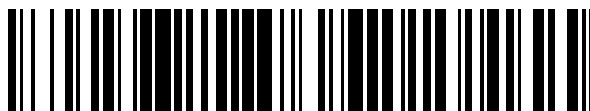


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 739**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815185 .6**

96 Fecha de presentación: **17.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1718265**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Bifidobacteria globosum probiótica canina**

30 Prioridad:
19.12.2003 US 531588 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2012

73 Titular/es:
**THE IAMS COMPANY
7250 POE AVENUE
DAYTON, OHIO 45414, US y
ALIMENTARY HEALTH LIMITED**

72 Inventor/es:
**BOILEAU, Thomas William-Maxwell;
CEDDIA, Michael Anthony;
COLLINS, John Kevin;
DAVENPORT, Gary Mitchell;
KIELY, Barry Pius;
O'MAHONY, Liam Diarmuid;
SUNVOLD, Gregory Dean;
TETRICK, Mark Alan y
VICKERS, Robert Jason**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 388 739 T3

DESCRIPCIÓN

Bifidobacteria globosum probiótica canina

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

- 10 Los mecanismos de defensa de protección del tracto gastrointestinal (GI) de mamíferos frente a la colonización por bacterias patógenas son muy complejos. El tracto GI de la mayoría de los mamíferos es colonizado por microflora natural y por microorganismos patógenos invasivos. En un individuo saludable, esta microflora competitiva está en 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 en estos animales puede dar como resultado animales domésticos más sanos.

- 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. A menudo los trastornos GI de los animales domésticos, incluidos los que se encuentran en perros y gatos, están relacionados con un crecimiento bacteriano excesivo y la producción de enterotoxinas mediante 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, constituyentes de las mismas como, por ejemplo, proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que estimulan la salud de los mamíferos preservando y promoviendo el desarrollo de la microflora natural del tracto GI y reforzando los controles de enfermedades autoinmunes. Hay quienes consideran que las bacterias probióticas son más eficaces cuando se derivan de la especie del individuo a tratar, o especies estrechamente relacionadas con la misma. 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.

- 25 En WO 01/90311 se describen microorganismos probióticos aislados de muestras fecales obtenidas de gatos y perros que tienen 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.

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

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium globosum* NCIMB 41198 que puede obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tiene actividad probiótica.

- 40 La presente invención comprende además una composición que comprende una cepa de *Bifidobacterium globosum* NCIMB 41198 que puede obtenerse aislando tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tiene actividad probiótica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Salmonella typhimurium* ocasionado por las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

- 45 La Figura 2 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria monocytogenes* por parte de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

La Figura 3 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria innocua* por parte de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

La Figura 4 demuestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli* 0157H45 por parte de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

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

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

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

Descripción detallada de la invención

Secuencias

- 10 SEC. n.º 1 – Secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico 16s-23s de *Bifidobacterias globosum* AHCF (NCIMB 41198).

SEC. n.º 2 – Izquierda 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

SEC. n.º 3 – Derecha 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

Números de depósito bacteriano

- 15 La tabla siguiente indica que la cepa *Bifidobacteria globosum* es ilustrativa de la presente invención. La cepa bacteriana está depositada en National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de depósito	Secuencia 16s-23s
<i>Bifidobacteria globosum</i> AHCF	NCIMB 41198	SEC. n.º 1

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

- 20 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”.

- 25 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.

El término “mutantes de los mismos”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye cepas bacterianas derivadas que tienen al menos 93% de homología, preferiblemente al menos 96% de homología, más preferiblemente 98% de homología con la secuencia polinucleótida del espaciador intergénico 16s-23s de una cepa mencionada, pero que comprende mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

- 30 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, al menos, 60%, más preferiblemente, al menos, 75%, más preferiblemente aún 85% de homología con la secuencia precursora. 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/>.

- 40 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.

- 45 En la presente memoria, “animal de compañía” significa un animal doméstico. Preferiblemente, “animales de compañía” significa animales domésticos como perros, gatos, conejos, hurones, caballos, vacas, o similares. Más preferiblemente, “animal de compañía” significa un perro o gato doméstico.

Cepas de *Bifidobacteria globosum*

El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de *Bifidobacteria globosum* NCIMB 41198 que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino 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.

Se ha descubierto que las cepas de *Bifidobacteria globosum* obtenidas mediante aislamiento directamente del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de mamíferos se adhieren al tracto gastrointestinal tras la alimentación de células bacterianas viables, y también son significativamente inmunomoduladoras cuando se suministran a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las *Bifidobacteria globosum* obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado se asocian estrechamente con los tejidos mucosos del intestino. Sin pretender tampoco imponer ninguna teoría, se cree que esto resulta en que el probiótico *Bifidobacteria globosum* de la presente invención genera respuestas del huésped alternativas que resultan en acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal extirpado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped mediante interacción directa con el epitelio de la mucosa y con las células inmunes del huésped. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo 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 la *Bifidobacteria globosum* de la presente invención sea muy eficaz como organismo probiótico.

Las *Bifidobacteria globosum* de la presente invención, que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado, tienen actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un número de cepas/especies patógenas, medido por zonas de inhibición o ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano conocidos por el experto en la técnica. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicativa de una actividad probiótica *in vivo* potencial en animales, preferiblemente en animales de compañía como perros y gatos. Las bacterias ácido lácticas 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.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención pueden ser resultado de un número de acciones diferentes por parte de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención. Se ha sugerido anteriormente en la técnica que diversas cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal después del consumo oral, evitando la unión de organismos patógenos a la mucosa intestinal mediante oclusión. Esto requiere 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 las *Bifidobacteria globosum* de la presente invención, que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado, si bien ejercen un cierto efecto probiótico debido a la oclusión si se presentan en cualquier forma viable, pueden transmitir un efecto probiótico sustancial tanto en forma viable como no viable debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos o los matan, y/o alteran la competencia inmune del animal huésped. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias de la presente invención se pueden ofrecer como cultivos viables o no viables o productos de fermentación purificada y seguir proporcionando un efecto terapéutico benéfico al animal huésped.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención son capaces de mantener viabilidad después del tránsito a través del tracto gastrointestinal. Esto es deseable para que los cultivos vivos de 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 las tripas por las bacterias ácido lácticas de la presente invención es deseable para que se proporcionen los beneficios probióticos al huésped. 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 lo tanto, es preferible que las bacterias ácido lácticas de la presente invención mantengan la viabilidad después de la suspensión en un medio que tenga un 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 ácido lácticas 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.

