

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 811**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00992099 .2**

96 Fecha de presentación: **28.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1251747**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2002**

54 Título: **Composiciones de alimento para mascotas que permiten tratar a los animales domésticos contra especies de helicobacter**

30 Prioridad:
18.01.2000 EP 00200179

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**SOCIETE DES PRODUITS NESTLÉ S.A.
CASE POSTALE 353
1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:
**BALLEVRE, Olivier;
CORTHEZY-THEULAZ, Irène y
ENSLÉN, Marc, Yves, Adolphe**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 378 811 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

Composiciones de alimento para mascotas que permiten tratar a los animales domésticos contra especies de helicobacter

La presente invención está relacionada con el uso de una cepa aislada de bacterias lácticas para la preparación de una composición alimentaria pensada para el tratamiento o profilaxis de trastornos relacionados con infección por organismos similares a *Helicobacter* en animales domésticos. La invención también está relacionada con composiciones alimentarias para animales domésticos preparada para los mismos.

Antecedentes de la invención

Se sabe que en humanos, la infección con el organismo patógeno *Helicobacter pylori* puede provocar gastritis, y conduce a una enfermedad ulcerativa y tumores gástricos. Los métodos de tratamiento son numerosos. Se ha mostrado anteriormente en PE 577903 (Nestlé) que las bacterias del ácido láctico son capaces de inhibir *Helicobacter pylori* tanto in vitro como in vivo.

Los carnívoros domésticos como los perros y los gatos están prácticamente todos infectados con otras especies de *Helicobacter* gástricos. La mayoría de ellos no pueden cultivarse in vitro, pero morfológicamente se parecen a *H. heilmannii*. También se aisló *H. felis* de la mucosa gástrica de gatos y, recientemente, dos nuevas especies de *Helicobacter*, denominadas *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*, se aislaron de perros. No obstante, el único análisis morfológico no permite discriminar entre estas especies de *Helicobacter* y se agrupan bajo la denominación de "organismos gástricos similares a *Helicobacter*" (GHLO).

Los GHLO colonizan el antrum y/o el corpus de animales domésticos mientras que la colonización de *H. pylori* principalmente tiene lugar en el corpus. Los organismos GHLO colonizadores se localizan en lo más profundo de las glándulas fúndicas gástricas y algunas veces se encuentran de hecho dentro de los canalículos celulares de las células parietales gástricas así como en las fosas gástricas y en el mucus, en comparación con *H. pylori* que se sabe que no es una bacteria invasiva. (Dunn et al, 1997 : "Hp se localiza en el mucus adherido a la superficie del epitelio superficial y a menudo se encuentran en lo profundo de las criptas"...)

La contaminación del estómago de gatos y perros por especies de *Helicobacter* se considera un factor de riesgo importante para desarrollar una gastritis media o grave. La inflamación observada normalmente es menos grave que la que sucede en humanos infectados con *H. pylori*. Las lesiones más graves como las úlceras de estómago, linfomas y cáncer puede observarse pero la patogenicidad de los GHLO está lejos de ser clara.

Sin embargo, al controlar la infección por GHLO en gatos y perros a un nivel bajo se considera un beneficio por la mayoría de veterinarios. Debido a que no es una enfermedad totalmente reconocida que requiera una terapia farmacológica, es necesario un producto alimentario que contenga un ingrediente activo capaz de minimizar la infección por GHLO en perros y gatos.

Resumen de la invención

Así, la presente invención está relacionada con la utilización de una cepa de bacteria del ácido láctico seleccionada de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis* y/o sus metabolitos o un medio fermentado así para la preparación de una composición para el tratamiento o profilaxis de infección de GHLO en animales domésticos.

En una realización preferible, se utilizan los metabolitos producidos por la cepa aislada o un medio fermentado por dicha bacteria del ácido láctico, o subfracciones de medio fermentado cultivado por la cepa aislada de bacteria del ácido láctico.

En una realización preferible la cepa de bacteria del ácido láctico se selecciona de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCMI 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium sp.* NCC 2627, *Bifidobacterium sp.* NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Otro objeto está relacionado con un método para el tratamiento o para la profilaxis de trastornos relacionados con infección por GHLO en animales domésticos, que comprende la administración a un animal doméstico una composición que contiene al menos una cepa de bacteria del ácido láctico y /o sus metabolitos o un medio fermentado por al menos una bacteria del ácido láctico que se ha aislado y seleccionado por su capacidad de mostrar una fuerte actividad bactericida anti-*Helicobacter* in vitro.

La composición alimentaria para mascotas que contiene una cantidad efectiva de la menos un componente seleccionado de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM 1-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), los metabolitos y un medio de crecimiento fermentado de los mismos; un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

Esta composición alimentaria para mascotas es capaz de disminuir la infección por GHLO en perros y gatos de forma que la carga de GHLO y la actividad ureasa se reducen en al menos 0,5 grados en el fundus y en al menos 0,5 grados en el antrum.

El efecto de la composición sobre la gastritis crónica se analizó también mediante el examen citológico de la biopsia en secciones finas. Se puede inducir una regresión de la gastritis fúndica crónica, con una regresión media en un grado de inflamación gástrica (graduada de 0 a 3) en al menos 0,5.

En otra realización, esta composición alimentaria para mascotas puede inducir una reducción significativa de malos olores en el aliento que están correlacionadas con el nivel de infección por GHLO.

Descripción detallada de la invención

Dentro de la siguiente descripción, el término "GHLO" define a los "organismos gástricos similares a *Helicobacter*". Las especies de *Helicobacter* como *Helicobacter felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeroni* y *H. salomonis*, por ejemplo, que se ha visto que colonizan la mucosa gástrica en animales domésticos, se agrupan bajo esta denominación.

Además, se incluye dentro de los términos "trastornos por GHLO", todos los trastornos que pueden afectar directamente al tracto gastrointestinal de animales domésticos, pero también a trastornos secundarios como síntomas de halitosis, por ejemplo.

Finalmente "NCC" se refiere a la Colección de Cultivos Nestlé (Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Suiza).

Respecto al primer objeto de la presente invención, el uso de al menos una cepa de bacteria del ácido láctico y/o sus metabolitos o un medio fermentado por al menos una cepa de bacteria del ácido láctico que es capaz de mostrar una fuerte actividad bactericida anti-*Helicobacter* in vitro, se refiere a la preparación de una composición pensada para la profilaxis o el tratamiento de trastornos relacionados con una infección por GHLO en animales domésticos.

