



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 518**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06734370 .7**

96 Fecha de presentación : **02.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1880001**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54

Título: **Lactobacilli probióticos felinos.**

30

Prioridad: **31.05.2005 US 686055 P**
21.06.2005 US 692440 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73

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

72

Inventor/es: **Boileau, Thomas, William-Maxwell;**
Kiely, Barry, Pius;
O'Mahony, Liam Diarmuid;
MacSharry, John y
Sunvold, Gregory, Dean

74

Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 518 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

Lactobacilli probióticos felinos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de los microorganismos probióticos, más concretamente a bacterias del ácido láctico probióticas de felinos y métodos de utilización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los mecanismos de defensa para proteger al tracto gastrointestinal (GI) de los mamíferos de la colonización por bacterias son extremadamente complejos. El tracto GI de la mayoría de los mamíferos es colonizado por microflora natural y por microorganismos patógenos invasivos. En un estado de salud, esta microflora en competencia está en un estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede conducir a muchos trastornos GI, o bien prevenirlos, tanto en humanos como en otras especies de mamíferos, tales como animales de compañía, incluyendo gatos, perros y conejos. El bienestar de los animales de compañía está estrechamente relacionado con su alimentación y salud GI, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal puede mejorar la salud de estos animales de compañía.

15 La cantidad y la composición de la microflora intestinal tiende a ser estable, si bien la edad y la dieta la puede modificar. Se considera que la acidez gástrica, la bilis, el movimiento peristáltico intestinal y la inmunidad local son factores importantes de la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y de otros diversos mamíferos. Con frecuencia, los trastornos GI de animales de compañía, incluidos los observados en felinos, están vinculados a una sobrepoblación bacteriana y a la producción de enterotoxinas por bacterias patógenas. Estos factores afectan al equilibrio de la microflora intestinal y pueden producir inflamaciones y enfermedades autoinmunes.

20 Durante los últimos años la investigación ha comenzado a descubrir algunas cepas valiosas de bacterias y su empleo potencial como agentes probióticos. Los probióticos son preparados de bacterias, viables o muertas, con constituyentes tales como proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que estimulan la salud de los mamíferos preservando la microflora natural del tracto GI y reforzando los controles de enfermedades autoinmunes. Hay quienes creen que las bacterias probióticas son más eficaces si se obtienen de las especies que se pretenden tratar, o bien de especies estrechamente relacionadas con las mismas. Por ello, para su uso en animales de compañía, son necesarias cepas probióticas obtenidas de animales de compañía, diferentes de las que se obtienen de los humanos.

30 En WO 01/90311 se describen microorganismos probióticos aislados de muestras fecales obtenidas de gatos con actividad probiótica. Sin embargo, dichas bacterias se obtuvieron de muestras fecales y pueden no formar parte de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto GI.

35 El American Journal of Veterinary Research; vol. 32, de 9 Septiembre 1971, páginas 1399-1405, también describe la microflora en el tracto alimentario de los gatos. Se puede encontrar alguna información adicional en The Journal of Nutrition, Ag. 2004, vol. 38, 8 Supl.; páginas 2022S-2026S. En The Veterinary Clinics of North America; Small Animal Practice, Mar 1999, vol. 29; páginas 523-550 se publica un estudio sobre la sobrepoblación bacteriana del intestino delgado. En WO 03/010298 describe ciertas bacterias probióticas originarias del tracto gastrointestinal humano.

En US-2003/0190309 se refiere a nuevos probióticos para su uso en alimentos de animales de compañía.

40 El artículo de G.W. Osbaldiston y otros en Am. J. Vet. Res., vol 32, n.º 9, Septiembre 1971, páginas 1399-1405, se refiere a un estudio de la microflora del tracto alimentario de los gatos.

El artículo de R. A. Rastall en Am. Soc. Nut. Sci., vol 134, n.º 8, Agosto 2004, páginas 2022 - 2026 se refiere a un estudio de bacterias en el intestino.

45 El artículo de Johnston K.L. en Veterinary clinics of North-America: Small animal practice, vol. 29, n.º 2, Marzo 1999, páginas 523-550, se refiere a la sobrepoblación bacteriana en el intestino delgado.

En W003/010298 se refiere a las cepas de un Lactobacillus Salivarus probiótico.

50 En consecuencia, existe la necesidad de disponer de cepas de bacterias que se puedan obtener por aislamiento de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto GI que estén especialmente adaptadas a los gatos, y que hayan sido seleccionadas por sus propiedades probióticas y su capacidad para sobrevivir el procesado, e incorporar dichas cepas a composiciones adecuadas para su uso.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una cepa de bacterias del ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenible por aislamiento de tracto gastrointestinal de felinos extirpado y lavado, con actividad probiótica, en donde dicha cepa se selecciona del grupo formado por *Lactobacillus salivarius* ss. *Salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C), *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119); mutantes de los mismos y mezclas de los mismos.

Además, la presente invención está orientada a proporcionar usos de bacterias de ácido láctico obtenibles por aislamiento de tracto gastrointestinal de felinos extirpado y lavado, para mantener y mejorar la salud de animales de compañía, y composiciones que comprenden las bacterias de ácido láctico.

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.

Secuencias

SEQ. n.º 1 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus salivarius subsp. Salicinius*, NCIMB 41287

SEQ. n.º 2 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus animalis*, NCIMB 41288

SEQ. n.º 3 – 16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus reuteri*, NCIMB 41289

SEQ. n.º 4 – Izquierda 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

SEQ. n.º 5 – Derecha 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

Números de depósito bacteriano

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

Cepa	Número de depósito	Secuencia 16s-23s
<i>Lactobacillus salivarius subsp. salicinius</i>	NCIMB 41287	SEQ. n.º 1
<i>Lactobacillus animalis</i>	NCIMB 41288	SEQ. n.º 2
<i>Lactobacillus reuteri</i>	NCIMB 41289	SEQ. n.º 3

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

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.

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".

