

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 984**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004 E 04815186 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1718266**

54 Título: **Bifidobacterias pseudolongum probióticas caninas**

30 Prioridad:

**19.12.2003 US 531099 P**

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

**03.12.2014**

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)**  
**One Procter & Gamble Plaza**  
**Cincinnati, OH 45202, US y**  
**ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)**

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**

**ES 2 523 984 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).

## DESCRIPCION

Bifidobacterias pseudolongum probióticas caninas

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la 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 gastrointestinal de la mayoría de mamíferos está colonizado por microflora natural y microorganismos patógenos invasivos. En un individuo saludable, esta microflora competitiva está en estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede producir o evitar muchos trastornos gastrointestinales, en humanos, y en otras especies de mamíferos como animales de compañía incluidos gatos, perros y conejos. El bienestar de los animales de compañía está estrechamente relacionado con su alimentación y salud gastrointestinal, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal en estos animales puede dar como resultado animales domésticos más sanos.

15 El número y composición de la microflora intestinal suele ser estable, aunque la edad y la dieta pueden modificarlo. 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 gastrointestinales 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 desestabilizan el equilibrio de la microflora intestinal y pueden fomentar la inflamación y respuestas inmunitarias aberrantes.

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 gastrointestinal 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 gastrointestinal.

30 En US-1 503 094 A (CRAMER JR STUART W), publicada el 29 de julio de 1924, describe un método profiláctico y de tratamiento de diarrea en perros mediante la administración oral de, al menos, un *Bifidobacterium* seleccionado de *Bifidobacterium pseudolongum* y *Bifidobacterium adolescentis* aislado de los intestinos y/o de las heces de los perros.

35 En EP-0 609 056 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]), publicada el 3 de agosto de 1994, describe composiciones dietéticas de prescripción para animales de compañía que comprenden *Bifidobacterium pseudolongum* SS-24

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

**Sumario de la invención**

45 Se proporciona una cepa de bacterias ácido lácticas de la especie *Bifidobacteria pseudolongum* que puede obtenerse por aislamiento del tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tiene actividad probiótica en los animales.

La cepa de bacterias ácido lácticas es una *Bifidobacteria pseudolongum* que tiene una secuencia de ADN de la región del espacio intergénico 16s-23s que tiene, al menos, 93% de homología con la SEQ. ID n.º 1.

50 En otra realización preferida de la invención la cepa de bacteria ácido láctica es *Bifidobacteria pseudolongum* AHC7 NCIMB 41199.

Además, se proporcionan usos de las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado para mantener y mejorar la salud de las mascotas, y composiciones que comprenden bacterias ácido lácticas.

5 Estas características y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la técnica después de leer la presente descripción.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Salmonella typhimurium* debido a las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

10 La Figura 2 muestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria monocytogenes* debido a las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria innocua* debido a las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli* 0157H45 debido a las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención según la metodología expuesta en el Ejemplo 2.

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

La Figura 6 muestra las características de crecimiento de las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención en presencia de sales biliares porcinas al 0,5%, 1% y 5%.

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

**Descripción detallada de la invención**

Secuencias

SEC. ID n.º 1 – Secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico 16s-23s de *Bifidobacteria pseudolongum* AHC7 (NCIMB 41199).

25 SEC. ID n.º 2 – Secuencias de cebador para el análisis de secuencia de ADN 16s-23s.

Números de depósito bacteriano

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

Cepa	Número de depósito	Secuencia 16s-23s
<i>Bifidobacteria pseudolongum</i> AHC7	NCIMB 41199	SEC. ID n.º 1

30 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.

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.

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

Salvo que se indique lo contrario, el contenido de todas las fuentes bibliográficas a las que se hace referencia en el presente texto se incorpora en su totalidad a la presente memoria a título de referencia.

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

En la siguiente descripción, la abreviatura UFC (“unidades formadoras de colonias”) designa al número de células bacterianas reveladas por recuentos microbiológicos en placas de agar, como se conoce comúnmente 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.

- 5 El término “mutaciones de ADN”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden al menos alteraciones de una sola base que incluyen delecciones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones del ADN conocidas por el experto en la técnica, entre las que se incluyen la modificación genética introducida en una secuencia de aminoácidos o nucleótida precursora mientras se mantiene al menos 50% de homología con la secuencia precursora. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones de ADN tiene al menos un 60%, más preferiblemente al menos 75%, aún más preferiblemente 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/>.
- 10
- 15 El término “modificación genética”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de un organismo o bien mediante la inserción en el genoma de dicho organismo o mediante vectores que incluyen ADN plasmídico o bacteriófago como es conocido por el experto en la técnica, siendo dicha secuencia de ADN de al menos dos bases de ácido desoxirribonucleico de longitud.
- 20 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, “animales de compañía” significa un perro o gato doméstico.

#### Cepas de *Bifidobacteria pseudolongum*

25 El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de *Bifidobacteria pseudolongum* que puede 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.

30

35

40 Se ha descubierto que las cepas de *Bifidobacteria pseudolongum* que pueden obtenerse 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 cree que las *Bifidobacteria pseudolongum* que pueden obtenerse mediante aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado están estrechamente asociadas con los tejidos mucosos del intestino. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esto da lugar a la generación por parte del probiótico *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención de respuestas del huésped alternativas que proporcionan acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas obtenidas mediante aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped a través de la interacción directa del epitelio mucoso, y las células del sistema inmunitario 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 las *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención sean muy eficaces como organismos probióticos.

45

50

55 Las *Bifidobacteria pseudolongum* 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 mediante 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 de ácido láctico de la presente invención preferiblemente tienen actividad antimicrobiana *in vitro* ante *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Eschericia coli*, más preferiblemente una mezcla de estas cepas, más preferiblemente aún, todas estas cepas.

60

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención pueden ser el resultado de un número de acciones diferentes por parte de las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención. Se ha sugerido previamente en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de las muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal tras la ingestión oral al evitar la adherencia de microorganismos patógenos a la mucosa intestinal por oclusión. Esto requiere la ingestión oral de células bacterianas “vivas” o viables para que se pueda establecer una colonia de bacterias en el intestino. Sin embargo, se cree que las *Bifidobacteria pseudolongum* 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 pseudolongum* de la presente invención son capaces de mantener viabilidad después del tránsito a través del tracto gastrointestinal. Esto es deseable para que los cultivos vivos de las bacterias se tomen oralmente, y para que se produzca la colonización en los intestinos y las tripas tras el tránsito por el esófago y el estómago. La colonización de los intestinos y las tripas por las bacterias de ácido láctico de la presente invención es deseable para que se proporcionen los beneficios probióticos al huésped. La dosificación oral de células no viables o purificadas aisladas de la misma induce beneficios temporales, pero puesto que las bacterias no son viables, no pueden crecer, y proporcionan continuamente un efecto probiótico *in situ*. Por consiguiente, esto puede requerir que se dosifique al huésped regularmente para mantener los beneficios para la salud. En contraste, las células viables que pueden sobrevivir al tránsito gástrico en forma viable y, posteriormente, colonizar adhiriéndose y proliferando en la mucosa del intestino pueden proporcionar efectos probióticos continuamente *in situ*.

