

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 142**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2021** **PCT/EP2021/065710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2021** **WO21250208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2021** **E 21731798 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 4165220**

54 Título: **Composición probiótica y usos de la misma contra infecciones por *Candida***

30 Prioridad:

11.06.2020 EP 20179563

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

ADM DENMARK A/S (100.0%)
Bogbinderivej 6
3390 Hundested, DK

72 Inventor/es:

BRANDBORG, ERIK y
MIKKELSEN, LASSE SOMMER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 142 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 probiótica y usos de la misma contra infecciones por *Candida*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende un *Lactobacillus rhamnosus* opcionalmente en combinación con otros lactobacilos y al uso de los mismos en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis.

10

Antecedentes de la invención

Las especies de *Candida* son comensales en la cavidad bucal y forman parte de la microbiota normal en aproximadamente el 50 % de los individuos sanos. Sin embargo, las especies de *Candida* son patógenos oportunistas que, en determinadas circunstancias, provocan infección en la mucosa bucal, denominada candidiasis bucal. Las infecciones son provocadas principalmente por *Candida albicans* que tiene la capacidad de cambiar entre la forma de blastospora y la forma de hifas, más invasiva. Sin embargo, se han aislado otras especies de *Candida* de sitios infectados en la cavidad bucal, incluyendo *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis*.

15

Actualmente, el aumento de la resistencia de los hongos a la terapia antimicótica provoca preocupación y, en consecuencia, se ha propuesto un enfoque bioecológico alternativo para el tratamiento contra los hongos.

20

Existe un creciente interés por las bacterias probióticas para prevenir y combatir enfermedades bucales. La OMS define las bacterias probióticas como "*Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador*". Se cree que los géneros probióticos más comunes *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* actúan mediante exclusión competitiva de patógenos de los sitios de adhesión de la mucosa bucal, compitiendo por los nutrientes disponibles y alterando la defensa inmunitaria de la mucosa del hospedador.

25

Además, algunas bacterias probióticas producen ácidos a partir de la fermentación de hidratos de carbono, lo que genera un pH bajo, y algunas bacterias acidolácticas producen peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y bacteriocinas que son perjudiciales para los patógenos.

30

Las bacterias probióticas se consideran beneficiosas en varias áreas del cuerpo humano, incluyendo la cavidad bucal y la vagina. Por lo tanto, una microbiota sana puede prevenir el desarrollo de infecciones patógenas, tales como la infección por *Candida* patógena.

35

La candidiasis es una infección provocada por una especie de *Candida*. La *Candida* aparece en la microbiota normal y sana de la piel y del interior del cuerpo, en lugares tales como la boca, la garganta, el intestino y la vagina, sin ser patógena. Ocasionalmente, la *Candida* puede provocar una infección patógena si el ambiente dentro de la boca, la garganta o el esófago cambian de una manera que estimula el crecimiento de los hongos.

40

La candidiasis en la boca y la garganta se denomina aftas o candidiasis orofaríngea. La candidiasis en el esófago se denomina candidiasis esofágica o esofagitis por *Candida*. La candidiasis esofágica es una de las infecciones más comunes en personas que viven con VIH/SIDA.

45

La vulvovaginitis por *Candida* es provocada por cambios inflamatorios en el epitelio vaginal y vulvar secundarios a la infección por especies de *Candida*, más habitualmente *Candida albicans*. *Candida* es parte de la microbiota vaginal normal de muchas mujeres y con frecuencia es asintomática. Por lo tanto, la vulvovaginitis candidiásica se desarrolla cuando *Candida* provoca una infección patógena en la vagina/vulva, que se asocia a síntomas de irritación, picor, disuria o inflamación.

50

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones que contribuyan al mantenimiento de la salud bucal o vaginal. En particular, existe la necesidad de composiciones que puedan usarse en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis.

55

Sumario de la invención

La presente invención se realizó en vista de la técnica anterior descrita anteriormente y el objeto de la presente invención es proporcionar una composición probiótica, que puede usarse en el mantenimiento de la salud bucal o vaginal. En particular, el objeto de la presente invención es proporcionar una composición probiótica para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis.

60

Para resolver el problema, la presente invención proporciona composiciones que comprenden la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y métodos de uso de la misma. Es decir, los inventores de la presente invención han descubierto que la composición de la presente invención que comprende la cepa ERB 36 de

65

Lactobacillus rhamnosus (DSM 32992) es capaz de inhibir el crecimiento de especies de *Candida* que se sabe que se asocian a infecciones bucales o vaginales patógenas.

Zheng *et al.* propusieron recientemente enmiendas taxonómicas para el género *Lactobacillus*. (Zheng et al. (2020), incorporado en el presente documento por referencia). Sin embargo, los cambios taxonómicos propuestos no han sido aprobados ni implementados en la actualidad. Los cambios taxonómicos sugeridos que pueden llegar a ser relevantes para la presente invención son *Lactocaseibacillus rhamnosus* (actualmente *Lactobacillus rhamnosus*) y *Latilactobacillus curvatus* (*Lactobacillus curvatus*).

Un primer aspecto de la presente invención proporciona la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un cultivo que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a la composición de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a la composición de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un producto nutracéutico que comprende la composición de acuerdo con la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un suplemento nutricional que comprende la composición de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un recipiente que contiene la composición de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un kit que comprende una pluralidad de recipientes de acuerdo con la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para reducir una infección por *Candida* spp. en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Un aspecto adicional más de la presente invención se refiere a un método para reducir, aliviar o prevenir la candidiasis en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Un aspecto relacionado de la presente invención proporciona un método para el mantenimiento de la salud bucal o vaginal en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Mediciones de pH en placas de agar de control sin *Candida*.

Figura 2 Mediciones de pH en placa de agar con *C. dubliniensis*.

Figura 3 Mediciones de pH en placa de agar con *C. albicans*.

Figura 4 Mediciones de pH en placa de agar con *C. glabrata*.

Figura 5 Mediciones de pH en placa de agar con *C. parapsilosis*.

Figura 6 Mediciones de pH en placa de agar con *C. tropicalis*.

Figura 7 Mediciones de pH en placa de agar con *C. krusei*.

Tabla 1 Lista de microbios utilizados en el Ejemplo 1.

Tabla 2 Inhibición del crecimiento de seis aislados clínicos y seis especies de *Candida* de referencia por 14 cepas diferentes de lactobacilos a diferentes concentraciones celulares (unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). Mediana de puntuaciones de inhibición de acuerdo con un modelo modificado de Simark-Mattson *et al.*, Sistema de puntuación de 2007: 0 = inhibición completa (sin colonias visibles); 1 = inhibición casi total (las colonias son ligeramente visibles); 2 = ligera inhibición (las colonias son claramente visibles, pero más pequeñas que en la placa de control); 3 = sin inhibición del crecimiento (colonias iguales a las de la placa de control)

Tabla 3 Frecuencia en porcentaje (%) de la puntuación de inhibición del crecimiento 0-3 para cada cepa de lactobacilos (todas las concentraciones).

Tabla 4 Tabla 4x4 que muestra la comparación entre los cuatro lactobacilos con mejor rendimiento. Números que indican valores de p. Ensayo de chi cuadrado entre las cuatro cepas de lactobacilos seleccionadas.

Tabla 5 Frecuencia en porcentaje (%) de la puntuación de inhibición del crecimiento de 0-3 para cada dosis basada en ensayos con las 14 cepas de lactobacilos.

Tabla 6 Frecuencia en porcentaje (%) de la puntuación de inhibición del crecimiento 0-3 para cada especie de *Candida* basada en ensayos con las 14 cepas de lactobacilos (todas las concentraciones).

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición probiótica para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis. Con el fin de identificar bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Candida* spp., los inventores realizaron un estudio de interferencia de superposición de agar empleando 14 cepas de lactobacilos y seis *Candida* spp. (véase el Ejemplo 1).

La cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) incluidas en el estudio se aislaron de la mucosa bucal de un donante infantil sano. El estudio identificó que las dos cepas de *Lactobacillus* tenían efectos inhibidores particulares sobre el crecimiento de las *Candida* spp.

Un estudio adicional reveló que la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) eran los lactobacilos de mejor rendimiento con respecto a la producción de ácido, lo que sugiere que la producción de ácido desempeña una función importante en la inhibición del crecimiento de *Candida* spp. (véase el Ejemplo 2).

Lactobacillus rhamnosus ERB 36 (también denominado P5-1 en el presente documento) se depositó en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el

12 de diciembre de 2018 a efectos del depósito de patentes de acuerdo con el Tratado de Budapest. El número de depósito de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* es DSM 32992.

Lactobacillus rhamnosus ERB18 (también denominado P2-1 en el presente documento) se depositó en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 12 de diciembre de 2018 a efectos del depósito de patentes de acuerdo con el Tratado de Budapest. El número de depósito de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* es DSM 32991.

Un primer aspecto de la presente invención proporciona la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992). La cepa también se denomina en el presente documento P5-1 y se identificó que era superior a las otras cepas incluidas en el estudio (véanse los Ejemplos 1 y 2).

En una realización, la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) aislada se proporciona en su forma aislada pura. En otra realización, la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) se proporciona en una forma aislada esencial.

Cultivo microbiano, caldo de cultivo

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) de la presente invención. Las células de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) comprendidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento inicialmente son esencialmente todas viables. "Esencialmente todas viables" significa al menos el 50 % de las bacterias presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento inmediatamente después de la preparación de los mismos, son viables, tal como al menos el 75 %, por ejemplo, al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, por

ejemplo, al menos el 95 %.