- 5 Además, es preferible que las bacterias ácido lácticas de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33% cuando se encuentren en presencia de al menos 0,5% de sales biliares porcinas. El crecimiento, tal como se emplea en la presente memoria, se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Es más preferible que las bacterias de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33% cuando se encuentren en presencia de al menos 1% de sales biliares porcinas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las bacterias ácido lácticas de la presente invención, capaces de crecer
- 10 en presencia de, al menos, 0,5% de sales biliares porcinas, pueden sobrevivir a las condiciones presentes en el intestino. Se cree que esto se debe a que la adición de bilis porcina al medio de cultivo reproduce las condiciones del intestino.

- Además, es preferible que las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención tengan una adhesión significativa a las células epiteliales del intestino *in vitro*. Tal como se utiliza en la presente memoria, “adherencia significativa” significa que al menos el 4% del número total de bacterias ácido lácticas incubadas junto con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a
- 15 células epiteliales. Más preferiblemente, al menos el 6% de las células bacterianas co-incubadas se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que la adherencia de las células epiteliales del intestino *in vitro* es indicativa de la capacidad de las bacterias ácido lácticas de colonizar el tracto gastrointestinal de un animal *in vivo*.

- 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
- 20 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 bacterias ácido lácticas según la presente invención tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s según la SEC. n.º 1. La cepa de bacterias ácido lácticas según la presente invención es la cepa de *Bifidobacteria globosum* NCIMB 41198 (AHCF).

- La cepa de bacterias ácido lácticas del género *Bifidobacteria globosum* obtenida mediante aislamiento del tracto
- 25 gastrointestinal canino extirpado y lavado se puede utilizar para proporcionar un beneficio probiótico tras la administración oral en animales, preferiblemente animales de compañía o seres 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
- 30 (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, periodontitis, 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
- 35 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. Se prefiere el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluido el tratamiento o prevención de
- 40 diarreas; la regulación del sistema inmunológico, preferiblemente el tratamiento o prevención de las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación; manteniendo o mejorando la salud de la piel y/o el pelaje, preferiblemente tratando o previniendo las enfermedades atópicas de la piel; mejorando o reduciendo los efectos del envejecimiento, incluidos los niveles de actividad y percepción mental; y evitando la pérdida de peso durante la infección y tras la misma.

- 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
- 45 supervisar utilizando pruebas de la función inmunológica *in vivo* como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de las células asesinas naturales, la respuesta de los anticuerpos a las vacunas, hipersensibilidad retardada y mezclas de las mismas. Dichos métodos se describen brevemente en la presente memoria, pero son bien conocidos por el experto en la técnica.

1. Blastogénesis de linfocitos: esta prueba mide la respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos aislados de la sangre total fresca de los animales de prueba y control a varios mitógenos y es una medida de la función global de las células T y B. Explicado de manera concisa, los mononucleocitos de la sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre total mediante métodos de centrifugación de la densidad Ficoll-Hypaque conocidos por el experto en la técnica. Los PBMC aislados se lavan dos veces en un medio celular RPMI 1640 suplementado con HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células lavadas se vuelven a suspender en RPMI 1640, se cuentan y se ajusta la densidad celular apropiadamente. Las células 2×10^5 se exponen en un rango de concentraciones
- 50 (0,1 µg/ml a 100 µg/ml) de varios mitógenos, algunos ejemplos de los cuales incluyen mitógeno de la hierba carmín (Gibco), fitohemaglutinina (Gibco) y conconavalina A (Sigma), por triplicado durante 72 horas a 37 °C y 5% de 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 recolectan y se leen los recuentos por centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.
- 55

2. Actividad de las células asesinas naturales: como se describe en US-6.310.090, esta prueba mide la actividad efectora *in vitro* de las células asesinas naturales aisladas de la sangre total fresca de los animales de prueba y control. Las células asesinas naturales son un componente de la función inmunológica de un mamífero. Para evaluar la actividad citotóxica de las células NK se utilizaron células de adenocarcinoma de tiroides canina como células diana. Previamente se había demostrado que esta línea celular es susceptible de ser destruida por las células NK caninas. Las células diana se cultivaron en un matraz T75 con 20 ml de medio esencial mínimo (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. EE. UU.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Tras la confluencia, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se resuspendieron a una concentración de 5×10^5 células/ml en medio completo (RPMI-1640+10% FCS+100 U/ml de penicilina+100 µg/ml de estreptomycin). Con una pipeta, se introdujeron alícuotas de 100 µl de las células diana, por triplicado, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. Linfocitos (células efectoras; 100 µl) aislados mediante separación Ficoll-Hypaque (según se describe anteriormente en la presente memoria), se añadieron a las células diana para proporcionar una relación célula efectora/célula diana (E:T) de 10:1. Después de 10 horas de incubación a 37 °C se añadieron 20 µl de un sustrato que contenía 5 µg de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37 °C, después de las cuales se extrajo el MTT no metabolizado mediante aspiración. Los cristales de formazano se disolvieron añadiendo 200 µl de etanol al 95%. La densidad óptica se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. El porcentaje de lisis específica de células NK se calculó del siguiente modo:

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

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

Otros métodos para determinar el efecto de las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención se describen en US-6.133.323 y US-6.310.090.