Por lo tanto, es preferible que las bacterias de ácido láctico de la presente invención mantengan la viabilidad después de la suspensión en un medio que tenga un pH de 2,5 durante 1 hora. El término “mantener la viabilidad”, tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que al menos 25% de las bacterias suspendidas inicialmente en el medio de prueba son viables utilizando la técnica de recuento de colonias conocida por el experto en la técnica. Preferiblemente, “mantener la viabilidad” significa que al menos 50% de las bacterias suspendidas inicialmente son viables. Es deseable que las bacterias de ácido láctico de la presente invención conserven su viabilidad después de ser expuestas a un pH bajo, ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos del estómago y el intestino superior *in vivo* después de la ingesta oral por animales.

Además, es preferible que las bacterias de ácido láctico 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 término crecimiento, tal y como se utiliza 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 en presencia de, al menos, 0,5% de sales biliares porcinas, pueden sobrevivir a las condiciones presentes en el intestino. Se cree que esto es el resultado de la adición de bilis porcina al medio de cultivo simulando las condiciones del intestino.

Además, es preferible que las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención tengan una adhesión significativa a las células epiteliales del intestino *in vitro*. El término “adhesión significativa”, tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que al menos 4% del número total de bacterias de ácido láctico coincubadas con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a las células epiteliales. Más preferiblemente, al menos 6% de las células bacterianas coincubadas 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 de ácido láctico de colonizar el tracto gastrointestinal de un animal *in vivo*.

La secuencia polinucleótica intergénica 16s-23s es conocida por el experto en la técnica como la secuencia de ADN en el genoma bacteriano que se puede utilizar para identificar las especies y cepas de bacterias. Esta secuencia de polinucleótidos intergénica se puede determinar con el método detallado más adelante en el Ejemplo 4.

La cepa de *Bifidobacteria pseudolongum* tiene una secuencia de polinucleótidos intergénica 16s-23s que tiene al menos 93%, preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 99% de homología con la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. ID n.º 1. Más preferiblemente, la cepa de bacterias ácido lácticas tiene una secuencia de polinucleótidos 16s-23s según la SEQ. ID n.º 1. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias ácido lácticas es la cepa *Bifidobacteria pseudolongum* NCIMB 41199 AHC7, o una mutante de la misma.

La cepa de bacterias ácido lácticas del género *Bifidobacteria pseudolongum* obtenida mediante aislamiento del tracto 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. Este beneficio probiótico generalmente mantiene y mejora la salud general del animal. Elementos, no limitadores, de salud animal y fisiología

que se benefician, sea por aliviar terapéuticamente los síntomas o por prevenir enfermedades mediante profilaxis, incluyen desórdenes inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, cánceres (especialmente los de los sistemas gastrointestinal y inmunitario), diarreas, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de articulaciones, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones por hongos, periodontosis, enfermedades urogenitales, trauma asociado a cirugía, metástasis postquirúrgica, sepsis, pérdida de peso, aumento de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, infección de la barrera del intestino, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, y trastornos dermatológicos. El tratamiento preferido es el del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o prevención de la diarrea; regulación del sistema inmunológico, preferiblemente el tratamiento o prevención de la enfermedad autoinmune y la inflamación; mantener o mejorar la salud de la piel y/o del sistema de recubrimiento, preferiblemente tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel; mejorar o reducir los efectos del envejecimiento, incluidos el estado de alerta y los niveles de actividad; y prevenir la pérdida de peso durante y después de una infección.

El tratamiento de los trastornos descritos más arriba se puede medir utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, los trastornos inflamatorios incluyendo las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación se pueden detectar y supervisar utilizando pruebas de la función inmunológica *in vivo* como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de las células asesinas naturales, la respuesta de los anticuerpos a las vacunas, hipersensibilidad retardada y mezclas de las mismas. Estos métodos se describen brevemente en la presente memoria, aunque 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  $2 \times 10^5$  se exponen en un rango de concentraciones (de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 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  $\text{CO}_2$  con 10% de suero fetal bovino (Sigma). A las 54 horas las células se pulsan con 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -timidina, y las células se recolectan y se leen los recuentos por centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.

2. Actividad de las células asesinas naturales: según se describe en US-6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de las células asesinas naturales aisladas a partir de sangre entera fresca de animales de ensayo y control. Las células asesinas naturales son un componente de la función inmunológica de un mamífero. Para evaluar la actividad citotóxica de las células NK se utilizaron células de adenocarcinoma de tiroides canina como células diana. Previamente se había demostrado que esta línea celular es susceptible de ser destruida por las células NK caninas. Las células diana se cultivaron en un matraz T75 con 20 ml de medio esencial mínimo (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Tras la confluencia, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml en medio completo (RPMI-1640+10% FCS+100 U/ml de penicilina+100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina). Con una pipeta, se introdujeron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de las células diana, por triplicado, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.) y se cultivaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. A continuación se añadieron linfocitos (células efectoras; 100  $\mu\text{l}$ ) aisladas mediante separación Ficoll-Hypaque (según se ha descrito anteriormente) a las células diana para proporcionar una relación de efector/célula diana (E:T) de 10:1. Al cabo de 10 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de un sustrato que contenía 5  $\mu\text{g}$  de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La mezcla se cultivó durante 4 horas a 37 °C, tras lo cual se extrajo el MTT no metabolizado mediante aspiración. Los cristales de formazano se disolvieron añadiendo 200  $\mu\text{l}$  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.

- 5 4. Hipersensibilidad retardada: Un método *in vivo* no invasivo, de evaluación del estado del sistema inmunológico. Esta prueba comprende una inyección intradermal del mitógeno policlonal fitohemaglutinina (PHA) junto con glóbulos rojos de ovejas, una vacuna multivalente, histamina (100 µl de fosfato de histamina a una concentración de 0,0275 g/l; Greer, Lenoir, NC) 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.

- 15 Además, se puede determinar la mejora de los efectos de la edad utilizando la absorptometría de rayos X doble 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.

- 20 Las *Bifidobacteria* 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.

- 25 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:

- 30 a) Índice de caída de pelo: a cada sujeto que realiza la prueba se le asigna un índice de caída de pelo recogiendo el pelo producido durante una sesión de cepillado estandarizada. El pelo se guarda y se pesa, y se comparan los sujetos que realizan la prueba con los sujetos de control.
- b) Evaluaciones de la piel/pelaje subjetivas: los participantes en la evaluación, y que disponen de la formación adecuada, evalúan subjetivamente el estado de la piel y el pelaje valorando la caída del pelo, la caspa, el brillo, la uniformidad, la suavidad y la densidad.
- 35 c) Valoración funcional de la piel: la función de barrera de la piel se puede evaluar limpiando la superficie de la piel con una gasa empapada en acetona. Esta técnica desestabiliza de forma eficaz la barrera de la piel al eliminar las capas monocelulares y las fracciones lípidas asociadas de la capa córnea de la epidermis. La desestabilización de la barrera se cuantifica midiendo el aumento en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y el grado de enrojecimiento del sitio dañado utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica. Las puntuaciones de enrojecimiento (eritema) se obtienen utilizando el sistema de cámara e iluminación descrito anteriormente. Las lecturas TEWL y las puntuaciones de enrojecimiento se obtienen inmediatamente antes y después de la desestabilización, y en criterios de evaluación de cinco y 24 horas para evaluar las propiedades protectoras y de curación de la piel.

- 45 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.