En la siguiente descripción la abreviatura UFC ("unidades formadoras de colonias") designa el número de células bacterianas obtenido por recuento microbiano sobre placas de agar, del modo generalmente entendido en la técnica.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "mutantes del mismo" incluye cepas bacterianas derivadas que comprenden mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN del genoma bacteriano, excluyendo la secuencia intergénica 16s-23s.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "mutaciones de ADN" incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden, como mínimo, alteraciones únicas de base incluyendo supresiones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones del ADN conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo modificaciones genéticas introducidas en un nucleótido precursor o secuencia de aminoácidos mientras se mantiene, como mínimo, un 50% de homología respecto a la secuencia precursora. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones de ADN tiene, respecto a la secuencia parental, una homología de,

como mínimo, 60%, más preferiblemente, como mínimo 75%, aún más preferiblemente 85%. Tal como se utiliza en la presente memoria, la "homología" de secuencias se puede determinar empleando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la homología se puede determinar empleando el programa "BLAST" de algoritmo de homología en línea públicamente disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "modificación genética" incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de un organismo, sea por inserción en el genoma de dicho organismo, sea mediante vectores incluyendo ADN plásmido o bacteriófagos como los conocidos por los expertos en la técnica, teniendo dicha secuencia de ADN una longitud de, como mínimo, dos bases de ácido desoxirribonucleico.

- 10 En la presente memoria, "animal de compañía" significa un animal doméstico. Preferiblemente, "animal de compañía" significa un felino (gato), un can (perro), conejo, hurón, caballo, vaca, o animal similar, doméstico. Más preferiblemente, "animal de compañía" significa un felino doméstico.

Cepas de Lactobacilli del Ácido Láctico

- 15 El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de bacteria del ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenible por aislamiento a partir de tracto gastrointestinal de felino, extirpado y lavado, que tiene actividad probiótica en animales. Los probióticos son microorganismos viables o muertos, composiciones procesadas de microorganismos, sus constituyentes tales como proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que influyen beneficiosamente en un anfitrión. Las bacterias probióticas se utilizan generalmente en forma de células viables. No obstante, esta utilización se puede ampliar a células no viables tales como los cultivos o composiciones muertos que contienen los factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos matados térmicamente, o bien microorganismos matados mediante exposición a un pH alterado o sometidos a presión. A los efectos de la presente invención, se prevé que el término "probióticos" también incluya los metabolitos generados por los microorganismos de la presente invención durante la fermentación, en caso de que no sean citados por separado. Estos metabolitos se pueden liberar al medio de fermentación, o bien pueden quedar almacenados dentro del microorganismo. Tal como se utiliza en la presente memoria, "probióticos" también incluye las bacterias, homogeneizados de bacterias, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes de fermentos bacterianos, y mezclas de los mismos, que cumplen funciones beneficiosas en el animal que los recibe cuando se administran en dosis terapéuticas.

- 20 Se ha descubierto que las bacterias de ácido lácticos del género *Lactobacilli* obtenibles directamente por aislamiento a partir del tracto GI de mamíferos, extirpado y lavado, se adhieren al tracto GI tras la alimentación de células bacterianas viables, y también tienen un considerable efecto inmunomodulador cuando se administran a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que los *Lactobacilli* obtenibles por aislamiento a partir del tracto GI extirpado y lavado están estrechamente asociados a los tejidos de mucosa intestinales. Igualmente sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esto conduce a que los *Lactobacilli* probióticos de la presente invención generan respuestas de anfitrión alternativas que causan su acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas obtenibles por aislamiento a partir de tracto GI extirpado y lavado pueden modular el sistema inmunitario del anfitrión mediante la interacción directa con el epitelio de mucosa y las células inmunitarias del anfitrión. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo de acción tradicional asociado a las bacterias probióticas, es decir, la inhibición de la adherencia patógena al intestino por la oclusión y la competición por nutrientes, hace que los *Lactobacilli* de la presente invención sean muy eficaces como organismos probióticos.

- 30 Los *Lactobacilli* la presente invención, obtenibles por aislamiento a partir de tracto GI de felino extirpado y lavado, poseen *in vitro* actividad antimicrobiana contra una serie de cepas/especies bacterianas patógenas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicadora de una actividad probiótica potencial *in vivo* en animales, preferiblemente animales de compañía como los felinos. Las bacterias del ácido láctico de la presente invención tienen preferiblemente una actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Eschericia coli*, más preferiblemente una mezcla de estas cepas y, aún más preferiblemente, todas estas cepas.

- 35 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico de la presente invención puede ser el resultado de una serie de acciones diferentes de las bacterias del ácido láctico de la presente memoria. Anteriormente se ha sugerido en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de muestras de heces ejercen un efecto probiótico en el tracto GI tras consumo por vía oral, inhibiendo la adherencia de organismos patógenos a la mucosa intestinal por oclusión. Esto requiere el consumo oral de células bacterianas "vivas" o viables, para que en el intestino se establezca una colonia de bacterias. Sin embargo, se cree que los *Lactobacilli* de la presente invención, obtenibles por aislamiento a partir de tracto GI de felinos extirpado y lavado, aunque ejerce un cierto efecto probiótico debido a la oclusión si se administra en una forma viable, puede tener un considerable efecto probiótico, tanto en forma viable como no viable, debido a que durante la fermentación *in vitro* se produce una sustancia o sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos o los matan, y/o alteran la competencia inmunitaria del animal anfitrión. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias de la presente invención se pueden administrar en forma de cultivos o productos de fermentación purificados tanto viables como no viables, proporcionando siempre un efecto terapéutico beneficioso al animal anfitrión.

Preferiblemente, las bacterias del ácido láctico de la presente invención son capaces de mantener su viabilidad durante el tránsito por el tracto GI. Esto es deseable para que los cultivos vivos de la bacteria se puedan administrar oralmente, y para que se produzca la colonización en los intestinos y en el intestino grueso después del tránsito a través del esófago y del estómago. La colonización de los intestinos y del intestino grueso por las bacterias del ácido láctico de la presente invención es deseable para poder aportar al anfitrión ventajas probióticas de larga duración. La dosificación oral de células no viables o material purificado aislado de los mismos produce ventajas temporales pero, dado que las bacterias no son viables, no pueden multiplicarse y producir de modo continuo un efecto probiótico *in situ*. Como consecuencia de ello, esto puede requerir que el anfitrión reciba una dosis periódica, para mantener las ventajas para la salud. Al contrario, las células viables capaces de sobrevivir el tránsito gástrico en forma viable y luego formar colonias adhiriéndose a la mucosa intestinal y proliferando en ella, pueden aportar de modo continuo efectos probióticos *in situ*.