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

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

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

- Índice de caída de pelo: a cada sujeto que realiza la prueba se le asigna un índice de caída de pelo recogiendo el pelo producido durante una sesión de cepillado estandarizada. El pelo se retiene y se pesa y se comparan los sujetos que realizan la prueba con los sujetos de control.
- 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.
- 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 lipídicas 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.

5

El tratamiento o prevención de la infección gastrointestinal, incluida la diarrea, en los animales de compañía se puede medir utilizando 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.

10 Puntuación: 5 Extremadamente seca

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)

15 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

20 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

25 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

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

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

35 Además, el tratamiento de la infección gastrointestinal en los 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 preferiblemente comprende la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales de compañía se pueden cuantificar utilizando la técnica de recuento de colonias estándar conocida por el experto en la técnica. Más preferiblemente, las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, bacteroides y mezclas de los mismos. 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.

45 El método de uso de las bacterias de la presente invención también puede incluir el tratamiento, bien profiláctico o bien terapéutico del tracto urinario de los mamíferos, preferiblemente de los animales de compañía. Ejemplos no limitativos de tratamiento del tracto urinario incluyen el tratamiento o prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento o prevención de enfermedades renales, incluyendo piedras en el riñón, el tratamiento o prevención de infecciones en la vejiga y similares. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las *Bifidobacteria* de la presente invención son útiles en la prevención de estas dolencias como resultado de su capacidad de degradar el ácido oxálico, como se demuestra *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.

Las *Bifidobacteria globosum* de la presente invención se pueden utilizar en un método para mejorar o mantener la salud de los animales de compañía y comprenden la mejora de la digestión de las 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 en la cantidad de metabolitos tóxicos y enzimas perjudiciales que son el resultado de la fermentación colónica (Tomomatsu, H. "Health effects of oligosaccharides", (1994) *Food Technol.* **48**, p. 61-65). La digestión de las fibras se puede determinar utilizando el método descrito en Vickers y col. (2001), "Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora", *Am. J. Vet. Res.* **61** (4), 609-615, con la excepción de que en lugar de inocular utilizando muestras fecales diluidas, cada experimento utilizó cultivos puros de las cepas bacterianas de interés.

El método de uso de las bacterias *Bifidobacteria globosum* de la presente invención de forma típica implica consumo oral por parte del 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 *Bifidobacteriaglobosum* de la presente invención pueden proporcionarse al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz para mantener o mejorar la salud del animal, preferiblemente, un animal de compañía. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" referido a las bacterias ácido lácticas 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 posología concreta.

Preferiblemente, las bacterias ácido lácticas se administran al animal de compañía con una dosis de $1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^{14}$ UFC por día, más preferiblemente de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^{12}$ UFC por día. La composición preferiblemente puede contener, al menos, 0,001% de $1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g de las *Bifidobacteria globosum* obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado. Las bacterias *Bifidobacteria globosum* se pueden dar al animal en forma viable o como células destruidas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de la fermentación de las bacterias ácido lácticas de la presente invención, o cualquier mezcla de las mismas.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria globosum*, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se utilizan 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 comprende parte de la ingestión alimentaria habitual, la composición puede estar en forma de un alimento animal desecado como galletas o croquetas, un alimento en grano procesado, un alimento animal húmedo, yogures, salsas, dulces, golosinas y similares.

Dichas composiciones pueden comprender otros componentes. Otros componentes son ventajosos para incluir en las composiciones útiles en la presente invención, pero son opcionales para los fines de la 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, 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, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, preferiblemente de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia. Además, las composiciones alimenticias que comprenden las bacterias ácido lácticas de la presente invención también pueden comprender de 4% a 25% de la fibra alimentaria 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 pueden también comprender un prebiótico. "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 ácido lácticas en el tracto gastrointestinal del animal doméstico a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no 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 Tirlemont 3300, Bélgica bajo el nombre comercial "Raftiline". Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftiline (g) ST que es un polvo blanco fino que contiene de 90% y 94% en peso de inulina, hasta 4% en peso de glucosa y fructosa, y de aproximadamente 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 Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos, o bien utilizando microorganismos.

Para los alimentos desecados para animales domésticos, un proceso adecuado es la cocción por extrusión, aunque se puede utilizar el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cocinan por extrusión, los alimentos desecados para animales domésticos normalmente se suministran en forma de croquetas. Si se utiliza un prebiótico, el prebiótico se puede administrar con los otros ingredientes del alimento desecado para animales domésticos antes de llevar a cabo el procesamiento. En la solicitud de patente europea N.º 0850569 se describe un proceso adecuado. Si se usa un microorganismo probiótico, lo mejor es recubrir el organismo sobre el alimento seco para animales o rellenar este con aquel. La publicación de patente europea número EP-0 862 863 describe un proceso adecuado.

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 alimenticias húmedas típicas pueden comprender de 5% a 15% de proteínas, de 1% a 10% de grasas y de 1% a 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.

En otra realización, las composiciones suplementarias como galletas, dulces, y otras golosinas pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 60% de proteínas, o de 22% a 40% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, las composiciones 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. Los alimentos y las composiciones suplementarias previstas para ser utilizadas en perros y gatos se conocen comúnmente en la técnica.

Los alimentos para animales domésticos pueden contener otros principios activos 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.

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. Además, muchos ingredientes que se utilizan comúnmente en los alimentos para animales domésticos son fuentes de ácidos grasos y 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.

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 de carne típicas pueden comprender de 0,5% a 5% de proteína en bruto, de 2% a 5% de grasa en bruto, y de 1% a 5% de fibra.

