



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 542**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815183 .1**  
96 Fecha de presentación : **17.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1718154**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Lactobacillus probióticos caninos.**

30 Prioridad: **19.12.2003 US 530972 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.10.2011**

73 Titular/es: **THE IAMS COMPANY**  
**7250 Poe Avenue**  
**Dayton, Ohio 45414, US**  
**ALIMENTARY HEALTH LIMITED**

72 Inventor/es: **Boileau, Thomas, William-Maxwell;**  
**Ceddia, Michael, Anthony;**  
**Collins, John, Kevin;**  
**Davenport, Gary, Mitchell;**  
**Kiely, Barry, Pius;**  
**O'Mahony, Liam, Diarmuid;**  
**Sunvold, Gregory, Dean;**  
**Tetrick, Mark, Alan y**  
**Vickers, Robert, Jason**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 542 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**

Lactobacillus probióticos caninos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere al campo de los microorganismos probióticos, más específicamente bacterias lácticas probióticas caninas y métodos de uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los mecanismos de defensa de protección del tracto gastrointestinal (TG) de mamíferos frente a la colonización por bacterias son muy complejos. En la mayoría de los mamíferos, el tracto gastrointestinal está colonizado por microflora nativa y microorganismos patógenos invasivos. En un estado saludable, esta microflora competitiva está en estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede provocar o prevenir muchos trastornos del tracto gastrointestinal, tanto en humanos como en otras especies de mamíferos como, por ejemplo, animales de compañía, incluyendo gatos, perros y conejos. El bienestar de los animales de compañía está muy relacionado con su alimentación y la salud de su tracto gastrointestinal, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal de dichos animales puede resultar en mascotas más sanas.

15 La cantidad y composición de la microflora intestinal tiende a ser estable, aunque la edad y la dieta pueden modificarla. La acidez gástrica, la bilis, la peristalsis intestinal y la inmunidad local son factores que se consideran importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y diversos mamíferos. A menudo, los trastornos del tracto gastrointestinal, incluidos los de caninos y felinos, están asociados al exceso de crecimiento bacteriano y a la producción de enterotoxinas por parte de bacterias patógenas. Estos factores alteran el equilibrio de la microflora intestinal y pueden favorecer la inflamación y respuestas inmunes aberrantes.

20 Durante los últimos años, la investigación ha comenzado a resaltar algunas cepas valiosas de bacterias y su uso potencial como agentes probióticos. Se consideran como probióticos las preparaciones de bacterias, viables o muertas, sus constituyentes como, por ejemplo, proteínas o carbohidratos, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que favorecen la buena salud de los mamíferos conservando la microflora natural en el tracto gastrointestinal y reforzando los controles normales en las respuestas inmunes aberrantes. Algunos expertos creen que las bacterias probióticas son más eficaces cuando se derivan de las especies a tratar o especies relacionadas cercanamente con las mismas. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener cepas probióticas derivadas de animales de compañía para usarlas para animales de compañía que sean diferentes de las derivadas de los humanos.

30 WO 01/90311 describe microorganismos probióticos aislados de muestras fecales obtenidas de gatos y perros que tienen actividad probiótica. Sin embargo, estas bacterias se obtuvieron de muestras fecales, y pueden no formar parte de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto gastrointestinal.

JCM, número de registro 5670 se refiere a una cepa de *Lactobacillus animalis* depositada por Dent y Williams (1983).

35 JCM, número de registro 1717 se refiere a una cepa de *Lactobacillus murinus*, depositada por Hemme y col. (1982).

"Species specific oligonucleotide probes for the detection and identification of *Lactobacillus* isolated from mouse faeces" de S.H. Park y K. Itoh en *J. Appl. microbiology* 2005,99,51-57 se refiere al desarrollo de técnicas de seguimiento específicas para cada especie para la detección e identificación rápida de *Lactobacillus* procedentes de heces de ratón.

WO03/01298 se refiere a cepas de *Lactobacillus salivarius* probióticas.

40 Por consiguiente, es necesario proporcionar cepas de bacterias que puedan obtenerse mediante aislamiento de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto gastrointestinal que estén adaptadas especialmente para animales de compañía y se hayan seleccionado por sus propiedades probióticas y capacidad para sobrevivir el procesamiento, e incorporar dichas cepas en composiciones que son adecuadas para su uso.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 Una cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que puede obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal seccionado y lavado que tiene actividad probiótica, en donde la cepa es la especie *Lactobacillus murinus/ruminus* AHC1222-número de registro NCIMB41194, *Lactobacillus murinus/ruminus* AHC 3133-número de registro NCIMB 41195, *Lactobacillus murinus/ruminus* AHC 5323-número de registro NCIMB 41196, *Lactobacillus murinus/ruminus* AHC 6331-número de registro NCIMB 41197 o mezcla de los mismos.

50 Además, la presente invención tiene como objeto proporcionar usos de bacterias lácticas que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado para mantener y mejorar la salud de las mascotas, y composiciones que comprenden bacterias lácticas.

Estas características y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica después de leer el presente ejemplo.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

5 La Figura 1 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Salmonella typhimurium* por parte de la bacteria *Lactobacilli* de la presente invención según la metodología expuesta en el ejemplo 2.

La Figura 2 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria monocytogenes* por parte de la bacteria *Lactobacilli* de la presente invención según la metodología expuesta en el ejemplo 2.

La Figura 3 demuestra la inhibición del *crecimiento in vitro* de *Listeria innocua* por parte de la bacteria *Lactobacilli* de la presente invención según la metodología expuesta en el ejemplo 2.

10 La Figura 4 demuestra la inhibición del *crecimiento in vitro* de *Escherichia coli* 0157H45 por parte de la bacteria *Lactobacilli* de la presente invención según la metodología expuesta en el ejemplo 2.

La Figura 5 demuestra la estabilidad en medio *ácido in vitro* de las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención según la metodología expuesta en el ejemplo 3.

15 La Figura 6 demuestra las características del crecimiento de las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de 0,5%, 1% y 5%.

La Figura 7 demuestra la capacidad *in vitro* de las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención para adherirse a células epiteliales estomacales HT-29.

Secuencias

20 SEC. n.º 1 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 1222 (NCIMB 41194).

SEC. n.º 2 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 3133 (NCIMB 41195).

SEC. n.º 3 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 5323 (NCIMB 41196).

25 SEC. n.º 4 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 6331 (NCIMB 41197).

SEC. n.º 5 – 16s-23s PCR secuencias cebadoras para análisis de secuencia.

Números de registro de bacterias

30 La siguiente tabla indica especies *Lactobacillus* y número de cepa para las cepas que son ejemplos de la presente invención. Las cepas bacterianas están depositadas en National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de registro	Secuencia 16s-23s
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 1222	NCIMB 41194	SEC. n.º 1
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 3133	NCIMB 41195	SEC. n.º 2
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 5323	NCIMB 41196	SEC. n.º 3
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 6331	NCIMB 41197	SEC. n.º 4

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Todos los pesos, medidas y concentraciones de la presente memoria están medidos a 25 °C en la composición en su totalidad, salvo que se indique lo contrario.

35 Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes de composiciones referidas en la presente memoria son porcentajes en peso y todas las relaciones son relaciones en peso.

Salvo que se indique lo contrario, todos los pesos moleculares son pesos moleculares promedios en peso.

Excepto en los casos en los que se detallan los valores de medición reales de ejemplos específicos, los valores numéricos a los que se hace referencia en la presente memoria deberán considerarse acompañados por la palabra “aproximadamente”.

5 Con la siguiente descripción, la abreviación CFU (“unidad formadora de colonias”) designa el número de células bacterianas obtenido mediante conteos microbiológicos en placas de agar, como se comprenderá habitualmente en la técnica.

10 En la presente memoria, el término “mutantes” incluye cepas bacterianas derivadas que tienen al menos 88% de homología, preferiblemente al menos 90% de homología, más preferiblemente 95% de homología, con la secuencia de polinucleótidos del espaciador intergénico 16s-23s de una cepa referenciada, pero que comprende mutaciones de DNA en otras secuencias de DNA en el genoma bacteriano.

15 En la presente memoria, el término “mutaciones de DNA” incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden, al menos, alteraciones sencillas de bases que incluyen deleciones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones de DNA conocidas por el experto en la técnica, incluyendo modificación genética introducida en un nucleótido precursor o secuencia de aminoácido manteniendo al mismo tiempo, al menos, 50% de homología con la secuencia precursora. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones de DNA tiene, al menos, 60%, más preferiblemente, al menos, 75%, más preferiblemente aún 85% de homología con la secuencia precursora. En la presente memoria, la “homología” de la secuencia puede determinarse usando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la homología usando el programa de algoritmo de homología en línea “BLAST”, disponible para el público en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

20 En la presente memoria “modificación genética” incluye la introducción de secuencias de DNA exógenas y/o endógenas en el genoma de un organismo por inserción en el genoma de dicho organismo o mediante vectores que incluyen DNA plásmido o bacteriófago según es conocido por el experto en la técnica, teniendo dicha secuencia de DNA una longitud de, al menos, dos bases de ácido desoxirribonucleico.

25 En la presente memoria, “animal de compañía” significa un animal doméstico. Preferiblemente, “animal de compañía” significa un canino, felino, conejo, hurón, caballo, vaca, o similares. Más preferiblemente, “animal de compañía” significa un canino o felino doméstico.