Por ello, es preferible que las bacterias del ácido láctico de la presente invención conserven su viabilidad después de estar en suspensión en un medio de pH de 2,5 durante 1 hora. Tal como se utiliza en la presente memoria, "conservar la viabilidad" significa que al menos el 25% de las bacterias inicialmente suspendidas en el medio de ensayo son viables usando el método de recuento en placas conocido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, "conservar la viabilidad" significa que al menos el 50% de las bacterias inicialmente suspendidas son viables. Es deseable que las bacterias del ácido láctico de la presente invención conserven su viabilidad después de ser expuestas a un pH bajo, ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos del estómago y el intestino superior *in vivo* después de la ingesta oral por animales.

Además es preferible que las bacterias del ácido láctico de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33% cuando están en presencia de al menos 0,5% de sales biliares de felinos. El crecimiento, tal como se emplea en la presente memoria, se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Más preferiblemente, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento de al menos 33% en presencia de al menos 1% de sales biliares de felinos. Aún más preferiblemente, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento del 100% en presencia de 0,5% de sales biliares de felinos. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las bacterias de ácido láctico de la presente invención, capaces de conservar la viabilidad en presencia de al menos 0,5% de sales biliares de felinos, pueden sobrevivir en las condiciones existentes en el intestino. Se considera que este es el resultado de la adición de bilis de felino al medio de cultivo, imitando las condiciones del intestino.

Adicionalmente, es preferible que las bacterias de ácido láctico de la presente invención tengan una adherencia significativa a las células epiteliales de los intestinos *in vitro*. Tal como se utiliza en la presente memoria, "adherencia significativa" significa que al menos el 1% del número total de bacterias del ácido láctico incubadas junto con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a células epiteliales. Más preferiblemente, al menos el 5% de las células bacterianas co-incubadas se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la adherencia a células epiteliales intestinales *in vitro* es una indicación de la capacidad de las bacterias de ácido láctico para colonizar el tracto GI de un animal *in vivo*.

Preferiblemente, la cepa de bacteria de ácido láctico, según la presente invención, es de una especie seleccionada del grupo que comprende *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, o *Lactobacillus plantarum*. Preferiblemente, la cepa de bacteria de ácido láctico se selecciona del grupo que comprende *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Lactobacillus johnsonii*.

La secuencia 16s-23s de polinucleótidos intergénicos es conocida por los expertos en la técnica como la secuencia de ADN del genoma bacteriano que se puede usar para identificar las diferentes especies y cepas de una bacteria. Esta secuencia de polinucleótidos intergénica se puede determinar con el método detallado más adelante en el Ejemplo 4.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa de bacteria de ácido láctico, según la presente invención, se selecciona del grupo que comprende los *Lactobacilli* con una secuencia 16s-23s de polinucleótidos seleccionada entre SEQ. n.º 1, SEQ. n.º 2, ó SEQ. n.º 3. Más preferiblemente aún, la cepa de bacteria de ácido láctico, según la presente invención, se selecciona del grupo que comprende *Lactobacillus salivarius* ss *salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C), *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119) o un mutante de los mismos.

La cepa de bacteria de ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenible por aislamiento a partir de tracto gastrointestinal felino, extirpado y lavado, se puede usar para aportar ventajas probióticas tras el consumo oral por animales, preferentemente animales de compañía, o humanos. Esta ventaja probiótica generalmente mantiene y mejora el estado de salud general del animal. Elementos, no limitadores, de salud animal y fisiología que se benefician, sea por aliviar terapéuticamente los síntomas o por prevenir enfermedades mediante profilaxis, incluyen desórdenes inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, cánceres (especialmente los de los sistemas gastrointestinal y inmunitario), diarreas, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de articulaciones, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, infecciones

bacterianas, infecciones víricas, infecciones por hongos, periodontosis, enfermedades urogenitales, trauma asociado a cirugía, metástasis postquirúrgica, sepsis, pérdida de peso, aumento de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, infección de la barrera del intestino, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, y trastornos dermatológicos. Es preferido el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o la prevención de la diarrea; la regulación del sistema inmunitario, preferiblemente el tratamiento o la prevención de la inflamación o enfermedad autoinmune; mantener y mejorar la salud del sistema de la piel y/o pelaje, preferiblemente tratar o prevenir la dermatitis atópica; mejorar o reducir los efectos del envejecimiento, incluyendo los niveles de actividad y conciencia mental; prevenir trastornos asociados al eje hipotálamo-pituitario-adrenal, y mejorar la salud de las articulaciones para mejorar la movilidad.

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. Tales métodos se describen brevemente en la presente memoria, pero son bien conocidos por los expertos en la técnica.

1. Blastogénesis de linfocitos: este ensayo mide la respuesta de proliferación *in vitro* de linfocitos aislados de sangre entera fresca de animales de ensayo y control frente a diversos mitógenos, y es una medida de la función global de células B y T. 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/estreptomina. Las células lavadas se vuelven a suspender en RPMI 1640, se cuentan y se ajusta la densidad celular apropiadamente. Las 2×10^5 células se exponen a una gama de concentraciones (0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$) de diversos mitógenos, entre cuyos ejemplos se incluyen el mitógeno de *Phytolacca americana* (Gibco), fitohemaglutinina (Gibco) y conconavalina A (Sigma), en triplicado, durante 72 horas a 37 °C, y 5% CO₂ con 10% de suero fetal bovino (Sigma). A las 54 horas, las células se pulsan con 1 μCi ³H-timidina, y las células se recogen y se leen los recuentos de centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.

2. Actividad de las células asesinas naturales: como se describe en US-6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de células asesinas naturales aisladas de sangre entera fresca de animales de ensayo y de control. Las células asesinas naturales son un componente de la función inmunológica de un mamífero. Se emplearon células de adenocarcinoma de tiroides de felino como células diana para evaluar la actividad citotóxica de las células NK (asesinas naturales). Previamente se había demostrado que esta línea celular era susceptible de ser asesinada por células asesinas naturales felinas. 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 10% de suero fetal de ternero (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Una vez alcanzada la confluencia, las células diana se trataron con tripsina, se lavaron 3 veces y se volvieron a suspender con 5×10^5 células/ml en un medio completo (RPMI-1640+10% FCS+100 U/ml de penicilina+100 $\mu\text{g/ml}$ of estreptomina). Triplicado 100 μL alícuotas de las células blanco se pipetearon en placas de 96 pocillos y fondo en forma de U (Costar, Cambridge, Mass.) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia de las células. Linfocitos (células efectoras; 100 μl) aisladas mediante una separación Ficoll-Hypaque (como se ha descrito anteriormente) se añadieron luego a las células blanco para obtener una relación de células efectoras/blanco (E:B) de 10:1. Después de la incubación durante 10 horas a 37 °C., se añadieron 20 l de un sustrato que contiene 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, después de las cuales se extrajo el MTT no metabolizado mediante aspiración. Los cristales de formazan se disolvieron añadiendo 200 μl de etanol de 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:

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

3. Respuesta de anticuerpos 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 probiótica y de control.

4. Hipersensibilidad de tipo retardado: método *in vivo*, no invasivo para evaluar el estado del sistema inmunitario. Esta prueba comprende una inyección intradérmica del mitógeno policlonal fitohemaglutinina (PHA) junto con hematíes ovinos como vacuna multivalente, histamina (100 µl de 0,0275 g/l de fosfato de histamina; Greer, Lenoir, NC), o PBS (100 µl de Phosphate Buffered Saline, 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.