Otros ejemplos no limitativos de suplementos adecuados para su uso en la presente invención incluyen polvos, suspensiones en aceite, quesos en suspensiones con una base de leche, 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 con una 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 grasa y de 50% a 90% de un vehículo líquido como la leche.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de bacterias *Bifidobacteriaglobosum* de tractos gastrointestinales caninos

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

Se retiraron los sobrenadantes tras agitación del tejido mucoso (con agitador vórtex durante 1 minuto) y tras homogeneización mecánica del tejido. Se colocó cada sobrenadante en placa de agar de clostridium reforzado (RCA) o agar MRS con 0,05% de cisteína y con mupirocina. Las placas se incubaron anaeróbicamente usando el sistema Anerocult GasPak durante 24 horas a 37 °C. Las colonias aisladas de las placas se sembraron de nuevo por agotamiento sobre cada MRS o RCA y de nuevo se llevó a cabo el cultivo de forma anaeróbica bajo las mismas condiciones. Las colonias aisladas se sembraron 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 50 CHL, BioMerieux). Las células recolectadas se lavaron dos veces con tampón de fosfato 0,05M (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 (pH 6,5) 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.

Se aislaron cincuenta y ocho (58) cepas de bacterias ácido lácticas de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado, de las cuales seis resultaron ser del género *Bifidobacteria*, y una de la cepa *B. globosum*.

Ejemplo 2: Revisión de actividad antimicrobiana

Las cepas bacterianas *Bifidobacteria globosum* aisladas se incubaron anaeróbicamente en caldo de cultivo TPY. Se inocularon 2 µl de cada cultivo en placas de agar TPY y se dejaron incubando anaeróbicamente durante la noche. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Eschericia coli* 0157H45 se hicieron crecer previamente durante la noche y se inocularon 100 µl en agar fundido (1% en volume). Este cultivo indicador se vertió sobre la superficie de las placas MRS o TPY 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*.

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

Ejemplo 3: Mediciones de supervivencia y colonización In Vitro

Tolerancia al pH

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 TPY ajustado con 1M HCl a pH 2,5. Las células se cultivaron anaeróbicamente 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 Figura 5 demuestra claramente que cinco cepas eran resistentes a pH 2,5 durante 1 hora. La Tabla 2 resume estos datos para cada cepa.

Designación de la cepa	Conc. al comienzo	Conc. al cabo de 1 hora	Viabilidad (%)
AHC A	1,50E+08	1,20E+08	80
AHC B	4,00E+07	5,50E+07	137
AHC C	1,10E+08	1,50E+08	136
AHC F	6,00E+08	6,00E+08	100
AHC 7	2,50E+07	4,50E+07	180

Tabla 2

Resistencia a la bilis

5 Las cepas bacterianas se aplicaron por estrías sobre agar TPY 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 24 horas. Un observador experto comparó el crecimiento con el de placas de control, y el crecimiento de las colonias se describió así:

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%);

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

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 Figura 6 muestra que las *Bifidobacteria* de la presente invención muestran claramente resistencia a las sales biliares, siendo capaces de crecer y formar colonias a un nivel de, al menos, 33% cuando se exponen a sales biliares al 0,5%.

Adherencia celular al epitelio intestinal

20 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 de volumen total) por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos (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. Las células epiteliales se lisaron en H₂O desionizada y el número de bacterias adherentes enumeradas usando el método de conteo de placa conocido por el experto en la técnica. La adherencia se expresó como porcentaje del número inicial de bacterias en la placa.

Como puede verse en la Figura 7, la cepa de *Bifidobacteria globosum* depositada con el NCIMB, con los números de registro NCIMB 41198 se adhieren a las células epiteliales del intestino HT-29 a niveles de, al menos, 4%.

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

Las colonias de *Bifidobacteria globosum* se seleccionaron de una placa de agar y se volvieron a suspender en un tampón IX PCR, calentado a 96 °C durante 5 minutos, congelado a -70 °C durante 5-10 minutos, descongelado y se añadió una parte alícuota a un tubo para PCR de Eppendorf. Se realizó el PCR usando los cebadores espaciadores intergénicos (IGS), GS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y GS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. Las condiciones del proceso fueron 35 96 °C durante 1 min (1 ciclo), 94 °C durante 30 seg, 53 °C durante 30 seg, 72 °C durante 30 seg (28 ciclos). La reacción PCR contenía 5 µl de ADN, tampón para PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mm de dNTPs (Roche, Reino Unido), 0,4 µm de cebador IGS 150 ng L y R (/50 µl) (MWG Biotech, Alemania) y Bioline *Taq* polimerasa (0,6 unidades). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador Hybaid. Los productos de la PCR (8 µl) se ejecutaron junto a un marcador de peso molecular (ΦX 174 *Hae III*, Promega) en un 2% de gel teñido con bromuro de etidio de agarosa en TAE, para determinar su perfil IGS. Utilizando los mismos cebadores anteriores, el ADN del espaciador intergénico (IGS) se secuenció para las 2 cepas caninas de *Bifidobacteria globosum* utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica.

Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con la base de datos de secuencias en línea "BLAST", que puede consultarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para homología con otras secuencias 16s-23s bacterianas depositadas. La mejor correspondencia para AHCF fue 45 *Bifidobacterium pseudolongum* ATCC 25526, con valores de homología de 92%. Sin embargo, existen diversas diferencias entre estas cepas y entre cada una de ellas.

Ejemplo 5: Composiciones de ejemplo

Los Ejemplos 1-4 son ejemplos de composiciones de croquetas secas que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* de la presente invención.

