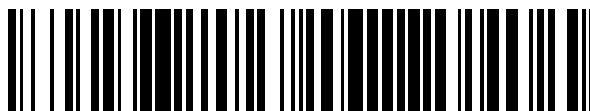


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 127**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)	A23L 33/21	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)		
A61K 38/47	(2006.01)		
A61K 47/44	(2007.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 35/745	(2015.01)		
A61K 35/747	(2015.01)		
A23L 33/135	(2006.01)		
A23L 33/17	(2006.01)		
A23L 33/175	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2012 PCT/IB2012/001745**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034975**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012 E 12780278 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2753687**

54 Título: **Cepas de bacterias del ácido láctico y/o bifidobacterias que inhiben/reducen el crecimiento de diferentes biotipos de E. coli y diferentes biotipos de clostridios**

30 Prioridad:

09.09.2011 IT RM20110475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2018

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via Mattei 3
28100 Novara (NO), IT**

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 675 127 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

Cepas de bacterias del ácido láctico y/o bifidobacterias que inhiben/reducen el crecimiento de diferentes biotipos de *E. coli* y diferentes biotipos de clostridios

La presente invención se refiere a cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias, que tienen acciones de inhibición/reducción del crecimiento de diferentes biotipos de *E. coli* (gramnegativa), incluyendo *E. coli* O157:H7 y O104:H4, y de diferentes especies bacterianas que pertenecen a la familia de las *Clostridiaceae* (bacilos anaerobios, grampositivos) responsables de la putrefacción y de infecciones intestinales graves (*Clostridium difficile*).

Además, la presente invención se refiere a cepas de bacterias lácticas que tienen actividad antimicrobiana específica contra *Listeria monocytogenes* (grampositiva), *Enterococcus sp.* y *Klebsiella sp.* (gramnegativa). Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una de dichas cepas de bacterias lácticas y/o bifidobacterias, opcionalmente en combinación con acetilcisteína y/o lisozima. Se sabe que *Escherichia coli*, abreviada a *E. coli*, es la especie mejor conocida del género *Escherichia*: dentro de la misma, se distinguen al menos 171 serotipos, caracterizados por diferentes combinaciones de los antígenos O, H, K, F. Es una de las especies principales de bacterias que viven en la parte inferior del intestino de animales de sangre caliente (aves y mamíferos, incluyendo el humano), y que son necesarias para la correcta digestión de los alimentos. Su presencia en cuerpos de agua indica la presencia de condiciones de fecalización (es el principal indicador de contaminación fecal, junto con los enterococos). El género *Escherichia*, junto con otros géneros tales como, por ejemplo, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Serratia*, se agrupan juntos bajo el nombre de coliformes. Técnicamente, el "grupo coliforme" comprende bacterias aerobias y anaerobias no esporógenas.

Aunque es un habitante común del intestino y tiene un papel fundamental en el proceso digestivo, hay situaciones en las que *E. coli* puede provocar enfermedades en el humano y los animales. Algunas cepas de *E. coli* son el agente causal de enfermedades intestinales y extraintestinales tales como infecciones de las vías urinarias, meningitis, peritonitis, septicemia y pulmonitis. Algunas cepas de *E. coli* son toxigénicas, es decir, producen toxinas que pueden ser la causa de diarrea entre otras cosas. La disentería provocada por *E. coli* es una toxiinfección alimentaria común, dado que se contrae principalmente de productos alimenticios contaminados. La contaminación puede producirse a partir de carne infectada cocinada de manera inadecuada, de leche no pasteurizada y quesos elaborados a partir de la misma, y de otros alimenticios contaminados por heces. *E. coli* produce cuatro tipos de toxinas que se distinguen, por su diferente sensibilidad a tratamiento térmico, en termolábiles y termoestables, y por su acción toxigénica (toxinas Shiga y toxinas hemolíticas, HlyA).

La toxina termolábil, denominada LT, es muy similar en estructura y funciones a la toxina colérica. Contiene una subunidad "A" y cinco subunidades "B" en una holotoxina. Las subunidades B contribuyen a la adherencia y a la entrada de la toxina en las células intestinales del huésped, donde la subunidad A estimula las células para liberar agua, provocando diarrea.

Una "cepa" de *E. coli* es un grupo con características particulares que pueden hacer que sea reconocible por otras cepas de *E. coli*, de manera similar al modo en el que pueden distinguirse animales de diferentes razas. Diferentes cepas de *E. coli* viven en diferentes especies animales, de modo que es posible establecer si el material fecal en el agua procede, por ejemplo, de humanos o aves.

Surgen continuamente nuevas cepas de *E. coli* del proceso biológico natural de mutación, y algunas de estas cepas tienen características que pueden ser perjudiciales para un animal huésped. Aunque en la mayoría de los adultos humanos una cepa patógena no provocaría probablemente nada salvo diarrea, y podría no producir ningún síntoma, en niños pequeños o personas enfermas o aquellas debilitadas por enfermedades recientes o que se someten a tratamientos particulares, una cepa nueva podría provocar enfermedades graves e incluso la muerte. Un ejemplo de una cepa particularmente virulenta de *E. coli* es *E. coli* O157:H7. Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica son las principales responsables de enfermedad en países industrializados. El serotipo principalmente responsable de estas enfermedades es *E. coli* O157:H7.

E. coli O157: H7 o *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) es una cepa enterohemorrágica de la bacteria *Escherichia coli* que es una causa de enfermedades transmitidas por alimentos. La infección conduce a menudo a diarrea hemorrágica y, ocasionalmente, a insuficiencia renal, síndrome hemolítico urémico (HUS), especialmente en personas jóvenes, niños y personas mayores. La transmisión se produce por la vía fecal-oral, y la mayor parte de los casos de enfermedad están asociados con el consumo alimentario de alimentos crudos o poco cocinados, contaminados por el suelo o agua contaminada, o consumo de verduras contaminadas por tal agua. En rumiantes, vive como comensal en el intestino, pero no da lugar a patología por la escasez de receptores para la toxina producida por la bacteria. Con referencia al género *Clostridium*, se sabe que muchos alimentos contienen estas bacterias que son responsables de los procesos de degradación de los propios alimentos, y que si se ingieren con la dieta y alcanzan el intestino, pueden modificar la composición de la microflora e iniciar la putrefacción.

Los alimentos generalmente responsables de estas toxiinfecciones alimentarias son carnes frescas contaminadas en

particular por *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, etc., que puede hidrolizar azúcares formando sustancias malolientes tales como indol, amoníaco y mercaptanos.

Al pescado, por otro lado, le pueden atacar otras especies de *Clostridium*, *C. botulinum* que pueden desarrollar y producir una toxina incluso a bajas temperaturas (4 °C). Entre los clostridios más peligrosos para el humano está *Clostridium difficile*, que puede producir enterotoxinas responsables de casos de diarrea hemorrágica, colitis pseudomembranosa con complicaciones graves tales como perforación, septicemia y muerte. La bacteria forma esporas resistentes al calor y se transmite de persona a persona por medio de la vía fecal-oral.

Generalmente, la patogénesis provocada por *C. difficile* está asociada con el uso de antibióticos que producen un desequilibrio notable en la microflora intestinal, provocando la prevalencia de especies putrefactantes, en detrimento de aquellas con acción fermentativa.

C. difficile es ubicuo, en particular en entornos hospitalarios, y puede colonizar el intestino de un pequeño porcentaje de individuos sanos (aproximadamente el 5 %). El uso de antibióticos está asociado con su desarrollo en exceso y con sus manifestaciones patológicas graves debido a su resistencia a la mayor parte de antibióticos. Las esporas ingeridas, una vez han superado la barrera gástrica, se establecen en el colon donde germinan y evolucionan a la forma vegetativa, que por multiplicación binaria genera una población numerosa responsable de las múltiples formas patológicas que son particularmente graves en los ancianos.

Se estima que actualmente este organismo infecta a más del 30 % de los pacientes tratados en hospitales en los Estados Unidos. Además, *Listeria monocytogenes* es un patógeno ubicuo responsable en el humano de listeriosis, una infección potencialmente mortal de origen alimentario.

Las bacterias probióticas (lactobacilos y bifidobacterias) son microorganismos que benefician la salud del huésped, y por esta razón se consumen comúnmente por un número cada vez mayor de personas que eligen productos alimenticios, productos lácteos fermentados, yogur y complementos que contienen bacterias probióticas.

Zhang *et al* (Veterinary microbiology Elsevier BV, NL, vol. 141, n.º 1-2, 24 de febrero de 2010, páginas 142-148) tratan la evaluación de *Lactobacillus rhamnosus* GC, en particular la actividad específica contra una sola cepa de *E. coli*, K88.