#### Cepas de *Lactobacilli* del ácido láctico

30 El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado que tiene actividad probiótica en animales. Los probióticos son microorganismos, viables o muertos, composiciones procesadas de microorganismos, sus constituyentes como, por ejemplo, proteínas o carbohidratos, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que, de forma ventajosa, afectan a un huésped. El uso general de bacterias probióticas es en forma de células viables. Sin embargo, puede extenderse a células no viables como, por ejemplo, cultivos matados o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados mediante bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos térmicamente matados por calor, o microorganismos matados por exposición a pH alterado o sometidos a presión. Para el propósito de la presente invención, está previsto además que “probióticos” incluya los metabolitos generados por los microorganismos de la presente invención durante la fermentación, si no se indican por separado. Estos metabolitos pueden liberarse al medio de fermentación, o pueden almacenarse en el interior del microorganismo. En la presente memoria “probiótico” también incluye bacterias, productos bacterianos homogeneizados, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes de fermentos bacterianos, y mezclas de los mismos, que desempeñan funciones para el animal huésped cuando se administran a una dosis terapéutica.

45 Se ha descubierto que las bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento directamente a partir del tracto gastrointestinal seccionado y lavado de mamíferos se adhieren al tracto gastrointestinal después del consumo de células bacterianas viables, y son también significativamente inmunomoduladoras cuando se dan como alimento a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las *Lactobacilli* obtenibles mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal seccionado y lavado se asocian íntimamente con los tejidos mucosos del intestino. Sin pretender tampoco imponer ninguna teoría, se cree que esto resulta en *Lactobacilli* probióticas de la presente invención que generan respuestas del huésped alternativas que resultan en acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal seccionado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped mediante interacción directa con el epitelio de la mucosa y con las células inmunes del huésped. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo tradicional de acción asociado con las bacterias probióticas, es decir, la prevención de adherencia patógena al intestino mediante inclusión y competición por nutrientes, hace que las *Lactobacilli* de la presente invención sean muy eficaces como organismo probiótico.

55 Las *Lactobacilli* de la presente invención, que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado, tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra un número de cepas/especies bacterianas patógenas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esta actividad

antimicrobiana *in vitro* es indicativa de actividad probiótica *in vivo* potencial en animales, preferiblemente animales de compañía como, por ejemplo, caninos y felinos. Las bacterias lácticas de la presente invención preferiblemente tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Escherichia coli*, más preferiblemente una mezcla de estas cepas, más preferiblemente aún, todas estas cepas.

5 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de la presente invención puede ser resultado de un número de acciones diferentes por parte de las bacterias lácticas de la presente invención. Se ha sugerido anteriormente en la técnica que diversas cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal después del consumo oral, evitando la unión de organismos patógenos a la mucosa intestinal mediante oclusión. Esto requiere consumo oral de células bacterianas “vivas” o viables para que una colonia de bacterias se establezca en el intestino. Sin embargo, se cree que las *Lactobacilli* de la presente invención, que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado, si bien ejercen un cierto efecto probiótico debido a la oclusión si se presentan en cualquier forma viable, pueden transmitir un efecto probiótico sustancial tanto en forma viable como no viable debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos o los matan, y/o alteran la competencia inmune del animal huésped. Esta forma de actividad probiótica es deseable, puesto que las bacterias de la presente invención pueden darse como cultivos viables o no viables o productos de fermentación purificados y continuar transmitiendo un efecto terapéutico beneficioso al animal huésped.

Preferiblemente, las bacterias lácticas de la presente invención son capaces de mantener viabilidad después del tránsito a través del tracto gastrointestinal. Esto es deseable para que los cultivos vivos de las bacterias sean administrados por vía oral y para que se produzca la colonización en el intestino delgado o en el intestino grueso después del tránsito a través del exófago y estómago. La colonización del intestino delgado o del intestino grueso por parte de las bacterias lácticas de la presente invención es deseable para la transmisión al huésped de ventajas probióticas a largo plazo. La dosificación oral de células no viables o productos aislados de las mismas induce ventajas temporales, pero puesto que las bacterias no son viables, no pueden crecer y transmiten continuamente un efecto probiótico *in situ*. Como resultado, esto puede requerir que el huésped sea dosificado de forma regular para mantener las ventajas para la salud. En contraste, las células viables que pueden sobrevivir el tránsito gástrico en forma viable, y posteriormente colonizar adheriéndose a la mucosa del intestino y proliferando sobre la misma, son capaces de transmitir efectos probióticos continuamente *in situ*.

Por lo tanto, es preferible que las bacterias lácticas de la presente invención mantengan viabilidad tras la suspensión en un medio que tiene un pH de 2,5 durante 1 hora. En la presente memoria, “mantener viabilidad” significa que al menos 25% de las bacterias inicialmente suspendidas en los medios de ensayo son viables usando el método de conteo de placa conocido por el experto en la técnica. Preferiblemente, “mantener viabilidad” significa que al menos 50% de las bacterias inicialmente suspendidas son viables. Es deseable que las bacterias lácticas de la presente invención mantengan viabilidad después de la exposición a pH bajo ya que esto reproduce la exposición a los jugos gástricos en el estómago e intestino superior *in vivo* después del consumo oral en animales.

Además, es preferible que las bacterias lácticas de la presente invención tengan un crecimiento de, al menos, 66% cuando están en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 0,5%. El crecimiento, en la presente memoria, se describe más detalladamente en el ejemplo 3. Más preferiblemente, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento de, al menos, 33% cuando están en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 1%. Más preferiblemente aún, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento de 100% en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 0,5%. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las bacterias lácticas de la presente invención, capaces de mantener viabilidad en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 0,5% son capaces de sobrevivir las condiciones presentes en el intestino. Se cree que esto se debe a que la adición de bilis porcina al medio de cultivo reproduce las condiciones del intestino.

Además, es preferible que las bacterias lácticas de la presente invención tengan una adhesión significativa *in vitro* a las células epiteliales del intestino. En la presente invención, “adhesión significativa” significa que, al menos, 0,2% del número total de bacterias lácticas incubadas conjuntamente con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a las células epiteliales. Más preferiblemente, al menos 0,3% de las células bacterianas incubadas conjuntamente se adhieren *in vitro* a las células epiteliales. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la adherencia *in vitro* a la célula epitelial del intestino es indicativa de la capacidad de las bacterias lácticas de colonizar el tracto gastrointestinal de un animal *in vivo*.

Preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es de una especie seleccionada del grupo que comprende *Lactobacillus murinus/ruminus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, o mezclas de las mismas, más preferiblemente *Lactobacillus murinus/ruminus*.

La secuencia polinucleotídica intergénica 16s-23s es conocida por el experto en la técnica como la secuencia de DNA en el genoma bacteriano que puede usarse para identificar diferentes especies y cepas de bacterias. Esta secuencia polinucleotídica intergénica puede determinarse mediante el método detallado más adelante en el ejemplo 4.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s según la SEC. n.º 1. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es *Lactobacilli murinus/ruminus* cepa NCIMB 41194 (AHC1222), o un mutante de la misma.

5 En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s según la SEC. n.º 2. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es *Lactobacilli murinus/ruminus* cepa NCIMB 41196 (AHC5323), o un mutante de la misma.

10 En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s según la SEC. n.º 3. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es *Lactobacilli murinus/ruminus* cepa NCIMB 41197 (AHC6331), o un mutante de la misma.

15 En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s según la SEC. n.º 4. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es *Lactobacilli murinus/ruminus* cepa NCIMB 41195 (AHC3133), o un mutante de la misma.

La cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que puede obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado puede usarse para transmitir ventajas probióticas tras el consumo oral en animales, preferiblemente animales de compañía o humanos. Este beneficio probiótico generalmente mantiene y mejora la salud general del animal. Elementos no limitativos de ventaja para la salud y fisiología animal, tanto en el alivio terapéutico de síntomas como en la prevención de enfermedades mediante profilaxis, incluyen desórdenes inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del colon, síndrome del colon irritable, cáncer (especialmente los de los sistemas gastrointestinal e inmunológico), diarrea, diarrea asociada al uso de antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de las articulaciones, diabetes mellitus, síndrome de resistencia a la insulina, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital, trauma asociado a intervenciones quirúrgicas, enfermedad metastática inducida por intervenciones quirúrgicas, sepsis, pérdida de peso, ganancia de peso, excesiva acumulación de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, cachexia, curación de heridas, úlceras, infección de la barrera intestinal, alergia, asma, desórdenes respiratorios, desórdenes circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, desórdenes del sistema de coagulación sanguínea, enfermedad renal, desórdenes del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, desórdenes nutricionales, osteoporosis, desórdenes endocrinos, y desórdenes epidérmicos. Es preferido el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluido el tratamiento o prevención de la diarrea; la regulación del sistema inmunológico, preferiblemente el tratamiento o prevención de la enfermedad autoinmune e inflamación; mantenimiento o mejora de la salud de la piel y/o pelaje, preferiblemente tratamiento o prevención de enfermedad atópica de la piel; mejora o reducción de los efectos del envejecimiento, incluyendo el estado de conciencia y los niveles de actividad; y prevención de la pérdida de peso durante y después de una infección.

El tratamiento de los trastornos descritos más arriba se puede medir utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, los trastornos inflamatorios, incluyendo las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación, se pueden detectar y supervisar utilizando pruebas de la función inmunológica in vivo como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de las células asesinas naturales, la respuesta de los anticuerpos a las vacunas, hipersensibilidad retardada y mezclas de las mismas. Dichos métodos se describen brevemente en la presente memoria, pero son bien conocidos por el experto en la técnica.