Puntuación: 5 Extremadamente seca

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

Puntuación: 4 Firme (deposición ideal)

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

Puntuación: 3 Blanda y definida

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

Puntuación: 2 Blanda, sin forma

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

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, también se registran otras observaciones, incluyendo las siguientes: sangre en la deposición; objeto extraño en la deposición; o mucosidades en la deposición.

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 enumerar 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 se incluyen *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de las mismas.

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 que puede formar precipitados insolubles que producen infecciones en el riñón, 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 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

Las *Bifidobacteria pseudolongum* 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**, págs. 61-65). La digestión de las fibras se puede determinar utilizando el método descrito en Vickers y col. (2001), “Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora”, *Am. J. Vet. Res.* **61** (4), págs. 609-615, con la excepción de que en lugar de inocular utilizando muestras fecales diluidas, cada experimento utilizó cultivos puros de las cepas bacterianas de interés.

El método de uso de las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención de forma típica implica consumo oral por parte del animal. La ingestión oral puede ocurrir como parte de la ingestión alimentaria habitual o como un suplemento de la misma. La ingestión oral de forma típica se produce al menos una vez al mes, preferiblemente al menos una vez a la semana, más preferiblemente al menos una vez al día. Las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* 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. El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, tal y como se utiliza en la presente memoria, en referencia a las bacterias de ácido láctico, significa aquella cantidad de bacterias suficiente para proporcionar el efecto deseado o beneficiar a un animal huésped que necesite un tratamiento, sin embargo, lo suficientemente baja

para evitar efectos adversos como toxicidad, irritación, o una respuesta alérgica, proporcionada con una relación de beneficio/riesgo razonable cuando se utiliza en el modo de la presente invención. La “cantidad terapéutica efectiva” específica variará en función de factores como la condición particular que se está tratando, la condición física del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la forma de dosificación específica que se utilizará, el vehículo empleado, la solubilidad de la forma de la dosis y el régimen de dosificación particular.

Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico se dan a los animales de compañía a una dosis de 1,0E+04 a 1,0E+14 UFC por día, más preferiblemente de 1,0E+06 a 1,0E+12 UFC por día. La composición, preferiblemente, puede contener, al menos, 0,001% de 1,0E+04 a 1,0E+12 UFC/g de las *Bifidobacteria pseudolongum* obtenidas mediante aislamiento del tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado. Las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum* se pueden dar al animal en forma viable o como células destruidas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de fermentación de las bacterias ácido lácticas de la presente invención, o cualquier mezcla de los mismos.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria pseudolongum*, 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. Como se ha indicado anteriormente, la composición puede formar parte de la ingestión alimentaria habitual, o 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 ser incluidos como composiciones usadas en la presente invención, pero son opcionales para los propósitos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones alimenticias son preferiblemente equilibradas nutricionalmente. En una realización, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% de proteína en bruto, preferiblemente de aproximadamente 22% a aproximadamente 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, aproximadamente 15% en peso, ejemplos no limitativos de los cuales 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 no limitativos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y los granos molidos gruesos secos o procesados como grano molido grueso de pescado, grano molido grueso de aves de corral, grano molido grueso de carne, grano molido grueso de huesos y similares. Otros tipos de fuentes de proteínas en bruto adecuadas incluyen gluten de trigo o gluten de maíz y proteínas extraídas de fuentes microbianas como la levadura.

Además, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de grasa, preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia. Adicionalmente, las composiciones alimenticias que comprenden las bacterias de ácido láctico de la presente invención también pueden comprender de aproximadamente 4% a aproximadamente 25% de fibra alimentaria total. Las composiciones también pueden comprender una fuente de almidón múltiple 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 mijo, el sorgo, la cebada, la alfalfa, el trigo, y similares son fuentes ilustrativas. Además, las composiciones pueden también contener otros materiales diferentes tales como suero desecado y otros subproductos lácteos.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención también pueden comprender un prebiótico. El término “prebiótico” incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del animal doméstico y, por lo tanto, estimulan el crecimiento o desarrollo de las bacterias de ácido láctico en el tracto gastrointestinal del animal doméstico a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la inulina y sus productos de hidrólisis comúnmente conocidos como fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligo derivados del almidón. Los prebióticos pueden ser suministrados en cualquier forma que sea adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede ser suministrado en forma de material vegetal que contiene la fibra. Entre los materiales vegetales adecuados se incluyen los espárragos, las alcachofas, las cebollas, el trigo o las achicorías, 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 Orafiti SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo el nombre comercial “Raftiline”. Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftiline (g) ST que es un polvo blanco fino que contiene entre aproximadamente 90% y aproximadamente 94% en peso de inulina, hasta aproximadamente 4% en peso de glucosa y fructosa, y entre aproximadamente un 4% y 9% en peso de sacarosa. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido como el que se obtiene de Orafiti SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial “Raftilose”. Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma

de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos o utilizando microorganismos.

Para 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. Un proceso adecuado se describe en la solicitud de patente europea N.º 0850569. Si se utiliza un microorganismo probiótico, es mejor que el microorganismo recubra o llene el alimento desecado para animales domésticos. Un proceso adecuado se describe en el número de publicación de la patente europea EP-0 862 863.

Para los alimentos húmedos, se pueden utilizar los procesos descritos en US-4.781.939 y US-5.132.137 para producir productos de carne simulada. Pueden usarse también otros procedimientos para producir productos troceados; por ejemplo, cocinado en un horno de vapor. De forma alternativa, los productos en barra se pueden producir emulsionando un material cárnico adecuado para producir una emulsión de carne, añadir un agente gelificante adecuado, y calentar la emulsión de carne antes de ponerla en latas u otros recipientes. Las composiciones alimenticias húmedas típicas pueden comprender de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de proteína, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de grasa, y de aproximadamente 1% a aproximadamente 7% de fibra. Entre los ingredientes no limitativos que se pueden utilizar en las composiciones alimenticias húmedas se incluyen el pollo, pavo, ternera, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de ternera, hígado de pollo, arroz para la elaboración de cerveza, sémola de maíz, grano molido grueso de pescado, huevo, pulpa de remolacha, cloruro, grano molido grueso de lino, cordero, subproductos de la ternera, subproductos del pollo y mezclas de los mismos.

En otra realización, composiciones suplementarias como galletas, productos para masticar, y otras golosinas pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de aproximadamente 20% a aproximadamente 60% de proteínas, o de aproximadamente 22% a aproximadamente 40% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, las composiciones suplementarias pueden comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de grasa, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 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 se incluye el ácido alfa-linoleico, el ácido gamma linolénico, el ácido linoleico, el ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y ácido docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semilla de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linolénico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de semilla de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también se pueden utilizar en los sustratos de recubrimiento a los que se ha hecho referencia anteriormente. El cinc puede ser suministrado en varias 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 una fuente de prebióticos, con un aceite rico en ácido linoleico, como el aceite de semilla de soja, proporciona beneficios inesperados, que sugieren un efecto sinérgico.