Además, K. A. Eaton *et al* (Infection and Immunity, vol. 79, n.º 1, 25 de octubre de 2010, páginas 185-191) tratan la actividad de una bacteria del ácido láctico contra una sola cepa bacteriana, cepa de EHEC 86-24 (véase, por ejemplo, la página 186, Materials and Methods).

Además, Johnson-Henry *et al* (Infection and Immunity, vol. 76, n.º 4, 1 de abril de 2008, 1340-1348) tratan la actividad de una cepa bacteriana contra una sola cepa de *E. coli* (véase, por ejemplo, la página 1341, columna izquierda, tercer párrafo).

El documento US 2008/175899 se refiere a una formulación para promover la salud sinusal que incluye al menos un agente probiótico en combinación con N-acetilcisteína (NAC) y un bioflavonoide o derivado del mismo.

Marchese (International Journal of Antimicrobial Agents vol. 22, 1 de octubre de 2003, 95-110) se refiere a los efectos de la fosfomicina, sola y en combinación con N-acetilcisteína, en biopelículas de *E. coli*.

El documento WO 2011/017040 es relativo a una composición nutricional incluyendo una combinación de fibras que tiene materiales particulados de fibras aglomeradas y un probiótico.

Rada *et al* (Biotechnology Letters, vol. 32, n.º 3, 27 de noviembre de 2009, 451-455) tratan la susceptibilidad de bifidobacterias a lisozima como posible criterio de selección para cepas de bifidobacterias probióticas.

El documento WO 2007/100765 se refiere a métodos y composiciones para tratar sepsis en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la administración de cantidades eficaces de al menos un componente probiótico modificado con lisozimas. El documento WO 2012/001440 se refiere a una composición que comprende dos cepas de bacterias probióticas capaces de realizar una acción antioxidante y/o antibacteriana y competitiva contra especies de bacterias coliformes que producen gas mediante fermentación de azúcares, en particular lactosa, aisladas de lactantes afectados por cólico. El documento WO 2010/136891 A1 es relativo al uso de *L. pentosus* LPS 01 (DSM 21980) para el tratamiento de infecciones de bacterias gramnegativas, incluyendo *E. coli*.

Permanece la necesidad, por tanto, de tener bacterias probióticas disponibles capaces de colonizar el intestino y traer los efectos beneficiosos al huésped. En particular, permanece la necesidad de tener bacterias probióticas disponibles capaces de prevalecer sobre especies patógenas, con los consiguientes beneficios para la salud. Incluso más particularmente, permanece la necesidad de tener bacterias probióticas disponibles capaces de prevenir y/o tratar infecciones y/o patologías relacionadas con bacterias patógenas (grampositivas y gramnegativas).

Tras una intensa actividad de investigación, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que bacterias seleccionadas son capaces de dar una respuesta apropiada a las necesidades mencionadas anteriormente.

Además, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que usando N-acetilcisteína, que tiene la característica de disolver las biopelículas bacterianas producidas normalmente en defensa propia por los gérmenes patógenos, la acción de bacteriocinas de las cepas probióticas seleccionadas es mucho más eficaz.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que usando una técnica particular de microencapsulación en una matriz lipídica, preferiblemente de naturaleza vegetal, lo que confiere gastroprotección a la lisozima, esta última es capaz de pasar sin daños a través del tubo gastroduodenal, para activarse a nivel del colon y para expresar su acción lítica contra las esporas de todas las especies de clostridios. Como consecuencia de su acción hidrolítica en las esporas del género *Clostridium* y *C. difficile* en particular, en el momento de su germinación, no se produce la formación de células vegetativas responsables del aumento en la población de patógenos ni la formación de toxinas.

La acción combinada de cepas probióticas con actividad fermentativa y efecto barrera contra las especies putrefactantes, incluyendo los clostridios, junto con la acción directa de la lisozima que, de hecho, evita la germinación de las esporas de clostridios, constituye una estrategia extraordinaria e innovadora contra este peligrosos grupo de patógenos. La combinación total (bacterias probióticas de la presente invención que producen bacteriocinas, y/o N-acetilcisteína que disuelve la biopelícula bacteriana, y/o lisozima, preferiblemente en forma microencapsulada en una matriz lipídica, que bloquea la germinación de la esporas) constituye una herramienta innovadora capaz de combatir un gran número de cepas patógenas, contra las que hasta ahora no había estrategia de oposición eficaz.

Un objeto de la presente invención está formado por una selección de cepas de bacterias lácticas que son capaces de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con: los diversos patógenos, incluyendo *E. coli* y en particular *E. coli* O157:H7 y O104:H4; y/o patógenos *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus sp.*, pudiéndose usar también dichas bacterias, opcionalmente, en combinación con N-acetilcisteína y/o lisozima. La lisozima puede estar microencapsulada y gastroprotegida en una matriz lipídica. En una realización preferida, la matriz lipídica es de origen vegetal que tiene un punto de fusión comprendido entre 30 °C y 80 °C, preferiblemente desde 40 °C hasta 70 °C, incluso más preferiblemente desde 50 °C hasta 60°.

Otro objeto de la presente invención está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una de las cepas de bacterias según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos de *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157:H7; y/o patógenos de *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus sp.*

Otro objeto de la presente invención está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una de las dichas cepas de bacterias en combinación con N-acetilcisteína.

Otro objeto de la presente invención está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una de las dichas cepas de bacterias en combinación con lisozima. En una realización preferida, la lisozima está microencapsulada.

Otro objeto de la presente invención está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una de las dichas cepas de bacterias en combinación con N-acetilcisteína y con lisozima. En una realización preferida, la lisozima está microencapsulada con una matriz lipídica. En una realización preferida, la matriz lipídica es de origen vegetal que tiene un punto de fusión comprendido entre 30 °C y 80 °C, preferiblemente desde 40 °C hasta 70 °C, incluso más preferiblemente desde 50 °C hasta 60°.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se describen en la continuación de la descripción y se reivindicarán en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Lista de tablas y dibujos

La tabla 1 muestra una lista de 14 cepas de lactobacilos, 4 cepas de bifidobacterias y 2 cepas de estreptococos que se han sometido a prueba contra 4 biotipos de *E. coli*.

Las tablas 2-5 indican las cepas que producen bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada y que pueden combatir, inhibir o reducir el crecimiento de bacterias patógenas que pertenecen a la especie *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157:H7.

Las tablas 6 y 7 se refieren a las cepas del género *Lactobacillus*.

La figura 1 muestra la técnica usada para someter a prueba las cepas que son el objeto de la presente invención.

La figura 2 muestra los halos de inhibición formados por las cepas de la tabla 4, contra *E. coli* (ATCC 8739 ATCC 10536 ATCC 35218 ATCC 25922) y serotipo O157:H7 (CQ 9485).

La figura 3 se refiere a los datos mostrados en las tablas 6 y 7.

La figura 4 se refiere a la actividad inhibidora *in vitro* de las cepas de bacterias probióticas contra *E. coli*.

Las figuras 5 y 6 se refieren a la actividad inhibidora *in vitro* de las cepas de bacterias probióticas contra otras bacterias enteropatógenas.

El solicitante ha realizado una intensa actividad de investigación y selección a partir de un grupo muy amplio de cepas de bacterias. Al final de esta actividad, el solicitante encontró y seleccionó un grupo de cepas de bacterias que pertenecían a una especie o a varias especies seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus pentosus*. Las cepas seleccionadas son capaces de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada, siendo éstas sustancias que son capaces de combatir, inhibir o reducir eficazmente bacterias patógenas. Estas cepas tienen una aplicación y uso válidos en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con bacterias patógenas gramnegativas y/o grampositivas.

Las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que comprende los coliformes y clostridios. Los coliformes son un grupo de bacterias que pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae*. En particular, los coliformes son bacterias facultativas aerobias y anaerobias, no esporógenas, gramnegativas, en forma de bastón, que fermentan lactosa, con la producción de gas y ácidos, a 35 °C-37 °C en 48 horas y poseen la enzima beta-galactosidasa. Son organismos ubicuos; algunos están presentes en el material fecal, y se usan, por tanto, como indicadores de contaminación tanto de agua como de alimentos, otros son de origen acuático o telúrico. El grupo comprende más de cincuenta géneros, entre ellos *Citrobacter*, *Enterobacter*, preferiblemente *Enterobacter cloacae*, *Escherichia*, preferiblemente *E. coli*, *Hafnia*, *Klebsiella*, preferiblemente *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* y *Yersinia*. Otros patógenos siempre de interés en el contexto de la presente invención pertenecen a la familia de las *Clostridiaceae*, con particular referencia a *C. difficile*. También se ejerce acción antagonista contra especies seleccionadas del grupo que comprende *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus sp.* y *Klebsiella sp.*

Un objeto de la presente invención está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una cepa bacteriana según la reivindicación 1 que pertenece a una especie o a varias especies seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, capaz de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos tales como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus sp.*

En una realización, la composición farmacéutica o alimenticia o complemento o el dispositivo médico comprende al menos una cepa bacteriana según la reivindicación 1 que pertenece a una especie o a varias especies seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*, capaz de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos tales como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus sp.*

La cepa y/o las diversas combinaciones posibles de las cepas mencionadas anteriormente (véanse también las tablas 1-5 a continuación) seleccionadas para dicho fin pueden usarse solas o en combinación con N-acetilcisteína; o en combinación con lisozima microencapsulada; o en combinación con N-acetilcisteína y lisozima microencapsulada.