Estas cepas se han seleccionado entre cepas de bacterias de ácido láctico respecto a sus parámetros tecnológicos y fisiológicos y en particular por sus buenas características de crecimiento, al menos 5×10^8 bacterias /ml, preferiblemente 10^6 - 10^{10} bact/ml, más preferiblemente 10^9 - 10^{10} bact/ml y su capacidad de mostrar una fuerte actividad bactericida anti-*Helicobacter* in vitro.

En una realización la cepa de bacterias del ácido láctico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium* sp., *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium animalis*.

La cepa de bacterias del ácido láctico se selecciona de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM 1-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium* sp. NCC 2627, *Bifidobacterium* sp. NCC 2657 y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Entre las diferentes cepas seleccionadas de acuerdo con la presente invención, las siguientes cepas se depositaron por ejemplo bajo el tratado de Budapest en la colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM) del Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia: *Lactobacillus johnsonii* (NCC 533) el 30.06.92 con la referencia CNCM I-1225, *Lactobacillus paracasei* (NCC 2461) el 12.01.99 con la referencia CNCM I-2116 y *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, NCC 2592, NCC 2613, *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 el 19.04.00 con las referencias (CNCM I-2448), (CNCM I-2450), (CNCM I-2452) (CNCM I-2451), (CNCM I-2449) y (CNCM I-2453), respectivamente. La cepa de *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536) fue proporcionada por Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca).

Caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas

Lactobacillus johnsonii CNCM I-1225

- microorganismo Gram positivo, sin motilidad, sin esporulación
 - forma de bacilo bastante corto y ancho
 - 5 - microorganismo microaerófilo con metabolismo homofermentativo, producción de ácido láctico L (+) y D (-).
 - catalasa (-), producción de CO₂ (-), hidrólisis de arginina (-)
 - 10 - fermentación de azúcares: amigdalina (+), arabinosa (-), celobiosa (+), esculina (+), fructosa (+), galactosa (-), glucosa (+), lactosa (+), maltosa (+/-), manitol (-), manosa (+), melibiosa (-), rafinosa (+), ribosa (-), salicina (+), sacarosa (+), trehalosa (+).
 - Lactobacillus paracasei CNCM I-2116
 - 15 - Gram positivo
 - catalasa negativo,
 - 20 - arginina en forma NH₃ negativo,
 - producción de CO₂ negativo
 - producción de ácido láctico L(+),
 - 25 - crecimiento en presencia de sales biliares en una concentración de hasta alrededor de 0,4%.
- La cepa aislada de bacterias lácticas y/o su medio de cultivo fermentado puede utilizarse para la preparación de composiciones que pretenden mejorar la salud de la mascota, y en particular para la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la infección por GHLO en animales domésticos.
- 30 Estos pueden utilizarse en otros trastornos relacionados con la infección por GHLO, como el mal aliento. De hecho, la presencia de GLHO en el estómago de gatos y perros puede tener una clara influencia en el mal aliento al producir una gran cantidad de amonio a partir de la urea. Este amonio puede aparecer en el aliento tras eructarse. El mal aliento también puede estar relacionado con la presencia de GHLO en el estómago por la producción de compuestos sulfuro volátiles. Preferiblemente, los metabolitos producidos por dichas cepas aisladas pretenden reducir el mal olor del aliento y refrescar el aliento de la mascota.
- 35 También puede utilizarse una subfracción del medio de cultivo fermentado por la cepa aislada cepa de bacterias del ácido láctico.
- 40 La cepa de bacterias del ácido láctico de acuerdo con la invención, puede utilizarse en su forma viable o inactivada.
- En una realización preferible, la cepa de bacterias del ácido láctico se utiliza en presencia de su medio de crecimiento fermentado. Dicho medio puede esterilizarle solo o con un alimento, extraído o secado por pulverización, enfriado o estable a temperatura ambiente, por ejemplo.
- 45 Las bacterias del ácido láctico o el medio de fermentación equivalente puede utilizarse de forma que la cantidad disponible para la mascota puede corresponder a alrededor de 10³-10¹⁴ cfu diarias. Esta cantidad depende del peso del animal, y está preferiblemente alrededor de 10⁹-10¹² ufc/día para perros y 10⁷-10¹¹ ufc/día para gatos.
- 50 En otra realización, la invención está relacionada con un método para el tratamiento o la profilaxis de trastornos relacionados con una infección por GHLO en animales domésticos, que comprende la administración a una mascota de una composición que contiene al menos una cepa de bacterias del ácido láctico y/o un medio fermentado por al menos una bacteria del ácido láctico con las características anteriores. La cantidad disponible para la mascota puede corresponder a alrededor de 10³-10¹⁴ ufc diarias, y está preferiblemente alrededor de 10⁹-10¹² ufc / día para perros y 10⁷-10¹¹ ufc / día para gatos.
- 55 El segundo objeto principal de la presente invención está relacionado con una composición alimentaria para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de bacterias del ácido láctico y/o sus metabolitos o medio de crecimiento fermentado, y dichas bacterias lácticas poseen las características anteriores, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.
- 60 La cepa y/o su medio fermentado puede seleccionarse de entre una o más bacterias lácticas adecuadas para el consumo animal por su capacidad de mostrar una actividad bactericida anti-Helicobacter *in vitro*.
- 65

Al menos una cepa bacteriana con las características anteriores y/o su medio fermentado puede administrarse a la mascota como un suplemento a su dieta normal o como un componente de un alimento para mascotas nutricionalmente completo.

- 5 La composición alimentaria para mascotas nutricionalmente completa de acuerdo con la invención puede estar en forma pulverizada o seca, o ser un producto alimentario húmedo, enfriado o estable a temperatura ambiente.

También puede ser un suplemento a la dieta para animales domésticos o una composición farmacéutica.

- 10 El alimento para mascotas nutricionalmente completo puede encontrarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo en forma seca, semihúmeda y húmeda. Estos alimentos para mascotas pueden fabricarse del modo convencional. Aparte de las cepas bacterianas y/o su medio fermentado, estos alimentos para mascotas pueden incluir uno o más componentes de entre cualquier fuente de almidón, fuente de proteínas y fuente de lípidos.

- 15 Las fuentes de almidón adecuadas son, por ejemplo, granos y legumbres como el maíz, arroz, trigo, cebada, avena, soja y mezclas de los mismos.