1. Blastogénesis de linfocitos: este ensayo mide la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos aislados a partir de sangre entera fresca de animales de ensayo y control para diversos mitógenos y es una medida de la función general de las células T y B. Explicado de manera concisa, los mononucleocitos de la sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre total mediante métodos de centrifugación de la densidad Ficoll-Hypaque conocidos por el experto en la técnica. Los PBMC aislados se lavan dos veces en un medio celular RPMI 1640 suplementado con HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células lavadas se vuelven a suspender en RPMI 1640, se cuentan y se ajusta la densidad celular apropiadamente. Las células  $2 \times 10^5$  se exponen en un rango de concentraciones (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de varios mitógenos, algunos ejemplos de los cuales incluyen mitógeno de la hierba carmín (Gibco), fitohemaglutinina (Gibco) y conconavalina A (Sigma) por triplicado durante 72 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> con 10% de suero fetal bovino (Sigma). A las 54 horas las células se pulsan con 1  $\mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>H-timidina, y las células se recolectan y se leen los recuentos por centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.

2. Actividad natural de célula asesina: según se describe en US-6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de las células asesinas naturales aisladas a partir de sangre entera fresca de animales de ensayo y control. Las células asesinas naturales son un componente de la función inmunológica de un mamífero. Para evaluar la actividad citotóxica de las células NK se utilizaron células de adenocarcinoma de tiroides canina como células diana. Previamente se había demostrado que esta línea celular es susceptible de ser destruida por las células NK

caninas. Las células diana se cultivaron en un matraz T75 con 20 ml de medio esencial mínimo (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Tras la confluencia, las células diana fueron tripsinizadas, lavadas 3 veces y resuspendidas a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml en medio completo (RPMI-1640+10% SFB+100 U/ml de penicilina+100 µg/ml de estreptomina). Con una pipeta, se introdujeron alícuotas de 100 µL de las células diana, por triplicado, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Massachusetts) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. Linfocitos (células efectoras; 100 µL) aislados mediante separación Ficoll-Hypaque (según se describe anteriormente en la presente memoria) se añadieron a las células diana para proporcionar una relación célula efectora/célula diana (E:T) de 10:1. Tras 10 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 20 µl de un sustrato que contenía 5 µg de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37 °C, tras lo cual se extrajo el MTT no metabolizado mediante aspiración. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 200 µL de etanol al 95%. La densidad óptica se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. El porcentaje de lisis específica de células NK se calculó del siguiente modo:

$$\text{Citotoxicidad específica (\%)} = 100 \times \left\{ 1 - \frac{[(\text{OD de células diana y células efectoras}) - (\text{OD de células efectoras})]}{(\text{OD de células diana})} \right\}$$

3. Respuesta del anticuerpo a las vacunas: se da a los sujetos que realizan la prueba una serie (de hasta 5) vacunas después de, al menos, 12 semanas de alimentación de control o probiótica. Las vacunas pueden ser una mezcla de vacunas nuevas y redundantes. Entre los ejemplos no limitativos de series de vacunas que se pueden utilizar se incluyen mezclas de vacunas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Entre los ejemplos no limitativos de vacunas adecuadas para su uso en la presente invención se incluyen la vacuna para moquillo canino, adenovirus, coronavirus, parainfluenza y parvovirus. El historial de vacunas del sujeto de la prueba determinará las vacunas que se utilizarán. Los anticuerpos específicos a las vacunas administradas se miden en la sangre durante 3 semanas y se compara la duración y la resistencia de la respuesta en los grupos de alimentación probióticos y de control.

4. Hipersensibilidad retrasada: un método no invasivo *in vivo*, de evaluación del estado del sistema inmunológico. Este ensayo comprende una inyección intradérmica del mitógeno policlonal Phytohemmaglutinin (PHA) junto con glóbulos rojos de oveja, una vacuna multivalente, histamina (100 µL de 0,0275 g/l de fosfato de histamina; Greer, Lenoir, NC), o PBS (100 µL de solución salina tamponada con fosfato, 8,5 g/l; Sigma). La respuesta inmunitaria al antígeno se registra como el grosor del pliegue cutáneo utilizando calibradores en intervalos de tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas después de administrar la inyección. Un incremento en el grosor del pliegue cutáneo es indicativo de una mayor respuesta a la hipersensibilidad que debe disminuirse mediante el tratamiento con las bacterias de la presente invención.

Métodos adicionales para determinar el efecto de las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención se describen en US-6.133.323 y US-6.310.090.

Además, se puede determinar la mejoría de los efectos de la edad utilizando absorptometría de rayos X doble o una exploración mediante tomografía computerizada (TC) para medir la composición del cuerpo, incluyendo la masa de la grasa corporal, la masa exenta de grasas y el contenido mineral del hueso. De forma similar, este método se puede utilizar para determinar los cambios en la anatomía como la pérdida de peso o la densidad ósea en los sujetos tras la infección.

Las *Lactobacilli* de la presente invención pueden también usarse en un método para reducir los niveles de estrés en animales de compañía. Las concentraciones de hormonas del estrés en la sangre incluyendo la epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol y proteína C reactiva se pueden medir para determinar los niveles de estrés y su reducción o mantenimiento. Estas hormonas son marcadores biológicos de estrés reconocidos y se pueden medir fácilmente utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Además, el mantenimiento o mejora de la salud de la piel y/o el pelaje de los animales de compañía, incluyendo la enfermedad atópica de la piel, se puede medir utilizando valoraciones de la piel y del recubrimiento dirigidas por dos personas cualificadas. Entre los ejemplos de los criterios examinados durante dichas valoraciones se incluyen los siguientes:

- a) Índice de caída de pelo: a cada sujeto que realiza la prueba se le asigna un índice de caída de pelo recogiendo el pelo producido durante una sesión de cepillado estandarizada. El pelo se retiene y se pesa y se comparan los sujetos que realizan la prueba con los sujetos de control.
- b) Evaluaciones subjetivas de la piel/recubrimiento: panelistas cualificados evalúan subjetivamente la condición de la piel y recubrimiento evaluando la caída del pelo, caspa de los animales, brillo, uniformidad, suavidad y densidad.
- c) Valoración funcional de la piel: la función de barrera de la piel puede evaluarse frotando la superficie de la piel con una gasa remojada en acetona. Esta técnica desestabiliza de forma eficaz la barrera de la piel al

5 eliminar las capas monocelulares y las fracciones lípidas asociadas de la capa córnea de la epidermis. La desestabilización de la barrera se cuantifica midiendo el aumento en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y el grado de enrojecimiento del sitio dañado utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica. Las puntuaciones de enrojecimiento (eritema) se obtienen utilizando el sistema de cámara e iluminación descrito anteriormente. Las lecturas TEWL y las puntuaciones de enrojecimiento se obtienen inmediatamente antes y después de la desestabilización, y en criterios de evaluación de 5 y 24 horas para evaluar las propiedades protectoras y de curación de la piel.

10 El tratamiento o prevención de la diarrea en los animales de compañía puede medirse usando puntuación correspondiente a la evaluación de las heces. Según la presente invención, las puntuaciones para las deposiciones se pueden registrar diariamente según las siguientes directrices y comparar los grupos de control y de prueba antes y después de la ingestión con las bacterias.

Puntuación: 5 Extremadamente seca

15 Esta deposición es dura y no se adhiere a las superficies. La deposición rodará si se empuja. No se produce ninguna indentación al recoger la deposición. La deposición a menudo se defeca en grupos de deposiciones individuales en lugar de en una sola unidad. La deposición mantiene su forma original después de ser recogida.

Puntuación: 4 Firme (deposición ideal)

Esta deposición es firme, bien definida y cilíndrica. Esta deposición no se parte fácilmente al recogerla. Esta deposición puede dejar residuos en superficies y guantes. Esta deposición a menudo se defeca como una unidad. La deposición mantiene su forma original después de ser recogida.

20 Puntuación: 3 Blanda y definida

Esta deposición es blanda, sin embargo, tiene formas definidas. Esta deposición se partirá fácilmente y, sin duda alguna, dejará residuos en superficies y guantes. La deposición a menudo pierde su forma original después de ser recogida. Esta deposición a menudo está presente con otra puntuación pero puede comprender toda la muestra de la deposición.

25 Puntuación: 2 Blanda, sin forma

30 Esta deposición es blanda y no tendrá una forma cilíndrica. La forma a menudo asociada con un "2" es una forma de "boñiga de vaca". Esta deposición perderá su forma original al ser recogida y dejará, sin duda alguna, residuo en las superficies y los guantes. La puntuación de esta deposición a menudo está presente con otra puntuación pero puede comprender toda la muestra de la deposición. Esta muestra de la deposición se puede extender sobre un área de varios centímetros.

Puntuación: 1 Líquida

35 La deposición con esta puntuación siempre parecerá líquida y puede que haya o no presente materia en forma de partículas. Esta deposición a menudo se defecará en grupos de pilas en lugar de en una unidad completa. En esta muestra de la deposición a menudo hay mucosidades presentes. Esta muestra de la deposición es muy difícil de recoger y siempre quedan residuos en las superficies y en los guantes. Esta muestra de la deposición se puede extender sobre un área de varios centímetros.

Además, se registran también otras observaciones, incluyendo: sangre en heces, objetos extraños en las heces; o mucosidad en las heces.

40 Además, el tratamiento de la infección gastrointestinal en los animales de compañía puede comprender mejorar la ecología microbiana de los animales de compañía. Mejorar la ecología microbiana de los animales de compañía preferiblemente comprende reducir los niveles de bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales de compañía se pueden cuantificar utilizando la técnica de recuento de colonias estándar conocida por el experto en la técnica. Más preferiblemente, las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, Bacteroides y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de cepas adecuadas de bacterias patógenas incluyen *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de las mismas.