La viabilidad de las bacterias se puede confirmar sembrando en placa las bacterias en un medio adecuado (por ejemplo, agar solidificado en una placa de Petri de tamaño convencional) y determinando el número de colonias formadas. La medida, unidad formadora de colonias (o UFC), se usa para cuantificar la cantidad de bacterias viables (vivas) en la composición (lo que refleja la capacidad de las bacterias para replicarse).

Las bacterias comprendidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo, fermento y la composición de la presente invención confieren un beneficio para la salud al sujeto, cuando un sujeto las ingiere en cantidades adecuadas (tal como en forma de una formulación como se describe en el presente documento). De ello se deduce que la bacteria no es patógena y no confiere ningún efecto nocivo en las cantidades ingeridas. Las bacterias también se denominan bacterias probióticas.

En una realización de la presente invención, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento es uno puro o esencialmente puro, en el sentido de que el único o esencialmente único organismo presente es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En otra realización, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende al menos un microorganismo probiótico adicional, preferentemente una bacteria probiótica. Preferentemente, la al menos una bacteria probiótica adicional es una especie de lactobacilo.

En otra realización, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende al menos una especie de lactobacilo seleccionada del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), *Lactobacillus jensenii* 22B42, la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).

En una realización preferida, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende además la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991). En una realización adicional, las bacterias presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende además o consiste esencialmente en la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y al menos una especie de lactobacilo seleccionada del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), *Lactobacillus jensenii* 22B42, la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).

Los microbios presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento están equilibrados preferentemente de manera que la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) no es superada en número por otras bacterias incluidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento. Por ejemplo, las UFC en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento pueden distribuirse uniformemente entre los microbios presentes.

En otra realización, al menos el 50 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992), tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En una realización adicional, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991).

En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es *Lactobacillus jensenii* 22B42.

En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870).

En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

Composición

Un tercer aspecto proporciona una composición que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992). En una realización de la presente invención, la composición es una pura o esencialmente pura, en el sentido de que el único o esencialmente único organismo presente es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En otra realización, la composición comprende al menos un microorganismo probiótico adicional, preferentemente una bacteria probiótica. En una realización de la presente invención, la composición es una pura o esencialmente pura, en el sentido de que el único o esencialmente único organismo presente es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).

En otra realización, la composición comprende al menos un microorganismo probiótico adicional, preferentemente una bacteria probiótica. En una realización, la composición comprende además *Bacillus subtilis* DE111. Preferentemente, la al menos una bacteria probiótica adicional es una especie de lactobacilo.

5 En otra realización, la composición comprende además al menos un *Lactobacillus* sp. seleccionado del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), *Lactobacillus jensenii* 22B42, la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).

10 En una realización preferida, la composición comprende además la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991). En una realización adicional, las bacterias presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende además, consiste o consiste esencialmente en la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y al menos una especie de lactobacilo seleccionada del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), *Lactobacillus jensenii* 22B42, la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y
15 *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).

Los microbios presentes en la composición están equilibrados preferentemente de manera que la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) no es superada en número por otras bacterias incluidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento. Por ejemplo, las UFC en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento
20 pueden distribuirse uniformemente entre los microbios presentes.

En otra realización, al menos el 50 % de las UFC presentes en la composición es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992), tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las UFC es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).
25

En una realización adicional, aproximadamente el 50 % de las UFC presentes en la composición es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991).
30

En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC presentes en la composición es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es *Lactobacillus jensenii* 22B42.

35 En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC presentes en la composición es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870).

En una realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC presentes en la composición es la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).
40

Las unidades formadoras de colonias (UFC) iniciales y la estabilidad y viabilidad continuas de la composición están influenciadas por una diversidad de factores. La estabilidad de una composición probiótica sometida a ensayo en el momento de su fabricación dependerá de una combinación de factores. Variaciones en el envasado, la temperatura y
45 la humedad afectarán a la viabilidad de los productos probióticos antes de tomarlos. Los factores protectores que ayudan a conservar la frescura y viabilidad de las cepas probióticas en un suplemento incluyen refrigeración, envasado resistente y almacenamiento en un lugar fresco y seco. Si una composición probiótica se mantiene en condiciones muy cálidas o húmedas, las UFC en la composición disminuyen. Por lo tanto, la estabilidad y viabilidad continuas dependen de limitar su exposición a condiciones ambientales estimulantes tales como el calor y la humedad.

50 En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos 10^5 UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^6 UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^7 UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición.
55

En una realización, la composición de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992), por ejemplo, al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por gramo de dicha
60 composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por gramo de dicha composición.

En una realización de la presente invención, la composición comprende de 10^5 a 10^{13} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como de 10^5 a 10^{13} UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992). En otra realización de la presente invención, la composición comprende de 10^6 a 10^{12} UFC de lactobacilos por gramo de
65

dicha composición, tal como de 10^6 a 10^{12} UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992). En otra realización más, la composición comprende de 10^7 a 10^{11} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como de 10^7 a 10^{11} UFC de la cepa ERB36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992). En una realización adicional, la composición comprende de 10^8 a 10^{10} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como de 10^8 a 10^{10} UFC de la cepa ERB36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992), por ejemplo, 10^9 lactobacilos por gramo de dicha composición.

En una realización, la composición comprende la cepa ERB36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991).

En una realización adicional, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por gramo de dicha composición.

En una realización, la composición comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y *Lactobacillus jensenii* 22B42.

En una realización adicional, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por gramo de dicha composición.

En una realización, la composición comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870).

En una realización adicional, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición.

En una realización, la composición comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).

En una realización adicional, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por gramo de dicha composición, por ejemplo, al menos 10^9 UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por gramo de dicha composición.

Las cepas de lactobacilos de la composición de la presente invención pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada dependiendo de la formulación de la composición. En una realización preferida, los lactobacilos están en una forma liofilizada, secada por pulverización, secada al vacío o microencapsulada o cualquier combinación de las mismas. Por lo tanto, en una realización, la composición de la invención se proporciona en un recipiente, tal como un vial, que comprende una o más cepas de lactobacilos en forma liofilizada o secada por pulverización.

Excipientes

En una realización de la presente invención, la composición comprende además al menos un excipiente. En otra realización, el al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en un agente de carga, un aglutinante, un agente de revestimiento, un edulcorante y un aroma.

En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de carga" se refiere a un aditivo que aumenta el volumen o peso de la composición manteniendo intacta su utilidad o funcionalidad. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un agente de carga seleccionado del grupo que consiste en xilitol, sorbitol, eritritol, maltitol, lactitol, inositol y manitol, celulosa microcristalina, glucosa, isomalt y almidón, tal como almidón de patata o almidón de maíz.

En el contexto de la presente invención, el término "aglutinante" se refiere a material de unión que mantiene juntos los componentes de la composición, estabiliza una forma o conformación, o hace que una mezcla se fusione. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un aglutinante seleccionado del grupo que consiste en maltodextrina y carboximetilcelulosa de sodio.

En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de revestimiento" se refiere a una sustancia natural o

sintética que proporciona un recubrimiento ceroso y homogéneo, para proporcionar protección a la composición. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un agente de revestimiento seleccionado del grupo que consiste en mono y diglicéridos de ácidos grasos, dióxido de silicio, ácido esteárico, cera de abejas, cera de candelilla, cera de carnauba, goma laca, cera microcristalina, cera cristalina, lanolina, cera de polietileno oxidado, ésteres de colofonio, parafina.

La composición de la presente invención puede comprender además al menos un edulcorante. En una realización, el al menos un edulcorante es un edulcorante bajo en calorías.

En una realización, el edulcorante bajo en calorías se selecciona de la lista que consiste en un edulcorante a granel y un edulcorante intenso. En una realización más, el edulcorante bajo en calorías es un alcohol de azúcar. En una realización adicional, el edulcorante bajo en calorías se selecciona de la lista que consiste en xilitol, sorbitol, eritritol, maltitol, lactitol, isomalt, inositol y manitol.

La composición puede comprender una combinación de edulcorante bajo en calorías tal como una combinación de alcoholes de azúcar como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la composición también puede comprender una combinación de uno o más edulcorantes a granel y uno o más edulcorantes intensos.

En una realización, la composición comprende un edulcorante intenso seleccionado de la lista que consiste en sacarina, aspartamo, estevia, un glucósido de esteviol tal como esteviósido, sucralosa y acesulfamo tal como acesulfamo de potasio (Ace-K). En otra realización, el edulcorante se selecciona del grupo que consiste en rebaudiósido, aspartamo, neotamo, sacarina y advantamo.

La composición de la presente invención comprende al menos un aroma. Se puede incluir más de un aroma para proporcionar una experiencia de degustación más compleja. En una realización, dicho al menos un aroma es al menos un aroma seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, aroma de limón, aroma de melón dulce, aroma de arándano, aroma de melocotón, aroma de fresa, aroma de frambuesa, aroma de cola, aroma de chocolate, aroma de menta, aroma de cereza, aroma de lima, aroma de naranja, aroma de vainilla, aroma de mandarina, aroma de regaliz, aroma de albaricoque, aroma de eucalipto, aroma de té verde, aroma de jengibre y aroma de murtón. La cantidad de compuestos aromatizantes en la composición puede variar. En una realización, el al menos un aroma está presente en una cantidad del 1 al 10 % p/p en dicha composición.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende:

- (i) agentes de carga en forma de xilitol y celulosa microcristalina, isomalt,
- (ii) aglutinantes en forma de maltodextrina y carboximetilcelulosa de sodio,
- (iii) agentes de revestimiento en forma de mono y diglicérido de ácidos grasos y dióxido de silicio,
- (iv) un edulcorante en forma de glucósido de esteviol, y
- (v) opcionalmente aromas, por ejemplo, en forma de ácido cítrico y aroma de limón.