En los casos en los que la composición es en forma de salsa de carne, la composición preferiblemente comprende al menos 10% de caldo o consomé, incluyendo ejemplos no limitativos del mismo consomé de verduras de carne de vaca, pollo o jamón. Las composiciones de salsa de carne típicas pueden comprender de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5% de proteína en bruto, de aproximadamente 2% a aproximadamente 5% de grasa en bruto, y de aproximadamente 1% a aproximadamente 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 es en forma de una pastilla, se requieren agentes aglutinantes adecuados para mantener la pastilla en una forma sólida y comprimida. Entre los ejemplos no limitativos de agentes aglutinantes adecuados se incluyen las gomas naturales como la goma xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otros conocidos por el experto en la técnica. Cuando la composición es en forma de una cápsula, la composición preferiblemente está encapsulada utilizando tecnologías conocidas por el experto en la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de materiales de encapsulación adecuados se incluye el poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginatos y gelatina. Las composiciones basadas en yogur pueden comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de proteína, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de carbohidratos, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de fibra, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de grasa y de aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de un vehículo líquido como, por ejemplo, la leche.

## Ejemplos

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

#### Ejemplo 1: Aislamiento de *Bifidobacteria pseudolongum* de tractos gastrointestinales caninos

5 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.

10 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. Se cultivaron anaeróticamente, utilizando el sistema Anaerocult GasPak, durante 24 horas a 37 °C. Se volvieron a aplicar colonias aisladas de las placas MRS o RCA y se cultivaron de nuevo anaeróticamente con 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 50CHL, BioMerieux). Las células recolectadas se lavaron dos veces con tampón de fosfato 0,05 m (pH 6,5) y cisteína-HCl (500 mg/l) seguido de tratamiento sónico. Con centrifugación se eliminaron los residuos celulares. Los sobrenadantes se cultivaron con NaF (6 mg/ml) y iodoacetato de Na (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se paró mediante incubación con hidrocloreto de hidroxilamina (pH 6,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se monitorizó el desarrollo de color tras la adición de HCl (4 m), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (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.

20 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. pseudolongum*.

#### Ejemplo 2: Análisis de actividad antimicrobiana

25 Las cepas bacterianas de *Bifidobacteria pseudolongum* aisladas se cultivaron anaeróticamente en caldo de cultivo TPY. Se cultivaron 2 µl de cada cultivo sobre TPY placas de agar y se incubaron anaeróticamente durante la noche. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Eschericia coli* O157H45 fueron precultivadas durante la noche y se inocularon 100 µl de las mismas en agar fundido (1% volumen/volumen). 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*.

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

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

##### *Tolerancia al pH*

40 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 1 m HCl a pH 2,5. Las células se cultivaron anaeróticamente a 37 °C y se midió su supervivencia a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos usando el método de recuento de placas conocido por el experto en la técnica.

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

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). Se cultivaron placas a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento al cabo 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);

10 ++ (2) – Crecimiento claro, pero no tan bueno como el de los controles (>33% pero <66%);

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

Una vez comparado el crecimiento de las colonias en presencia de sales biliares frente a los controles, se asignan 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 cm<sup>2</sup> a 37 °C en atmósfera humidificada con un contenido de 5% en CO<sub>2</sub> en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) con un contenido de 10% en suero fetal de ternero (FCS), pen/strep, glutamina y fungizona. Para fines experimentales, las células epiteliales se sembraron a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml (3 ml volumen total) por pocillo en 6 placas de cultivo (Sarstedt). Tras una incubación de 7 días, para permitir la diferenciación, las monocapas epiteliales se lavaron con un medio exento de antibióticos conteniendo 10% FCS. A cada pocillo se añadieron suspensiones bacterianas con/in DMEM exento de antibiótico y se cultivaron las células durante 90 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se lavaron las monocapas tres veces con PBS. Se realizó la lisis de las células epiteliales en agua desionizada, y se contó el número de bacterias adheridas empleando el método de recuento de placas conocido por los expertos en la técnica. La adherencia se expresó como porcentaje del número inicial de bacterias en la placa.

30 Como puede verse en la Figura 7, la cepa de *Bifidobacteria pseudolongum* depositada con el NCIMB con el número de registro NCIMB 41199 se adhiere a las células epiteliales del intestino HT-29 a niveles de, al menos, 4%.

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

35 Se tomaron colonias de *Bifidobacteria pseudolongum* de una placa de agar y se volvieron a suspender en un tampón IX PCR, calentado a 96 °C durante 5 minutos, congelando a -70 °C durante 5-10 minutos, descongelando y añadiendo una parte alícuota a un tubo Eppendorf para PCR. Se llevo a cabo un proceso de PCR usando cebadores para el espaciador intergénico (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. Las condiciones del proceso fueron 96 °C durante 1 min (1 ciclo), 94 °C durante 30 sec, 53 °C durante 30 sec, 72 °C durante 30 sec (28 ciclos). La reacción 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 L y R (150 ng/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 (XØ174 *Hae III*, Promega) en un 2% de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio 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 pseudolongum* utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica.

45 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. *Bifidobacterium pseudolongum* ATCC25865, con valores de homología de 92%, fue la mejor correspondencia para AHC 7. Sin embargo, existen varias diferencias entre estas cepas.

Ejemplo 5: Ejemplos de composiciones

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

Ingrediente	Porcentaje sobre un gramaje			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Granos de cereal	Hasta el 100	Hasta el 100	Hasta el 100	Hasta el 100
Subproducto de grano molido grueso de aves de corral	43,5	40	45	35
Grasa de aves de corral	1,28	1,02	1,16	1,35
Producto 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 de cerveza desecada	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monosódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato cálcico	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloruro potásico	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerales	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-Metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloruro sódico	0,03	0,03	0,03	0,03
Probiótico (1 x 10 <sup>10</sup> ufc/g NCIMB 41199 en aceite de girasol)	0,1	0,5	1	0,4

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

Ingrediente	Porcentaje sobre un gramaje		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	Hasta el 38	Hasta el 47	Hasta el 50
Hígado de aves de corral	Hasta el 25	Hasta el 20	Hasta el 15
Productos de aves de corral	25	20	20
Arroz para la elaboración de cerveza	5	7	10
Producto de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de aves de corral	2,9	3,0	3,2
Consomé de pollo	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1
Minerales	0,05	0,1	0,1
Probiótico (1 x 10 <sup>10</sup> ufc/g NCIMB 41199)	4	5	6

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

Ingrediente	Porcentaje sobre un gramaje		
	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 ( $1 \times 10^{10}$ ufc/g NCIMB 41199)	4	5	6

5

Aunque se han ilustrado y descrito ciertas realizaciones de la presente invención, resultará obvio para el experto en la técnica que pueden realizarse otros cambios y modificaciones diferentes.