50 El método de uso de las bacterias de la presente invención puede también incluir el tratamiento, ya sea profiláctico o terapéutico, del tracto urinario de los mamíferos, preferiblemente de animales de compañía. Entre los ejemplos no limitativos de tratamiento del tracto urinario se incluye el tratamiento o prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento o prevención de enfermedades renales, incluyendo piedras en el riñón, el tratamiento o prevención de infecciones en la vejiga y similares. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención son útiles en la prevención de estas dolencias como resultado de su capacidad para degradar los cristales que contienen urato, estruvita o ácido oxálico, como se ha demostrado *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario que puede formar precipitados insolubles que resultan en infecciones del

riñón, vejiga y otras infecciones del tracto urinario. Al degradar el ácido oxálico y, por consiguiente, prevenir potencialmente su precipitación y acumulación en el tracto urinario, las bacterias de la presente invención puede tratar y prevenir infecciones y otras dolencias del tracto urinario. La degradación del ácido oxálico puede medirse *in vitro* usando el kit de ensayo de ácido oxálico núm. de cat. 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

Las *Lactobacilli* de la presente invención pueden usarse en un método para mejorar o mantener la salud de los animales de compañía que comprende mejorar la digestión de la fibra. La mejora de la digestión de las fibras es deseable ya que estimula el crecimiento de dichas bacterias probióticas, además de la microflora endógena beneficiosa, que contribuye a la supresión de algunas bacterias potencialmente patógenas. Además, se ha documentado en los seres humanos una disminución en la cantidad de metabolitos tóxicos y enzimas perjudiciales que son el resultado de la fermentación colónica (Tomomatsu, H. "Health effects of oligosaccharides", (1994), Food Technol, **48**, págs. 61 - 65). La digestión de las fibras se puede determinar utilizando el método descrito en Vickers y col. (2001), "Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora", *Am. j. Vet. Res.* **61** (4), 609-615, con la excepción de que en lugar de inocular utilizando muestras fecales diluidas, cada experimento utilizó cultivos puros de las cepas bacterianas de interés.

El método de uso de las bacterias lácticas de la presente invención de forma típica incluye consumo oral por parte del animal. El consumo oral puede tener lugar como parte de la ingesta dietaria normal, o como un suplemento a la misma. El consumo oral de forma típica tiene lugar al menos una vez al mes, preferiblemente al menos una vez a la semana, más preferiblemente una vez al día. Las bacterias lácticas de la presente invención pueden proporcionarse al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz para mantener o mejorar la salud del animal, preferiblemente, un animal de compañía. En la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" con respecto a las bacterias lácticas, significa que la cantidad de bacterias suficiente para proporcionar el efecto o ventaja deseada a un animal huésped en necesidad de tratamiento, aunque es lo suficientemente baja como para evitar efectos adversos como, por ejemplo, toxicidad, irritación, o respuesta alérgica, se corresponde con una relación ventaja/riesgo razonable cuando se usa según la presente invención. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará con factores tales como la condición específica que se esté tratando, la condición física del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concomitante (si hubiera alguna), la forma de dosificación específica a usar, el vehículo empleado, la solubilidad de la forma de dosificación, y el régimen de dosificación específico.

Preferiblemente, las bacterias lácticas se suministran al animal de compañía a una dosis de  $1,0E+04$  a  $1,0E+14$  CFU por día, más preferiblemente de  $1,0E+06$  a  $1,0E+12$  CFU por día. La composición preferiblemente puede contener al menos 0,001% de  $1,0E+04$  a  $1,0E+12$  CFU/g de las bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado. Las bacterias lácticas pueden suministrarse al animal en forma viable o como células matadas, o productos de destilación, fracciones aisladas u otras fracciones de los productos de fermentación de las bacterias lácticas de la presente invención, o cualquier mezcla de las mismas.

Preferiblemente, las bacterias lácticas, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se usan para preparar una composición prevista para mantener o mejorar la salud de un animal. Según se ha indicado anteriormente en la presente memoria, la composición puede ser parte de la ingesta dietaria normal, o un suplemento. Cuando la composición comprende parte de la ingesta dietaria normal, la composición puede estar en forma de un alimento seco para animales como, por ejemplo, galletas o croquetas, un alimento a base de grano procesado, un alimento húmedo para animales, yogures, jugos de carne, productos para masticar, juguetes y golosinas para animales y similares.

Dichas composiciones pueden comprender otros componentes. Otros componentes son ventajosos para ser incluidos como composiciones usadas en la presente invención, pero son opcionales para los propósitos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones alimenticias son preferiblemente nutricionalmente equilibradas. En una realización, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteína cruda, preferiblemente de 22% a 40% de proteína cruda, en peso de la composición alimenticia. El material de la proteína en bruto puede comprender cualquier material que tenga un contenido en proteínas de, al menos, un 15% en peso, incluyendo ejemplos no limitativos del mismo proteínas vegetales como la soja, la semilla del algodón y los cacahuets, proteínas animales como la caseína, la albúmina y el tejido cárnico. Entre los ejemplos no limitativos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y las harinas secas o procesadas como harina de pescado, harina de aves de corral, harina de carne, harina de huesos, y similares. Otros tipos de fuentes de proteínas en bruto adecuadas incluyen gluten de trigo o gluten de maíz y proteínas extraídas de fuentes microbianas como la levadura.

Además, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, preferiblemente de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia. Además, las composiciones alimenticias que comprenden las bacterias lácticas de la presente invención pueden también comprender de 4% a 25% de fibra dietaria total. Las composiciones pueden también comprender una fuente de almidón múltiple según se describe en WO99/51108.

Las composiciones de la presente invención pueden también comprender una fuente de carbohidrato. Granos o cereales tales como el arroz, el maíz, el milo, el sorgo, la cebada, la alfalfa, el trigo, y similares son fuentes ilustrativas. Además, las composiciones pueden también contener otros materiales diferentes tales como suero seco y otros subproductos lácteos.

5 Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención pueden también comprender un prebiótico. El término "prebiótico" incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del animal doméstico y, por lo tanto, estimulan el crecimiento o desarrollo de las bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal del animal doméstico a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no  
10 limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la inulina y sus productos de hidrólisis habitualmente conocidos como fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligoderivados del almidón. Los prebióticos pueden ser suministrados en cualquier forma que sea adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede ser suministrado en forma de material vegetal que contiene la fibra. Entre los materiales vegetales adecuados se incluyen los espárragos, las alcachofas, las cebollas, el trigo o las achicorias, o residuos de estos materiales vegetales. De forma  
15 alternativa, la fibra prebiótica se puede suministrar como un extracto de inulina, por ejemplo los extractos de achicoria son adecuados. Los extractos de inulina adecuados se pueden obtener a través de Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo el nombre comercial "Raftiline". Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftiline (g) ST que es un polvo blanco fino que contiene entre un 90 y un 94% en peso de inulina, hasta un 4% en peso de glucosa y fructosa, y entre un 4 y un 9% en peso de sacarosa. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido como el que se  
20 obtiene de Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos, o utilizando microorganismos.

Para alimentos secos para animales, un proceso adecuado es el cocinado por extrusión, aunque pueden usarse  
25 horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cocinan por extrusión, el alimento seco para animales se proporciona generalmente en forma de croqueta. Si se usa un prebiótico, el prebiótico puede mezclarse con los otros ingredientes del alimento seco para animales antes del procesamiento. Un proceso adecuado se describe en la solicitud de patente europea núm. 0850569. Si se usa un microorganismo probiótico, lo mejor es recubrir el organismo sobre el alimento seco para animales o rellenar este con aquel. Se describe un proceso adecuado en la publicación de patente europea número EP-0.862.863.

30 Para alimentos húmedos, los procesos descritos en las patentes US-4.781.939 y US-5.132.137 pueden usarse para producir sucedáneos de productos cárnicos. Pueden usarse también otros procedimientos para producir productos en forma de trozos; por ejemplo, cocinado en un horno de vapor. De forma alternativa, pueden producirse productos en forma de masa emulsionando un material cárnico adecuado para producir una emulsión  
35 cárnica, añadiendo un agente gelificante adecuado, y calentando la emulsión cárnica antes de llenar latas u otros contenedores. Las composiciones alimenticias húmedas típicas pueden comprender de 5% a 15% de proteína, de 1% a 10% de grasa, y de 1% a 7% de fibra. Ejemplos de ingredientes no limitativos que pueden usarse en composiciones alimenticias húmedas incluyen pollo, pavo, ternera, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de ternera, hígado de pollo, arroz utilizado en la elaboración de cerveza, sémola de maíz, harina de pescado, huevo, pulpa de remolacha, cloruro, grano molido grueso de lino, cordero, subproductos de ternera,  
40 subproductos de pollo y mezclas de los mismos.

En otra realización, las composiciones suplementarias como galletas, productos para masticar, y otras golosinas para animales pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 60% de proteínas, o de 22% a 40% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, las composiciones  
45 suplementarias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, o de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición suplementaria. Las composiciones de alimentos y suplementos previstas para usar en caninos o felinos son habitualmente conocidas en la técnica.

Los alimentos para animales pueden contener otros principios activos como, por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga y cinc. Ácidos grasos de cadena larga adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una  
50 fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y ácido docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semilla de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma-linolénico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites pueden también usarse en los sustratos de recubrimiento a los que se ha hecho referencia anteriormente en la presente memoria. El cinc puede proporcionarse en diversas formas  
55 adecuadas, por ejemplo, como sulfato de cinc u óxido de cinc. Además, muchos ingredientes usados habitualmente en alimentos para animales son fuentes de ácidos grasos y cinc. Se ha observado que la combinación de achicoria, como fuente de prebiótico, con un aceite rico en ácido linoleico como, por ejemplo, aceite de soja, proporciona ventajas no esperadas, que parecen indicar un efecto sinérgico.