- 20 Las fuentes de proteína adecuadas pueden seleccionarse de entre cualquier fuente animal o vegetal adecuada; por ejemplo carne y harina, harina de ave, harina de pescado, concentrados de proteínas de soja, proteínas de la leche, gluten y similares. Para los animales de edad avanzada, es preferible que la fuente de proteínas contenga una proteína de elevada calidad.

Las fuentes de lípidos adecuadas incluyen carnes, grasas animales y grasas vegetales.

- 25 La elección de las fuentes de almidón, proteína y lípidos vendrán determinadas principalmente por las necesidades nutricionales del animal, consideraciones de palatabilidad, y el tipo de producto a producir. Para los animales domésticos de edad avanzada, el alimento para mascotas preferiblemente contiene proporcionalmente menos grasa que los alimentos para animales domésticos más jóvenes. Además, las fuentes de almidón pueden incluir uno o más de los siguientes componentes: arroz, cebada, trigo y maíz.

- 30 Además, también pueden incorporarse varios ingredientes distintos, como por ejemplo, azúcar, sal, especias, aderezos, vitaminas, minerales, agentes aromatizantes, grasas y similares en el alimento para mascotas según se desee.

- 35 Para los alimentos para mascotas secos, un proceso adecuado es el cocinado con extrusión, aunque pueden utilizarse el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cocina con extrusión, el alimento para mascotas seco a menudo se proporciona en forma de croquetas. Si se utiliza un probiótico, debe mezclarse el probiótico con el resto de ingredientes del alimento para mascotas seco previamente a su procesado. Un proceso adecuado se describe en la solicitud de patente europea N° 0850569, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. Si se utiliza un microorganismo probiótico, el organismo se sitúa como un recubrimiento o como un relleno en el alimento para mascotas seco. Un proceso adecuado se describe en la solicitud de patente europea N° 0862863, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

- 45 Para los alimentos húmedos, los procesos descritos en las patentes US 4.781.939 y 5.132.137 pueden utilizarse para producir productos que simulan ser carne. Las descripciones de estas patentes se incorporan aquí como referencia. También pueden utilizarse otros procedimientos para producir productos en porciones, por ejemplo cocinar en un horno de vapor. Alternativamente, pueden producirse productos en rodajas emulsificando un material cárnico adecuado para producir una emulsión cárnica, añadiendo un agente gelificante adecuado y calentando la emulsión cárnica previamente a su introducción en latas u otro tipo de contenedores.

- 50 La cantidad de probiótico en el alimento para mascotas está preferiblemente alrededor del 20% en peso; especialmente alrededor del 10% en peso. Por ejemplo, el probiótico puede comprender alrededor del 0,1% a alrededor del 5% en peso del alimento para mascotas. Para los alimentos para mascotas que utilizan achicoria como probiótico, la achicoria incluida puede comprender de alrededor del 0,5% a alrededor del 10% en peso de la mezcla alimenticia, más preferiblemente de alrededor del 1% a alrededor del 5% en peso.

- 60 Si se utiliza un microorganismo probiótico, el alimento para mascotas preferiblemente contiene de alrededor de 10^4 a alrededor de 10^{10} células del microorganismo probiótico por gramo de alimento para mascotas; más preferiblemente de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^9 células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para mascotas puede contener de alrededor del 0,5% a alrededor del 20% en peso de la mezcla del microorganismo probiótico, preferiblemente de alrededor del 1% a alrededor del 6% en peso; por ejemplo de alrededor del 3% a alrededor del 6% en peso.

- 65 Los alimentos para mascotas pueden contener otros agentes activos como ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga adecuados incluyen el ácido alfa linoleico, ácido gamma linoleico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácido

eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. El aceite de borraja, el aceite de semillas de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linoleico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de semilla de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico.

5 Si es necesario, los alimentos para mascotas se suplementan con minerales y vitaminas de forma que sean nutricionalmente completos.

Además, si se desea, la cepa de bacterias puede estar encapsulada, por ejemplo en una matriz de azúcares, matriz de grasas o matriz de polisacáridos.

10 La cantidad de alimento para mascotas que debe consumir la mascota para obtener un efecto beneficioso dependerá del tamaño o de la mascota, el tipo de mascota y la edad de la mascota. Sin embargo, a menudo será adecuada una cantidad del alimento para mascotas que proporcione una cantidad diaria de alrededor de aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc de al menos una cepa de bacterias del ácido láctico y/o el medio de fermentación equivalente. Preferiblemente, se administran alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc / día para perros o 10^7 - 10^{11} ufc / día para gatos.

20 La composición de acuerdo con la invención se pretende utilizar en particular para la profilaxis o el tratamiento de infecciones relacionados con GHLO en animales domésticos, y en particular en el tracto gastrointestinal o en el intestino grueso de los animales domésticos, por ejemplo. También se pretende utilizar para mantener una función digestiva sana en animales domésticos y evitar la reinfección por cepas patógenas como los GHLO, por ejemplo. Por lo tanto, esta composición también puede utilizarse como adyuvante de una terapia con antibióticos frente a la infección por GHLO.

25 El efecto de la composición de acuerdo con la invención sobre los GHLO se evaluó mediante un examen histológico de secciones de biopsia (véase el ejemplo 2). Si el número de GHLO por sección es de ausencia de bacterias (grado "0"); menos de 5 bacterias (grado "1"); entre 5 y 20 bacterias (grado "2") y más de 20 bacterias (grado "3"). Esta composición alimentaria para mascotas es capaz de reducir la infección por GHLO en perros y gatos de forma que la carga de GHLO y la actividad ureasa en el fundus se reduce en al menos 0,5 grados y al menos en 0,5 grados en el antro.

El efecto de la composición sobre la gastritis crónica también se evaluó mediante un examen citológico de secciones finas de biopsia. La clasificación histológica de la gastritis crónica es:

- 35 - grado 0: fibrosis superficial, 0 neutrófilos, 0-10 linfocitos y células plasmáticas, sin agregados, epitelio normal;
- gastritis crónica leve - grado 1: gastritis superficial crónica, 10-15 linfocitos o células plasmáticas que involucran el tejido intersticial superficial, agregados <2, epitelio normal,
- 40 - gastritis crónica moderada - grado 2: gastritis intersticial crónica, 10-50 o más linfocitos o células plasmáticas que involucran el grosor completo de la mucosa, agregados >3, epitelio normal
- gastritis crónica severa - grado 3: gastritis atrófica, 10-50 o más linfocitos o células plasmáticas, agregados >3, cambios en el epitelio glandular.