P153& sequence  
LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Bifidobacterias Probióticas Psudgum Caninas

<130> P153&

<140> No concedida todavía  
<141> 2004-12-15

<150> 60/531099  
<151> 2003-12-19

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 526  
<212> ADN  
<213> Bifidobacterium pseudolongum

<220>  
<221> característica\_var  
<222> (494)..(494)  
<223> n e s a , t , g o c

<220>  
<221> característica\_var  
<222> (510)..(510)  
<223> n e s a , t , g o c

<220>  
<221> característica\_var  
<222> (518)..(518)  
<223> n e s a , t , g o c

<400> 1  
tggggcacgg tagtgcccga tatgggatgc ttcctttcct ggccgtgtgg ccgggtggtg 60  
tcccttgctg gctggaaaaa ggtcaaggcg cctgcgccct tgtggtgtgg gtggacagtg 120  
gtgtggtgca tgctgttggg ttcccggacc gccaggcccc ttgtcggggg tgggtgttccg 180  
ttcccgccgt cctggccgtg ccccttgtgg ggtgggtgcc tgggggtggtg tgggtgtggtg 240  
gtttgagaac tggagagtgg acgcgagcat gaacggtgtg ccttttgggg tgtgccgggt 300  
gtgttcgtac tgttgathtt gtcgaaccgt tccgtgcccc cctttcgggt ggggtgcgtgg 360  
attgtgttcg cgagtgtttt ggtaagcccc ccgcactggt ggtgtgggtg gtgtttaaatt 420  
gatctgatta attgtcgtaa ggtgttccag tgcaagtggc atgggcccgt ggcccccttt 480

ttgcgggggt tggngggttt tttccatggn cgtatggngg aatcct 526

P153& sequence

<210> 2  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial

<400> 2  
gctggatcac ctcctttc 18

<210> 3  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial

<400> 3  
ctggtgccaa ggcattcca 18

2

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de *Bifidobacterium pseudolongum* NCIMB 41199 que puede obtenerse por aislamiento de tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tiene actividad probiótica.
- 5 2. La cepa según la reivindicación 1, que tiene la capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de un animal de compañía, en donde el animal de compañía es un perro o un gato.
3. Una cepa según la reivindicación 1 para mantener o mejorar la salud de un animal de compañía, en donde el animal de compañía es un perro o un gato.
- 10 4. La cepa según la reivindicación 3 para tratar afecciones seleccionadas de la regulación del sistema inmunológico de animales de compañía, mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento de dicho animal de compañía, mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en dicho animal de compañía, prevenir la pérdida de peso durante y después de una infección en dicho animal de compañía, tratar o prevenir la infección gastrointestinal en dicho animal de compañía, tratar o prevenir dolencias del tracto urinario en animales de compañía, o mezclas de los mismos.
- 15 5. La cepa según la reivindicación 4 para la regulación del sistema inmunológico en animales de compañía, que comprende tratar o prevenir la enfermedad autoinmune en dicho animal de compañía, tratar o prevenir la inflamación en dicho animal de compañía o mezclas de los mismos.
- 20 6. La cepa según la reivindicación 4 para mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento de dicho animal de compañía, que comprende tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel de dicho animal de compañía.
- 25 7. La cepa según la reivindicación 4 para tratar o prevenir la infección gastrointestinal en dicho animal de compañía que comprende mejorar la ecología microbiana de dicho animal de compañía, reducir los niveles de bacterias patógenas en las heces de dicho animal de compañía, en donde dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, o mezclas de las mismas.
8. La cepa según la reivindicación 4 para tratar o prevenir dolencias del tracto urinario en animales de compañía, en donde dicha dolencia del tracto urinario comprende infección del tracto urinario, piedras en el riñón o mezclas de las mismas y en donde dicha cepa de *Bifidobacterias pseudolongum* NCIMB 41199 probiótica aumenta la degradación de ácido oxálico *in vitro*.
- 30 9. La cepa según la reivindicación 1 en donde se aumenta la digestión de fibra en dicho animal de compañía.
10. La cepa según la reivindicación 1 en donde se reducen los niveles de estrés en dicho animal de compañía, en donde dichos niveles de estrés se miden determinando el nivel de hormonas de estrés seleccionadas del grupo que consiste en epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol, proteína C reactiva o mezclas de las mismas.
- 35 11. La cepa según la reivindicación 1 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. Una composición que comprende una cepa según la reivindicación 1 y un vehículo.
- 40 13. La composición según la reivindicación 12 en donde dicha composición es un alimento para animales de compañía, preferiblemente un alimento para gatos o un alimento para perros, en donde la composición es un alimento húmedo para animales o un alimento seco para animales.
14. La composición según la reivindicación 13 en donde la composición es en forma de una croqueta, un producto para mascar, una galleta, un suplemento alimentario para animales de compañía, un jugo, un producto lácteo, una cápsula, un comprimido o una pastilla.
- 45 15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 que comprende al menos 0,001% de aproximadamente 1,0E+04 UFC/g a aproximadamente 1,0E+12 UFC/g de las bacterias ácido lácticas.
16. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 en donde las bacterias *Bifidobacterium pseudolongum* están en forma de células viables, células no viables, o las fracciones activas constituyentes de las mismas.

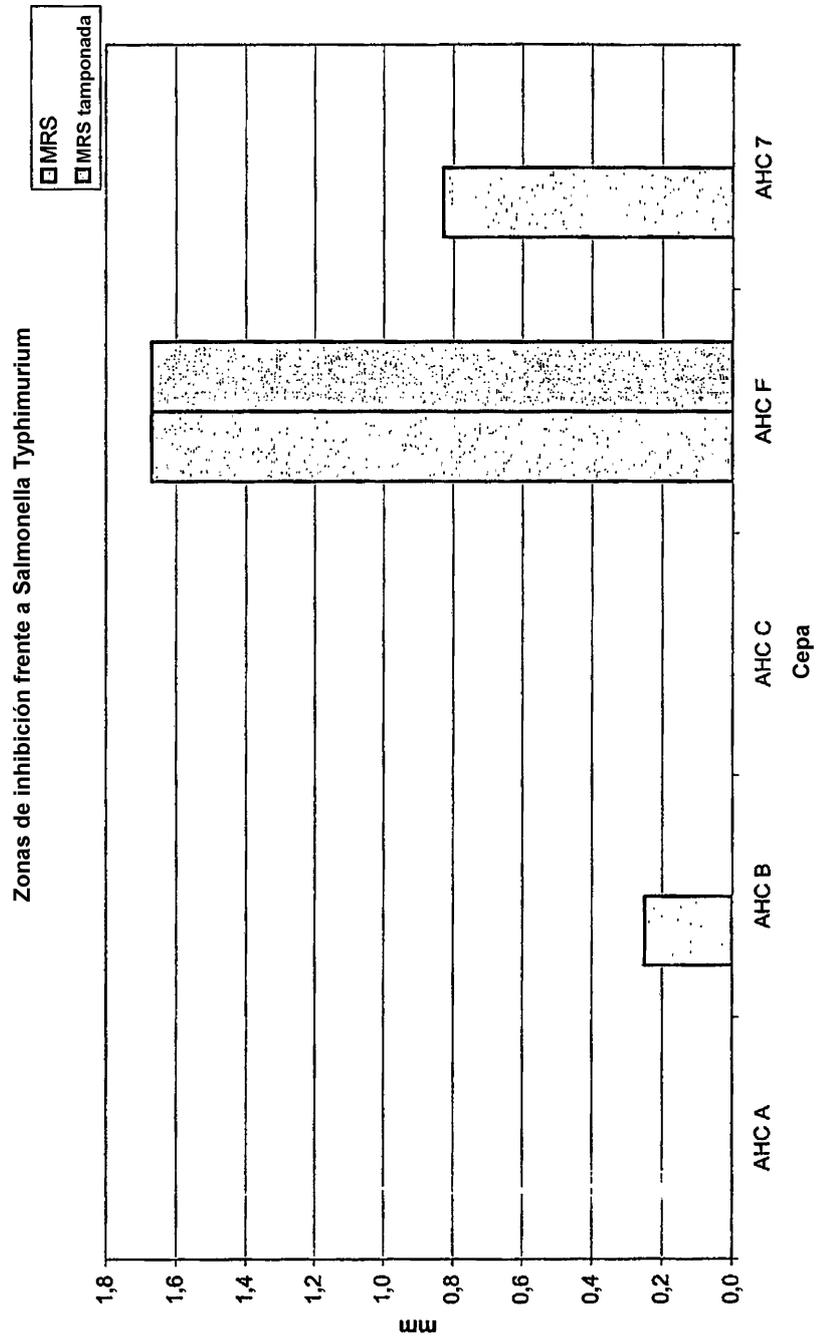


Figura 1.