En una realización, el patógeno *E. coli* se selecciona de entre *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O104:H4.

La tabla 1 muestra una lista de 14 cepas de lactobacilos, 4 cepas de bifidobacterias y 2 cepas de estreptococos que se han sometido a prueba contra 4 biotipos de *E. coli*. Los valores se expresan como halo de inhibición (mm).

Tabla 1

Especie	Cepa	N.º de presentación	Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i>			
			ATCC 8739	ATCC 10536	ATCC 35218	ATCC 25922
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	BS01	LMG P-21384	+	+	-	-
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604	++	++	+	+

<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706	++	++	+	+
<i>B. longum</i>	BL05	DSM 23234	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i>	LPC00	LMG P-21380	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i>	LPC08	DSM 21718	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605	++	++	++	+++
<i>L. rhamnosus</i>	LGG	ATCC 53103	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981	++	++	+	+
<i>L. fermentum</i>	LF10	DSM 19187	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021	++	++	++	+
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020	+	++	+	+
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022	++	+++	-	+
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023	++	+++	-	+
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980	++	++	+++	+++
<i>L. delbr. subsp. delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106	++	+++	++	+++
<i>L. reuteri</i>	LRE01	DSM 23877	+	+	-	-
<i>L. reuteri</i>	LRE03	DSM 23879	+	+	-	-
<i>S. thermophilus</i>	YO2	DSM 16590	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	YO3	DSM 16591	-	-	-	-

Las bacterias sometidas a prueba en la tabla 1, tomadas de manera individual o en combinación entre sí, tienen una aplicación válida en el contexto de la presente invención. Las cepas de bacterias se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en las indicadas en la tabla 2.

5

Tabla 2

Especie	Cepa	N.º de presentación
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106
<i>L. reuteri</i>	LRE01	DSM 23877
<i>L. reuteri</i>	LRF03	DSM 23879
<i>L. reuteri</i>	LRF03	DSM 23879
<i>L. reuteri</i>	LRF03	DSM 23879

Las cepas de la tabla 2 son capaces de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada que pueden combatir, inhibir o reducir el crecimiento de bacterias patógenas que pertenecen a la especie *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157:H7.

10

Las cepas de la tabla 2 se han sometido a prueba individualmente con el propósito de identificar su capacidad para antagonizar (inhibir el crecimiento o reducir el número de una o más especies/géneros microbianos patógenos perjudiciales), según se indica en las cuatro columnas de la derecha en la tabla 1.

15

Todas las cepas descritas y/o reivindicadas en la presente solicitud de patente se han depositado según el Tratado de Budapest y se ponen a disposición del público bajo petición a la autoridad depositaria competente. Las cepas de bacterias se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en las indicadas en la tabla 3.

20

Tabla 3

Especie	Cepa	N.º de presentación
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604

<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

Las cepas de bacterias se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en las indicadas en la tabla 4.

5 Tabla 4

Especie	Cepa	N.º de presentación
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

La composición de la presente invención tiene aplicación válida adicional para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con los patógenos *E. coli*, *H. pylori* y *Clostridium difficile*.

10 En una realización, la composición de la presente divulgación comprende o, alternativamente, consiste en desde una hasta ocho cepas, seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en las indicadas en la tabla 4.

15 La composición de la presente divulgación comprende o, alternativamente, consiste en desde una hasta seis cepas, preferiblemente de desde dos hasta cinco cepas, incluso más preferiblemente de tres o cuatro cepas, seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en las cepas indicadas en la tabla 4.

La composición comprende las seis cepas, según se indica en la tabla 5; o de los 4 lactobacilos de la tabla

20 Tabla 5

Especie	Cepa	N.º de presentación
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

25 El solicitante ha encontrado que las cepas de bacterias seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *L. pentosus* LPS01 DSM 21980, *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, *L. plantarum* LP02 LMG P-21020 y *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605 pueden ejercer una actividad inhibidora contra las 4 cepas de *E. coli*; en particular las cepas *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605 y *L. pentosus* LPS01 DSM 21980 muestran mayor actividad también contra el serotipo O157:H7.

30 Además, el solicitante ha encontrado que la cepa *L. plantarum* LP01 LMG P-21021 mostró capacidad inhibidora contra todas las bacterias enteropatógenas, en particular contra *Listeria monocytogenes*.

35 Un objeto de la presente divulgación está formado por una composición farmacéutica o alimenticia o un complemento o un dispositivo médico que comprende al menos una cepa bacteriana que pertenece a una especie o a varias especies seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus pentosus* que es capaz de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos tales como *E. coli*, incluyendo el serotipo O157:H7, y *Listeria monocytogenes*.

En una realización, dicha composición farmacéutica o alimenticia o complemento o dispositivo médico comprende al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *L. plantarum* LP01 LMG P-21021 y *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605; ventajosamente comprende o consiste en las cepas *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605; o comprende o consiste en la cepa *L. plantarum* LP01 LMG P-21021.

En la composición de la presente invención, la mezcla de cepas de bacterias puede estar presente en una cantidad comprendida entre el 0,5 % y el 20 % en peso, en comparación con el peso total de la composición, preferiblemente entre el 2,5 % y el 10 %. La composición puede comprender además al menos una fibra prebiótica y/o hidratos de carbono con acción bifidogénica.

La fibra prebiótica que tiene aplicación en la composición de la presente invención es una fibra que deben usar las cepas de bacterias presentes en la composición, pero no los patógenos que se pretende que antagonicen.

Además, la composición también puede comprender otros componentes y/o ingredientes activos tales como vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, sustancias con acción antioxidante, hipocolesterolemizante, hipoglucémica y antiinflamatoria y agentes antiendulzamiento en una cantidad comprendida generalmente entre el 0,001 % y el 20 % en peso, preferiblemente entre el 0,01 % y el 5 % en peso, siempre según el tipo de componente activo y su dosis diaria recomendada si la hubiera, en comparación con el peso total de la composición.

La composición alimenticia que es el objeto de la presente invención, por ejemplo, una composición simbiótica, o un complemento o una composición farmacéutica o un dispositivo médico, se prepara según las técnicas y los equipos conocidos por los expertos en el campo. La composición puede contener bacterias en una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UFC/g de mezcla, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/g de mezcla. La composición puede contener bacterias en una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UFC/dosis, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/dosis.

La dosis puede estar comprendida entre 0,2 y 10 g, por ejemplo, es de 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

Las bacterias probióticas usadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en forma de polvo, polvo deshidratado o liofilizada.

Todas las composiciones de la presente invención se preparan según técnicas conocidas para los expertos en el campo, y mediante el uso de equipos conocidos.

En una realización preferida, la composición que es el objeto de la presente invención comprende además acetilcisteína (o N-acetilcisteína) que es un derivado N-acetilado del aminoácido cisteína, y lisozima, preferiblemente microencapsulada y gastroprotegida en una matriz lipídica, según se describió anteriormente.

El solicitante ha encontrado que el uso de acetilcisteína junto con una o dos de las cepas de bacteria, descritas en las tablas 1-5, o en las diversas realizaciones preferidas mencionadas anteriormente, es capaz de disolver la biopelícula bacteriana producida por las propias bacterias patógenas y que dichos patógenos usan como protección. En la práctica, se ha observado que las bacterias patógenas son capaces de formar un recubrimiento protector (biopelícula) alrededor de las células. La biopelícula hace que las células de los patógenos sean más difíciles de atacar y estén mejor protegidas. La acetilcisteína es capaz de penetrar la biopelícula de las células y disolverla, facilitando el ataque en las células patógenas por medio de las bacteriocinas y/o los metabolitos y/o el agua oxigenada producidos por las cepas de bacterias que son el objeto de la presente invención.