45 Esta composición puede inducir una regresión de gastritis fúndica crónica, con una regresión mediana del grado de inflamación gástrica de al menos alrededor de 0,5.

50 También se ha demostrado que esta composición induce una reducción significativa del mal aliento. Así, se pretende utilizar para tratar o evitar los trastornos secundarios relacionados con la infección por GHLO como el mal olor del aliento en los animales domésticos.

Además, las composiciones de acuerdo con la presente invención también se pretenden utilizar para aumentar la longevidad en perros.

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración y en modo alguno deben tomarse como limitantes de la materia objeto de la presente solicitud. Todos los porcentajes se proporcionan en peso a no ser que se indique de otro modo.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de la cepa bacteriana

65 Para seleccionar la cepa bacteriana de acuerdo con la presente invención, pueden incubarse los GHLO cultivables (10^7 bacterias) a 37°C y en CO₂ al 5% durante 1-2 horas en presencia de diluciones seriadas de dicho sobrenadante de cultivo de la cepa bacteriana (BS) en DMEM. Tras la incubación, la mezcla de GHLO-BS se centrifuga a 12.000 g

durante 3 minutos, luego se lava el botón con 1 ml de NaCl 0,9%, y se resuspende en 500 µl de test de ureasa rápido (Jatrox®-H.p.-test, Procter & Gamble Pharmaceuticals GmbH, Weiterstadt, Alemania). Los cambios colorimétricos, proporcionales a la actividad ureasa, se determinan mediante un análisis fotométrico a una densidad óptica de 550 nm.

La viabilidad bacteriana se estima previamente y tras la incubación con LS mediante la siembra en placa de diluciones seriadas de los GHLO en placas de suero (GC agar, Gibco BRL, Paisley, Escocia) suplementadas con suero de caballo al 10%, Inotec, y con Isovitale X al 1% (Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, MD), y el conteo de las unidades formadoras de colonias (CFU).

Ejemplo 2

Se estudian los efectos de un suplemento con medio de fermentación de Lactobacillus sobre la infección por Helicobacter spp. en perros.

Materiales y métodos

Animales

El comité ético de la escuela de veterinaria de Lyon - Francia, aprobó el estudio. Se incluyeron en el estudio nueve machos de beagle, que de forma natural habían contraído una infección gástrica con GHLO. El peso de los perros oscilaba entre 10 y 14 kg y la edad entre 3 y 4 años. Los perros se mantuvieron en casetas individuales con condiciones idénticas de higiene y alimentación (escuela de veterinaria de Lyon - Francia). Las casetas se limpiaron y desinfectaron diariamente.

Los perros se alimentaron regularmente a las 8 a.m. y tuvieron acceso constante al agua a lo largo del estudio. Durante el estudio completo, se alimentaron con una dieta específica: VITALITY® - Friskies, Francia (anexo A).

Diseño experimental

Antes del tratamiento, la infección gástrica con GHLO se había confirmado en los 9 beagle mediante una evaluación de la identificación de GHLO (histobacteriología), la actividad ureasa gástrica (test Jatrox®) y la presencia de gastritis crónica (histopatología) en biopsias fúndicas y/o antrales del estómago. Todos los perros con infección por GHLO se sometieron a un tratamiento de 13 días de duración. La detección de infección gástrica por GHLO mediante estas pruebas, además de la prueba del aliento de ¹³C-urea se repitió tres veces: antes del tratamiento [D₀], al final del tratamiento [D₁₃] y 30 días tras la finalización del tratamiento [D₄₃].

Tratamiento

El tratamiento se componía de un consumo diario de una preparación de leche acidificada fermentada por *L. johnsonii* NCC 533 de 13 días de duración. La preparación de leche acidificada debía consumirse completamente antes de la dieta específica (240 g de "VITALITY®/perro).

Pruebas de evaluación

- Examen clínico: durante el estudio completo, dos cirujanos veterinarios de la escuela de veterinaria de Lyon - Francia vigilaron a los perros. Las observaciones clínicas se registraron en un formulario de informe de casos.

- Biopsia gástrica: la endoscopia gástrica se realizó con anestesia (quetamina, IMALGENE®, 5 mg/ kg - IM). Los perros se mantuvieron sin comer durante 24 horas. La endoscopia se realizó con un videogastroscoPIO Olympus® GIFK/XV10. En cada día de evaluación, se tomaron 12 biopsias del fundus y del antro. Dos biopsias fúndicas y antrales se utilizaron inmediatamente para medir la actividad ureasa de los GHLO. Cuatro biopsias fúndicas y antrales se mantuvieron en una solución "bouin" antes de utilizarse en la histobacteriología e histopatología.

- Identificación de GHLO (histobacteriología): la identificación de GHLO se realizó mediante un examen histológico de secciones de la biopsia. Las secciones de tejido se tiñeron con un colorante tipo Giemsa y se evaluaron mediante microscopía óptica (x 1000). Se realizó una evaluación semicuantitativa de los GHLO teniendo en cuenta la localización en el estómago y la profundidad de la contaminación extracelular. Si el número de GHLO por sección es de ausencia de bacterias (grado "0"); inferior a 5 bacterias (grado "1"); entre 5 y 20 bacterias (grado "2") y más de 20 bacterias (grado "3"). Para cada biopsia fúndica y antral, se realizaron dos secciones, luego se evaluaron y el resultado fue la media de las dos evaluaciones (Ref. Willard M.D. Characterization of naturally developing small intestinal bacterial overgrowth in 16 German Shepherd Dogs. J Am Vet Med Assoc, 1994, 204, 1201-1206).

- Actividad ureasa gástrica (test Jatrox®- H.P., Procter & Gamble, Alemania): el principio del ensayo es que la urea en el medio de ensayo la escinde la ureasa presente en los GHLO. El aumento del valor del pH asociado con la escisión de la urea causa un cambio de color en el medio indicador (rojo fenol) de amarillo a rosa/rojo. Las biopsias

se analizaron inmediatamente tras su recogida. Tras la introducción de la biopsia en el medio indicador, se realizó una lectura del test Jatrox® a los 180 minutos mediante un fotómetro con un detector ultravioleta que se fijó a 550 nm para su lectura con una referencia a 650 nm. La actividad ureasa en las biopsias fúndicas y antrales es la media de dos determinaciones ópticas.