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

10 Además, se puede determinar la mejora de los efectos de la edad utilizando absorciometría de rayos X doble o una exploración mediante tomografía por ordenador CT 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.

15 Los *Lactobacilli* de la presente invención también se pueden emplear en un método para reducir los niveles de estrés de 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. De forma adicional, se puede realizar como imagen TC la medición directa de la magnitud adrenal como marcador *in vivo* de la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal.

25 Además, el mantenimiento o mejora de la salud de la piel o el pelaje de los animales domésticos, incluyendo las enfermedades atópicas de la piel, se puede medir utilizando evaluaciones de la piel y del pelaje dirigidas por dos personas con la debida formación. Entre los ejemplos de los criterios examinados durante dichas valoraciones se incluyen los siguientes:

a) Índice de caída del 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 guarda y se pesa, y se comparan los sujetos que realizan la prueba con los sujetos de control.

30 b) Evaluaciones subjetivas de piel y pelaje: miembros formados de un panel evalúan subjetivamente el estado de la piel y el pelaje valorando la muda de pelo, caspa, brillo, uniformidad, tersura y densidad.

35 c) Evaluación funcional de la piel: se puede evaluar la función de barrera de la piel pasando sobre la superficie de la piel una gasa empapada en acetona. Esta técnica desestabiliza de forma eficaz la barrera de la piel al 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.

40 El tratamiento o prevención de la diarrea en animales de compañía se puede medir empleando puntuaciones para las deposiciones. 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

45 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)

50 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.

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.

Puntuación: 2 Blanda, sin forma

- 5 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

- 10 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.

- 15 Además, se registran otras observaciones, incluyendo: sangre en las heces; objetos extraños en las heces; o mucosa en las heces.

- 20 Además, el tratamiento de infecciones gastrointestinales en animales de compañía puede comprender la mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía. La mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía comprende preferiblemente reducir las bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales domésticos se pueden cuantificar utilizando la técnica de recuento de placas 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. Entre los ejemplos, no limitativos, de cepas adecuadas de bacterias patógenas, están: *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de las mismas.

- 25 El método del uso de las bacterias de la presente invención también puede incluir el tratamiento, sea profiláctico o terapéutico, del tracto urinario de mamíferos, preferiblemente de animales de compañía. Entre los ejemplos no limitativos del tratamiento del tracto urinario se incluye el tratamiento o prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento o prevención de enfermedades renales, incluyendo cálculos en el tracto urinario, el tratamiento o prevención de infecciones de la vejiga y similares. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención son útiles para prevenir estas dolencias, como resultado de su capacidad de degradar el ácido oxálico, como se ha demostrado *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario, y puede formar precipitados insolubles que producen infecciones en el riñón, en la vejiga y en otros lugares 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 pueden tratar y prevenir infecciones y otras dolencias del tracto urinario. La degradación del ácido oxálico se puede medir *in vitro* utilizando el kit de pruebas de ácido oxálico, n.º de catálogo 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

- 40 Los *Lactobacilli* de la presente invención se pueden utilizar en un método para mejorar y mantener la salud de animales de compañía que comprende la mejora de la digestión de fibras. 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 de 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**, 61-65). La digestión de las fibras se puede determinar utilizando el método descrito en Vickers y col., "Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by feline colonic microflora", (2001) *Am. J. Vet. Res.* **61** (4), págs. 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. 6

- 50 Las cepas probióticas felinas de la presente invención se pueden emplear para reducir el olor de las heces y de la orina y, concomitantemente, en la caja de arena higiénica, reduciendo la producción en las heces y en la orina de compuestos que producen olores. Los ejemplos no limitativos de compuestos que producen olores incluyen el amoniaco, indoles, fenoles, aminas, ácidos grasos de cadena ramificada y compuestos volátiles que contienen azufre. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la reducción de los niveles de estos compuestos en las heces o en la orina de un animal de compañía reduce los olores asociados a las heces u orina. Además, para los animales de compañía que usan una caja de arena higiénica, se reduce consecuentemente el olor en la caja de arena.

- 55 El método de empleo de las bacterias de ácido láctico de la presente invención comporta de forma típica el consumo oral por el animal. El consumo oral puede ser parte de la ingesta dietaria normal, o bien un suplemento a la misma. El consumo oral se realiza habitualmente al menos una vez por mes, preferiblemente al menos una vez por semana, más preferiblemente al menos una vez por día. Las bacterias de ácido láctico de la presente

invención se pueden administrar al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz, para mantener o mejorar la salud del animal, preferiblemente un animal de compañía. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” referido a las bacterias de ácido láctico significa la cantidad de bacterias suficiente para aportar el efecto o las ventajas a un animal anfitrión que requiere tratamiento, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos adversos como la toxicidad, irritación, o respuestas alérgicas, de forma acorde con una relación razonable de ventajas/riesgos, cuando se utiliza del modo de la presente invención. La “cantidad terapéuticamente eficaz” específica variará dependiendo de factores tales como la afección particular a tratar, el estado físico del animal, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concomitante (si procede), la forma farmacéutica específica utilizada, el vehículo utilizado, la solubilidad de la forma farmacéutica y la posológica concreta.

Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico se administran al animal de compañía con una dosis de $1,0E+04$ a $1,0E+14$ UFC por día, más preferiblemente de $1,0E+06$ a $1,0E+12$ UFC por día. Preferiblemente, la composición puede contener al menos 0,001% de $1,0E+04$ a $1,0E+12$ UFC/g de las bacterias de ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenibles por aislamiento a partir de tracto GI felino extirpado y lavado. Las bacterias de ácido láctico se pueden administrar al animal en forma viable, o bien como células muertas, o destilados, material aislado u otras fracciones de los productos de fermentación de las bacterias de ácido láctico de la presente invención, o cualquier mezcla de los mismos.

Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se usan para preparar una composición destinada a mantener o mejorar la salud de un animal. Tal como se ha indicado anteriormente, la composición puede ser parte de la ingesta dietaria normal, o bien un suplemento. Cuando la composición es parte de la ingesta dietaria normal, la composición puede estar en forma de alimento animal seco, por ejemplo, galletas o croquetas, alimento de cereales procesados, alimento para animales húmedo, yogures, salsas, alimentos de mascar, golosinas y similares.

Tales composiciones pueden comprender componentes adicionales. 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 de alimentos preferentemente son nutricionalmente equilibradas. En una realización, dichas composiciones alimenticias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteína en bruto, preferiblemente de 22% a 40% de proteína en bruto, 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, ejemplos no limitativos del cual incluyen proteínas vegetales como la soja, la semilla del algodón y los cacahuetes, proteínas animales como la caseína, la albúmina y el tejido cárnico. Entre los ejemplos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y las harinas secas o procesadas tales como la harina de pescado, la harina de aves de corral, la harina de carne, la 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 aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de grasa, preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia. Adicionalmente, las composiciones alimenticias que comprenden las bacterias de ácido láctico de la presente invención también pueden comprender de aproximadamente 4% a aproximadamente 25% de fibra dietaria total. Las composiciones también pueden comprender una fuente múltiple de almidón, tal como 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 tales como suero secado y otros subproductos lácteos.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención también pueden 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 de ácido láctico 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 limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la inulina y sus productos de hidrólisis comúnmente conocidos como fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligo derivados 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 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 Tirlémont 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 aproximadamente 90% y aproximadamente 94% en peso de inulina, hasta aproximadamente 4% en peso de glucosa y fructosa, y entre aproximadamente un 4 y 9% en peso de sacarosa. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido como

el que se obtiene de Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos, o bien utilizando microorganismos.

5 Para los alimentos secos para animales de compañía, el cocinado por extrusión es un proceso adecuado, aunque se puede usar el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cocina por extrusión, el alimento seco para animales de compañía generalmente tiene la forma de croquetas. Si se usa un prebiótico, se puede mezclar el prebiótico con los demás ingredientes del alimento seco para animales de compañía, antes del procesamiento. En la solicitud de patente europea N.º 0850569 se describe un proceso adecuado. Si se emplea un microorganismo probiótico, lo mejor es que el organismo esté recubriendo el alimento seco para animales de compañía, o bien esté relleno el mismo. La publicación de patente europea número EP-0 862 863 describe un proceso adecuado.

10 Para alimentos húmedos se pueden emplear los procesos descritos en las patentes US-4.781.939 y US-5.132.137 para producir productos que imitan la carne. También se pueden usar otros procedimientos para producir productos en trozos; por ejemplo, cocinar en un horno de vapor. De forma alternativa, se pueden fabricar productos del tipo de los panes, emulsificando un material cárnico adecuado para producir una emulsión de carne, añadiendo un agente gelificante adecuado, y calentando la emulsión de carne antes de rellenar con ella latas u otros recipientes. Las composiciones de alimentos húmedos habituales pueden comprender de 5% a 15% de proteínas, del 1% al 10% de grasas y del 1% al 7% de fibra. Los ingredientes que, de forma no limitativa, se pueden usar en las composiciones de alimentos húmedos, incluyen pollo, pavo, carne vacuna, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de carne vacuna, hígado de pollo, residuos de arroz para la elaboración de cerveza, maíz molido, harina de pescado, huevos, pulpa de remolacha, cloruros, harina de lino, cordero, subproductos de carne vacuna, subproductos de pollo, y mezclas de los mismos.

15 En otra realización, las composiciones suplementarias como galletas, productos de mascar y otras golosinas pueden comprender, calculado 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 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 alimenticias y suplementarias destinadas al consumo de felinos son bien conocidas en la técnica.

20 Los alimentos para animales de compañía pueden contener otros agentes activos tales como ácidos grasos de cadena larga y cinc. Entre los ácidos grasos de cadena larga adecuados están el ácido alfa linoleico, el ácido gamma linoleico, el ácido linoleico, el ácido eicosapentanoico, y el ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son fuentes adecuadas de ácidos eicosapentanoicos y de ácido docosahexanoico.

25 El aceite de borraja, el aceite de semillas de grosella negra y el aceite de primula nocturna son fuentes adecuadas de ácido gamma linoleico. Los aceites de cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y aceites de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también se pueden utilizar en los sustratos de recubrimiento mencionados anteriormente. El cinc se puede suministrar de distintas formas adecuadas, por ejemplo como sulfato de cinc u óxido de cinc. Por otra parte, muchos ingredientes habitualmente empleados en alimentos para animales de compañía son fuentes de ácidos grasos y de cinc. Se ha observado que la combinación de achicoria, como fuente prebiótica y un aceite rico en ácido linoleico, por ejemplo aceite de soja, aporta ventajas inesperadas, lo que sugiere que existe un efecto de sinergia.

30 En los casos en los que la composición es en forma de salsa de carne, la composición puede comprender al menos 10% de caldo o consomé, cuyos ejemplos no limitativos incluyen el consomé de verduras, de carne de vaca, pollo o jamón. Las composiciones de salsa habituales pueden comprender de 0,5% a 5% de proteína en bruto, de 2% a 5% de grasas en bruto, y del 1% al 5% de fibra.

35 Los ejemplos adicionales, no limitativos, de suplementos adecuados para su uso en la presente invención incluyen polvos, suspensiones en aceite, suspensiones en leche, quesos, composiciones de base mantequilla de cacao, y pastillas o cápsulas. Cuando la composición está en forma de píldora, se requieren agentes ligantes adecuados para que la píldora se mantenga en forma sólida comprimida. Ejemplos no limitativos de agentes ligantes adecuados incluyen las gomas naturales tales como xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otras conocidas por los expertos en la técnica. Cuando la composición está en forma de cápsula, preferiblemente la composición está encapsulada empleando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos de materiales de encapsulado adecuados incluyen el alcohol polivinílico (PVA), la polivinilpirrolidona (PVP), los alginatos y la gelatina. Las composiciones a base de yogur pueden comprender de 1% a 5% de proteínas, de 10% a 20% de carbohidratos, de 1% a 5% de fibra, de 1% a 5% de grasas y de 50% a 90% de un vehículo líquido como la leche.