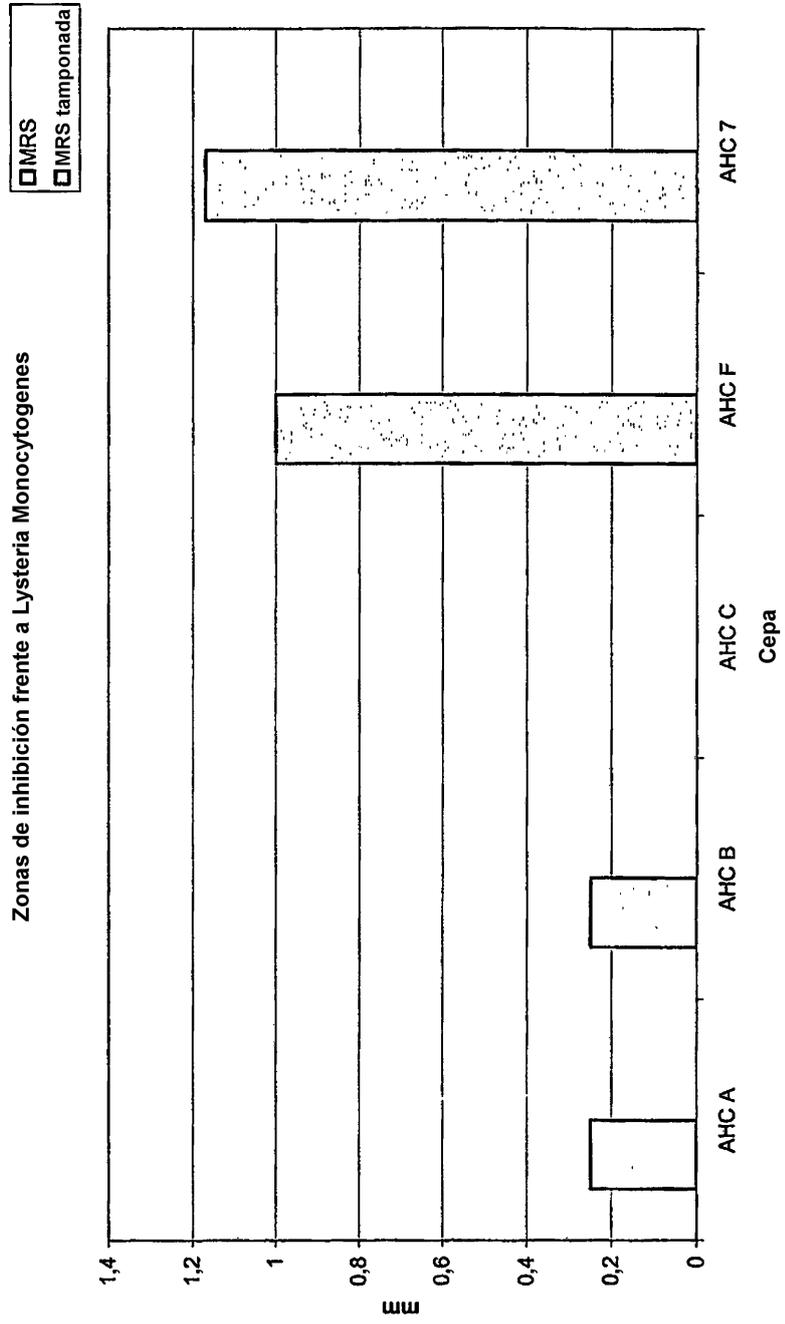


Figura 2.

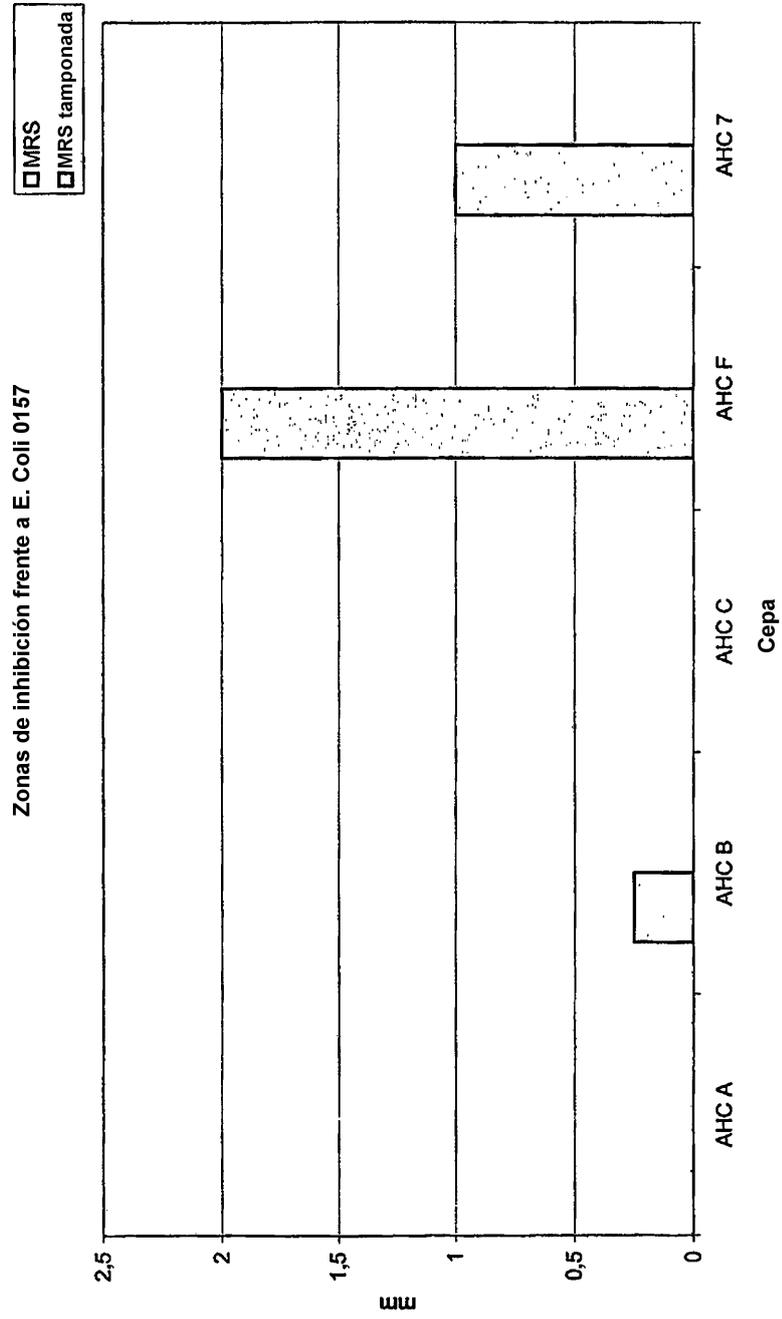


Figura 3.