5 • Prueba del aliento con ¹³C-urea (UBT): el ensayo UBT se realizó dos horas tras la anestesia para la endoscopia, de forma que ésta no influenciara los resultados del UBT. El UBT se realizó en perros deprivados de alimento, sin anestesia. La primera vez, los perros ingirieron una comida de prueba, que era la mitad de su ingesta diaria; es decir 120 g de VITALITY® / perro. La segunda vez, se administró a los perros por vía oral 7,5 mg de ¹³C-urea/ perro (MASS TRACE, Woburn - USA). Se obtuvieron muestras de ¹³CO₂ expirado antes de la comida de prueba [TB] y luego tras 40 minutos tras la administración de ¹³C-urea [T40]. Después, los perros obtuvieron la segunda mitad de su ingesta diaria de alimento. Las muestras de ¹³CO₂ expirado se analizaron con un espectrómetro de masas de proporción de isótopos en gases (FINNIGAN MAT, Bremen - Alemania). Para estandarizar los resultados entre laboratorios, se utilizó un análogo del estándar internacional de referencia de ¹³C (Vienna Pee Dee Belemnite o VPDB). El exceso porcentual de átomos de ¹³CO₂ se definió como la diferencia (valor delta, δ) en el porcentaje de átomos de ¹³CO₂ entre la muestra basal (muestra tomada antes de la comida de prueba y la administración de ¹³C [TB]) y las muestras obtenidas tras 40 minutos [T40] x 1000 (44,45). Los resultados se expresan como un exceso de δ¹³CO₂ (δ ‰).

20 • Histopatología (citología): la histopatología se realizó mediante el test cytoloBT y examen citológico de secciones finas de las biopsias. Las secciones impresas se tiñeron con hematoxilina-floxina-azafrán (HPS) y se observaron mediante un microscopio. Los criterios para el diagnóstico histológico de las biopsias gástricas se basan en el número de cada tipo de células, que es la media de tres campos vistos a un aumento de x400, y la cantidad de agregados linfocíticos, que es el número en una muestra a un aumento de x200. La clasificación histológica de la gastritis crónica es:

- grado 0: fibrosis superficial, 0 neutrófilos, 0-10 linfocitos y células plasmáticas, sin agregados, epitelio normal;
- gastritis crónica leve - grado 1: gastritis superficial crónica, 10-15 linfocitos o células plasmáticas que involucran el tejido intersticial superficial, agregados <2, epitelio normal,
- gastritis crónica moderada - grado 2: gastritis intersticial crónica, 10-50 o más linfocitos o células plasmáticas que involucran el grosor completo de la mucosa, agregados >3, epitelio normal
- gastritis crónica severa - grado 3: gastritis atrófica, 10-50 o más linfocitos o células plasmáticas, agregados >3, cambios en el epitelio glandular (atrofia). (Ref.: P. Lecoindre, M. Chevallier, R. Gillard y F. Daurin - Small intestinal bacterial overgrowth and inflammatory bowel diseases in dogs. Evaluation of the therapeutic efficacy of Spiramycine-Metronidazole association. Revue Méd. Vét, 1998;149:843-852).

40 Análisis estadístico

Cada resultado de las pruebas diagnósticas fue la media de dos determinaciones de biopsias distintas. La normalidad o anormalidad de la distribución de los resultados se ha estudiado mediante el procedimiento de Wilk-Shapiro.

45 Los efectos del tratamiento y posteriores al tratamiento se evaluaron utilizando una prueba de rangos con signo de Wilcoxon (WSRT) y/o un prueba t de pares igualados. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con un programa informático (Statistix®, Excel Microsoft®). Se consideró como significativo un valor de p < 0,05.

50 Resultados

Cinética de la carga gástrica de GHLO: Los resultados se presentan en las Tablas 1 y 2.

55 Tabla 1 : Histobacteriología en fundus

	Fundus / Corpus (grado)					
	D0	D14	D43	D14- D0	D43- D14	D43- D0
B01	3	1	2	-2	1	-1
B02	3	2	3	-1	1	0
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	3	2	1	-1	-1	-2
B06	3	0	3	-3	3	0
B07	3	1	2	-2	1	-1
B08	3	3	2	0	-1	-1
B09	3	1	1	-2	0	-2

B10	3	1	3	-2	2	0
Mediana	3	1	2	-2	1	-1
N° < 0	-	-	-	8	3	6
N° = 0	-	-	-	1	1	3
N° > 0	-	-	-	0	5	0
n	9	9	9	9	9	9
Media	2,9	1,3	1,9	-1,6	0,6	-1
+ - DE	0,11	0,29	0,35	0,29	0,47	0,29
				D14 vs D0	D43 vs D14	D43 vs D0
				WSRT	0,0143	10,3270
					0,0360	

Tabla 2 : Histobacteriología en el Antro

	Antro (grado)					
	D0	D14	D43	D14- D0	D43- D14	D43- D0
B01	1	1	2	0	1	1
B02	1	1	2	0	1	1
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	2	1	2	-1	1	0
B06	2	1	1	-1	0	-1
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	2	0	2	-2	2	0
B10	2	1	1	-1	0	-1
Mediana	2	1	1	-1	1	0
N° < 0	-	-	-	6	1	3
N° = 0	-	-	-	3	3	4
N° > 0	-	-	-	0	5	2
n	9	9	9	9	9	9
Media	1,6	0,8	1,3	-0,8	0,6	-0,2
+ - DE	0,18	0,15	0,24	0,22	0,29	0,32
				D14 vs D0	D43 vs D14	D43 vs D0
				WSRT	0,0360	0,1422
					0,5896	

5 A la finalización del tratamiento ([D0] a [D14]), la mediana de la carga bacteriana con GHLO disminuyó significativamente desde el grado "3" al grado "1" en el fundus (P= 0,0143) y desde el grado "2" al grado "1" en el antro (P= 0,0360).

10 Entre el inicio y el final del tratamiento ([D0] a [D43]), la mediana de la carga bacteriana con GHLO disminuyó significativamente desde el grado "3" al grado "2" en las biopsias del fundus (P<0,0360). En las biopsias del antro, no hubo diferencias significativas.

Actividad de ureasa gástrica (prueba de Jatrox®): Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4.