La cantidad de acetilcisteína presente en la composición que va a administrarse, que es el objeto de la presente invención, está comprendida entre 10 y 1000 mg/día, preferiblemente está comprendida entre 200 y 600 mg/día.

La acetilcisteína, preferiblemente en forma sólida, se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipos conocidos por los expertos en el campo.

La cantidad de lisozima, preferiblemente microencapsulada, presente en la composición que va a administrarse, que es el objeto de la presente divulgación, está comprendida entre 10 y 2000 mg/día, preferiblemente está comprendida entre 400 y 1000 mg/día. La lisozima (preferiblemente microencapsulada) está preferiblemente en forma sólida y se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipos conocidos por los expertos en el campo.

Las cantidades de acetilcisteína y lisozima microencapsulada presentes en la composición que va a administrarse, que es el objeto de la presente divulgación, están comprendidas respectivamente entre 10 y 1000 mg/día, preferiblemente entre 200 y 600 mg/día, mientras que la lisozima microencapsulada está comprendida entre 10 y 2000 mg/día, preferiblemente entre 400 y 1000 mg/día; se mezclan con las bacterias probióticas en forma sólida, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipos conocidos por los expertos en el campo. La cantidad de N-acetilcisteína presente en la composición que es el objeto de la presente divulgación está

comprendida entre 10 y 1000 mg/día, preferiblemente entre 50 y 200 mg/día, incluso más preferiblemente entre 60 y 150 mg/día. La N-acetilcisteína está disponible en el mercado en una forma farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en forma sólida, y se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipos conocidos por los expertos en el campo para dar una composición homogénea.

La cantidad de lisozima, preferiblemente microencapsulada y gastroprotegida, presente en la composición que es el objeto de la presente divulgación, está comprendida entre 10 y 2000 mg/día, preferiblemente está comprendida entre 400 y 1000 mg/día, incluso más preferiblemente entre 500 y 800 mg/día, preferiblemente en forma sólida; se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipos conocidos por los expertos en el campo para dar una composición homogénea. La lisozima está disponible en el mercado en una forma farmacéuticamente aceptable.

Sección experimental

La actividad antimicrobiana de 14 cepas de lactobacilos, 4 cepas de bifidobacterias y 2 cepas de estreptococos se sometió a prueba contra 4 biotipos de *E. coli*. ATCC 8739, ATCC 10536, ATCC 35218 y ATCC 25922; estos están disponibles para el público.

Los valores se expresan como halo de inhibición (mm). Los datos se muestran en la tabla 1.

Para determinar la actividad antimicrobiana, las cepas se sometieron a prueba siguiendo el protocolo establecido en Santini et al. (2010) *Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol. 31 de julio de 2010; 141 sup. 1:S98-108. Epub 8 de abril de 2010.

Las cepas de bacterias indicadas en la tabla 1 se cultivaron en un caldo MRS a 37 °C durante 18 horas usando un sistema para generar una atmósfera anaerobia (GasPack System). Los diferentes biotipos de *E. coli* se activaron en caldo de soja triptica (TBS) y se incubaron de manera aerobia a 37 °C durante 18 horas. Antes de los experimentos, las cepas se subcultivaron al menos tres veces. Para la prueba de la mancha en agar (una prueba conocida para los expertos en el campo) se llevó a cabo el siguiente procedimiento. En la práctica, se colocaron (se sembraron en mancha) 10 microlitros de un cultivo de las cepas mencionadas anteriormente de lactobacilos cultivados a 37 °C durante la noche (caldo de cultivo + medio) sobre la superficie de una placa agarizada (que contenía el medio TBS agarizado). Se incubó la placa durante 18 horas a 37 °C para permitir que se desarrollara la cepa (mancha). Se incubaron los biotipos de *E. coli* (0,1 %) en agar blando de soja triptica y se dispusieron sobre las manchas en las placas a las que se hizo referencia anteriormente. Una vez se había solidificado el agar superior, se invirtieron las placas y se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37 °C durante 24 horas. Se repitió cada prueba dos veces. Tras 24 horas se examinaron visualmente las placas para observar y determinar las zonas de inhibición. La presencia de una zona de inhibición de 2 mm o más alrededor de la mancha de lactobacilos se consideró un resultado positivo (véase la figura 1 para un resumen del método usado).

Se usó la misma técnica para las bifidobacterias que para los lactobacilos.

Técnica de agar superior:

Se extendió una cepa de *E. coli* sobre una placa de Petri agarizada (medio de agar McConkei) incubada en aerobiosis durante 24 h. Se recogen 1 o 2 colonias y se disuelven en 1 ml de agua estéril hasta que alcanzan un valor de turbidez de 0,5 en la escala McFarland (escala conocida citada en las tablas de referencia).

Se inoculan 100 µl de esta suspensión en 50 ml de medio de agar blando (LAPTg con el 0,7 % de agar) a una temperatura de aproximadamente 45 °C para mantenerla líquida.

Se vierten 3 ml de agar blando sobre la superficie de las placas preparadas previamente con los lactobacilos cultivados.

Secar e incubar a 37 °C en aerobiosis durante 18-20 h.

Los resultados se leyeron midiendo el halo de inhibición.

Resultados

A. Selección *in vitro* de las cepas de la presente invención contra biotipos de *E. coli*.

La actividad de inhibir el crecimiento de la *E. coli* se determinó usando los cultivos bacterianos vivos de las cepas indicadas en la tabla 1. Se obtuvieron resultados positivos para todas las cepas indicadas en la tabla 2. En particular, las cepas indicadas en las tablas 3-5 se distinguieron por su fuerte efecto de inhibición/reducción en el crecimiento de todos los biotipos de *E. coli* sometidos a prueba.

B. Selección de cepas de la presente invención que tienen una actividad inhibidora contra *E. coli* O157:H7 toxigena.

Las cepas indicadas en la tabla 1 también se sometieron a prueba contra *E. coli* O157:H7. La actividad inhibidora sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 se determinó usando los cultivos bacterianos vivos de las cepas indicadas en la tabla 1.

Según se muestra en la figura 2, solo 5 cepas sometidas prueba mostraron la capacidad para inhibir/reducir el crecimiento de los biotipos de *E. coli* sometidos a prueba, incluyendo la *E. coli* O157:H7 (CQ9485) enterohemorrágica. En la figura 2, los resultados se expresan como desviación estándar (DE) de los halos de inhibición, calculada en tres pruebas diferentes y que permite un punto de corte de 2 mm.

A partir de los datos experimentales notificados anteriormente, puede deducirse que 6 lactobacilos y 2 bifidobacterias (tabla 4) muestran una actividad de inhibición/reducción *in vitro* contra el crecimiento de cuatro cepas de *E. coli* (ATCC 8739 ATCC 10536 ATCC 35218 ATCC 25922), que son responsables de la producción de una amplia variedad de aminas biógenas tales como, por ejemplo, mercaptano, histamina, cadaverina, putrescina y tiramina mediante descarboxilación de los aminoácidos. Estas aminas biógenas se consideran responsables de intoxicaciones sistémicas peligrosas. Además, la presencia de nitritos y nitratos puede formar N-nitrosaminas que muestran una fuerte actividad mutágena que puede provocar algunos tipos de cáncer. Finalmente, los datos experimentales notificados anteriormente muestran que cinco cepas de bacterias sometidas a prueba son activas contra la cepa patógena de *E. coli* O157:H7 (CQ9485) que es capaz de producir una o más de las toxinas Shiga que son muy peligrosas para la salud humana e incluso pueden conducir a la muerte.

Sección experimentalMateriales y métodos: Microorganismos y condiciones de cultivo.

En el presente estudio, se usaron 4 especies diferentes de bacterias probióticas, que pertenecían al género *Lactobacillus* (tablas 6 y 7). Todas las bacterias se cultivaron en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS), (comercializado por la empresa Becton Dickinson, Milán, Italia) a 37 °C durante 18 horas, en condiciones de anaerobiosis (GasPak, Becton Dickinson, Milán, Italia). Se usaron los siguientes 4 biotipos de *E. coli* como cepas diana: *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922, adquiridos de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EE.UU.). La cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 (CQ 9485) fue ofrecida por el Departamento de Gastroenterología, Ospedale Maggiore della Carità, Novara, Italia. Se adquirió *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 de la American Type Culture Collection; *Enterococcus* sp. y *Klebsiella* sp. se aislaron de muestras de heces de neonatos afectados por cólico (Universidad de Bolonia, Italia). Todos los biotipos de *E. coli*, *Enterococcus* sp. y *Klebsiella* sp se cultivaron en medio de caldo de soja triptona (TBS) (Biotest, Rockaway, NJ, EE.UU.) y se incubaron de manera aerobia a 37 °C durante 18 horas. Se cultivó *Listeria monocytogenes* en medio Fraser (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y se incubaron de manera aerobia a 37 °C durante 18 horas. Se trasplantaron todas las cepas bacterianas al menos tres veces antes de usarse en los experimentos de inhibición.