En los casos en los que la composición es en forma de salsa de carne, la composición preferiblemente  
60 comprende al menos 10% de caldo o consomé, incluyendo ejemplos no limitativos del mismo consomé de

verduras de carne de vaca, pollo o jamón. Las composiciones de salsa de carne pueden comprender de 0,5% a 5% de proteína en bruto, de 2% a 5% de grasa cruda, y de 1% a 5% de fibra.

Otros ejemplos no limitativos de suplementos adecuados para su uso en la presente invención incluyen polvos, suspensiones de aceite, suspensiones a base de leche, quesos, y pastillas o cápsulas. Cuando la composición está en forma de una pastilla, se requieren agentes aglutinantes adecuados para mantener la pastilla en forma sólida, comprimida. Los ejemplos no limitativos de agentes aglutinantes adecuados incluyen gomas naturales como, por ejemplo, goma xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otros conocidos por el experto en la técnica. Cuando la composición está en forma de una cápsula, la composición preferiblemente se encapsula usando tecnologías conocidas por el experto en la técnica. Los ejemplos no limitativos de materiales de encapsulación adecuados incluyen poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginato y gelatina. Las composiciones con yogur pueden comprender de 1% a 5% de proteína, de 10% a 20% de carbohidratos, de 1% a 5% de fibra, de 1% a 5% de grasa y de 50% a 90% de vehículo líquido como, por ejemplo, leche.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no están previstos en absoluto para limitar el ámbito de la misma.

#### Ejemplo 1: aislamiento de bacterias lácticas de tractos gastrointestinales caninos

Las muestras intestinales caninas se obtuvieron de perros sanos que fueron llevados a veterinarios locales para aplicárseles eutanasia iniciada y aprobada por el dueño. Todos los animales estaban sanos y exentos de enfermedades. El colon, colon medio, intestino ciego e íleon de cada perro fueron seccionados para exponer la mucosa.

Los sobrenadantes se eliminaron después de la agitación del tejido mucoso (agitado en vórtex durante 1 minuto) y después de homogeneización mecánica del tejido. Cada sobrenadante se depositó en la placa de agar MRS (desarrollado por de Mann, Rogosa y Sharpe). Estos fueron incubados anaeróticamente, usando el sistema Anerocult GasPak, durante 48 horas a 37 °C. Las colonias aisladas de las placas se sembraron de nuevo por agotamiento sobre cada MRS y de nuevo se llevó a cabo el cultivo de forma anaeróbica bajo las mismas condiciones. Las colonias aisladas fueron sembradas de nuevo por agotamiento otras 4 veces para purificar una única cepa. Se evaluó la morfología y el aspecto microscópico de las colonias. Se sometieron a ensayo de reacción de Gram y actividad de catalasa productos aislados adecuados. La identificación de bacilos catalasa negativos, gram positivos se llevó a cabo usando ensayos API (API 50CHL, BioMerieux). Las células cultivadas se lavaron dos veces con tampón fosfato 0,05M (pH 6,5) y cisteína-HCl (500 mg/l) y se sometieron a continuación a tratamiento sónico. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación. Los sobrenadantes se incubaron con NaF (6 mg/ml) y yodoacetato de Na (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C. Se interrumpió la reacción mediante incubación con hidroxilamina HCl (pH 6,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un seguimiento del desarrollo del color tras la adición de HCl (4M), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (5% (peso/volumen) en HCl 0,1M) y fructosa-6-fosfato (sal de Na). Se constató la formación de acetilfosfato a partir de fructosa-6-fosfato mediante el color rojo formado por el quelato férrico de su hidroximato.

Se aislaron cincuenta y ocho (58) cepas bacterianas lácticas de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado, de las cuales se determinó que veintidós (22) pertenecían al género *Lactobacilli*.

#### Ejemplo 2: rastreo de actividad antimicrobiana

Cada una de las cepas bacterianas lácticas aisladas se incubó anaeróticamente en caldo MRS. Se aplicaron 2 µL de cada cultivo sobre placas de agar de MRS y se incubaron anaeróticamente durante la noche. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Eschericia coli* 0157H45 fueron precultivadas durante la noche y se inoculó 100 µL de las mismas en agar fundido (1% volumen/volumen). Este cultivo indicador se vertió sobre la superficie de las placas MRS inoculadas. Después de la incubación durante la noche, se midieron zonas de inhibición alrededor de la colonia probiótica. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en tres ocasiones diferentes. Además, la incorporación del tampón de betaglicerofosfato al 2% en el agar permitió la valoración de la contribución de producción de ácido a la inhibición de patógenos observada *in vitro*.

Los datos presentados en las figuras 1, 2, 3 y 4 demuestran claramente que las cepas de bacterias lácticas de la presente invención que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado tienen una actividad antimicrobiana *in vitro* significativa, lo que indica una posible actividad probiótica.

#### Ejemplo 3: mediciones *in vitro* de supervivencia y colonización

##### Tolerancia al pH

Las células bacterianas se obtuvieron de cultivos llevados a cabo durante la noche, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se resuspendieron en caldo MRS/TPY ajustado con HCl 1M a pH 2,5. Las células se incubaron anaeróticamente a 37 °C y se midió su supervivencia a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos usando el método de conteo de placa conocido por el experto en la técnica.

## ES 2 366 542 T3

La Figura 5 demuestra claramente que nueve cepas no eran resistentes a pH 2,5 durante 1 hora, y las 49 cepas eran resistentes a pH 2,5 durante 1 hora. La Tabla 2 resume estos datos para cada cepa.

Tabla 2

Designación de la cepa	Conc. al comienzo	Conc. Al cabo de 1 hora	Viabilidad (%)
AHC1211	2,60E+08	2,00E+08	76,92
AHC1212	4,20E+08	5,00E+08	119,05
AHC1221	3,50E+08	3,10E+08	88,57
AHC1213	9,50E+08	3,00E+08	31,58
AHC1222	2,30E+09	1,30E+08	5,65
AHC2321	1,20E+08	1,70E+04	0,01
AHC2322	2,00E+07	1,40E+04	0,07
AHC2121	4,70E+08	4,00E+05	0,09
AHC2211	2,30E+08	4,10E+04	0,02
AHC2212	2,80E+08	3,80E+04	0,01
AHC3131	2,70E+08	2,70E+08	100,00
AHC3132	4,00E+08	4,50E+08	112,50
AHC3133	3,00E+08	2,70E+08	90,00
AHC3231	2,60E+08	2,00E+08	76,92
AHC3311	2,50E+08	2,70E+08	108,00
AHC3312	2,20E+08	3,10E+08	140,91
AHC3313	9,00E+07	2E+08	222,22
AHC4221	2,10E+08	1	0,00
AHC5113	1,10E+09	1,00E+08	9,09
AHC5121	6,00E+08	3,50E+08	58,33
AHC5122	2,30E+09	9,00E+08	39,13
AHC5123	9,50E+08	5,50E+08	57,89
AHC5131	4,50E+08	4,00E+08	66,7
AHC5211	5,00E+08	5,00E+08	40
AHC5212	8,50E+08	6,00E+08	52,9
AHC5213	6,50E+08	4,00E+08	35,4
AHC5222	1,00E+08	1,00E+03	0,000001
AHC5223	1,10E+09	1,10E+09	77,3
AHC5241	6,00E+08	3,00E+08	25
AHC5243	2,50E+08	2,60E+08	68
AHC5323	8,00E+08	3,50E+08	10
AHC5331	3,00E+08	2,00E+08	28,3

AHC5333	9,50E+08	3,40E+08	13,7
AHC5342	4,00E+08	3,00E+08	42,5
AHC6211	5,00E+08	8,50E+08	38
AHC6212	2,20E+08	2,00E+05	4,5E-07
AHC6241	1,50E+08	8,00E+07	40
AHC6311	2,80E+08	4,00E+08	85,7
AHC6312	5,00E+08	6,50E+08	32
AHC6321	3,50E+08	4,00E+08	200
AHC6322	1,00E+08	6,00E+08	350
AHC6331	4,50E+08	4,00E+08	3,8
AHC6332	5,00E+08	9,00E+08	50
AHC6341	6,00E+08	2,00E+08	40

#### Resistencia a bilis

Las cepas bacterianas se sembraron por agotamiento sobre agar MRS suplementado con bilis porcina (Sigma) a 0,5%, 1% y 5% (peso/volumen). Se incubaron placas a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento al cabo de 48 horas. El crecimiento fue comparado con placas de control por parte de un observador experimentado, y el crecimiento de las colonias se describió como:

5

Negativo (0) – sin crecimiento;

+ (1) – Crecimiento traslúcido difuso (<33% de las placas de control con 0% de bilis);

++ (2) – Control definido pero no tan bueno como los controles (>33% pero <66%);

+++ (3) – Crecimiento equivalente a los controles (>66%).

10 Una vez que se ha comparado el crecimiento de las colonias en presencia de sales biliares con los controles, se asignan valores numéricos 0, 1, 2 o 3 (-; +; ++, +++ respectivamente) a los descriptores de crecimiento, y se expresan como porcentaje, en donde 3 representa 100%.

15 La Figura 6 muestra que la *Lactobacillus* de la presente invención muestra claramente resistencia a las sales biliares, siendo capaz de crecer y formar colonias a un nivel de al menos 66% en casi todos los casos cuando se expone a sales biliares al 0,5%.