15 Tabla 3 : Actividad de ureasa gástrica (prueba de Jatrox®) en fundus

	Fundus / Corpus (densidad óptica)					
	D0	D14	D43	D14- D0	D43- D14	D43- D0
B01	0,43	0,34	0,43	-0,09	0,09	0,01
B02	0,42	0,39	0,44	-0,04	0,05	0,01
B04	0,54	0,00	0,44	-0,53	0,44	-0,10
B05	0,47	0,31	0,49	-0,16	0,18	0,02
B06	0,44	0,42	0,43	-0,02	0,01	-0,01
B07	0,52	0,40	0,41	-0,11	0,01	-0,11
B08	0,68	0,31	0,40	-0,37	0,09	-0,28
B09	0,45	0,35	0,38	-0,10	0,02	-0,08
B10	0,44	0,32	0,43	-0,13	0,01	-0,01
Mediana	0,46	0,34	0,43	-0,12	0,09	-0,01
N° < 0	-	-	-	9	0	6
N° = 0	-	-	-	0	0	0
N° > 0	-	-	-	0	9	3

	Fundus / Corpus (densidad óptica)					
	D0	D14	D43	D14- D0	D43- D14	D43- D0
n	9	9	9	9	9	9
Media	0,49	0,32	0,43	-0,17	0,11	-0,06
+ - DE	0,03	0,04	0,01	0,06	0,04	0,03
				D14 vs D0	D43 vs D14	D43 vs D0
Prueba t de pares igualados				0,0155	0,0381	0,0921

Tabla 4 : Actividad de ureasa gástrica (prueba de Jatrox®) en el antro

	Antro (densidad óptica)					
	D0	D14	D43	D14- D0	D43- D14	D43- D0
B01	0,31	0,00	0,00	-0,31	0,00	-0,31
B02	0,33	0,05	0,00	-0,28	-0,05	-0,33
B04	0,41	0,00	0,00	-0,41	0,00	-0,41
B05	0,46	0,00	0,00	-0,46	0,00	-0,46
B06	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
B07	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00
B08	0,00	0,07	0,00	0,07	-0,07	0,00
B09	0,05	0,00	0,00	-0,05	0,00	-0,05
B10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
N° < 0	-	-	-	6	2	6
N° = 0	-	-	-	2	7	3
N° > 0	-	-	-	1	0	0
n	9	9	9	9	9	9
Media	0,20	0,01	0,00	-0,19	-0,01	-0,20
+ - DE	0,06	0,01	0,00	0,07	0,01	0,06
				D14 vs D0	D43 vs D14	D43 vs D0
Prueba t de pares igualados				0,0197	0,1756	0,0123

5 A la finalización del tratamiento ([D0] a [D14]), la media de la actividad ureasa disminuyó significativamente a un 35% en el fundus (P=0,0155) y 93% en el antro (P=0,0197).

10 Veintinueve días después del fin de tratamiento ([D14] a [D43]), la actividad media de la ureasa aumentó significativamente en un 35% en las biopsias del fundus (P=0,0381) pero siguió siendo inferior a la del inicio del tratamiento. La actividad ureasa del antro no se modificó y continuó siendo nulo.

Actividad de ureasa global (test de aliento con ¹³C-urea) :

15 Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5 : Actividad ureasa global (test de aliento con ¹³C-urea)

	D0	D14	D43	D14-D0	D43-D14	D43-D0
B01	34	6	55	-28	49	21
B02	18	26	21	8	-5	3
B04	165	24	50	-141	26	-116
B05	15	7	6	-8	-1	-9
B06	18	20	19	2	-1	1
B07	12	13	22	1	9	10
B08	47	17	15	-30	-2	-32
B09	20	10	9	-10	-1	-11
B10	32	9	13	-23	4	-19
Mediana	20	13	20	-10	-1	-9
N° < 0	-	-	-	6	5	5
N° = 0	-	-	-	0	0	0
N° > 0	-	-	-	3	4	4
n	9	9	9	9	9	9
Media	40	14	23	-26	9	-17
+ - DE	16	3	6	15	6	13

	D0	D14	D43	D14-D0	D43-D14	D43-D0
				D14 vs D0	D43 vs D14	D43 vs D0
			WSRT	0,0494	0,4772	0,3433

Entre el inicio y el final del tratamiento ([D0] a [D14]), la mediana del enriquecimiento de ¹³C de 35% de ¹³CO₂ espirado disminuyó significativamente (P=0,049).

- 5 Al final de los 29 días tras la finalización del tratamiento ([D14] a [D43]), del enriquecimiento de ¹³C del ¹³CO₂ espirado no se modificó de forma significativa.

Gastritis crónica (test de aliento con ¹³C-urea) :

- 10 Los resultados se proporcionan en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6 : Histopatología en el fundus

	Fundus / Corpus (grado)					
	Inclusión	D14	D43	D14- Incl.	D43-D14	D43- Incl.
B01	2	1	0	-1	-1	-2
B02	1	0	0	-1	0	-1
B04	2	0	0	-2	0	-2
B05	1	1	1	0	0	0
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	0	-1	0	-1
B08	1	0	0	-1	0	-1
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	2	0	0	-2	0	-2
Mediana	1	0	0	-1	0	-1
N° < 0	-	-	-	8	1	7
N° = 0	-	-	-	1	7	2
N° > 0	-	-	-	0	1	0
n	9	9	9	9	9	9
Media	1,3	0,2	0,2	-1,1	0,0	-1,1
+ - DE	0,17	0,15	0,15	0,20	0,17	0,26
				D14- Incl.	D43-D14	D43- Incl.
			WSRT	0143	0,7500	0,0225

- 15 Tabla 7 : Histopatología en el antro

	Antro (grado)					
	Inclusión	D14	D43	D14- Incl.	D43 - D14	D43- Incl.
B01	1	2	0	1	-2	-1
B02	1	0	0	-1	2	1
B04	0	0	0	0	0	0
B05	0	1	1	1	0	1
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	1	1	0	0	-1	-1
Mediana	1	0	1	0	0	0
N° < 0	-	-	-	4	2	3
N° = 0	-	-	-	3	4	4
N° > 0	-	-	-	2	3	2
n	9	9	9	9	9	9
Media	0,8	0,6	0,7	-0,2	0,1	-0,1
+ - DE	0,15	0,24	0,24	0,28	0,39	0,26
				D14- Incl.	D43-D14	D43- Incl.
			WSRT	0,5294	0,8336	0,7874

A la finalización del tratamiento ([Incl.] hasta D14]), la mediana de la gastritis crónica disminuyó significativamente desde grado "1" a grado "0" en el fundus (P= 0,0143). Esta disminución se mantuvo hasta la finalización del estudio. Cualquier modificación significativa de la mediana del grado no se mostró en las biopsias de antro.