50

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
Producto a base 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 (1×10^{10} ufc/g NCIMB 41198 en aceite de girasol)	1	0,5	0,1	0,6

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

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	Hasta 38	Hasta 47	Hasta 50
Hígado de aves de corral	Hasta 25	Hasta 20	Hasta 15
Productos de aves de corral	25	20	20
Arroz para fabricación de cerveza	5	7	10
Producto a base de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de 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 (1×10^{10} ufc/g NCIMB 41198)	4	5	6

5

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

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Leche	82,75	81,9	82,7
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1×10^{10} ufc/g NCIMB 41198)	4	5	6

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The IAMS Company
 Alimentary Health
 Boileau, Thomas
 Ceddia, Michael
 Collins, John
 Davenport, Gary
 Kiely, Barry
 O'Mahony, Liam
 10 Sunvold, Greg
 Tetrick, Mark
 Vickers, Robert
 15 <120> Canine Probiotic Bifidobacteria globosum
 <130> P152&
 <140> No concedida todavía
 <141> 15-12-2004
 20 <150> 60/531,588
 <151> 19-12-2003
 <160> 3
 25 <170> Versión patentada 3.1
 <210> 1
 <211> 556
 30 <212> ADN
 <213> Bifidobacteria Globosum NCIMB 41198
 <220>
 35 <221> característica_var
 <222> (460)..(460)
 <223> n es c, g, a o t.
 <220>
 40 <221> característica_var
 <222> (549)..(549)
 <223> n es c, g, a o t.
 <400> 1
 acgatttggtg ggcgcacggt ggtgcgccga tatggggatg cttccttttc ctggccgtct 60
 ggccgggtgg cgtcccttgc tggctgggaa aagggtcaag ggcctgcgc ccgttggtgt 120
 gtgggtggtg gtggtgtggt gcatgctgtt gggttcccg accgccaggc cccttgctcg 180
 ggggtggtgt ccgttccgc cgtcctggcc gtgcccctgt gtgggggtggg tgcctgggg 240
 ggtgtggtgt ggtggtttga gaactggaga gtggacgcga gcatgaacgg tgtgccctgt 300
 ggggtgtgcc ggggtgtgtc gtactgttga ttttgtcgaa ccgttccatc cccgcctttt 360
 ggggtggggg tgttggtgtg tgttcgcgag tgttttggtg gagccgtcca cgcccggtg 420
 ggtgtgggtg gtgttttagat gatctgatta gttgtcg tan ggtgttccag tgcaagtggc 480
 atggggcccg gggccctttt tgcgggggtg gtgggtttgt tgccatgggc gtatggtgga 540
 atgcctgtnc accacg 556
 45 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 388 739 T3

	<220>		
	<223> Artificial		
5	<400> 2		
	gctggatcac ctcccttc	18	
	<210> 3		
	<211> 18		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Artificial		
15	<400> 3		
	ctggtgccaa ggcattca	18	

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de Bifidobacterium globosum NCIMB 41198, que puede obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tiene actividad probiótica.
- 5 2. La cepa según la reivindicación 1, para mantener o mejorar la salud de un animal de compañía.
3. La cepa según la reivindicación 2, en donde la cepa se selecciona por su capacidad para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal del animal de compañía.
- 10 4. La cepa según la reivindicación 2 o reivindicación 3, para tratar uno o más estados seleccionados de la regulación del sistema inmunológico del animal de compañía, mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento del animal de compañía, mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en el animal de compañía, prevenir la pérdida de peso durante y después de infecciones en el animal de compañía, tratar o prevenir la infección gastrointestinal en el animal de compañía, o tratar o prevenir una afección del tracto urinario en el animal de compañía.
- 15 5. La cepa según la reivindicación 4, para la regulación del sistema inmunológico del animal de compañía, comprendiendo el tratamiento: tratar o prevenir la enfermedad autoinmune en el animal de compañía, tratar o prevenir inflamaciones en el animal de compañía o mezclas de los mismos.
6. La cepa según la reivindicación 4, para mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento del animal de compañía, comprendiendo el tratamiento tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel del animal de compañía.
- 20 7. La cepa según la reivindicación 4, para tratar o prevenir la infección gastrointestinal en el animal de compañía, comprendiendo el tratamiento mejorar la ecología microbiana del animal de compañía, reducir el nivel de bacterias patógenas en las heces del animal de compañía, y mezclas de los mismos.
8. La cepa según la reivindicación 7, en donde las bacterias patógenas se seleccionan de Clostridia, Escherichia, Salmonella, o mezclas de los mismos.
9. La cepa según la reivindicación 4, para tratar o prevenir una afección del tracto urinario en el animal de compañía, en donde la afección del tracto urinario comprende infección del tracto urinario, piedras en el riñón o mezclas de los mismos.
- 25 10. La cepa según la reivindicación 9, en donde el probiótico Bifidobacteria globosum incrementa la degradación de ácido oxálico in vitro.
11. La cepa según cualquiera de las reivindicaciones 4 -10, en donde la cepa se suministra a un animal en una cantidad de 1,0E+04 a 1,0E+12 UFC/animal al día.
12. La cepa según cualquiera de las reivindicaciones 4 -10, en donde el animal de compañía es un perro o un gato.
- 30 13. Una composición que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo.
14. La composición según la reivindicación 13 en forma de una croqueta, un producto para mascar, una galleta, un suplemento alimentario para animales de compañía, jugo, un producto lácteo, una cápsula, una pastilla o un comprimido.
15. La composición según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende al menos 0,001% de 1,0E+04 UFC/g a 1,0E+12 UFC/g de las bacterias ácido lácticas.
- 35 16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde las bacterias Bifidobacterium globosum están en forma de células viables o de células no viables.