55 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 de ácido láctico a partir del tracto GI felino

Se obtuvieron muestras intestinales de felinos a partir de gatos sanos presentados a veterinarios locales para su eutanasia por iniciativa y con aprobación de sus dueños. Todos los animales estaban sanos y exentos de enfermedades. Se disecaron el colon, colon medio, ciego e íleon de cada gato para exponer la mucosa.

- 5 Se retiraron los sobrenadantes tras agitación del tejido mucoso (con agitador vórtex durante 1 minuto) y tras homogeneización mecánica del tejido. Cada sobrenadante fue puesto en placas sobre agar de Mann Rogosa Sharpe (MRS). Las placas se incubaron anaeróticamente usando el sistema Anerocult GasPak durante 48 horas a 37 °C. Las colonias aisladas de las placas resembradas sobre cada MRS y vueltas a incubar anaeróticamente en las mismas condiciones. Las colonias aisladas se resembraron 4 veces más para purificar una cepa única. Se evaluaron la morfología de colonia y el aspecto microscópico. En los aislados adecuados se ensayaron la reacción de Gram y la actividad de catalasa. La identificación de bacilos gram positivos, catalasa negativos, se realizó usando el test API (API 50CHL, BioMerieux). Las células recolectadas se lavaron dos veces con tampón de fosfato 0,05 M (pH 6,5) y cisteína-HCl (500 mg/l) seguido de tratamiento sónico. Con centrifugación se eliminaron los residuos celulares. Los sobrenadantes se incubaron con NaF (6 mg/ml) y yodoacetato de Na (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante incubación con hidroxilamina-HCl (pH6,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se monitorizó el desarrollo de color tras la adición de HCl (4M), FeCl₃·6H₂O (5% (p/v) en 0,1 M HCl) y fructosa-6-fosfato (sal Na). La formación de acetil fosfato a partir de fructosa-6-fosfato se evidenció por el color rojizo formado por el quelato férrico de su hidroximato.

Ejemplo 2: Revisión de actividad antimicrobiana

- 20 Cada una de las cepas bacterianas de ácido láctico se incubó anaeróticamente en un medio MRS. 2 µl de cada cultivo se colocaron sobre placas de agar MRS y se incubaron anaeróticamente durante una noche. *Salmonella typhimurium* y *E. Coli* enteropatógeno (ExPEC) se hicieron crecer durante la noche y se inocularon 100 µl en agar fundido (1% v/v). Este cultivo indicador se vertió sobre la superficie de las placas MRS inoculadas. Tras la incubación durante una noche, se midieron las zonas de inhibición alrededor de la colonia probiótica. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en tres ocasiones separadas. Además, la incorporación al agar del tampón de beta-glicerofosfato al 2% permitió evaluar la contribución de la producción de ácido a la inhibición patógena observada *in vitro*.

- 30 Los datos presentados en la Tabla 2 demuestran claramente que las cepas de bacterias de ácido láctico de la presente invención obtenibles por aislamiento a partir de tracto GI felino, extirpado y lavado, poseen una considerable actividad antimicrobiana *in vitro*, indicadora de una potencial actividad probiótica.

Tabla 2

	AHF122A	AHF223C	AHF5119
S. typhimurium	9,34	7,5	9,665
ExPEC	11,84	7,67	11,17

Ejemplo 3: Mediciones de supervivencia y colonización In VitroTolerancia al pH

- 35 Se recolectaron células de bacterias de cultivos durante la noche, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se volvieron a suspender en un medio MRS/TPY ajustado con 1M HCl a pH 2,5. Las células se cultivaron anaeróticamente a 37 °C y se midió su supervivencia a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos usando el método de recuento de plaquetas conocido por el experto en la técnica. La Tabla 3 resume estos datos por cepa.

Tabla 3

- 40 Supervivencia de cepas en un medio de bajo pH (pH 2,5). Todos los datos son recuentos de log UFC.

CEPA	Tiempo (min.)					
	0	30	60	120	180	360
NCIMB 41287	9,31	9,13	8,95	8,88	8,84	8,52
NCIMB 41288	8,85	8,79	8,89	8,65	8,71	8,59
NCIMB 41289	9,25	9,06	8,97	9,10	9,00	8,88

Resistencia a la bilis

Las cepas bacterianas se aplicaron por estrías sobre agar MRS suplementado con bilis porcina (Sigma) al 0,5%, 1% y 5% (p/v). Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento después de 48 horas. Un observador experto comparó el crecimiento con el de placas de control, y el crecimiento de las colonias se describió así:

- 5
- Negativo (0) – sin crecimiento;
 - + (1) – Crecimiento translúcido borroso (<33% de placas de control con 0% bilis);
 - ++ (2) – Crecimiento claro, pero no tan bueno como el de los controles (>33% pero <66%);
 - +++ (3) – Crecimiento equivalente al de los controles (>66%).

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

- 15 La Tabla 4 muestra que los *Lactobacilli* de la presente invención claramente demuestran una resistencia a las sales biliares, y son capaces de crecer y formar colonias a un nivel de al menos 66% en la mayoría de los casos, cuando se exponen a un 0,3% de sales biliares porcinas.

Tabla 4

Supervivencia de cepas a varias concentraciones de bilis porcina.

CEPAS	PORCENTAJE DE BILIS (%)							
	0	0,3	0,5	1	2	5	7,5	10
NCIMB 41287	+++	+	+	-	-	-	-	-
NCIMB 41288	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
NCIMB 41289	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+

- 20 Además, para evaluar cualquier diferencia de la capacidad de las cepas de colonizar el tracto GI de gatos, las cepas bacterianas se aplicaron sobre agar MRS suplementado con bilis felina a 0,5%, 1% y 2% (p/v). La bilis felina se obtuvo de gatos sometidos a endoscopia en un entorno clínico durante un procedimiento no terminal. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento después de 48 horas. Un observador experto comparó el crecimiento con el de placas de control, y el crecimiento de las colonias se describió así:

- 25
- Negativo (0) – sin crecimiento;
 - + (1) – Crecimiento translúcido borroso (<33% de placas de control con 0% bilis);
 - ++ (2) – Crecimiento claro, pero no tan bueno como el de los controles (>33% pero <66%);
 - +++ (3) – Crecimiento equivalente al de los controles (>66%).