La composición también puede comprender un prebiótico que estimula la proliferación del microorganismo en el tracto gastrointestinal (GI) del sujeto que ingiere la composición. En una realización, la composición comprende además al menos un prebiótico seleccionado del grupo que consiste en sialooligosacáridos (SOS), fructo-oligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos (OMI), xilooligosacáridos (XOS), arabino-xilooligosacáridos (AXOS), manano oligosacáridos (MOS), oligosacáridos de soja, glicosilsacarosa (GS), lactosacarosa (LS), sialil-lactosa (SL), fucosil-lactosa (FL), Lacto-N-Neotetraosa (LNNT), lactulosa (LA), palatinosa-oligosacáridos (PAO), malto-oligosacáridos, gomas y/o hidrolizados de los mismos, pectinas, almidones y/o hidrolizados de los mismos.

Formulación de la composición de la invención

La composición puede proporcionarse en cualquier formulación adecuada. Preferentemente, la composición se proporciona en una formulación adecuada para la administración oral. En otra realización, la composición se proporciona en una formulación adecuada para la administración vaginal. En una realización, la composición está en forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, granulado, un producto liofilizado, un producto secado por pulverización, un producto secado al vacío, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema o cualquier combinación de los mismos. En una realización preferida, la composición se formula como un comprimido, preferentemente un comprimido masticable.

En una realización, la composición de la presente invención se formula como una composición farmacéutica, que comprende al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Uso de la composición de la presente invención

Un aspecto de la presente invención proporciona la composición para su uso como medicamento. El inventor ha descubierto que la composición puede inhibir el crecimiento de *Candida* spp., que se sabe que provoca infecciones bucales y vaginales patógenas.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a la composición de la presente invención para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria. En una realización, dicha enfermedad inflamatoria es una afección inflamatoria en la cavidad bucal o en la vagina. En una realización, la composición para su uso en el tratamiento de una infección patógena por *Candida*, por ejemplo, en la cavidad bucal o la vagina.

En una realización preferida, la composición de la invención es para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis, tal como la candidiasis bucal o la candidiasis vaginal.

La *Candida* spp. infecciosa puede ser cualquier *Candida* spp. En una realización, la *Candida* spp. se selecciona de la lista que consiste en *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*. En una realización preferida, la composición es para su uso en una infección patógena por *Candida* con la condición de que dicha candidiasis no sea provocada por *Candida albicans*.

La composición puede ser para la administración en forma de una dosis una vez al día. La composición puede formularse, por lo tanto, en consecuencia, por ejemplo, en forma de una unidad de dosis diaria. La composición también puede ser para la administración en forma de una dosis de dos veces al día, dosis de tres veces al día o incluso para la administración varias veces al día. De ello se deduce que la composición puede formularse por lo tanto de acuerdo con la pauta posológica. En una realización de la presente invención, la composición se administra dos veces al día.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de lactobacilos por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de lactobacilos por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de lactobacilos por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, por ejemplo, al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria.

En otra realización, la composición comprende además la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991). En una realización, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria, por ejemplo, al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa ERB 18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa ERB 18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991) por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de *Lactobacillus jensenii* 22B42 por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) por dosis diaria.

En una realización de la presente invención, la composición para el uso de acuerdo con la presente invención se administra por vía oral. Para este fin, la composición puede proporcionarse en forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, granulado, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema. En una realización preferida, la composición se formula como un comprimido, preferentemente un comprimido masticable.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para el mantenimiento de la salud bucal o vaginal en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para reducir una infección por *Candida* spp. en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para reducir, aliviar o prevenir la candidiasis en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la candidiasis es candidiasis bucal. En otra realización, la candidiasis es candidiasis vaginal.

La *Candida* spp. infecciosa puede ser cualquier *Candida* spp. En una realización, la *Candida* spp. se selecciona de la lista que consiste en *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*. En una realización preferida, la composición es para su uso en una infección patógena por *Candida* con la condición de que dicha candidiasis no sea provocada por *Candida albicans*.

Los métodos anteriores comprenden preferentemente la administración diaria de la composición de la presente invención. En una realización, la composición proporcionada al sujeto comprende al menos 10^7 UFC de lactobacilos por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de lactobacilos por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de lactobacilos por dosis diaria.

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, por ejemplo, al menos 5×10^7 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) por dosis diaria.

Composición nutracéutica y suplemento nutricional

En el contexto de la presente invención, un suplemento nutricional (o un suplemento dietético) es un producto destinado a la ingestión que contiene un "ingrediente dietético" destinado a añadir a la dieta valor nutricional adicional (suplementación).

Un aspecto de la presente invención proporciona un suplemento nutricional que comprende la composición de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión "productos nutracéuticos" se refiere a un producto derivado de fuentes alimenticias con los beneficios adicionales para la salud descritos en el presente documento, además del valor nutricional básico que se encuentra en los alimentos. Los productos nutracéuticos de la presente invención pueden contribuir al mantenimiento de la salud bucal o vaginal en un sujeto y reducir el riesgo de contraer una afección inflamatoria en la cavidad bucal, tal como una enfermedad periodontal, por ejemplo, gingivitis. Los productos nutracéuticos de la presente invención también pueden reducir el riesgo de contraer infecciones patógenas de especies de *Candida*.

Un aspecto de la presente invención proporciona un producto nutracéutico que comprende la composición de la presente invención. En una realización, el producto nutracéutico se proporciona en forma de un alimento funcional. El alimento funcional es una categoría que incluye alimentos integrales y fortificados con la composición de la presente invención. En otra realización, el producto nutracéutico se proporciona en forma de un alimento medicinal. El alimento medicinal se formula para ser consumido o administrado internamente, bajo la supervisión de un médico calificado.

El suplemento nutricional puede proporcionarse en muchas formas, tales como comprimidos (tales como comprimidos masticables), comprimido efervescente, polvo efervescente, cápsulas, cápsulas blandas, cápsulas de gel, líquidos o polvos.

El suplemento nutricional y nutracéutico de la presente invención puede contribuir al mantenimiento de la salud bucal o vaginal en un sujeto y reducir el riesgo de contraer infecciones patógenas de especies de *Candida*.

Envasado

La composición de la presente invención normalmente se envasa en un recipiente, que está preferentemente sellado,

que proporciona una barrera frente al oxígeno y la humedad con el fin de mantener la integridad de la composición.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a un recipiente que contiene la composición de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de recipientes adecuados incluyen un envase de tipo blíster (tal como un envase de tipo blíster de comprimidos), un sobrecito stick, bolsa, bolsita o cápsula. En una realización preferida, el recipiente es un papel de aluminio o un sobrecito stick de polietileno, que normalmente se sella mediante soldadura. El sobrecito stick normalmente se configura para una apertura fácil por rasgado. El sobrecito stick puede tener una muesca de desgarro. Por lo tanto, el sobrecito stick puede desecharse después de la ingestión de la composición. Preferentemente, el recipiente, tal como en forma de sobrecito stick o envase de tipo blíster de comprimidos, comprende una dosis única de la composición.

El recipiente puede comprender un desecante que induzca o mantenga un estado de sequedad (deseccación) de la composición. Los desecantes pueden estar en formas distintas de la sólida y pueden funcionar mediante otros principios, tales como el enlace químico de moléculas de agua.

El desecante puede ser cualquier desecante adecuado para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas. Los ejemplos de desecantes incluyen sílice, carbón vegetal y tamices moleculares.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit, en donde dicho kit comprende una pluralidad de recipientes, cada uno de los cuales comprende la composición de la presente invención. Preferentemente, cada recipiente del kit comprende una dosis única de la composición. Cada recipiente del kit puede comprender la misma composición. Como alternativa, los recipientes pueden comprender diferentes composiciones, por ejemplo, las composiciones pueden comprender diferentes aromas.

En la descripción de las realizaciones de la presente invención, no se han descrito explícitamente las combinaciones y permutaciones de todas las posibles realizaciones. Sin embargo, el simple hecho de que determinadas medidas se citen en diferentes reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes o se describan en realizaciones diferentes, no indica que una combinación de estas medidas no pueda usarse ventajosamente. La presente invención contempla todas las posibles combinaciones y permutaciones de las realizaciones descritas.

Los inventores pretenden que, en el presente documento, las expresiones "que comprende/n", "comprenden" y "comprende" sean opcionalmente sustituibles con las expresiones "que consiste/n en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

Ejemplos

Ejemplo 1

Para *C. albicans*, se ha demostrado interferencia probiótica con lactobacilos probióticos, por ejemplo, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14, ATCC PTA 5289 y DSM 17938, respectivamente. Según el conocimiento de los autores, sólo unos pocos estudios han analizado el efecto antifúngico de los lactobacilos probióticos sobre especies de *Candida* no *albicans* que se encuentran comúnmente en la cavidad bucal (Jorgensen *et al.*, 2017; Coman *et al.*, 2014; Verdenelli *et al.*, 2014 y Chew *et al.*, 2015). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar las capacidades *in vitro* de 14 cepas de lactobacilos para inhibir el crecimiento de seis *Candida* spp. patógenas bucales oportunistas.