5 CONCLUSION

I

	TRATAMIENTO ([D14] vs [D0]) Dieta específica + preparación de leche fermentada con <i>L. johnsonii</i> NCC 533		POST-TRATAMIENTO ([D43] vs [D14]) Dieta específica	
	FUNDUS	ANTRO	FUNDUS	ANTRO
GHLO ^{(2)-a}	(-)*	(-)*	ns	ns
Actividad ureasa ^{(1)-b}	(-)*	(-)*	(+)*	ns
Actividad ureasa ^{(2)-c}	(-)*		ns	
	([D14] vs Inclusión)		([D43] vs [D14])	
Gastritis crónica ^{(2)-d}	(-)*	ns	ns	ns

(1) prueba t de pares igualados; (2) prueba de rangos con signo de Wilcoxon - (-) (+) variación negativa o positiva P < 0.05 - ^a Histobacteriología - ^b prueba Jatrox® - ^c test de aliento con ¹³C-urea - ^d Histopatología

10 En perros con una infección gástrica por GHLO con una gastritis crónica, el consumo de una preparación de leche acidificada fermentado con *L. johnsonii* NCC 533 fue capaz de obtener:

- en fundus y en antro, a disminución significativa de la carga de GHLO y la actividad ureasa y la regresión de gastritis crónica durante el tratamiento,
- en fundus, una regresión significativa de la gastritis crónica que se mantuvo hasta el final del tratamiento,
- sin efectos secundarios.

15 Ejemplo 3: Propiedades anti-Helicobacter presentes en los sobrenadantes de cultivo de diferentes cepas de Lactobacilli.

20 Las propiedades anti-GHLO in-vitro de sobrenadantes de cultivo de crecimiento de Lactobacilli de las cepas aisladas: NCC 533, NCC 2583 y NCC 2628 se analizaron mediante la inhibición de la actividad ureasa.

25 Se hicieron crecer *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* en agar Columbia – sangre de oveja al 5%. *H. felis* creció sobre agar de infusión cerebro corazón (BHI) que contiene 3 g/L de extracto de levadura y sangre de oveja al 10%. Todas las especies de Helicobacter se mantuvieron en una atmósfera microaerofílica (85% N₂/10% CO₂/ 5% O₂) a 37°C durante 48 h. Las bacterias se recogieron en caldo BHI suplementado con 2.5 g/L de extracto de levadura. El número de bacterias se estimó midiendo la densidad óptica a 600 nm (1 DO600=10⁸ bacterias/ml).

30 Los sobrenadantes del cultivo, puros o prediluidos en el medio apropiado, se diluyeron finalmente 1:2 en medio DMEM. Tras ajustar el pH a 4,2, las muestras se esterilizaron mediante filtración a través de 0,2 µm. El equivalente de 1x10⁷ *H. pylori* se añadió a tubos que contienen 500 µl de diferentes muestras y los tubos se mantuvieron durante 1 hora más a 37°C en un incubador celular (5% CO₂). Las bacterias se recogieron mediante centrifugación. Los botones bacterianos se lavaron una vez en NaCl 0,9% y se resuspendieron en 250 µl de reactivo de prueba de ureasa (prueba Jatrox®-H.p.-; Procter & Gamble Pharmaceutical). Tras 1 hora de incubación adicional a 37°C, se determinaron los cambios colorimétricos, proporcionales a la actividad ureasa, mediante espectrofotometría a una densidad óptica (DO) de 550nm.

Preparación de sobrenadante fermentado

40 Los Lactobacilli de la colección de cultivos Nestlé denominados NCC 2583 y NCC 2628 se hicieron crecer en medio MRS-Pasteur. *E. faecium* SF68 y *S. boulardii* SB20 crecieron en medio HJL y YPF, respectivamente. Tras 48 h a 37°C, las bacterias se centrifugaron y los sobrenadantes fermentados se recuperaron y se congelaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Resultados

45 Se cultivaron unas reservas de las cepas de Lactobacillus, NCC 2583 y NCC 2628, de *E. faecium* SF68 (Bioferment) y de *S. boulardii* SB20 (Levucell) en paralelo en un medio apropiado. Los diferentes sobrenadantes fermentados se analizaron por su capacidad inhibidora frente a *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. felis* utilizando la prueba de la ureasa. Se utilizó un sobrenadante de cultivo de crecimiento de NCC 533 como control positivo y el medio de cultivo solo se utilizó como control negativo en el ensayo.

50

La Tabla 8 muestra el resultado de dos experimentos separados. El sobrenadante fermentado del *L. acidophilus* NCC 2628 inhibió totalmente la actividad ureasa de *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. felis*. El sobrenadante fermentado del *L. rhamnosus* NCC 2583 inhibió parcialmente la actividad ureasa de *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* pero no la de *H. felis*.

La incubación de cualquier especie de *Helicobacter* con el sobrenadante del cultivo de *L. johnsonii* NCC 533 condujo a una inhibición completa de su actividad ureasa. No se observó inhibición de actividad ureasa cuando se incubaron las tres especies de *Helicobacter* con los sobrenadantes de cultivo de crecimiento de *E. faecium* SF68, de *S. boulardii* SB20.

Tabla 8 : Efecto de diferentes sobrenadantes fermentados sobre la actividad ureasa de GHLO

Muestra	Especies	pH inicial	Actividad ureasa (DO _{550 nm})		
			<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>
MRS Pasteur	-	6,6	0,5	0,5	0,5
YPD	-	6,4	0,5	0,6	0,5
CNCM 1-1225	<i>L. johnsonii</i>	3,9	0,0	0,0	0,0
CNCM I-2583	<i>L. rhamnosus</i>	4,1	0,3	0,2	0,5
CNCM I-2628	<i>L. acidophilus</i>	4,1	0,0	0,0	0,0
SF68	<i>E. faecium</i>	5,1	0,5	0,5	0,5
SB20	<i>S. boulardii</i>	4,2	0,5	0,5	0,6

3 *Lactobacilli*, *E. faecium*, *S. boulardii* se cultivaron durante 48h en su medio apropiado. Se incubó una dilución 1/2 de los sobrenadantes de cultivo fermentado con 2×10^7 bacterias/ml. Tras la incubación de 1 h, se analizaron las actividades ureasa de *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* mediante espectrofotometría. Inhibición total DO_{550nm}=0; Sin inhibición DD_{550nm}≥0.5.