Perfil fermentativo usando API 50 CHL

Se cultivaron las especies de bacterias probióticas que pertenecían al género *Lactobacillus* durante 18 horas a 37 °C, se lavaron dos veces en agua estéril y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos. Tras la resuspensión en agua, en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de agua, se añadió una cantidad de muestra, tal como para alcanzar el valor de opacidad 2 en la escala McFarland. Se añadió una cantidad de muestra igual al doble de la cantidad usada previamente a 10 ml de medio API 50 CHL (API systems, BioMerieux). Se transfirieron 200 µl de la suspensión a cada pocillo de la galería API 50 CH. Se recubrieron todos los pocillos con aceite de parafina para garantizar la anaerobiosis. Se hidrataron las galerías y se incubaron a 37 °C. Se comprobaron cambios en el color de partida (morado) tras 1 y 2 días de incubación.

Cebadores y ensayo de PCR específico para las especies

Se extrae el ADN genómico de cada cepa de *Lactobacillus* con el kit MicroLysis™ (Labogen, Rho, Italia). Específicamente, se añaden 2 µl de cada cultivo bacteriano al tampón de lisis y se realiza lisis con el ciclador térmico Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Monza, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las cepas de *L. plantarum* a *L. pentosus*, se diseñaron los cebadores usados para la reacción de PCR en el gen *recA*, mientras que para la cepa de *L. rhamnosus*, se usó la región intergénica comprendida entre 16S y 23S del ARN ribosómico (tabla 6). La empresa Sigma-Aldrich sintetizó todos los cebadores.

Para la amplificación, se preparó una mezcla (25 µl) con GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), 1 µl de ADN lisado y el conjunto de cebadores específicos para las especies (0,30 mM). Se realizaron ciclos de PCR con el ciclador térmico Gene Amp PCR System 9700. Se muestran los programas de amplificación en la tabla 6.

PFGE

Se cultivan las cepas de *Lactobacillus* en medio MRS hasta que se alcanza una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,8. Tras lavar en la disolución tampón de Tris 10 mM, NaCl 20 mM, EDTA 50 mM, pH 7,2, las células se resuspenden en 300 µl de la misma disolución tampón. Tras la adición de 300 µl de agarosa al 2 % (Bio-Rad), las muestras se vierten en los moldes.

Se incuban los tapones durante 18 horas a 37 °C en la disolución de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, sarcosilo al 1 %, desoxicolato al 0,2 %, pH 7,6), con la adición de 2,5 mg/ml de lisozima (Sigma) y 4 U/ml de mutanolisina (Sigma). Se realizó tratamiento con proteinasa K (1 mg/ml) en disolución tampón EDTA 100 mM, sarcosilo al 1 %, desoxicolato al 0,2 % a pH 8,0 durante 24 h a 50 °C. Se lavan los tapones 4 veces con la disolución tampón Tris 20 mM, EDTA 50 mM a pH 8,0, añadiendo en los primeros 2 lavados fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (Sigma). Antes de la digestión con la enzima de restricción, se lavan los tapones dos veces con el tampón TE y luego se equilibraron durante 1 hora en el tampón de enzima de restricción adecuado. Las digestiones con las enzimas de restricción se llevan a cabo durante 18 horas a 37 °C para NotI y a 50 °C con SfiI. El ciclo electroforético se realiza con el aparato CHEF DR III (Bio-Rad) usando un gel de agarosa al 1 % (Bio-Rad) en un tampón TBE 0,5 M.

El ciclo se establece con los siguientes parámetros: NotI (tiempo de conmutador: 1-11 s, voltaje 6 V/cm, temperatura de tampón 14 °C, tiempo de ciclo 27 h); SfiI (tiempo de conmutador: 1-15 s, voltaje 5 V/cm, temperatura de tampón 14 °C, tiempo de ciclo 22 h). El gel de agarosa se tiñe con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y se observa por medio de luz UV.

Valoración de la actividad inhibidora *in vitro*

Se valoró la actividad antimicrobiana contra *E. coli* usando el protocolo descrito por Santini C. *et al.* En resumen, 10 ml de cada cultivo de LAB con densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1,0 se vierten (gota) sobre la superficie de una placa de Petri agarizada con medio LAPTg y se incuba de manera anaerobia durante 24 horas a 37 °C para permitir el crecimiento bacteriano (mancha). La cepa diana de *E. coli* (0,1 %) se inocula en medio de agar blando de soja triptica y se vierte sobre las placas que contienen las manchas. Tras la solidificación, las placas se invierten y se incuban en condiciones de aerobiosis durante 24 horas a 37 °C.

Cada experimento se realizó por duplicado. La presencia de un halo libre de crecimiento del patógeno bajo examen (halo de inhibición) se consideró un resultado positivo.

La cuantificación de la actividad inhibidora del probiótico en relación con diferentes cepas de *E. coli* se realizó en los laboratorios de la división de Investigación y Desarrollo de la empresa Biolab Research, MofinAlce Group, mientras que la cuantificación en relación con la cepa enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 se llevó a cabo por el personal especializado de la clínica privada "I Cedri", Fara Novarese, Italia.

Se valoró la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* sp. y *Klebsiella* sp. usando el método de difusión de disco. En resumen, se cultivaron LAB en medio MRS durante 24 horas a 37 °C, luego se lavaron y se resuspendieron en medio nuevo. El patógeno se siembra de manera uniforme sobre la superficie de la placa de Petri que contiene el medio agarizado específico para las especies patógenas bajo examen. Se colocan diferentes discos de papel sobre la superficie de la placa con el patógeno y entonces se absorben 100 µl de LAB en cada disco. Las placas se incuban a 37 °C durante 24 horas.

La presencia de un halo libre de crecimiento del patógeno bajo examen (halo de inhibición) se consideró un resultado positivo. Los resultados se expresan como halos de inhibición (mm). El umbral para determinar la significación del resultado es 2 mm.

ResultadosActividad inhibidora *in vitro* de cepas probióticas contra bacterias patógenas

La actividad antimicrobiana de algunas cepas de lactobacilos contra bacterias patógenas es multifactorial e incluye la producción de peróxido de hidrógeno, ácido láctico, moléculas conocidas tales como bacteriocinas y moléculas desconocidas estables al calor.

Según se muestra en la figura 4, los resultados obtenidos por el método de la mancha en agar y células vivas destacó el hecho de que todas las bacterias sometidas a prueba muestran actividad inhibidora en relación con las cuatro cepas de *E. coli*. Las cepas probióticas que presentan la mayor actividad inhibidora son *L. rhamnosus* LR04 y *L. pentosus* LPS01. Los datos obtenidos usando como diana la cepa enterohemorrágica *Escherichia coli* serotipo O157:H7, también mostraron la mejor actividad inhibidora en presencia de *L. rhamnosus* LR04 y *L. pentosus* LPS01 (figura 4).

Para caracterizar mejor las cepas probióticas bajo examen, el análisis se amplió a otras especies patógenas que atacan el tubo gastrointestinal humano, usando el método de difusión de disco. La cepa *L. plantarum* LP01 mostró inesperadamente la mejor capacidad inhibidora contra todas las enterobacterias patógenas sometidas a prueba, en particular contra *Listeria monocytogenes*.