Materiales y métodos:

Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio se usaron 14 cepas de lactobacilos (Bifodan A/S, Hundested, Dinamarca) y seis *Candida* spp. (cepas clínicas del Departamento de Microbiología Clínica, Rigshospitalet, Copenhague, Dinamarca y cepas de control de la Colección de cultivos, Universidad de Goteborg, Suecia) (Tabla 1).

Antes del estudio *in vitro*, las cepas de *Candida* aisladas clínicamente se caracterizaron mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida por matriz (MALDI-TOF) para confirmar su identidad (Tabla 1).

Los lactobacilos se cultivaron inicialmente en agar de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) durante 24 horas (h) en una cámara anaeróbica a 37 °C (H₂ al 10 %, CO₂ al 5 % y N₂ al 85 %).

Las cepas de *Candida* se cultivaron en agar BD Difco™ Sabouraud Dextrosa (SD) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.) durante 24 h en aire ambiente a 37 °C.

Ensayo de interferencia de superposición en agar

El ensayo de inhibición del crecimiento se realizó como se describió anteriormente (Jorgensen *et al.*, 2017). En resumen, se transfirió una colonia individual de lactobacilos cultivados durante la noche a 5 ml de caldo de Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) y se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones anaeróbicas. Al día siguiente, los lactobacilos se recogieron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de las cepas de lactobacilos se obtuvieron tras centrifugación y se destruyeron. Los sedimentos se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en caldo MRS. La DO se ajustó espectrofotométricamente (espectrofotómetro UV-Vis Genesys™ 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 1,8 a 630 nm (correspondiente a aproximadamente 10⁹ ufc/ml). Después, los cultivos se diluyeron en serie en caldo MRS en etapas de 6 veces. Se añadió un ml de los sobrenadantes, suspensiones sin diluir y suspensiones celulares correspondientes a aproximadamente 10⁷ y 10⁵ UFC/ml a 24 ml de agar MRS fundido esterilizado (~45 °C) en placas de Petri y se dejó que el agar solidificara. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C en condiciones anaeróbicas.

Una sola colonia de cada uno de las cepas de *Candida* cultivadas durante la noche se añadió a 5 ml de caldo y se incubó aeróbicamente a 37 °C durante 24 h. Al día siguiente, se vertió una capa adicional de 25 ml de agar SD fundido estéril sobre el agar MRS con lactobacilos cultivados y se dejó solidificar y secar al aire durante 3 h a temperatura ambiente. Las cepas de *Candida* cultivadas durante la noche se diluyeron en caldo SD hasta una DO final de 0,2 a 500 nm. Las suspensiones de *Candida* se estamparon en las placas con un replicador de pasadores de acero Steers (CMI-Promex ICN, Pedricktown, NJ, EE.UU.) y se dejaron secar durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se incubaron aeróbicamente durante la noche a 37 °C. Como controles, también se estamparon cepas de *Candida* en la parte superior de las placas sin lactobacilos dentro de la capa inferior de agar MRS.

Puntuación

Los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces en diferentes ocasiones. Los resultados se evaluaron de acuerdo con una versión modificada de Simark-Mattson *et al.* (2007) como:

- 0 = inhibición completa (sin colonias visibles)
- 1 = inhibición casi total (colonias ligeramente visibles)
- 2 = inhibición ligera (las colonias son claramente visibles pero más pequeñas que en la placa de control)
- 3 = sin inhibición del crecimiento (colonias iguales a las de la placa de control)

Dos observadores calificaron las placas de forma independiente y, en caso de desacuerdo, se llegó a un consenso mediante debate.

Análisis estadísticos

Todos los datos se procesaron con el software guía SAS Enterprise (versión 7.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para estadísticas descriptivas, las puntuaciones de inhibición del crecimiento para los lactobacilos a diferentes dosis se presentan como la mediana de la puntuación. La frecuencia de la puntuación de inhibición del crecimiento 0-3 para cada cepa de lactobacilos, dosis y *Candida* spp. se presenta en distribución porcentual.

Se realizaron ensayos de regresión de Poisson para las cepas de lactobacilos, *Candida* spp. y dosis para predecir las puntuaciones de inhibición del crecimiento para estas variables. Basándose en los resultados de estos ensayos, los cuatro lactobacilos que mostraron las puntuaciones de inhibición del crecimiento más bajas se sometieron a análisis de Chi-cuadrado.

Resultados

Los 14 lactobacilos tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de las *Candida* spp., sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad basada en la puntuación entre las diferentes cepas de lactobacilos ($p < 0,05$) (Tablas 2 y 3).

Se realizó un ensayo de regresión de Poisson para predecir la puntuación de inhibición del crecimiento para cada cepa de lactobacilos basándose en los experimentos de inhibición del crecimiento. El ensayo demostró que *L. rhamnosus* DSM 32992 mostró las mejores propiedades de inhibición del crecimiento contra las *Candida* spp. mostrando la mayor cantidad de puntuación 0 y 1, seguido de *L. rhamnosus* DSM 32991, *L. jensenii* 22B42 y *L. rhamnosus* PB01, respectivamente (Tablas 3 y 4). Las cuatro cepas tuvieron muy buena capacidad para inhibir el crecimiento de las *Candida* spp. basándose en la puntuación. Sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las cuatro cepas ($p < 0,0001$, chi cuadrado). Estadísticamente, *L. rhamnosus* DSM 32992 fue significativamente mejor en la inhibición de las *Candida* spp. en comparación con las otras tres cepas de lactobacilos ($p < 0,001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre *L. rhamnosus* DSM 32991 y *L. jensenii* 22B42 ($p = 0,109$) y hubo una diferencia estadísticamente significativa en el límite entre *L. rhamnosus* DSM 32991 y *L. rhamnosus* PB01 ($p = 0,059$). De forma análoga, hubo una diferencia estadísticamente significativa en el límite entre *L. jensenii* 22B42 y *L. rhamnosus* PB01 ($p = 0,067$) (Tabla 4).

De forma similar, se realizó un ensayo de regresión de Poisson para predecir la mejor dosis para inhibir el crecimiento. Los resultados revelaron un efecto casi igual para la dosis de 10^9 y 10^7 UFC/ml, siendo esta última ligeramente superior (NS). La dosis de 10^5 UFC/ml pareció ser la dosis más débil para la inhibición del crecimiento (Tablas 2 y 5).

La regresión de Poisson para las *Candida* spp. mostró que *C. parapsilosis* CCUG 56136 y la cepa clínica de *C. parapsilosis* fueron inhibidas en la mayor medida. *C. krusei* CCUG 47037 y la cepa clínica de *C. krusei* fueron las cepas más difíciles de inhibir, puesto que la mayoría de las colonias estaban ligeramente inhibidas o no estaban inhibidas (puntuación 2 y 3), (Tablas 2 y 6).

Conclusión

En conclusión, todos los lactobacilos sometidos a ensayo en este estudio *in vitro* mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida* spp. seleccionadas. Sin embargo, las cepas de lactobacilos con mejores capacidades de inhibición del crecimiento fueron *L. rhamnosus* DSM 32992, *L. rhamnosus* DSM 32991, *L. jensenii* 22B42 y *L. rhamnosus* PB01, respectivamente. La dosis óptima de los lactobacilos para inhibir el crecimiento fue de 10^7 UFC/ml. Las *Candida* spp. más inhibidas fueron *C. parapsilosis* CCUG 56136 y la cepa clínica de *C. parapsilosis*, mientras que *C. krusei* CCUG 56126 y la cepa clínica de *C. krusei* fueron las más difíciles de inhibir su crecimiento.

Tabla 1. Lista de microbios utilizados en el estudio

Géneros	Especies
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i> 23B33
	<i>Lactobacillus crispatus</i> NEU 458 DSM 15224
	<i>Lactobacillus fermentum</i> S1P2
	<i>Lactobacillus fermentum</i> S1P1
	<i>Lactobacillus jensenii</i> 12B1
	<i>Lactobacillus jensenii</i> 22B42
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01 DSM 14870
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NEU 427
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB18, P2-1, DSM 32991
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB 36, P5-1 DSM 32992
	<i>Lactobacillus gasseri</i> EBQ1 DSM 14869
	<i>Lactobacillus curvatus</i> EB10 DSM 32307
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> EB03 DSM 15527
	<i>Lactobacillus paracasei</i> S1-P3
<i>Candida</i>	Cepas CCUG de control <i>Candida albicans</i> CCUG 46390
	<i>Candida dubliniensis</i> CCUG 48722
	<i>Candida glabrata</i> CCUG 63819
	<i>Candida krusei</i> CCUG 56126
	<i>Candida parapsilosis</i> CCUG 56136
	<i>Candida tropicalis</i> CCUG 47037
	Aislados clínicos <i>Candida albicans</i> CBS 562 NT
	<i>Candida dubliniensis</i> 41_3 ZZMK
	<i>Candida glabrata</i> CBS 863
	<i>Candida krusei</i> RV 491
	<i>Candida parapsilosis</i> 26 PBS
	<i>Candida tropicalis</i> DSM 7524

Ejemplo 2

Material y métodos

Se midió la producción de ácido (medida por el pH) de los cuatro lactobacilos de mejor rendimiento y el efecto del pH sobre el crecimiento de *Candida* con un microelectrodo de pH y un electrodo de referencia (pH-100 y ref-100; Unisense A/S, Aarhus, Dinamarca) usando una modificación de un procedimiento descrito anteriormente (Jorgensen *et al.*, 2017) en placas seleccionadas del ensayo de inhibición del crecimiento. Los electrodos se montaron en una configuración de perfilado motorizada controlada por PC (MM33 y MC-232, Unisense A/S) y el posicionamiento y la obtención de datos se controlaron mediante un software dedicado (Sensortrace Pro 2.0, Unisense A/S). Los electrodos de pH y de referencia se calibraron con tampones de pH 4 y 7 a temperatura ambiente. El microelectrodo de pH tenía un límite de detección de 0,1 unidades de pH. El pH se midió el último día del ensayo de inhibición del crecimiento. La selección de las placas se basó en los resultados del ensayo de interferencia; se seleccionaron las placas con las puntuaciones de inhibición más altas para cada cepa de lactobacilos independientemente de la concentración. El pH se midió a través de colonias densas, ligeramente inhibidas, de *Candida* (*C. krusei* y *C. tropicalis*) y a través de colonias difusas, casi totalmente inhibidas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis*) incubadas en placas con *L. rhamnosus* DSM 32992 (P5-1), *L. rhamnosus* DSM 32991 (P2-1), *L. jensenii* 22B42 y *L. rhamnosus* PB01, respectivamente.