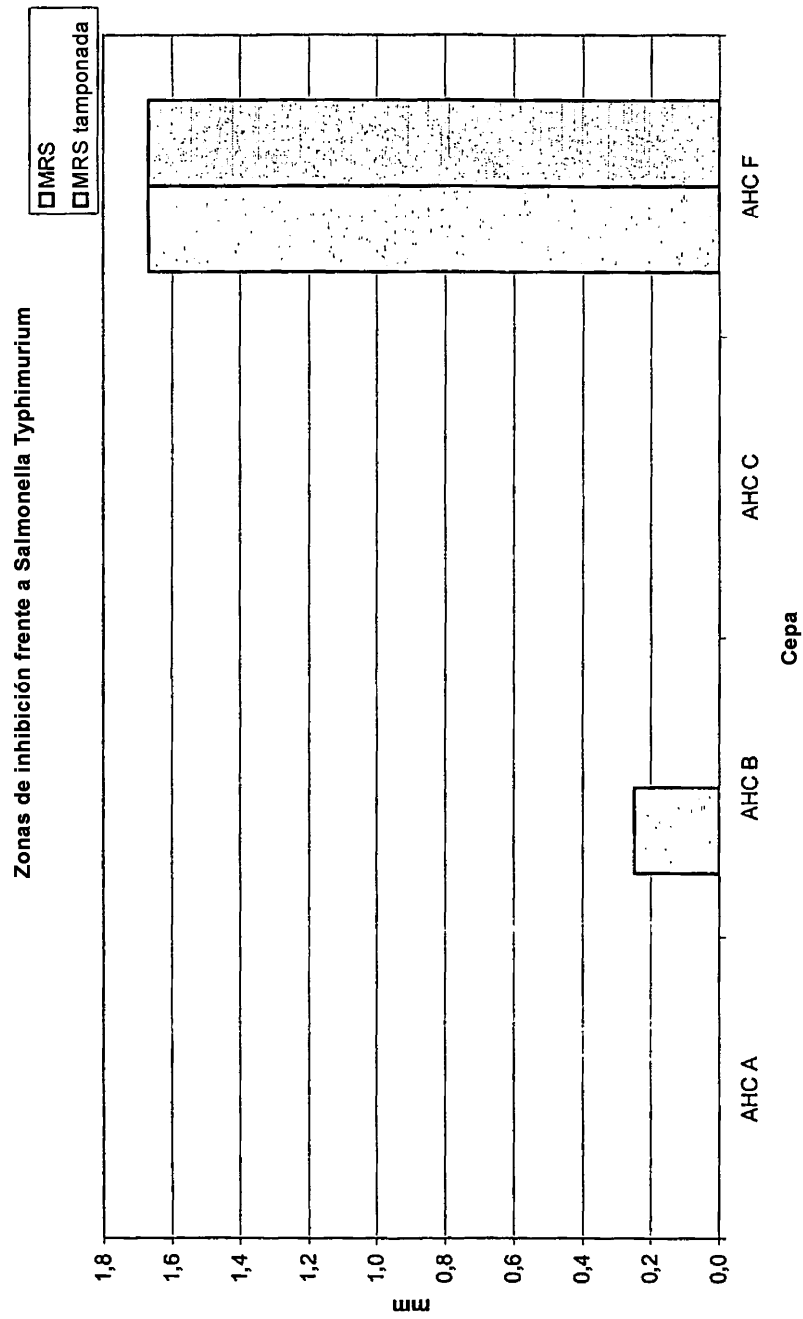


Figura 1.

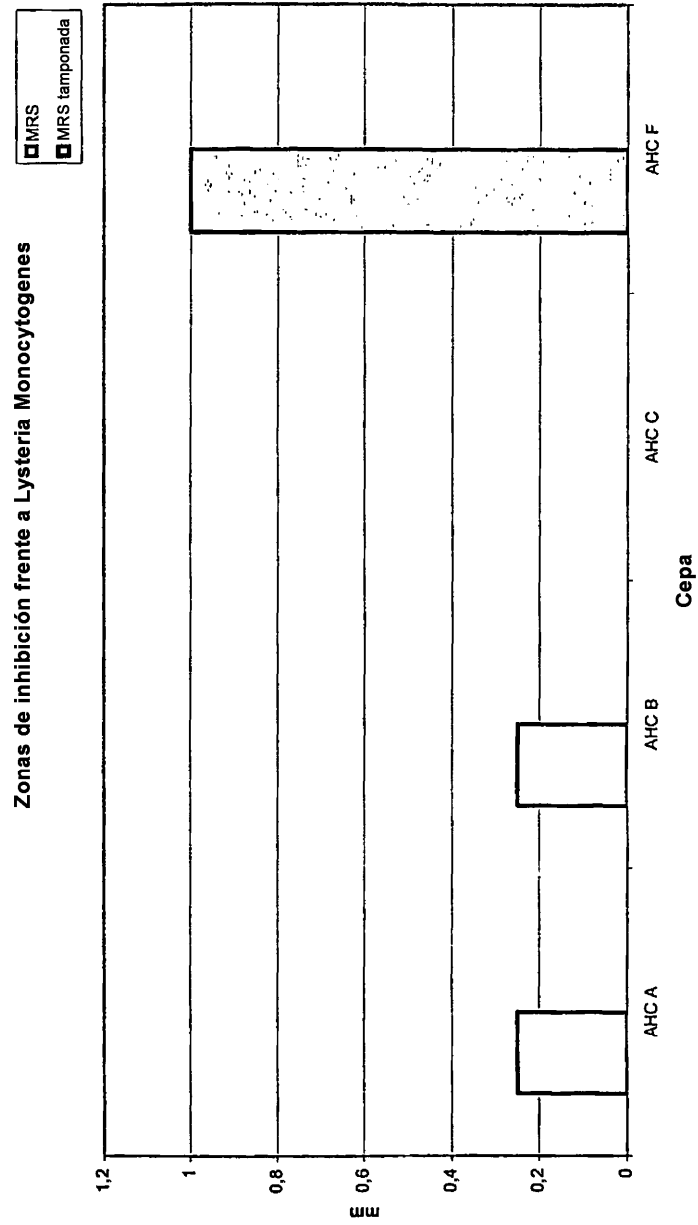


Figura 2.