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

La Tabla 5 muestra que los *Lactobacilli* de la presente invención claramente demuestran una resistencia a las sales biliares, y son capaces de crecer y formar colonias a un nivel de al menos 66% en la mayoría de los casos, cuando se exponen a un 0,5% de sales biliares felinas.

35

Tabla 5

Supervivencia de cepas a varias concentraciones de bilis felina.

CEPAS	PORCENTAJE DE BILIS (%)			
	0	0,5	1	2
NCIMB 41287	+++	+++	+++	+++
NCIMB 41288	+++	+++	++	++
NCIMB 41289	+++	+++	+++	+++

Adherencia celular al epitelio intestinal

- 5 La línea celular epitelial humana HT-29 se empleó para evaluar las propiedades de adherencia de cepas seleccionadas. Las células epiteliales se cultivaron del modo rutinario como monocapa en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ en Dulbecco's Minimal Essential Media (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal de ternero (FCS), pen/strep, glutamina y fungizona. Para fines experimentales, las células epiteliales se sembraron a una concentración de 5 x 10⁵ células/ml (3 ml volumen total) por pocillo en 6 placas de cultivo (Sarstedt). Tras una incubación de 7 días, para permitir la diferenciación, las monocapas epiteliales se lavaron con un medio exento de antibióticos conteniendo 10% FCS. Suspensiones bacterianas más/en DMEM exento de antibióticos se añadieron a cada pocillo y las células se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Tras la incubación, las monocapas se lavaron tres veces con PBS. Se realizó la lisis de las células epiteliales en agua desionizada, y se contó el número de bacterias adheridas empleando el método de recuento de placas conocido por los expertos en la técnica. La adherencia se expresó como porcentaje del número inicial de bacterias en la placa. El *Lactobacillus* AHF122A tuvo un nivel de adherencia del 39,5%, mientras que el *Lactobacillus* AHF223C tuvo un nivel de adherencia del 13,9%. El *Lactobacillus* AHF5119 tuvo un nivel de adherencia del 36,7%.

Ejemplo 4: Secuencia de polinucleótidos intergénicos 16s-23s

- 20 Los *Lactobacilli* felinos aislados se centrifugaron en tubos y los microgránulo resultantes se disolvieron en 100 µl de solución de extracción y 25 µl de solución de preparación de tejidos (Sigma, Kit XNAT2), se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron las muestras durante 5 minutos a 95 °C y después se añadieron 100 µl de solución de neutralización (kit XNAT2). La solución de ADN genómico se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop, y se almacenó a 4 °C.
- 25 Se realizó el PCR usando los cebadores espaciadores intergénicos (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' Bridgidi y col. 2000, System Appl. Microbiol., 23, 391-399 (2000)). Las condiciones de ciclo fueron 94 °C durante 3 min (1 ciclo), 94 °C durante 30 seg, 53 °C durante 30 seg, 72 °C durante 30 seg (28 ciclos). La reacción PCR contenía 4 µl (50 ng) de ADN, mezcla PCR (kit XNAT2), 0,4 µM cebador IGS L y R (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones PCR se realizaron con un aparato de termociclos Eppendorf. Los productos PCR (10 µl) se pasaron junto a un marcador de peso molecular (100 bp Ladder, Roche) sobre un gel teñido con agarose EtBr al 2% en TAE, para determinar el perfil IGS.

Los productos PCR de *Lactobacilli* (banda única) se purificaron empleando el kit de purificación PCR Promega Wizard.

- 35 Los productos PCR purificados se secuenciaron usando las secuencias del cebador (citadas) para la región del espaciador intergénico. Los datos de secuencia se contrastaron con el banco de datos de nucleótidos NCBI para determinar la identidad de la cepa mediante homología de nucleótidos.

- Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con el banco de datos de secuencias "BLAST" en línea, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para determinar homología con otras secuencias bacterianas 16s-23s depositadas. La mejor correspondencia para el AHF122A fue la cepa *Lactobacillus salivarius subsp. Salicinii* (AB102859) con una puntuación de homología del 94%. Para el AHF223C, la más parecida fue la cepa *Lactobacillus animalis LA51* (AY526615) con una puntuación de homología de 93%. El más parecido al AHF5316 fue el *Lactobacillus reuteri DSM 20016* (AF080100) con una puntuación de homología de 98%.

Ejemplo 5: Composiciones de ejemplo

- 45 Los Ejemplos 1 a 4 son ejemplos de composiciones de croquetas secas que comprenden los probióticos *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 subproductos de aves de corral	43,5	40	45	35
Grasa de aves de corral	1,28	1,02	1,16	1,35
Productos de huevo	2,4	2,1	2,5	2,2
Grano molido grueso de hígado de pollo	1,0	1,0	1,0	1,0
Levadura cervecera seca	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 de potasio	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 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41287 en aceite de girasol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41288 en aceite de girasol)	-	0,5	1	0,4

Los Ejemplos 5 a 7 son ejemplos de composiciones de alimentos húmedos para animales de compañía que comprenden los probióticos *Lactobacilli* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	Hasta el 38	Hasta el 47	Hasta el 50
Hígado de aves de corral	Hasta el 25	Hasta el 20	Hasta el 15
Productos de aves de corral	25	20	20
Arroz para la elaboración de cerveza	5	7	10
Productos de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de aves 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 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41289)	4	5	6

5

Los Ejemplos 8 a 10 son ejemplos de composiciones con suplemento de yogurt que comprenden los probióticos *Lactobacilli* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Leche	38	42	48
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41287)	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> Alimentary Health
 The IAMS Company
 Boileau, Thomas
 Kiely, Barry
 MacSharry, John
 O'Mahony, Liam
 Sunvold, Gregory

<120> Cepas de Lactobacilli derivadas de felinos

<130> P172P2&

<140> No asignada todavía
 <141> 2005-06-21

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 269
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus salivarius subsp. salicinius

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (13)..(14)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (26)..(26)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (28)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (43)..(43)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (65)..(65)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (121)..(122)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_var.
 <222> (124)..(124)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (166)..(166)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (225)..(225)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (255)..(255)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (267)..(267)
 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 1
 ttgcgggatc acnncctntc naaggnanaa ttacggaacc tgnacattta tcggatactt 60
 tgtttagttt tgagagggtca tatctctcaa gattttgttc tttgaaaact agatattgat 120
 nnanttctta aaaataaacc gagaacaccg cgttttaaag agtttnaaac aagaattata 180
 gttcttaatc gctaaactca taacctatta tcgtagata atatnagggtt aagttattaa 240
 gggcgtatgg tggangcctt ggccccnga 269