Además, se midió el pH en placas de control que contenían sólo los lactobacilos en la capa de agar inferior, pero sin *Candida* incubada, en una placa de control con cepas de *Candida*, pero sin lactobacilos y, por último, en una placa de agar de control sin lactobacilos ni cepas de *Candida*. Antes de medir, los electrodos de pH y de referencia se colocaron aproximadamente a 2 mm por encima de la superficie de las colonias de *Candida*. Los electrodos se configuraron para que se movieran en etapas de 100 µm y se midió el pH desde la superficie de las colonias y después cada 100 µm hasta una profundidad de 4,5 mm en el agar para asegurarse de que los sensores habían alcanzado la capa inferior de agar que contenía los lactobacilos.

Resultados

Los resultados de las mediciones del microsensor de pH se muestran en las Figuras 1-7. Aparecieron perfiles de pH similares para las cuatro cepas de lactobacilos incubadas con las *Candida* spp.; sin embargo, las mediciones de *L. rhamnosus* DSM 32992 (P51) y *L. rhamnosus* DSM 32991 (P2-1) generalmente mostraron los valores de pH más bajos en todas las placas. El pH del agar solo y en placas de control con las cuatro cepas de lactobacilos sin *Candida* spp. se presenta en la Figura 1. El pH del agar solo fue de 5,8, y el pH en las placas de agar con los lactobacilos varió entre 3,5-3,8. El pH medido a través de las colonias densas de *C. krusei* y *C. tropicalis* (Figuras 6 y 7) fue de aproximadamente 6,8 en la superficie de las colonias en la placa sin lactobacilos, alcanzando 5,8 a alrededor de 700-1000 µm en el agar. Para las mediciones con los lactobacilos, el pH en la superficie de las colonias de *Candida* varió entre 4,4-4,9 para *C. krusei* y 4,4-5,3 para *C. tropicalis*, y se volvió lentamente más ácido en todas las capas de agar, acercándose a aproximadamente pH 3,5 en la capa de agar inferior. Para el resto de las *Candida* spp., cuando las colonias estaban casi totalmente inhibidas (Figuras 2-5), el pH alcanzó un nivel de acidez comparable con la placa de control que muestra curvas de pH verticales a solo unos 100 µm debajo de la superficie y permaneció estable en todas las capas de agar.

Conclusiones

L. rhamnosus DSM 32992 (P5-1) y *L. rhamnosus* DSM 32991 (P2-1) mostraron los valores de pH más bajos, lo que indica la mayor producción de ácido de los lactobacilos seleccionados. Esto corresponde a los resultados del ensayo de inhibición, donde estas dos cepas de *Lactobacillus* presentaron las mejores capacidades de inhibición de los lactobacilos sometidos a ensayo contra las *Candida* spp. confirmando que la producción de ácido desempeña una función importante en la inhibición del crecimiento de *Candida*. *C. krusei* y *C. tropicalis* mostraron una tendencia a neutralizar los ácidos en la parte superior del agar indicando una capacidad de inhibir la acidificación provocada por los lactobacilos para garantizar su supervivencia.

Referencias

- Zheng *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020, 70:2782-2858.
 Jorgensen *et al.*, *Journal of Oral Microbiology*, 2017, 9(1): 1274582.
 Coman *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 117(2): 518-27.
 Verdenelli *ET AL.*, *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 116(5): 1297-307.
 Chew *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 2015, 118(5): 1180-90.
 Simark-Mattsson *et al.*, *Eur. J. Oral. Sci.*; 2007, 115(4): 308-14.

REIVINDICACIONES

1. Cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).
- 5 2. Un cultivo que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).
3. El cultivo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende al menos una especie de lactobacilo adicional seleccionada del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).
- 10 4. Una composición que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992).
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende al menos una especie de lactobacilo adicional seleccionada del grupo que consiste en la cepa ERB18 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32991), la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307).
- 15 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicha composición comprende de 10^5 a 10^{13} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, tal como de 10^6 a 10^{12} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición, por ejemplo, de 10^7 a 10^{11} UFC de lactobacilos por gramo de dicha composición.
- 20 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4 a 6, que comprende además al menos un excipiente, dicho al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en un agente de carga, un aglutinante, un agente de revestimiento, un edulcorante y un aroma.
- 25 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4 a 7, en donde dicha composición está en forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, un granulado, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema.
- 30 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para su uso como medicamento.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de la candidiasis.
- 35 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha candidiasis es candidiasis bucal o vaginal.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en donde dicha *Candida* spp. se selecciona de la lista que consiste en *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*.
- 40 13. Un producto nutracéutico que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
- 45 14. Un suplemento nutricional que comprende la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
15. Un recipiente que contiene la cepa ERB 36 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 32992) o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, tal como un envase de tipo blíster, sobrecito stick, bolsa, bolsita, sobrecito o cápsula.