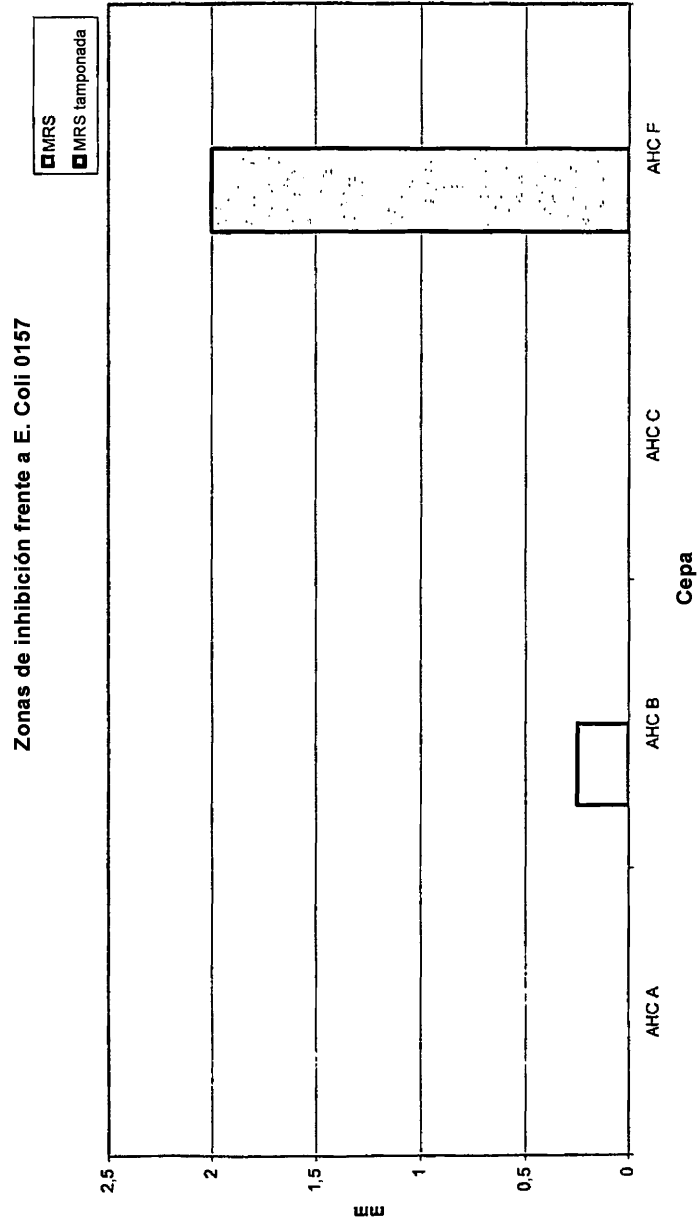


Figura 3.

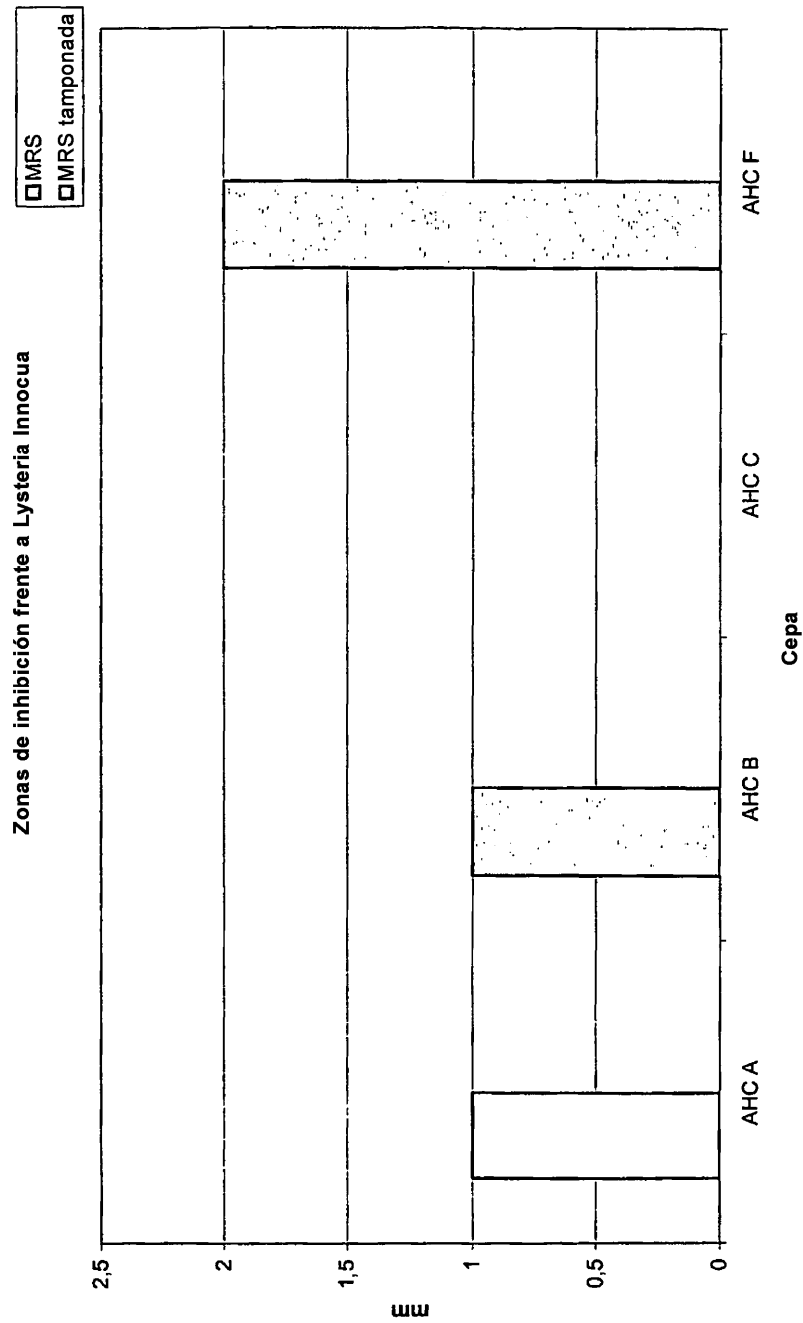


Figura 4.