#### Adhesión a las células epiteliales del intestino

20 La línea celular epitelial humana, HT-29, se usó para evaluar las propiedades de adhesión de cepas seleccionadas. Se realizó un cultivo de rutina de células epiteliales en monocapa en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina/streptomycin, glutamina y fungizona. Para fines experimentales, las células epiteliales se sembraron a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml (3 ml de volumen total) por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt). Tras la incubación durante 7 días, para permitir la diferenciación, las monocapas epiteliales se lavaron con medio exento de antibiótico que contenía 10% de SFB. Se añadieron suspensiones bacterianas con/en medio de cultivo DMEM exento de antibiótico a cada pocillo y las células se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las monocapas se lavaron tres veces con PBS. Las células epiteliales se lisaron en H<sub>2</sub>O desionizada y el número de bacterias adherentes enumeradas usando el método de conteo de placa conocido por el experto en la técnica. La adhesión se expresó como un porcentaje del número de bacterias inicialmente depositadas en la placa.

25

30 Como puede verse en la Figura 7, las cepas *Lactobacilli* depositadas con el NCIMB, con los números de registro NCIMB 41194, NCIMB 41195, NCIMB 41196 y NCIMB 41197 se adhieren a las células epiteliales del intestino HT-29 a niveles de al menos 0,2%.

#### Ejemplo 4: secuenciación polinucleotídica intergénica 16s-23s

Se recogieron colonias de *Lactobacilli* de una placa de agar y se resuspendieron en tampón de IX PCR, se calentaron a 96 °C durante 5 minutos, se congelaron a -70 °C durante 5-10 minutos, se fundieron y se añadió una alícuota a un tubo

- 5 Eppendorf para PCR. Se llevó a cabo una reacción por PCR usando los cebadores del espaciador intergénico (IGS) IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. Las condiciones del ciclo fueron 96 °C durante 1 min. (1 ciclo), 94 °C durante 30 sec., 53 °C durante 30 sec., 72 °C durante 30 sec. (28 ciclos). La reacción por PCR contenía 5 µL de DNA, patrón de PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mM de dNTPs (Roche, Reino Unido), 0,4 µM de IGS L y cebador R (150 ng/50 µl) (MWG Biotech, Alemania) y polimerasa Bioline *Taq* (0,6 unidades). Las reacciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclo Hybaid. Se hicieron reaccionar los productos PCR (8 µl) junto con un marcador de peso molecular (ΦX174 Hae III, Promega) sobre un gel manchado con EtBr de agarosa al 2% para determinar sus perfiles IGS. Usando los mismos cebadores que en el caso anterior, el DNA espaciador intergénico (IGS) se secuenció para 4 cepas de *Lactobacilli* usando métodos conocidos por el experto en la técnica.
- 10 Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con la base de datos de secuencias en línea "BLAST", que puede consultarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para homología con otras secuencias 16s-23s bacterianas depositadas. Las correspondencias más próximas para AHC 1222, 3133, 5323 y 6331 (NCIMB 41194, 41195, 41196 y 41197 respectivamente) correspondieron a la cepa *Lactobacillus ruminis* AF080103. Sin embargo, existen varias diferencias importantes entre las cepas de AHC y la
- 15 cepa de *Lactobacillus ruminis* en la región espaciadora, resultando en un valor de homología de 87%, y un valor de BLAST de, al menos, 170.

#### Ejemplo 5: composiciones ilustrativas

Los ejemplos 1 a 4 son ejemplos de composiciones de comida seca para animales que comprenden *Lactobacilli* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Granos de cereal	hasta el 100	hasta el 100	hasta el 100	hasta el 100
Harina de subproducto de ave de corral	43,5	40	45	35
Grasa de ave de corral	1,28	1,02	1,16	1,35
Producto de huevo	2,4	2,1	2,5	2,2
Harina de hígado de pollo	1,0	1,0	1,0	1,0
Levadura seca para fabricación de cerveza	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monosódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato cálcico	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloruro potásico	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerales	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloruro sódico	0,03	0,03	0,03	0,03
Probiótico (1 x 10 <sup>10</sup> cfu/g NCIMB 41194 en aceite de girasol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1 x 10 <sup>10</sup> cfu/g NCIMB 41197 en aceite de girasol)	-	0,5	1	0,4

- 20 Los ejemplos 5 -7 son ejemplos de composiciones alimenticias húmedas para animales que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7

Agua	hasta 38	hasta 47	hasta 50
Hígado de ave de corral	hasta 25	hasta 20	hasta 15
Productos de ave de corral	25	20	20
Arroz para fabricación de cerveza	5	7	10
Producto a base de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de ave de corral	2,9	3,0	3,2
Caldo de pollo	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1
Minerales	0,05	0,1	0,1
Probiótico ( $1 \times 10^{10}$ cfu/g NCIMB 41195)	4	5	6

Los ejemplos 8-10 son ejemplos de composiciones suplementarias para yogur que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Cantidad (porcentaje)	38	42	48
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico ( $1 \times 10^{10}$ cfu/g NCIMB 41196)	4	5	6

5 Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones determinadas de la presente invención, resulta obvio para el experto en la materia que es posible realizar diferentes cambios y modificaciones sin abandonar por ello el ámbito de la invención. Por consiguiente, las reivindicaciones siguientes pretenden cubrir todos esos cambios y modificaciones contemplados dentro del ámbito de la presente invención.

Listado de secuencias

<110> The IAMS Company  
 Alimentary Health Ltd  
 Boileau, Thomas  
 Ceddia, Michael  
 Collins, John  
 Davenport, Gary  
 Kiely, Barry  
 O'Mahony, Liam  
 Sunvold, Greg  
 Tetrick, Mark  
 Vickers, Robert

<120> Lactobacilli probióticas caninas

<130> P-149&

<140> No concedida todavía

<141> 2004-12-19

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 231

<212> DNA

<213> Lactobacillus murinus

<220>

<221> característica\_var

<222> (230)..(230)

<223> n e s a , g , c o t

<400> 1

atcgaccgcc ttttcgtgaa cttgttttag ttttgagagg tctactctca aacttgttct 60

ttgaaaacta gataatatct tttatttctt tgtaattaa aataaccgag aacaccgct 120

tttaaagagt ttaaacatt aatgtttaat cgctaaactc ataaccatta tcgtaagata 180

atataggtta agttattaag ggcgcatggt ggatgccttg gccaccagan a 231

<210> 2

<211> 234

<212> DNA

<213> Lactobacillus murinus

<220>

<221> característica\_var

<222> (7)..(7)

<223> n e s a , g , c o t

<400> 2

atttcgnacc gccttttcgt aaactttggt tagttttgag aggtctactc tcaaacttgt 60

tctttgaaaa ctagataata tcttttattt ctttgtaaat taaaataacc gagaacaccg 120

cgttttaaag agtttaaacc attaatgttt aatcgctaaa ctcataacca ttatcgtaag 180

ataatatagg ttaagttatt aagggcgcac ggtggatgcc ttggccacca gaga 234

<210> 3

<211> 234  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus murinus

<220>  
 <221> característica\_var  
 <222> (233)..(233)  
 <223> n e s a , g , c o t

<400> 3  
 atttcgaccg cctttaccgt gaactttggt tagttttgag aggtctactc tcaaacttgt 60  
 tctttgaaa ctagataata tcttttattt ctttgtaat taaaataacc gagaacaccg 120  
 cgttttaaag agtttaaaac attaatgttt aatcgctaa ctcataacca ttatcgtaag 180  
 ataatatagg ttaagttatt aagggcgcat ggtggatgcc ttggccacca gana 234

<210> 4  
 <211> 235  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus murinus

<220>  
 <221> característica\_var  
 <222> (226)..(226)  
 <223> n e s a , g , c o t

<220>  
 <221> característica\_var  
 <222> (234)..(234)  
 <223> n e s a , g , c o t

<400> 4  
 atttcgaacc gcctttaccg tgaactttgt ttagttttga gaggtctact ctcaaacttg 60  
 ttctttgaaa actagataat atcttttatt tctttgtaa ttaaataac cgagaacacc 120  
 gcgttttaa gagtttaaaa cattaatggt taatcgctaa actcataacc attatcgtaa 180  
 gataatatag gttaagttat taagggcgca tggatggatgc cttggnccacc agana 235