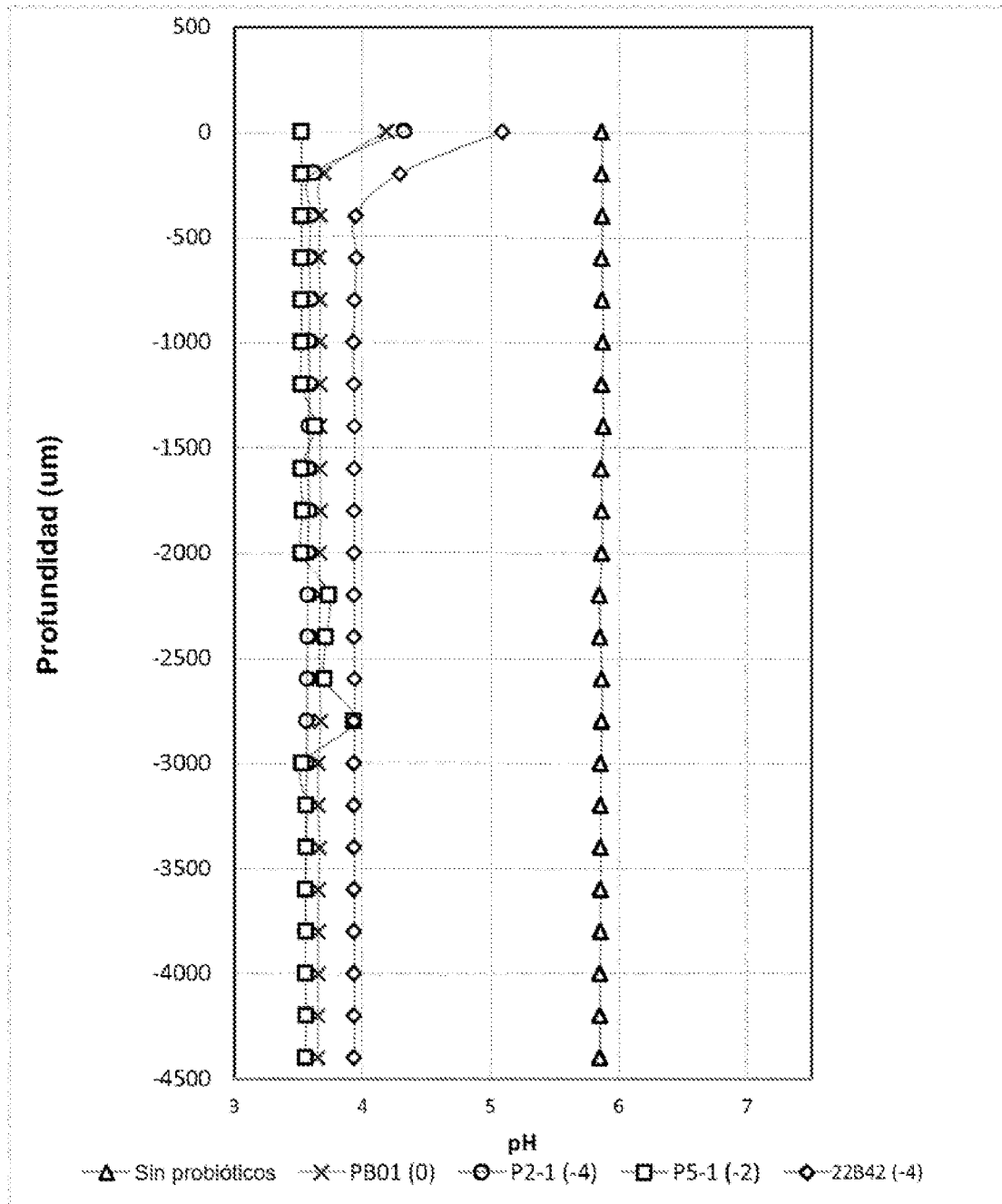


FIGURA 1

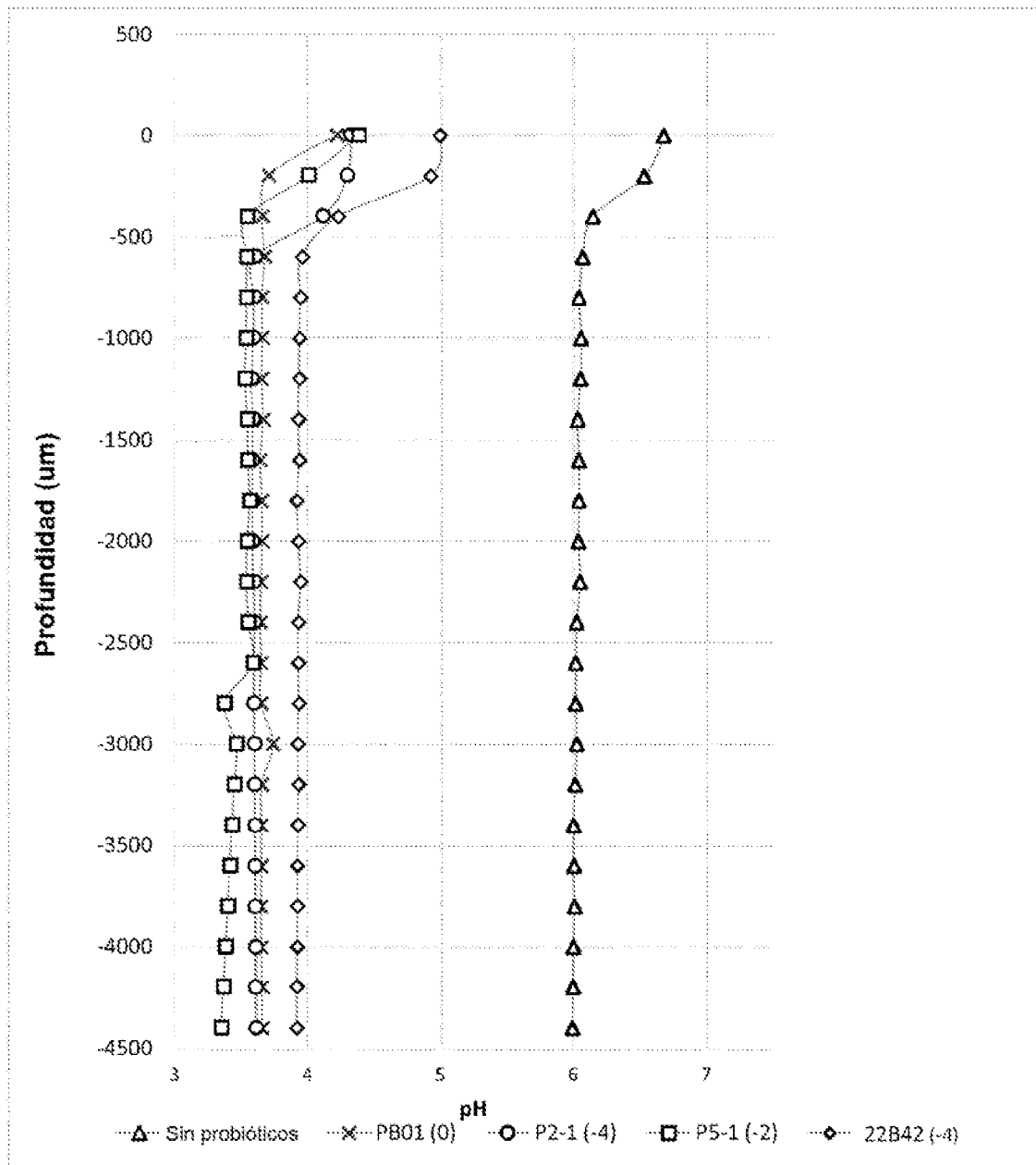


FIGURA 2

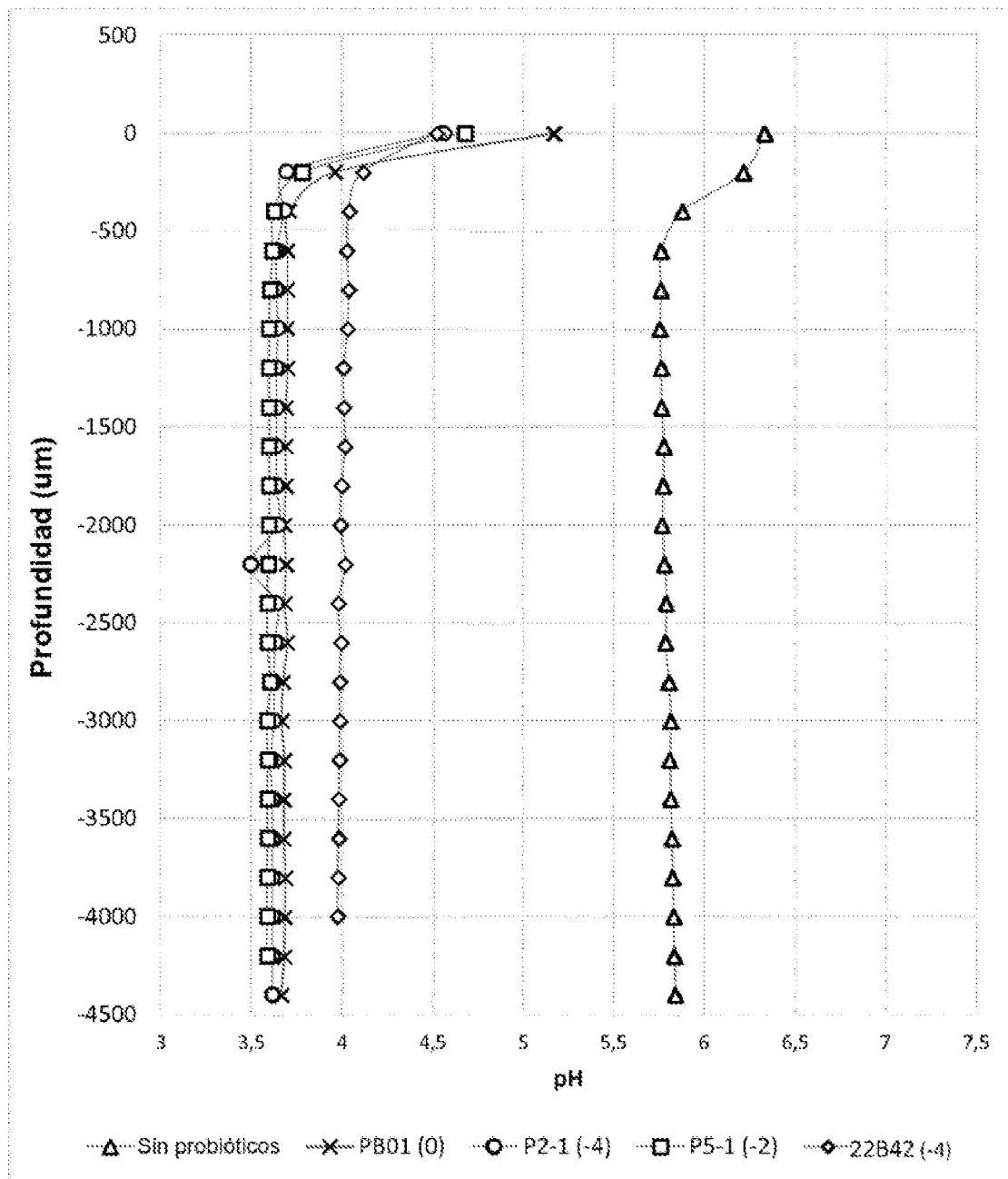


FIGURA 3

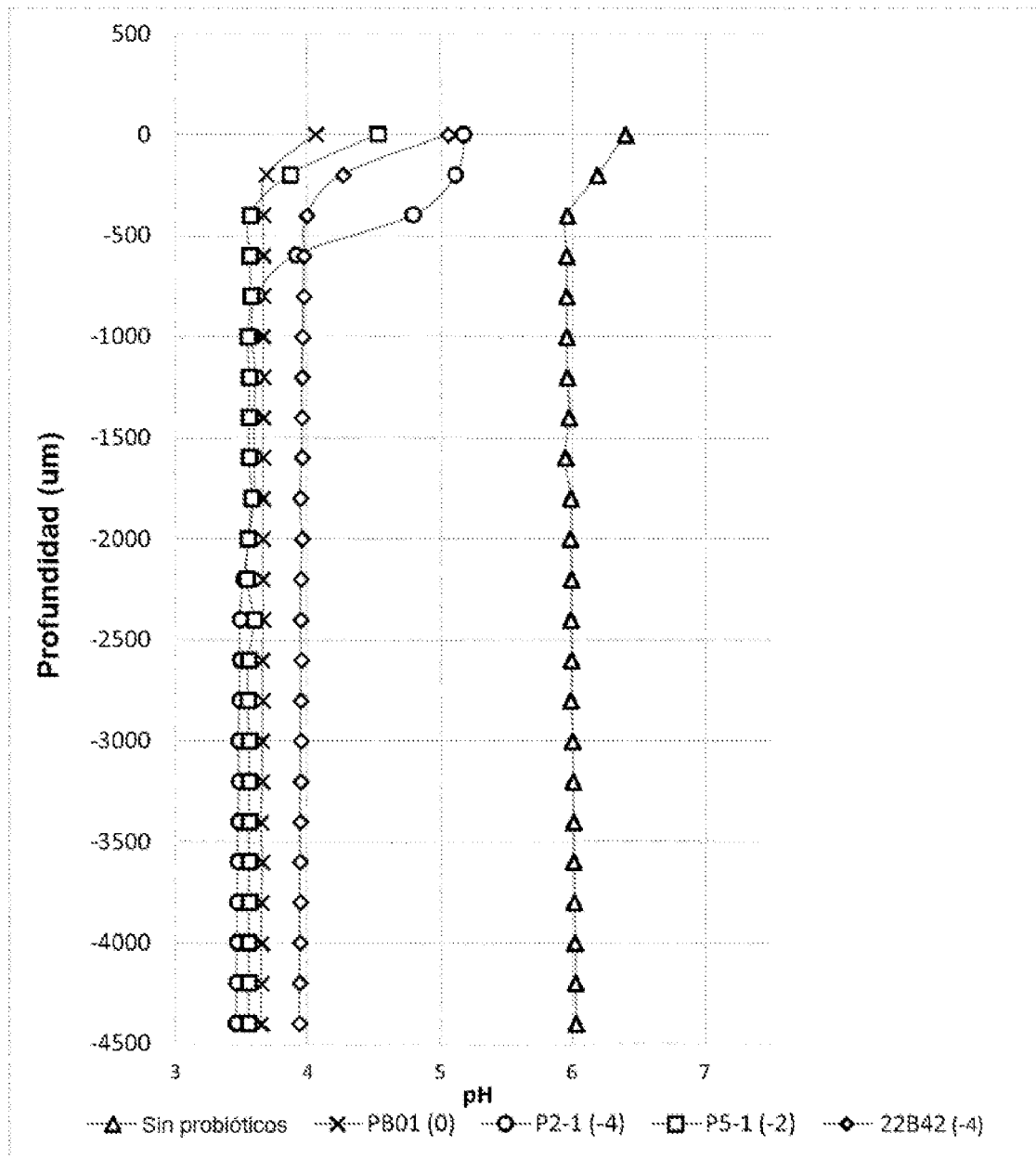


FIGURA 4

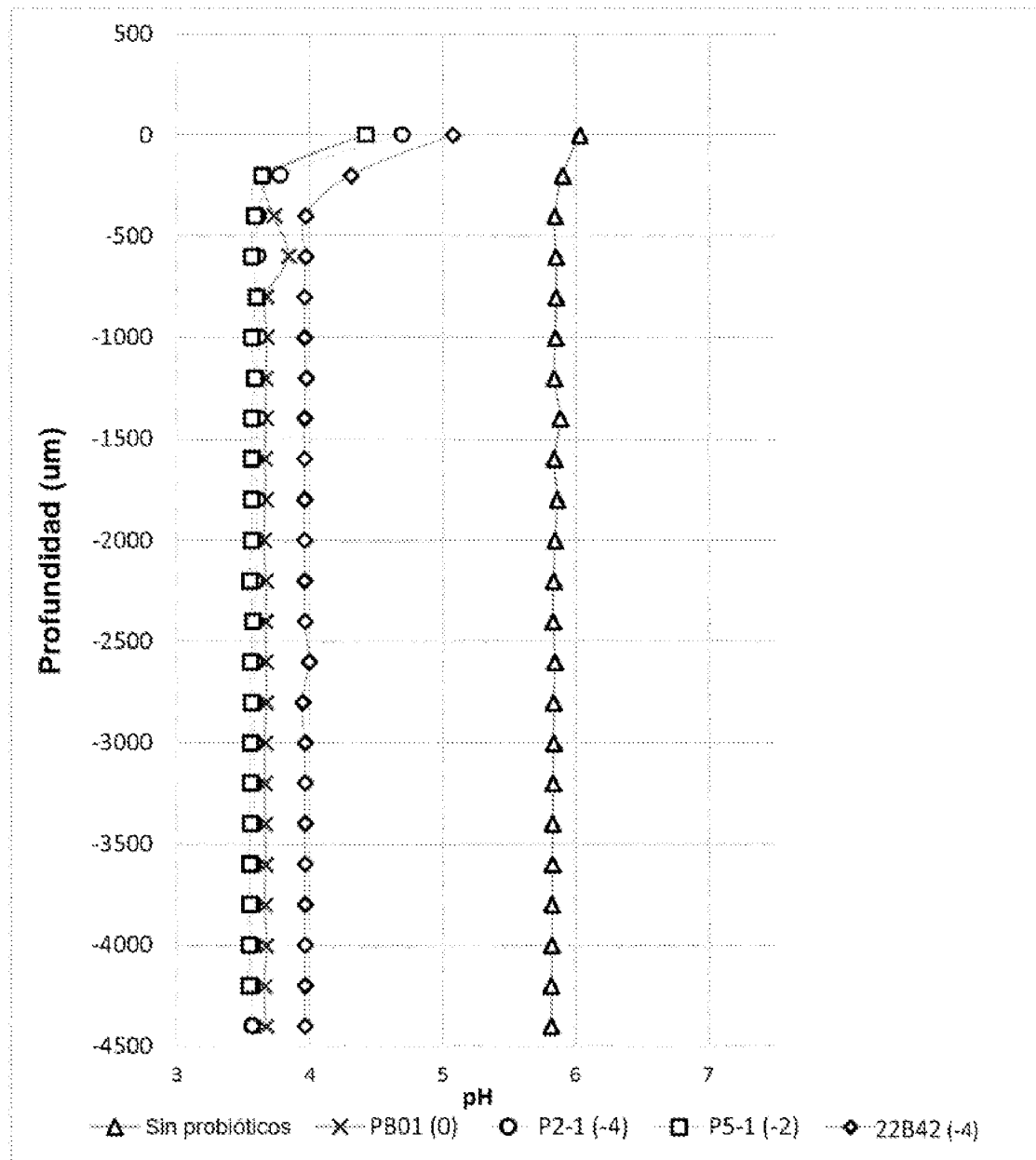


FIGURA 5

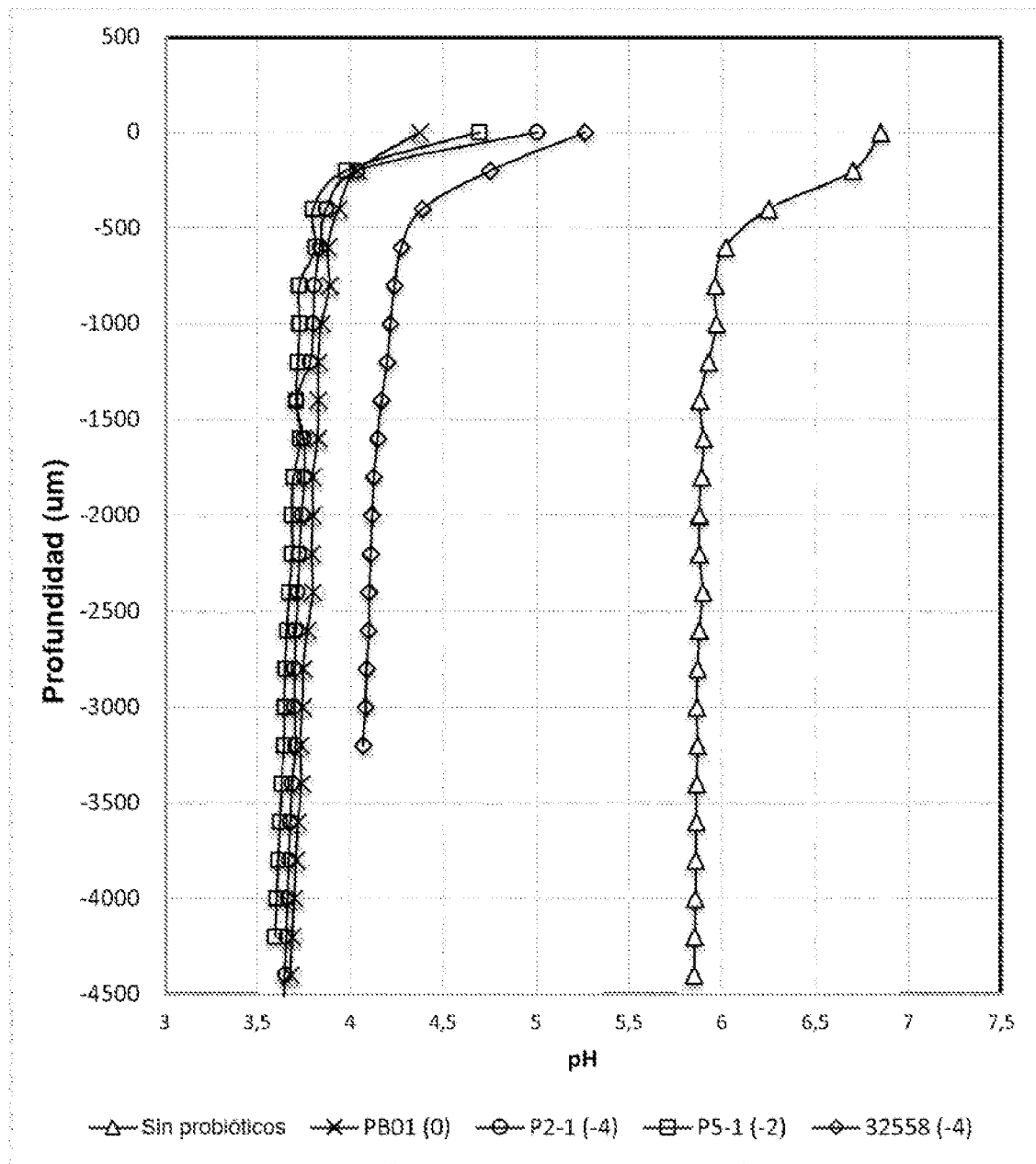


FIGURA 6

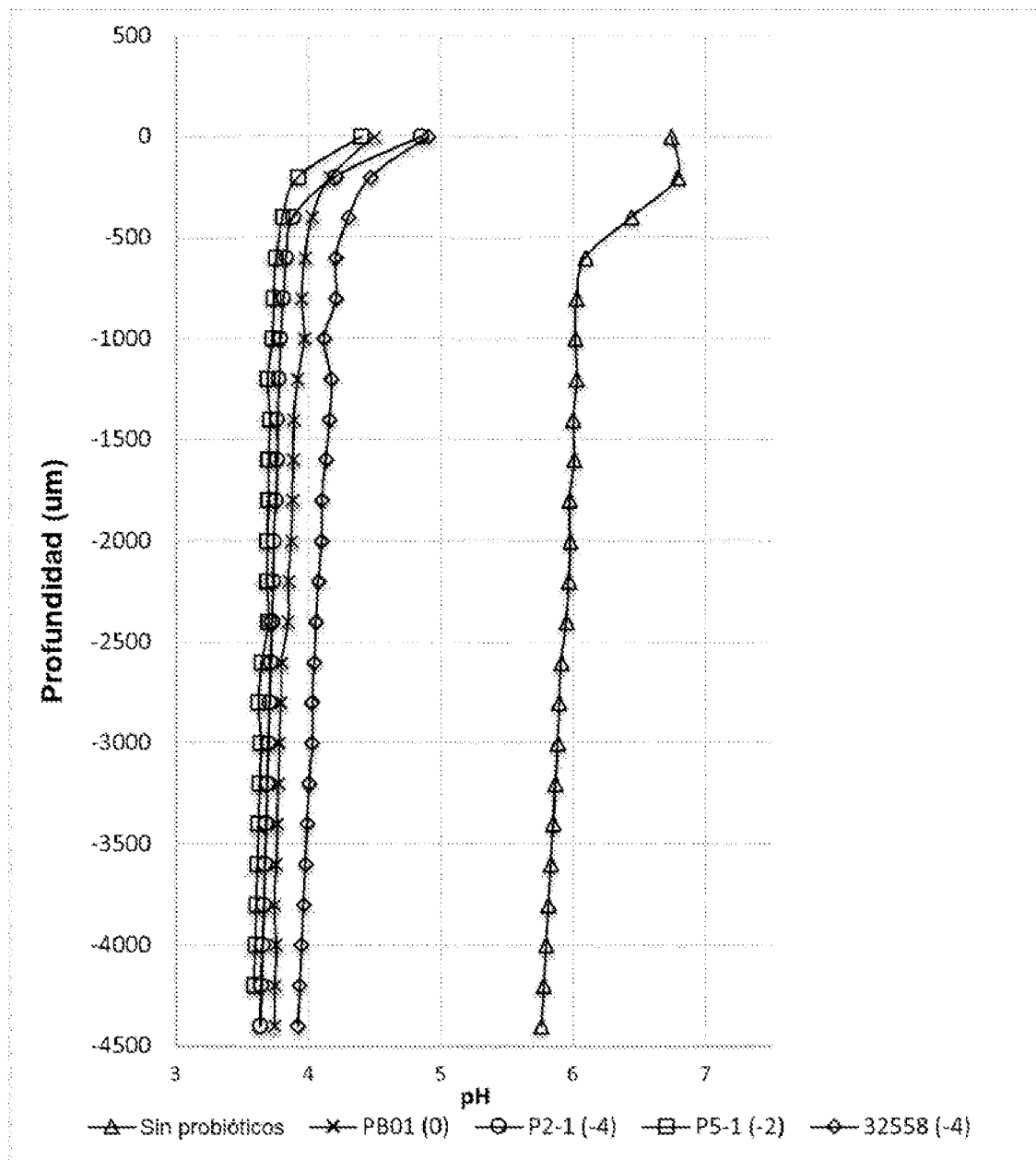


FIGURA 7

Especie <i>Lactobacillus</i>	UFC/ ml	Especie <i>Candida</i>											
		<i>C. albicans</i> CCUG 46390	<i>C. albicans</i> cepa clinica	<i>C. dubliniensis</i> CCUG 48722	<i>C. dubliniensis</i> cepa clinica	<i>C. glabrata</i> CCUG 63819	<i>C. glabrata</i> cepa clinica	<i>C. krusei</i> CCUG 56126	<i>C. krusei</i> cepa clinica	<i>C. parapsilosis</i> CCUG 56136	<i>C. parapsilosis</i> cepa clinica	<i>C. tropicalis</i> CCUG 47037	<i>C. tropicalis</i> cepa clinica
<i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> 23B33	10 ⁶	1	1	2	1	2	1	2	3	1	1	2	1
	10 ⁷	1	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	1
	10 ⁵	2	2	1	2	2	2	3	3	2	2	2	2
<i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> NEU 458	10 ⁶	1	1	1	0	2	2	2	3	1	0	3	1
	10 ⁷	2	1	1	1	1	1	2	2	1	0	3	1
	10 ⁵	1	2	1	1	2	1	2	2	0	0	0	1
<i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> S1P1	10 ⁶	1	1	1	1	2	2	2	2	1	0	3	1
	10 ⁷	1	1	1	1	2	2	2	3	1	0	3	1
	10 ⁵	1	1	1	1	1	1	2	2	0	1	3	1
<i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> S1P2	10 ⁶	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	2	1
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1
	10 ⁵	1	1	1	1	1	1	2	2	1	0	3	1
<i>Lactobacillus</i> <i>jensenii</i> 12B1	10 ⁶	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	3	1