<210> 2
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus animalis

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (2)..(2)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (6)..(6)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (12)..(12)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (14)..(14)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (24)..(24)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>

<221> característica_var.
 <222> (50)..(50)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (52)..(52)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (60)..(60)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (114)..(115)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (117)..(117)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (120)..(120)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (123)..(123)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (186)..(186)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (208)..(208)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (232)..(232)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (240)..(240)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (249)..(249)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (252)..(252)
 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 2
 cncctnactt ancncattt atcntacgat aatggttatg agtttagcgn tnaaacattn 60
 atgttttaa ctccttaaaa cgcggtgttc tcggttattt taattaacaa aganntnaan 120

ganattatct agttttcaaa gaacaagttt gagagtagac ctctcaaac taaacaaagt 180
 tcacgntaaa gtgcaggttt ccgaaatnat ccttagaaag gaggtgagcc ancagagaan 240
 ggaggtganc cngca 255

<210> 3
 <211> 284
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus reuteri

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (121)..(121)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (265)..(265)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (268)..(268)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (274)..(274)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_var.
 <222> (276)..(276)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 3
 gggctctgctg gatcacctcc tttctaagga ataaaacgga acctacacat cgaagaaact 60
 ttgttttagtt ttgaggggtt tacctcaga gcttgactt tgaaaactaa atactatcgt 120
 natttcttta ttaacaaaac aataaacgga gaacaccgcy ttatttgagt ttaattaac 180
 gaattataat cgctaactca attaatacaga caatctttga ttgtttgggt taagttatga 240
 agggcgcacg gtggatgcct tggcncnnga gccncnagac caga 284

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebadores para PCR

<400> 4
 gctggatcac ctcctttc 18

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

<220>
<223> Secuencia de cebadores para PCR

<400> 5
ctggtgcaa ggcattca

18

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacterias de ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenible por aislamiento a partir de tracto gastrointestinal felino extirpado y lavado, que posee actividad probiótica, en el que dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus salivarius* ss *salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C), *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119), mutantes de las mismas y mezclas de las mismas.
2. La cepa según la reivindicación 1, con capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de un animal de compañía, en donde el animal de compañía es un gato.
3. La cepa según la reivindicación 2, que tiene un crecimiento de al menos 33% cuando se cultiva en presencia de 0,5% de sales biliares felinas.
4. La cepa según la reivindicación 2, capaz de conservar la viabilidad después de 1 hora a pH 2,5.
5. La cepa según la reivindicación 1, en la que la cepa bacteriana de ácido láctico tiene una secuencia de ADN en la región de espaciador 16s-23s seleccionada de la SEQ. n.º 1, SEQ. n.º 2, o SEQ. n.º 3.
6. La cepa según la reivindicación 1, en la que el mutante es un mutante natural, genéticamente modificado o inducido.
7. La cepa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso a fin de mantener o mejorar la salud de un animal de compañía, en donde el animal de compañía es un gato.
8. La cepa para su uso según la reivindicación 7, para la regulación o mejora del sistema inmunitario de animales de compañía, para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes en animales de compañía, para tratar o prevenir inflamaciones en animales de compañía, para mantener o mejorar la salud del sistema de la piel y/o pelaje de animales de compañía, para tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel en animales de compañía, para mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en animales de compañía, para prevenir una pérdida de peso durante y después de una infección en animales de compañía, y para aumentar la digestión de fibras en animales de compañía.
9. La cepa para su uso según la reivindicación 7, para tratar o prevenir infecciones gastrointestinales en animales de compañía.
10. La cepa para su uso según la reivindicación 9, para mejorar la ecología microbiana de animales de compañía.
11. La cepa para su uso según la reivindicación 10, que comprende la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces de animales de compañía, en donde dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, y mezclas de las mismas.
12. La cepa para su uso según la reivindicación 8, para tratar o prevenir dolencias del tracto urinario de animales de compañía, en donde dicha dolencia del tracto urinario comprende una infección del tracto urinario o en donde dicha dolencia del tracto urinario comprende cálculos del tracto urinario.
13. La cepa para su uso según la reivindicación 12, en la que dichos probióticos *Lactobacilli* aumentan la degradación del ácido oxálico *in vitro*.
14. La cepa para su uso según la reivindicación 13, para reducir los niveles de estrés en animales de compañía, en donde dichos niveles de estrés se miden determinando el nivel de las hormonas de estrés seleccionadas del grupo que consiste en epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol, proteína C-reactiva, y mezclas de las mismas.
15. La cepa para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en la que la cepa está en una forma de dosificación oral para un animal en una cantidad desde 1,0E+04 hasta 1,0E+12 UFC/animal por día.
16. Una composición que comprende una cepa de bacterias de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
17. La composición según la reivindicación 16, en la que dicha composición es un alimento para un animal de compañía, en donde la composición es un alimento húmedo para animales o un alimento seco para animales.
18. La composición según la reivindicación 17, en la que la composición es un alimento para gatos.
19. La composición según la reivindicación 17, en la que la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en croquetas, golosinas masticables y galletas.
20. La composición según la reivindicación 17, en la que dicha composición es un suplemento alimenticio para animales de compañía.

21. La composición según la reivindicación 20, en la que la composición está en forma de una salsa de carne, yogur, queso u otro producto lácteo.
22. La composición según la reivindicación 20, en la que la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en cápsulas, comprimidos y pastillas.
- 5 23. La composición según la reivindicación 16, que comprende al menos 0,001% o de aproximadamente $1,0E+04$ UFC/g a aproximadamente $1,0E+12$ UFC/g de la bacteria de ácido láctico.
24. La composición según la reivindicación 16, en la que las bacterias de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, están en forma de células viables.
- 10 25. La composición según la reivindicación 16, en la que las bacterias de ácido láctico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, están en forma de células no viables o de fracciones activas constituyentes de las mismas.
26. Uso de bacterias de ácido láctico del género *Lactobacilli* obtenibles por aislamiento de tracto gastrointestinal felino, extirpado y lavado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para reducir los olores asociados a las heces o a la orina de un animal de compañía.
- 15 27. Uso según la reivindicación 26, en donde el olor está asociado a una caja de arena higiénica de un animal de compañía.