5

Tabla 6

Cepa bacteriana	nombre	secuencia (5'-3')	ciclo	referencia
<i>L. rhamnosus</i>	RHA	GCGATGCGAATTTCTATTATT	5' 95 °C, (30"	Appl. And Environ. Microb. 66 (2000) 297-303
	PRI	CAGACTGAAAGTCTGACGGT	94 °C, 30" 58 °C, 30" 72 °C)x30, 7' 72 °C	
<i>L. plantarum</i>	PLAN-f	CCGTTTATGCGGAACACCTA	3' 94 °C, (30"	Appl. And Environ. Microb. 67 (2001) 3450-3454
	P-REV	TCGGGATTACCAAACATCAC	94 °C, 10" 56 °C, 30" 72 °C)x30, 7' 72 °C	
<i>L. pentosus</i>	PENT-f	CAGTGGCGCGGTTGATATC	3' 94 °C, (30"	Appl. And Environ. Microb. 67 (2001) 3450-3454
	P-REV	TCGGGATTACCAAACATCAC	94 °C, 10" 56 °C, 30" 72 °C)x30, 7' 72 °C	

10 Tabla 7

Cepa	Código/n.º de presentación de depósito
<i>L. pentosus</i>	LPS01
	LP01
<i>L. plantarum</i>	LP02
<i>L. plantarum</i>	LR04
<i>L. rhamnosus</i>	

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica o alimenticia o complemento o dispositivo médico que comprende o, alternativamente, que consiste en al menos una cepa bacteriana que pertenece a una o más especies seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* que es capaz de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos que pertenecen a las especies *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus sp.*, en la que dichas cepas de bacterias se seleccionan del grupo que consiste en:
 - *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605
 - *L. plantarum* LP01 LMG P-21021
 - *L. plantarum* LP02 LMG P-21020.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dichas cepas de bacterias tienen una actividad contra el patógeno *E. coli*; y en la que dicho patógeno se selecciona preferiblemente de entre el serotipo *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O104:H4; o del grupo que comprende *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que dichas cepas de bacterias tienen una actividad contra el patógeno *Listeria monocytogenes*, cepa ATCC 19112.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende o, alternativamente, consiste en dos o tres o cuatro o cinco o seis cepas que pertenecen a una o más especies.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que la cepa bacteriana es *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605 para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos que pertenecen a las especies *E. coli* serotipo O157:H7 o *E. coli* O104:H4.
6. Composición según la reivindicación 1 o 4, en la que la cepa bacteriana es *L. plantarum* LP01 LMG P-21021 para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con patógenos que pertenecen a la especie *Listeria monocytogenes*.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha composición comprende además acetilcisteína.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha composición comprende además lisozima.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicha composición comprende además lisozima microencapsulada en una matriz lipídica, preferiblemente de origen natural, que tiene un punto de fusión comprendido entre 30 °C y 80 °C; preferiblemente desde 40 °C hasta 70 °C; incluso más preferiblemente desde 50 °C hasta 60°.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición comprende además acetilcisteína y lisozima microencapsulada en una matriz lipídica, preferiblemente de origen natural, que tiene un punto de fusión comprendido entre 30 °C y 80 °C; preferiblemente desde 40 °C hasta 70 °C; incluso más preferiblemente desde 50 °C hasta 60°.
11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicha composición comprende además al menos una fibra prebiótica y/o hidratos de carbono con acción bifidogénica.