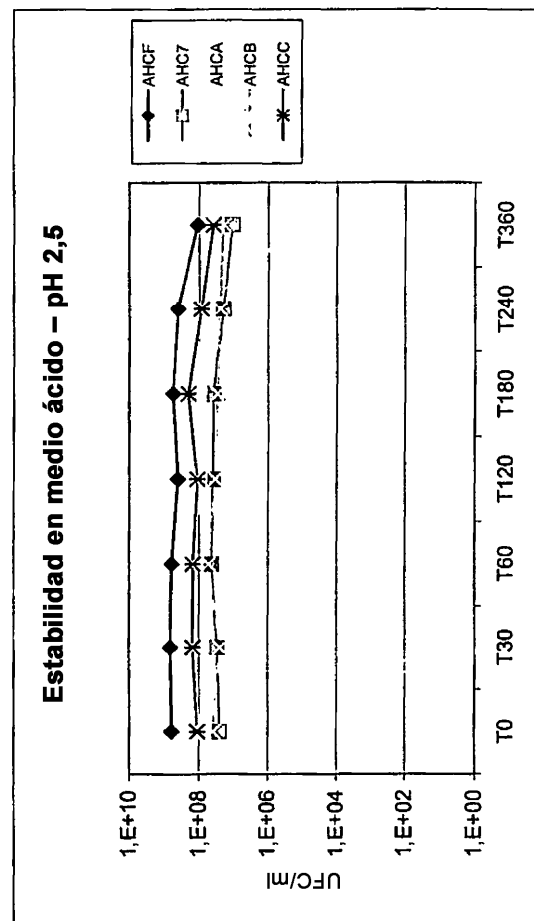


Figura 5.

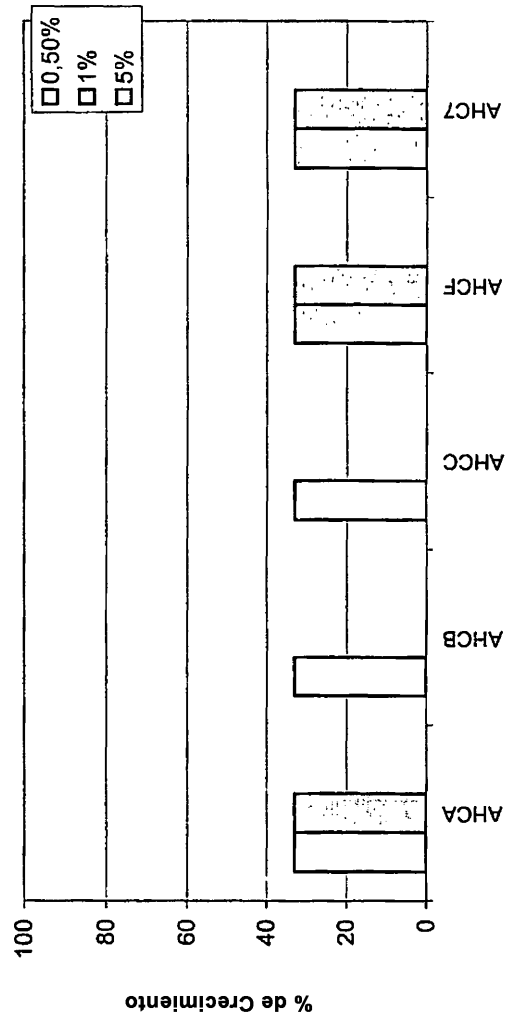


Figura 6.

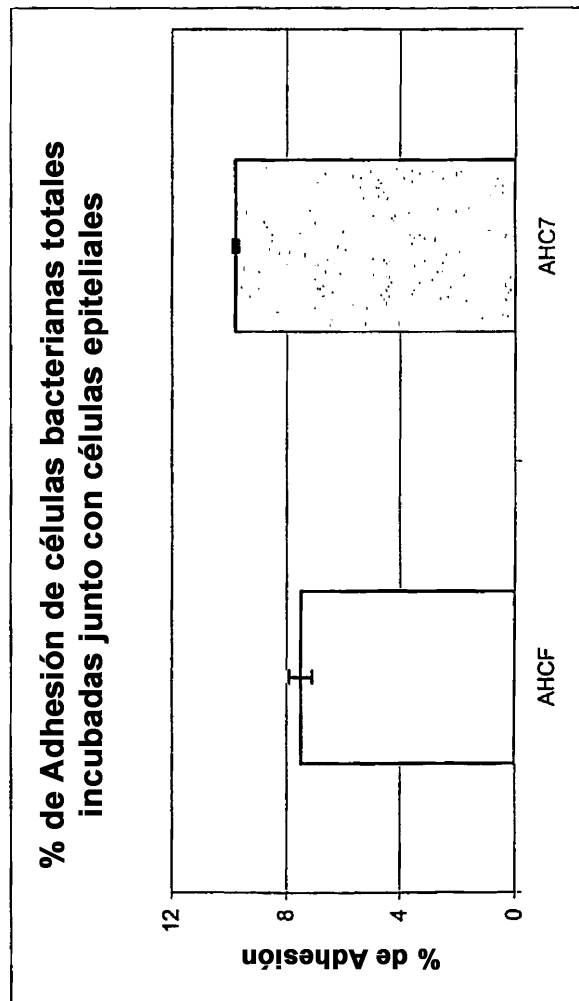


Figura 7.