	10 ⁷	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	3	1
	10 ⁵	2	2	1	1	2	2	2	3	1	1	2	2
<i>Lactobacillus</i> <i>jensenii</i> 22B42	10 ⁶	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	1
	10 ⁵	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	3	1
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> PB01	10 ⁶	1	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0	1
	10 ⁷	2	1	1	1	1	1	2	2	1	0	1	1
	10 ⁵	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> NEU 427	10 ⁶	1	1	1	1	2	2	2	3	1	0	2	1
	10 ⁷	2	1	1	1	2	2	2	3	0	0	2	1
	10 ⁵	2	1	2	1	2	2	2	3	1	1	3	1
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> ERB18, DSM 32991	10 ⁶	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	1	1
	10 ⁵	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> ERB 36, DSM 32992	10 ⁶	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
	10 ⁵	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1
<i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> EB01	10 ⁶	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
	10 ⁵	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	2
<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> EB10 DSM 32307	10 ⁶	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2
	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1
	10 ⁵	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> EB03 DSM 15527	10 ⁶	1	2	1	1	2	2	2	3	1	1	2	1
	10 ⁷	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	2	2
	10 ⁵	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> S1-P3	10 ⁶	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	10 ⁷	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	10 ⁵	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2

TABLA 2

<i>Lactobacillus</i> spp.	0	1	2	3
<i>Lactobacillus paracasei</i> S1-P3	0.9	59.1	37.1	2.9
<i>Lactobacillus acidophilus</i> EB03	5.2	35.9	37.2	21.7
<i>Lactobacillus curvatus</i> EB10 DSM 32307	2.4	32.5	47.0	18.1
<i>Lactobacillus gasseri</i> EB01	0.0	52.8	40.3	6.9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB 36, DSM 32992	5.3	73.3	21.4	0.0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB18, DSM 32991	11.4	61.0	23.8	3.8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01	8.7	36.2	40.6	14.5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NEU 427	12.5	47.2	33.3	7.0
<i>Lactobacillus jensenii</i> 22B42	11.4	56.5	22.9	9.2
<i>Lactobacillus jensenii</i> 12B1	0	39.9	50.0	10.1
<i>Lactobacillus fermentum</i> S1P2	5.9	55.5	31.0	7.6
<i>Lactobacillus fermentum</i> S1P1	9.4	54.4	23.2	13.0
<i>Lactobacillus crispatus</i> NEU 458 DSM15224	12.3	51.5	24.6	11.6
<i>Lactobacillus crispatus</i> 23B33	0	33.5	42.0	24.5
Puntuación	0	1	2	3

Tabla 3

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB 35, DSM 32992	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB 18, DSM 32991	<i>Lactobacillus jensenii</i> 22B42	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> PB01
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB 36, DSM 32992	-	0.0014	<0.0001	<0.0001
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ERB18, DSM 32991	0.0014	-	0.1088	0.0391
<i>Lactobacillus jensenii</i> 22B42	<0.0001	0.1088	-	0.0665
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01	<0.0001	0.0591	0.0665	-

Tabla 4

Puntuación	Dosis (UFC/ml)		
	10^5	10^7	10^9
0	7.1	5.9	3.9
1	42.5	51.6	50.6
2	37.6	35.6	38.8
3	12.8	6.8	6.7

Tabla 5

Candida spp.

Tabla 6