Figura 1

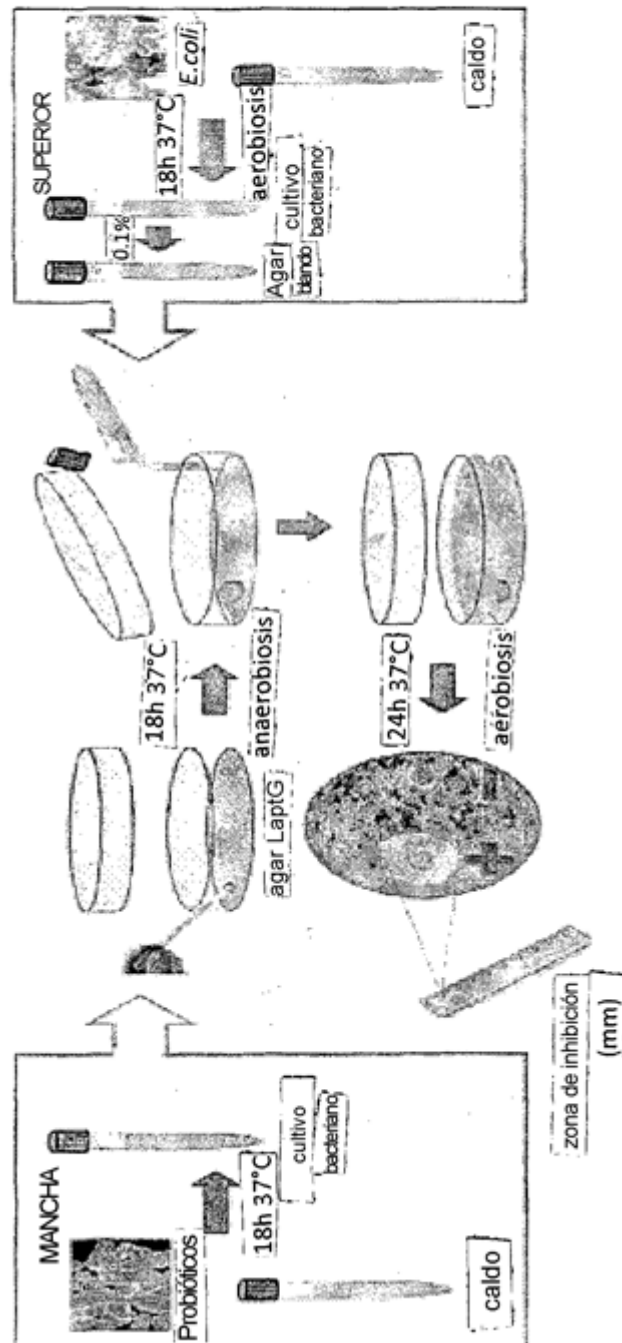


Figura 2

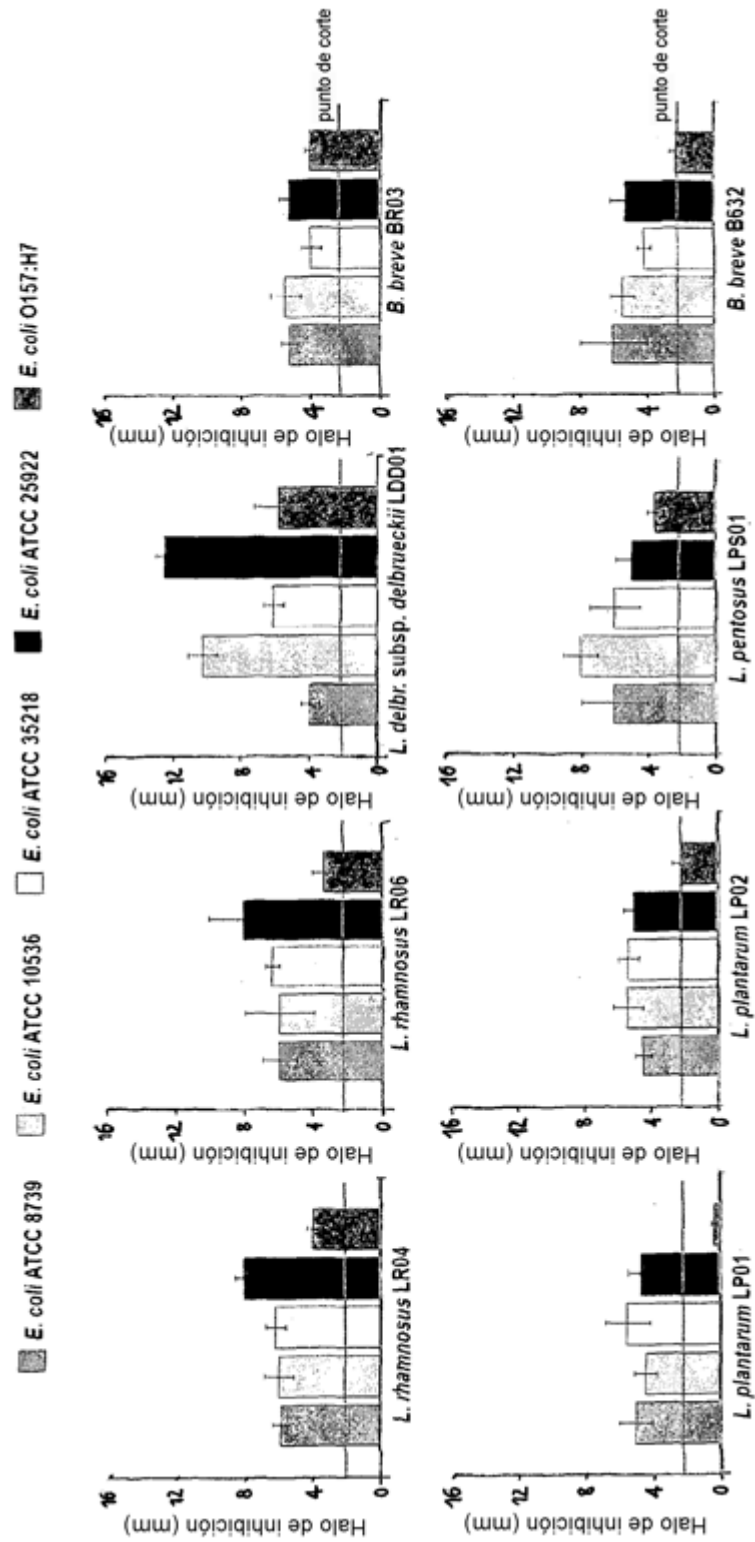


Figura 3

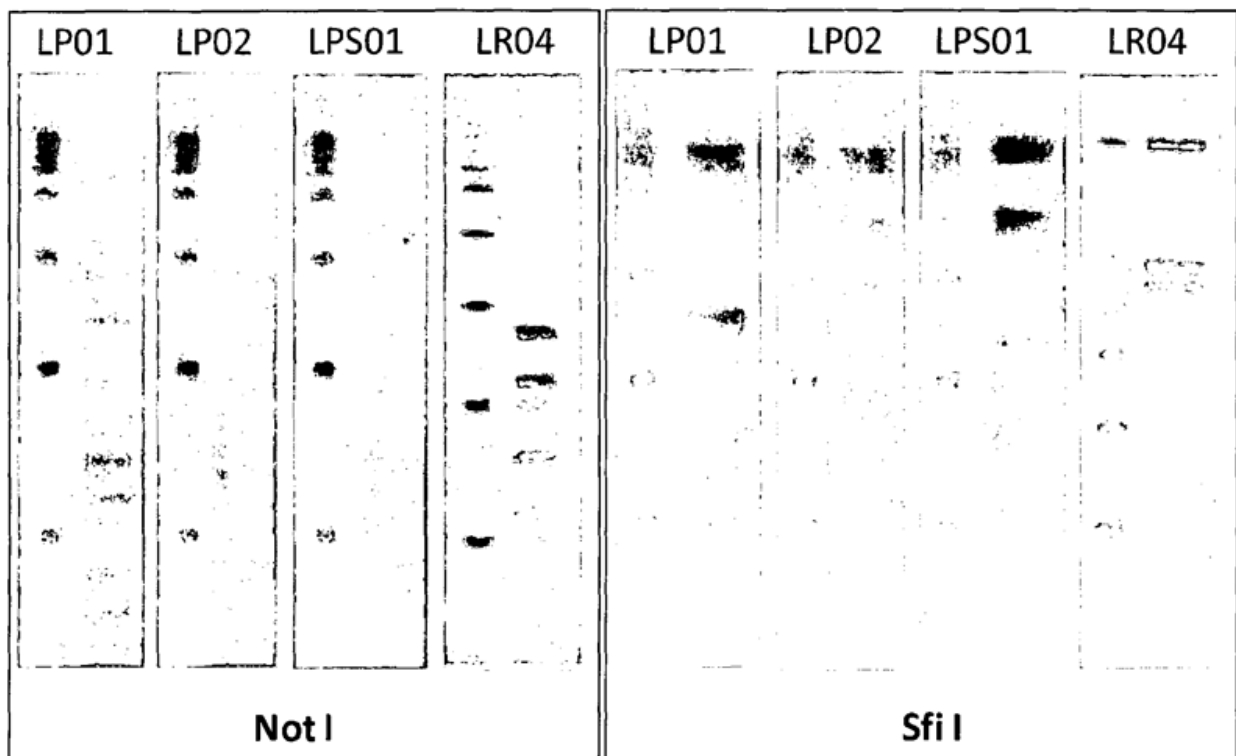


Figura 4

Actividad inhibidora *in vitro* de cepas de bacterias probióticas contra *E. coli*

A: Los resultados (expresados en mm) son el promedio $\pm$ la desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes.

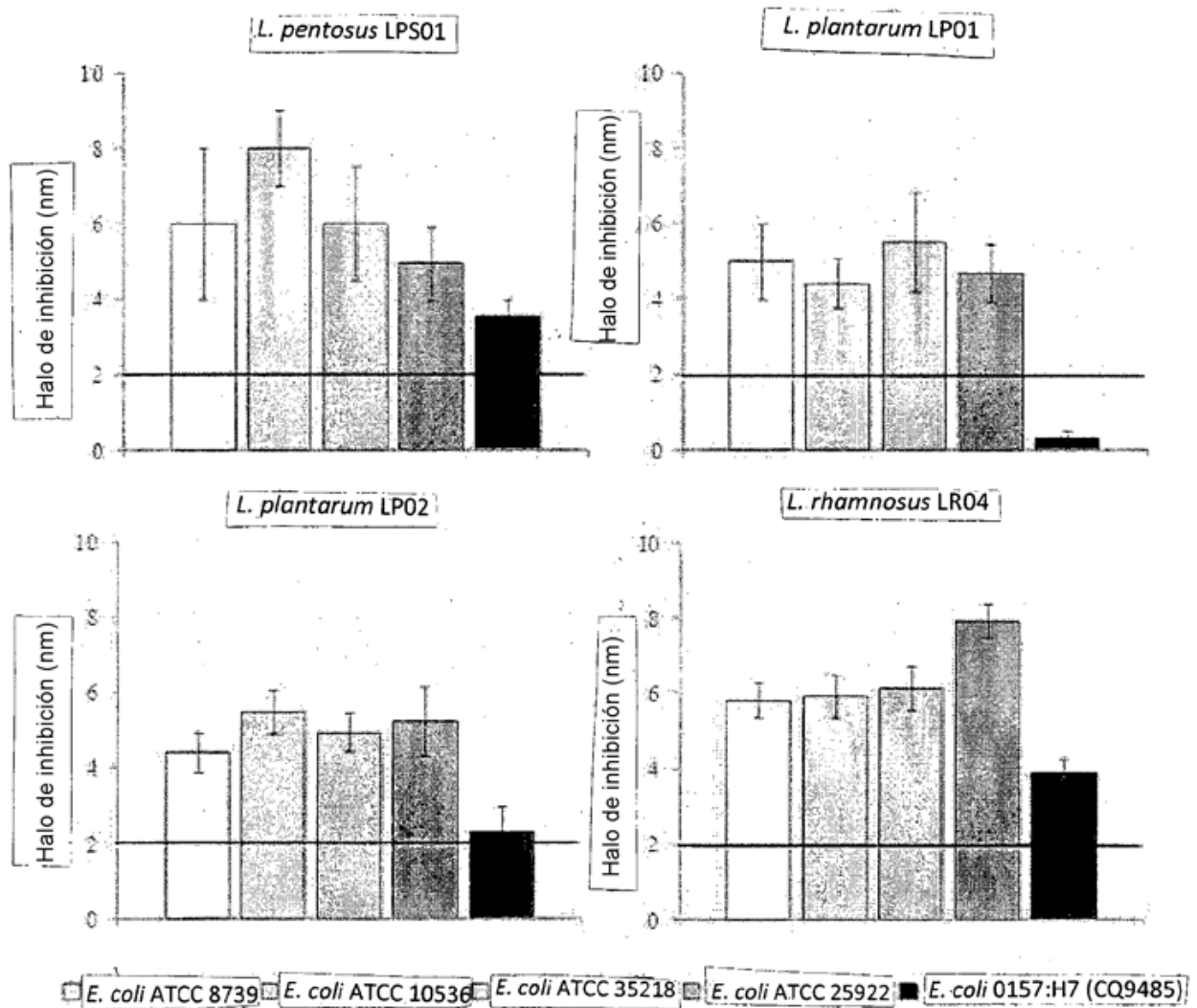


Figura 5

Actividad inhibidora *in vitro* de cepas probióticas contra otras bacterias enteropatógenas

A: Los resultados (expresados en mm) son el promedio $\pm$ la desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes.