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> artificial

<400> 5  
 gctggatcac ctcttttc 18

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> artificial

<400> 6  
ctggtgcaa ggcatcca

18

## REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli* que puede obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino seccionado y lavado que tiene actividad probiótica, en donde la cepa es de la especie *Lactobacillus murinus/ruminus* cepa AHC1222-número de registro NCIMB 41194, *Lactobacillus murinus/ruminus* cepa AHC3133-número de registro NCIMB 41195, *Lactobacillus murinus/ruminus* cepa AHC5323-número de registro NCIMB 41196, *Lactobacillus murinus/ruminus* cepa AHC6331-número de registro NCIMB 41197 o mezclas de los mismos.
2. La cepa según la reivindicación 1, que tiene la capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de un animal de compañía, en donde el animal de compañía es un perro o un gato.
3. La cepa según la reivindicación 1 ó 2, que tiene al menos 66% de crecimiento cuando se cultiva en presencia de sales biliares al 0,5%.
4. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, capaz de mantener viabilidad durante 1 hora a pH 2,5.
5. La cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas *Lactobacilli* probióticas aumentan la degradación de ácido oxálico *in vitro*.
6. La cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para mantener o mejorar la salud de un animal de compañía.
7. La cepa según la reivindicación 6, para aumentar la digestión de fibra en animales de compañía.
8. La cepa según la reivindicación 6, para reducir niveles de estrés en animales de compañía, en donde dichos niveles de estrés se miden determinando el nivel de hormonas de estrés seleccionadas del grupo que consiste en epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol, proteína C-reactiva y mezclas de los mismos.
9. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para tratar enfermedades seleccionadas de la regulación del sistema inmunológico de animales de compañía, mantener o mejorar la salud de la piel y/o el pelaje de animales de compañía, mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en los animales de compañía, evitar la pérdida de peso durante y después de una infección en animales de compañía, tratar o prevenir la infección gastrointestinal en animales de compañía, tratar o prevenir afecciones del tracto urinario en animales de compañía, o mezclas de los mismos.
10. La cepa según la reivindicación 9, para la regulación del sistema inmunológico de animales de compañía que comprende tratar o prevenir la enfermedad autoinmune en animales de compañía, tratar o prevenir la inflamación en animales de compañía, o mezclas de los mismos.
11. La cepa según la reivindicación 9, para mantener o mejorar la salud de la piel y/o el pelaje de animales de compañía que comprende tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel en animales de compañía.
12. La cepa según la reivindicación 9, para tratar o prevenir la infección gastrointestinal en animales de compañía que comprende mejorar la ecología microbiana de animales de compañía, reducir los niveles de bacterias patógenas en las heces de animales de compañía o mezclas de los mismos, en donde dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, o mezclas de los mismos.
13. La cepa según la reivindicación 12, para tratar o prevenir afecciones del tracto urinario en animales de compañía en donde dicha afección del tracto urinario comprende infección del tracto urinario, piedras en el riñón o mezclas de los mismos.
14. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cepa alimenta a un animal en cualquier cantidad de 1,0E+04 a 1,0E+12 CFU/animal por día, en donde el animal de compañía es un perro o un gato.
15. Una composición que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.
16. La composición según la reivindicación 15, en donde la composición es un alimento húmedo para animales, un alimento seco para animales, una croqueta, un producto masticable, una galleta, un suplemento alimenticio para animales de compañía, una salsa de carne, un yogur, queso u otro producto lácteo, una cápsula, un comprimido o una pastilla.
17. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, que comprende al menos 0,001% de aproximadamente 1,0E+04 CFU/g a aproximadamente 1,0E+12 CFU/g de las bacterias lácticas según la reivindicación 1.

18. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde las bacterias lácticas según la reivindicación 1 están en forma de células viables, células no viables, o las fracciones activas constituyentes de las mismas.

