Figura 6:

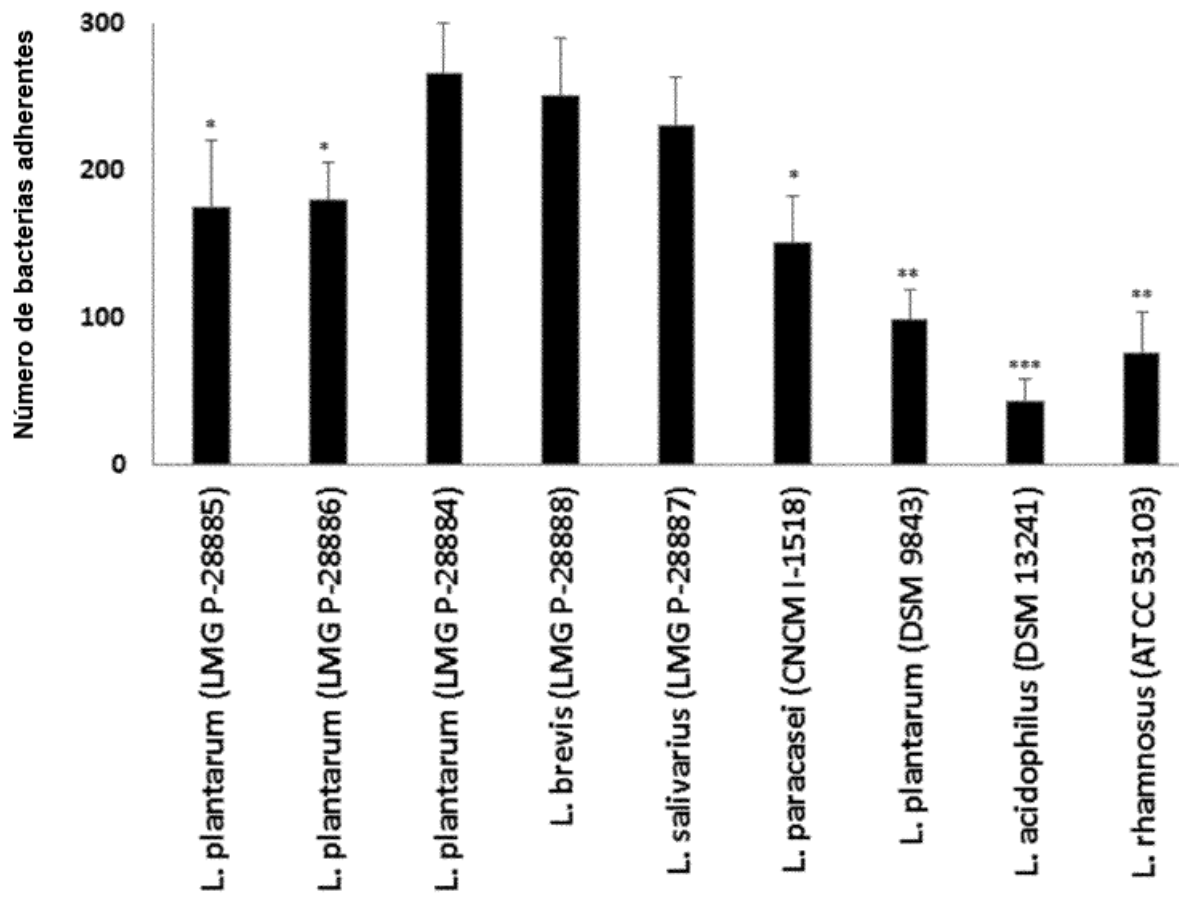


Figura 7:

Tabla 4

	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Mezcla de <i>L. Plantarum</i> (SH1313)			
+ <i>L. Salivarius</i> (CW30) + <i>L. Brevis</i> (SH111) + <i>L. Plantarum</i> (KS11)	++++	+++	++++
+ <i>L. Plantarum</i> (YAN734)			

Figura 8:

[illegible]