Ejemplo 4: Alimento seco para perros

La mezcla alimentaria está compuesta por alrededor de un 58% en peso de maíz, alrededor de un 5.5% en peso de gluten de maíz, alrededor de un 22% en peso de harina de pollo, 2,5% achicoria deshidratada, leche fermentada por cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) y *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116) por lo que la cantidad correspondiente para el perro es de alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc / día, y el resto de sales, vitaminas y minerales.

La mezcla alimentaria se introduce en un acondicionador y se humedece. El alimento húmedo se introduce entonces en un extrusor de cocción y se gelatiniza. La matriz gelatinosa que sale del extrusor se fuerza a través de un colorante y se extruye. El extrusado se corta en piezas adecuadas para alimentar a perros, se seca a alrededor de 110°C durante alrededor de 20 minutos, y se enfría para formar bolitas.

Este alimento seco para perros es capaz de mejorar la salud de la mascota, y en particular previene los trastornos relacionados con una infección por GHLO en animales domésticos.

Ejemplo 5

Se realiza un ensayo sobre un panel de 20 perros beagle macho, que han contraído de forma natural una infección gástrica con GHLO. A todos los perros se les administró primero un tratamiento clásico de antibióticos para la erradicación de GHLO, que comprende la administración de dos antibióticos diferentes (Spiramicina y Metronidazol) y un antisecretor como Omeprazol durante 1 semana.

Tras 7 días de tratamiento, la mitad de los perros fueron GHLO negativos, es decir, no se detectaron organismos de *Helicobacter* mediante histobacteriología, ni actividad de ureasa gástrica y un valor de la prueba de aliento con ¹³C-Urea inferior al 5 ‰ de aumento sobre la línea basal a los 40 minutos.

Tras el tratamiento, la mitad de los perros se alimentaron con el producto Friskies Menu Energy, que es un alimento seco para perros disponible en el mercado, como alimento control. Los 10 perros restantes se alimentaron con un alimento prueba que corresponde con el producto Friskies Menu Energy excepto que contiene bolitas de leche fermentada deshidratada de cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) y *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116), por lo que la cantidad para un perro es de alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc / día.

La prueba de aliento con ¹³C-Urea y la detección de *Helicobacter* mediante histobacteriología se midió de nuevo 6 semanas tras la alimentación con estas dos dietas diferentes. El resultado muestra que el 20% de los perros alimentados con producto normal Friskies Menu Energy, pasaron a ser positivos en 6 semanas. Todos los perros alimentados con el alimento de prueba fueron negativos tras 6 semanas.

Esta composición es eficiente como adyuvante en antibioterapias para la prevención de la reinfestación por GHLO.

Ejemplo 6: Alimentos para mascotas enlatados

5 Se preparó una mezcla de un 73% de carcasa de ave, pulmones de cerdo e hígado de ternera (triturado), un 16% de harina de trigo, un 2% de colorantes y un 9% de leche fermentada por las cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), vitaminas y sales inorgánicas. Esta mezcla se emulsiona a 12°C y se extruye en forma de un pudín que luego se cocina a una temperatura de 90°C. Se enfría hasta 30°C y se corta en porciones. El 45% de estas porciones se mezclan con un 55% de salsa preparada a partir de un 98% de agua, un 1% de colorante y un 1% de goma de guar. Se introduce en latas de hojalata y se esteriliza a 125°C durante 40 min.

10 Esta composición húmeda se pretende utilizar para prevenir o tratar los trastornos relacionados con la infección por GHLO en animales domésticos.

15 Ejemplo 7: Efecto sobre el mal aliento

Se alimentó a 10 perros con GHLO en el estómago con la misma dieta que en el ejemplo 2 durante 2 semanas. El olor del aliento se midió en cada perro al inicio y al final del tratamiento con la ayuda de un halitómetro.

20 Este experimento mostró que alimentar a los perros con una composición que contiene una preparación de leche acidificada fermentada por *L. johnsonii* NCC 533 induce una reducción significativa del mal aliento.

Además se observó una clara correlación entre el nivel de infección por helicobacter y el mal aliento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. La utilización de una cepa de bacterias del ácido láctico seleccionada de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis* y/o sus metabolitos o un medio fermentado de las mismas para la preparación de una composición para la profilaxis o tratamiento de la infección por GHLO en mascotas.
- 10 2. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa de bacterias lácticas se selecciona de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I- 2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453) y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).
- 15 3. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las bacterias del ácido láctico se utilizan en forma de un medio fermentado por dichas bacterias del ácido láctico, o una subfracción del medio de cultivo fermentado por las bacterias del ácido láctico.
- 20 4. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las bacterias del ácido láctico o el medio de fermentación equivalente se utiliza de forma que la cantidad disponible para la mascota es de 10^3 - 10^{14} ufc diarias.
- 25 5. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las bacterias del ácido láctico o el medio de fermentación equivalente se utiliza en una cantidad de 10^9 - 10^{12} ufc/día para los perros y 10^7 - 10^{11} ufc/día para los gatos.
- 30 6. Una composición alimenticia para mascotas que contiene una cantidad efectiva de al menos un componente seleccionado de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM 1-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453) y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), los metabolitos y un medio de crecimiento fermentado de los mismos; un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.
- 35 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las bacterias del ácido láctico se utilizan en forma de un medio fermentado por las bacterias del ácido láctico, viables o inactivadas, o una subfracción del medio de cultivo fermentado por las bacterias del ácido láctico.
- 40 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la cantidad de cepa de bacterias del ácido láctico o el medio de fermentación equivalente disponible para la mascota se corresponde a 10^3 - 10^{14} cfu diarias.
- 45 9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 8, que reduce la infección por GHLO en gatos y perros de forma que la carga de GHLO y la actividad ureasa en el fundus se reduce en al menos 0,5 grados y en al menos 0,5 grados en el antro.
- 50 10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 9, que induce una regresión de la gastritis fúndica crónica, con una regresión mediana del grado de la inflamación gástrica de al menos 0,5.
- 55 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 8, en el que los metabolitos reducen los malos olores del aliento de las mascotas.
12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 8, que evita o reduce los trastornos relacionados con la infección por GHLO en el tracto gastrointestinal de las mascotas, en particular en el estómago y en el intestino grueso.