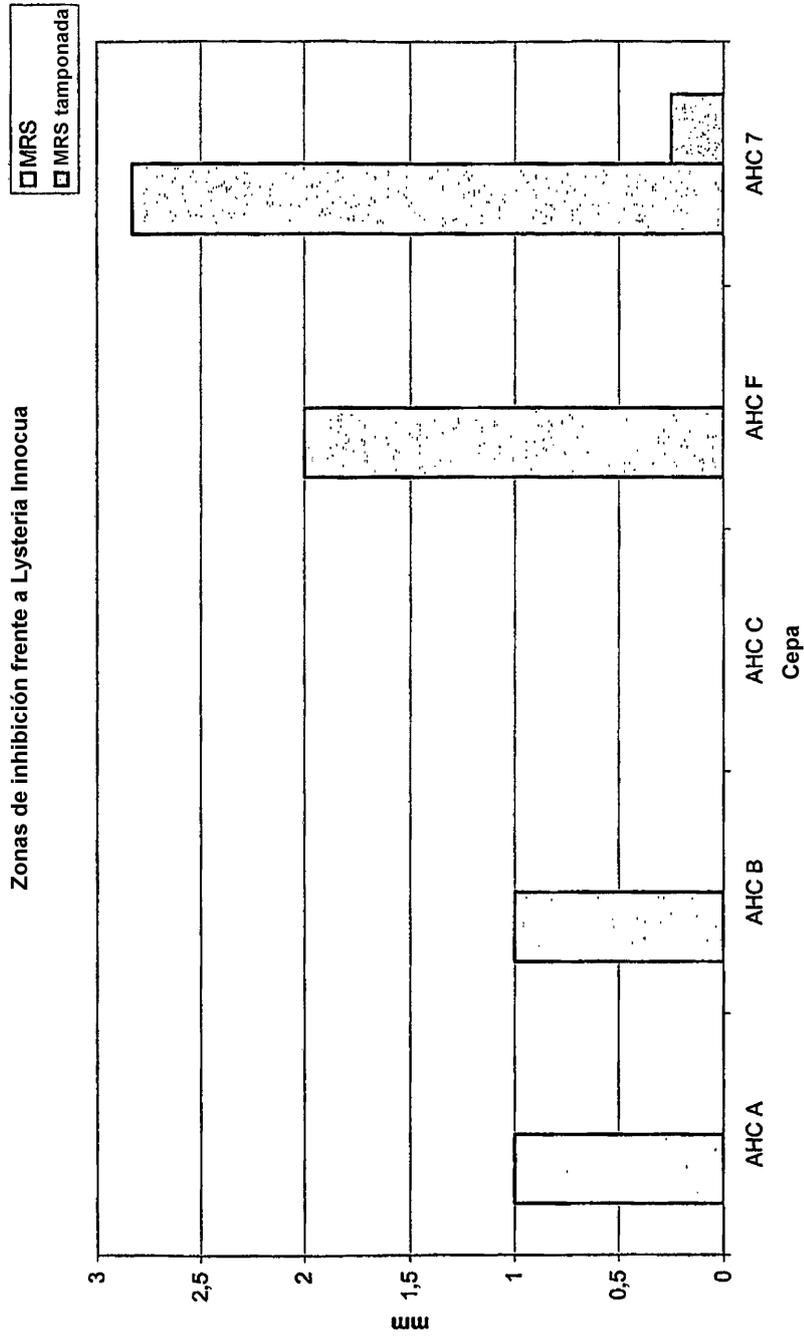


Figura 4.

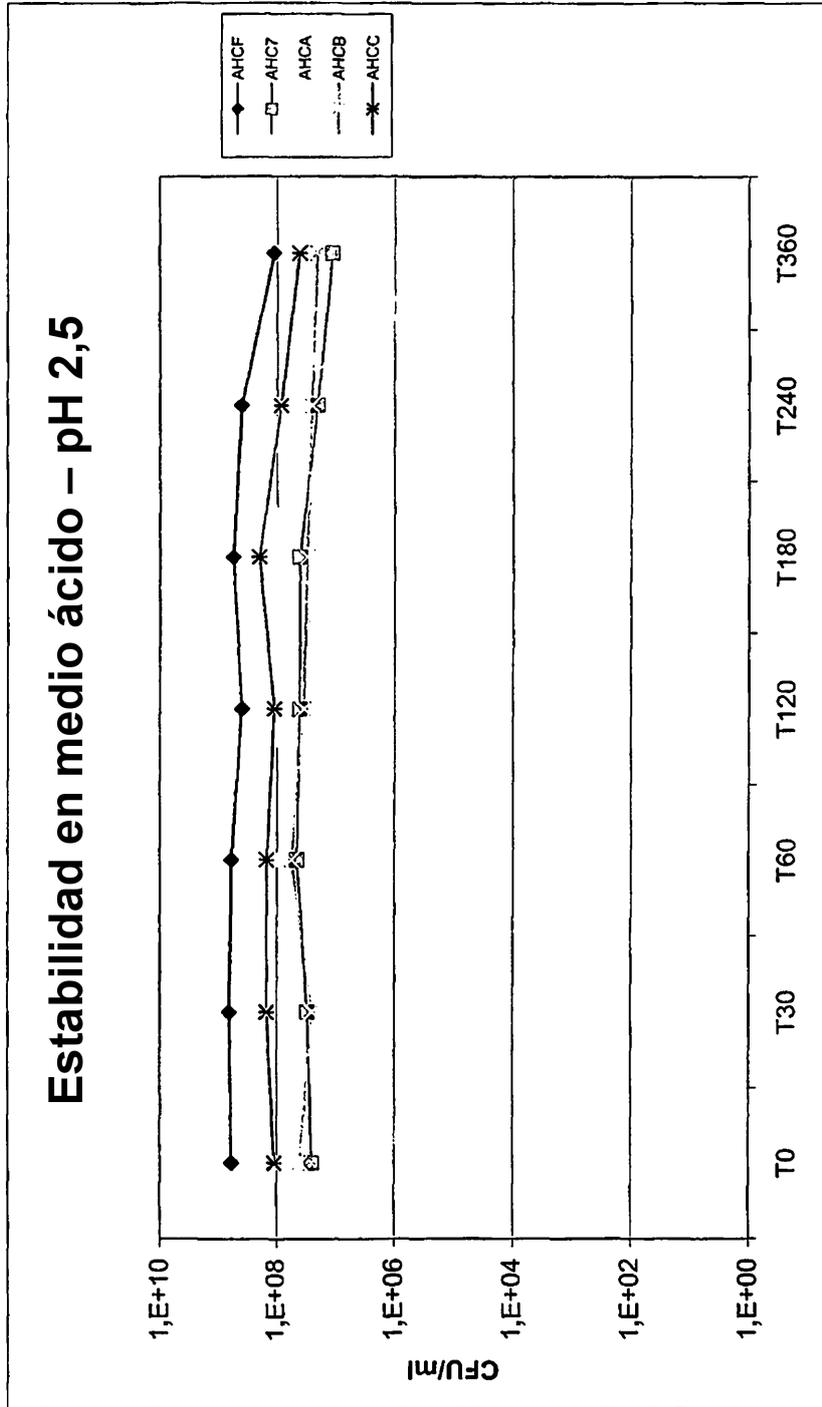


Figura 5.