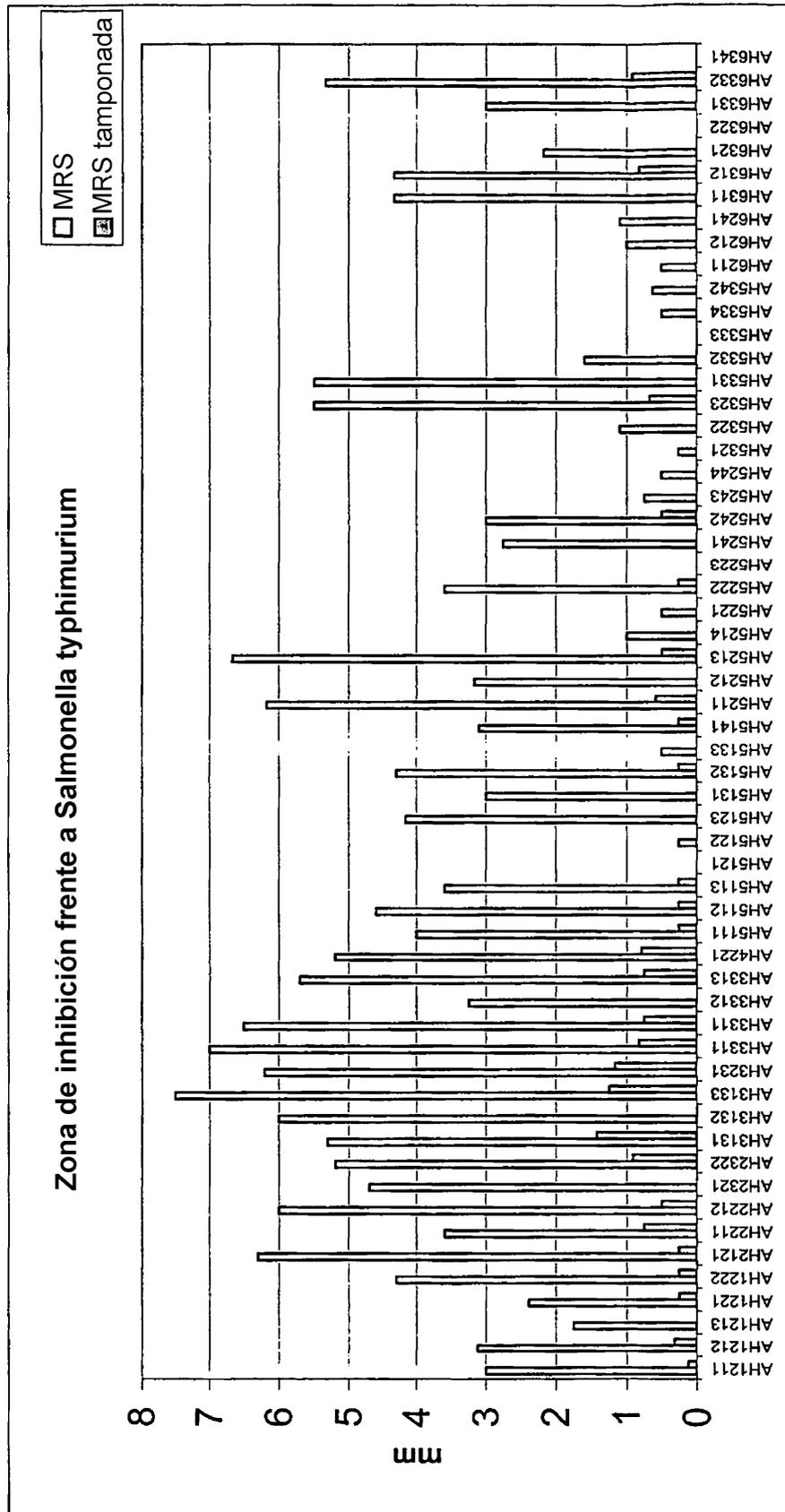


Figura 1



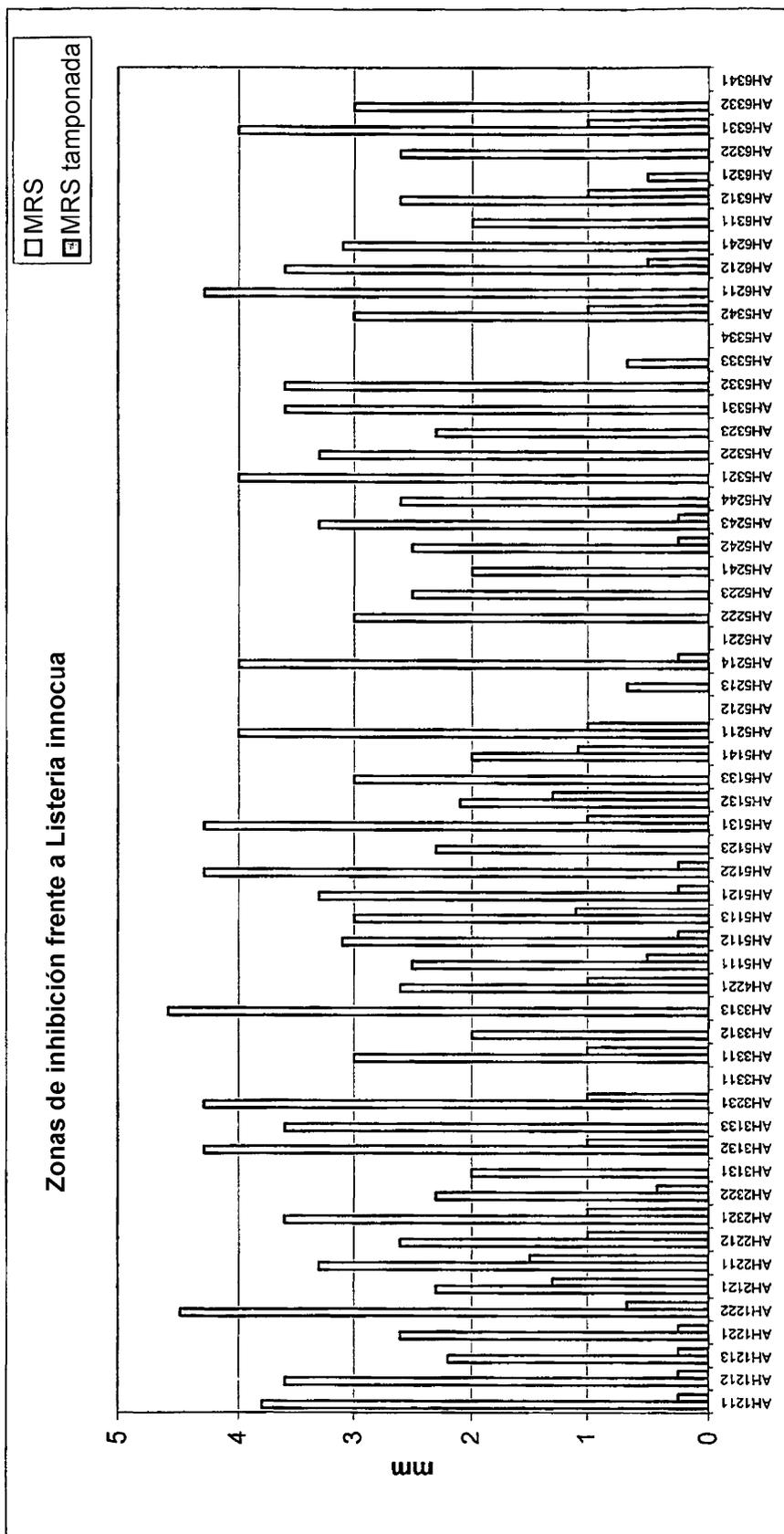


Figura 3

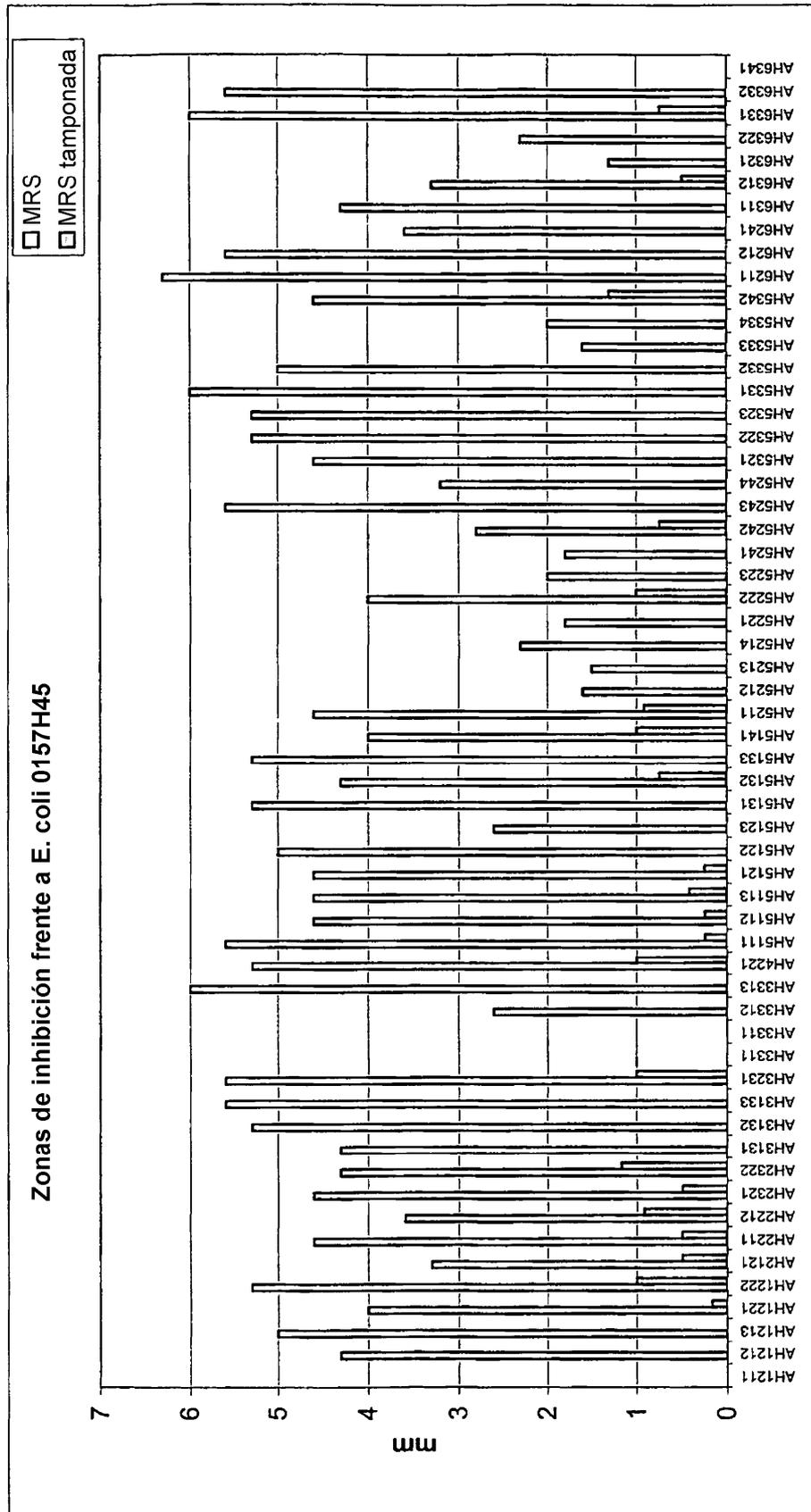
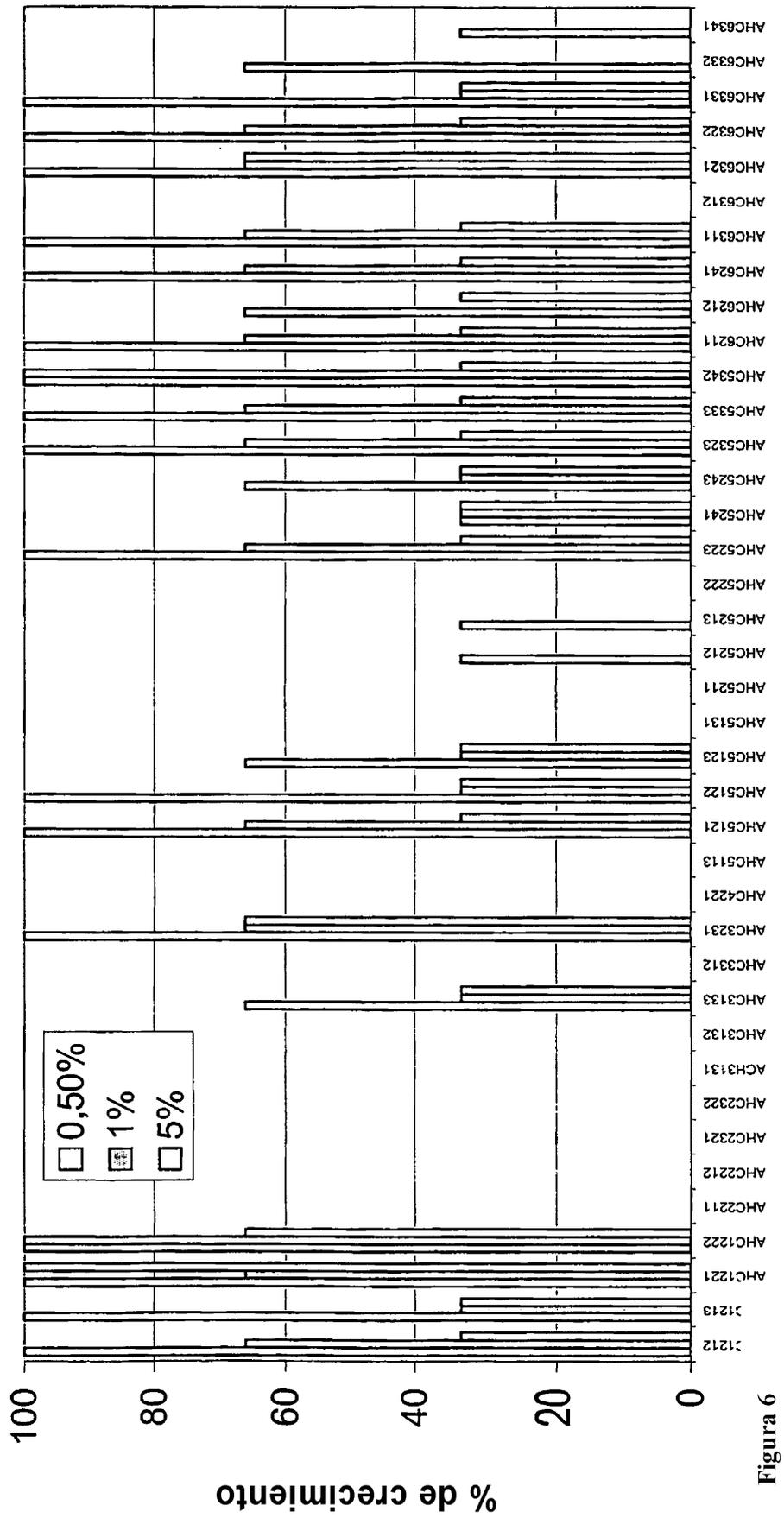


Figura 4





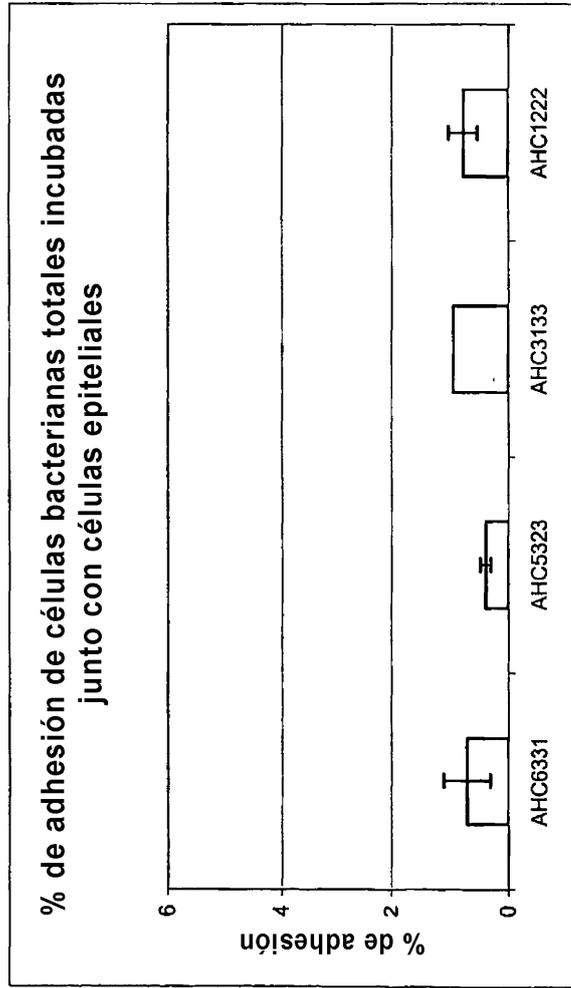


Figura 7