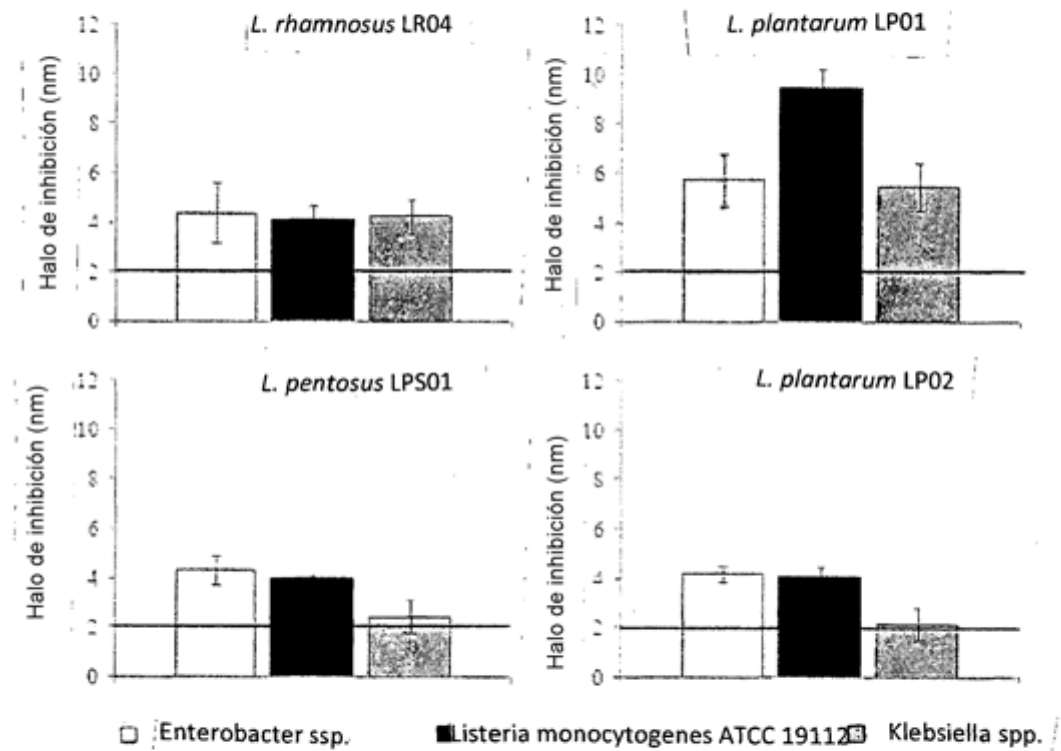
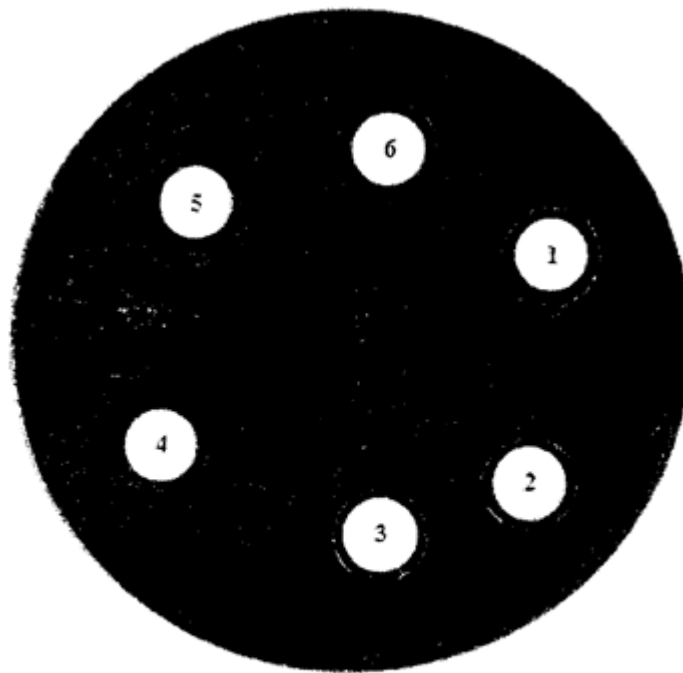
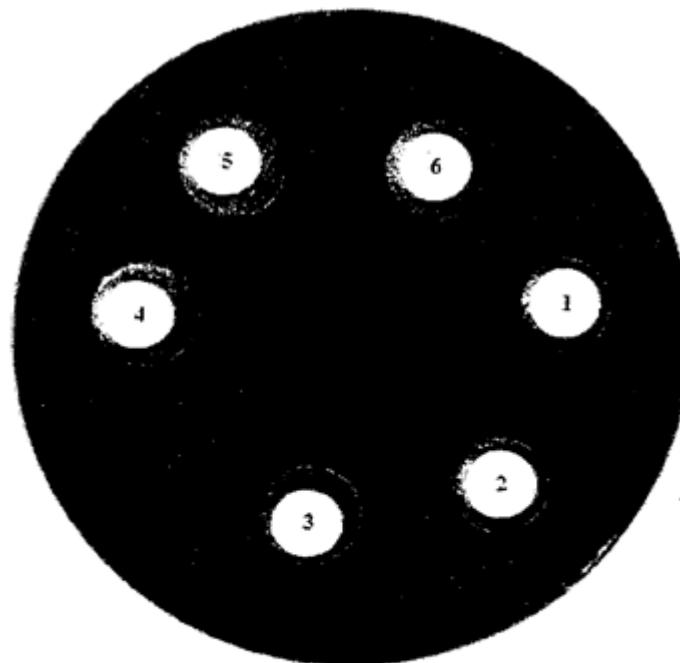


Figura 5, continúa en la página siguiente



Enterobacter spp.

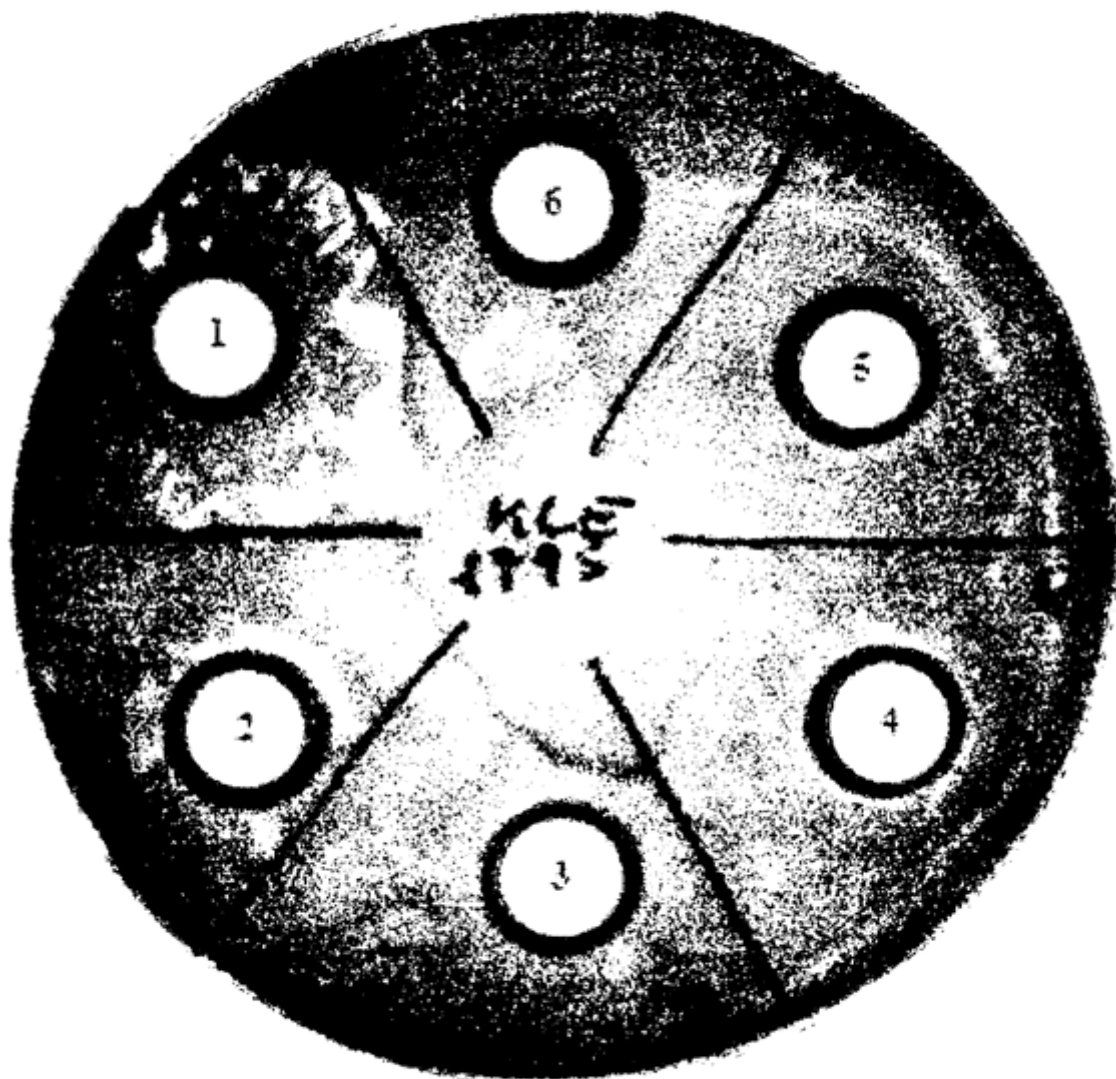


Listeria monocytogenes
ATCC 19112

Figura 5, continuación

Figura 6

Actividad inhibidora *in vitro* de cepas probióticas contra otras bacterias enteropatógenas. Leyenda: *L. rhamnosus* LR04 (disco5); *L. plantarum* LP01(disco4), *L. pentosus* LPS01 (disco2) y *L. plantarum* LP02



Klebsiella spp.

(disco 1)