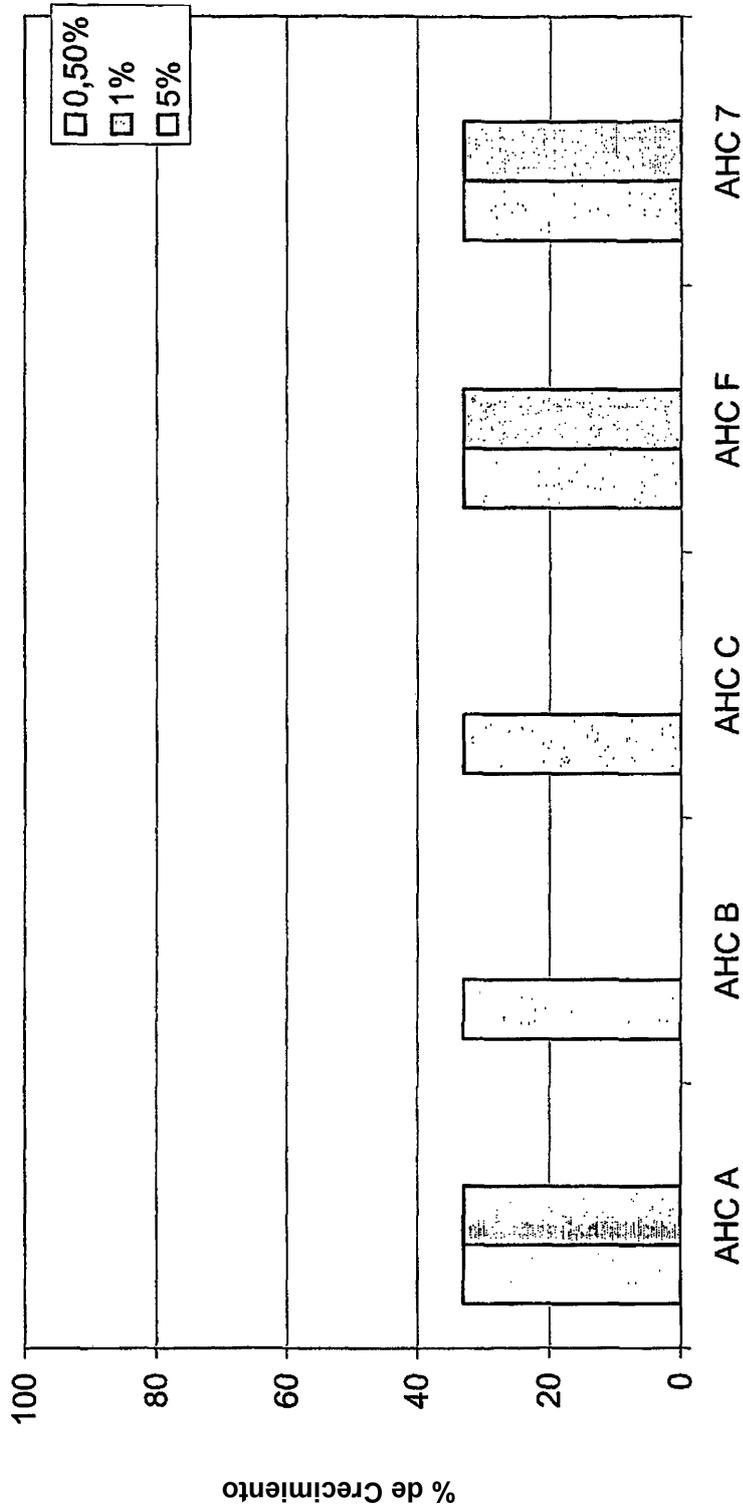


Figura 6.

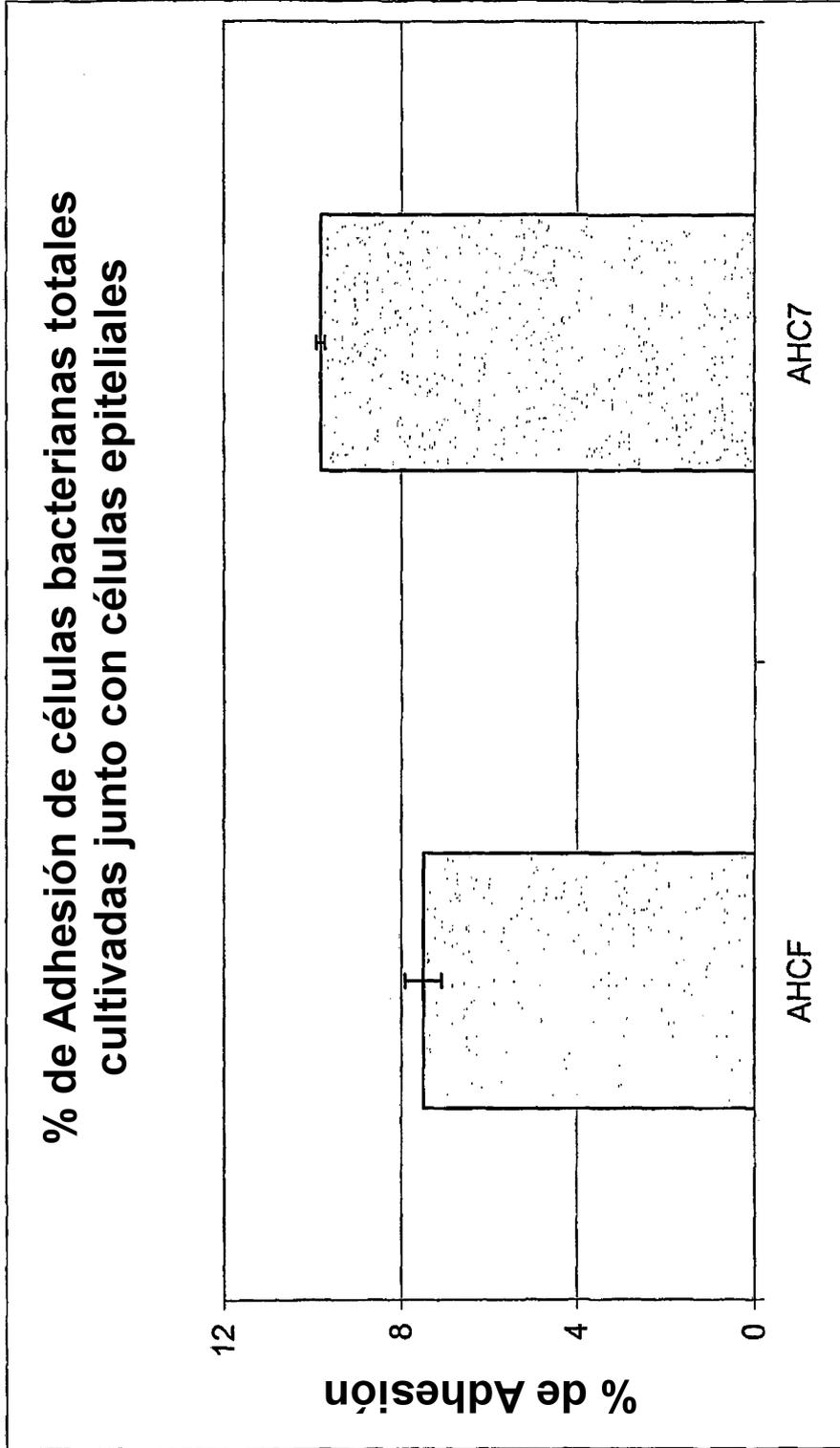


Figura 7.