

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 407**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2013.01)

A23K 1/00 (2013.01)

A23K 1/18 (2013.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10190118 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2449887**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de un producto alimenticio para animales de compañía, el cual contiene microorganismos probióticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2016

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MERCENIER, ANNICK;
PRIOULT, GUÉNOLÉE y
NUTTEN, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 565 407 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de un producto alimenticio para animales de compañía, el cual contiene microorganismos probióticos.

5 La presente invención, se refiere al sector de los productos alimenticios para animales domésticos o de compañía. De una forma particular, la presente invención, proporciona un procedimiento para preparar unas composiciones de productos alimenticios, las cuales comprenden microorganismos orgánicos probióticos, no replicantes (no replicables). Estos microorganismos probióticos no replicantes, son microorganismos probióticos, bioactivos, 10 tratados al calor.

Los beneficios para la salud de los organismos probióticos, se son bien aceptados, mientras tanto, en el arte de la técnica especializada, y éstos se encuentran resumidos, por ejemplo, por parte de Blum et al. en Curr Issues Intest 15 Microbiol. Septiembre del 2003; 4 (2): 53 - 60. A menudo, los probióticos, se administran conjuntamente con prebióticos, en las formulaciones simbióticas, las cuales pueden incluso tener unos beneficios incrementados para la salud.

El bienestar de los animales domésticos o de compañía, se encuentra estrechamente relacionado con su la 20 alimentación de éstos. Una alimentación correcta, debería tener como resultado un animal el cual se encuentre en forma y sano. De una forma adicional a proporcionar un valor nutritivo, la composición nutritiva, tiene una influencia sobre el equilibrio de la microflora intestinal, y ésta puede conducir a desórdenes gastrointestinales, o bien a la prevención de los desórdenes gastrointestinales en cuestión. Así, por lo tanto, los conocimientos existentes sobre el tracto gastrointestinal, y los procesos de digestión de los animales sanos, es parte integrante del entendimiento de una práctica de la alimentación de tipo práctico.

25 A menudo, los trastornos gastrointestinales de los animales caninos y de los animales felinos, se encuentran vinculados al sobrecrecimiento de las bacterias la producción de las enterotoxinas, producidas por bacterias patogénicas.

30 Durante el transcurso de los últimos años, la investigación, en el arte especializado de la técnica, se ha centralizado en algunas valiosas cepas de las bacterias del ácido láctico, y su uso potencial agentes probióticos. Los probióticos, se consideran como siendo preparaciones microbianas viables, las cuales fomentan la salud de los mamíferos, procediendo a preservar la microflora natural en el intestino. Se cree que, los probióticos, atacan a la mucosa intestinal, colonizan el tracto intestinal, y así por lo tanto, previenen o evitan la adherencia de los microorganismos 35 dañinos en ésta. Un requisito previo para su acción, reside en el hecho de que éstos deben alcanzar la mucosa del intestino, de una forma apropiada y viable y que, de una forma especial, éstos no se destruyan, mediante la influencia del bajo valor pH que prevalece en el estómago. De una forma particular, la fisiología del tracto digestivo de los gatos y de lo perros, difiere con respecto al de los seres humanos. Así, por ejemplo, el valor pH medio, en estómago, es el correspondiente a un valor pH de 3,4, para los perros, y de un valor pH de 4,2, para los gatos.

40 La patente estadounidense U S 7 189 390, describe nuevo microorganismos bacterianos del ácido láctico, los cuales se han aislado y se han seleccionado en cuanto a lo referente a su potencial probiótico y para su uso en la preparación de las composiciones alimenticias para animales de compañía o domésticos, pretendidos para mejorar la salud de los animales de compañía o domésticos en cuestión.

45 La patente estadounidense U S 2005 / 0 180 962, describe bacterias probióticas inactivadas, y procedimientos para el uso de las mismas.

50 Puesto que, hasta un porcentaje del 70 % del sistema inmune, se encuentra contenido en el tracto digestivo de los animales, los probióticos, no únicamente ayudan en la salud de la digestión de los animales, sino también, además, en la totalidad del sistema inmune de un animal de compañía o doméstico.

Las bacterias probióticas, según se conoce, son capaces de adherirse a las células intestinales y de excluir las 55 bacterias patogénicas en las células intestinales. Con objeto de poseer esta actividad, las bacterias probióticas, deben permanecer viables en el producto, hasta el momento en el que éste se consuma. Mediante la adición de bacterias vivas, en una croqueta o bizcocho como producto alimenticio para animales domésticos o de compañía, de tal forma que éstas sean viables, hasta que se proceda a al consumo del producto, y que las bacterias en cuestión, lleguen de una forma viable al interior del tracto intestinal, continúa siendo un desafío y, para cumplir con estos requisitos, son necesarios unos esfuerzos técnicos significativos.

60 Sería deseable el hecho tener disponible, una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, la cual sea apta para proporcionar unos beneficios probióticos, incluso después de un prolongado tiempo de almacenaje, bajo unas condiciones críticas para los probióticos en cuestión, de productos alimenticios, al mismo tiempo que, éstas, sean sencillas de preparar. Sería preferible, el hecho de que, la composición alimenticia para 65 animales de compañía o domésticos en cuestión, se lograra mediante la utilización de unos ingredientes los cuales sean de origen natural, y los cuales sean seguros de administrar, que éstos se encuentren exentos de efectos secundarios, y que su incorporación en las composiciones alimenticias para los animales de compañía o domésticos

en cuestión, pueda realizarse de una forma sencilla, mediante la utilización de las técnicas industriales correspondientes al arte especializado de la técnica actual.

5 Sería también deseable, el mejorar adicionalmente el efecto potenciador o estimulante (de la respuesta) inmune de los probióticos, en tales tipos de preparaciones.

Sería también así deseable, así mismo, el mejorar adicionalmente el efecto antiinflamatorio (de la respuesta) inmune de los probióticos, en tales tipos de preparaciones.

10 Los presentes inventores, han abordado esta necesidad. Así de este modo, un objetivo de la presente invención, era el consistente en mejorar el estado actual de arte especializado de técnica, con objeto de proporcionar un procedimiento para la preparación de composiciones alimenticias para animales de compañía o domésticos, los cuales pudieran satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas, arriba.

15 Los presentes inventores, se sorprendieron, al constatar el hecho de que podía cumplirse con este objetivo, mediante el contenido de la exposición descrita en la reivindicación independiente anexa. En las reivindicaciones independientes anexadas, se desarrolla, de una forma adicional, la idea de la presente invención.

20 De una forma correspondientemente en concordancia, los inventores, proponen un procedimiento para proporcionar una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes (no replicables).

25 La presente invención, está dirigida a un procedimiento para la preparación de una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde las 10^6 ufc, hasta las 10^{12} ufc, por servicio, comprendiendo, el citado procedimiento, el proceso de tratar los microorganismos probióticos en cuestión, mediante un tratamiento de alta temperatura / un corto transcurso de tiempo (HTST), a una temperatura correspondiente a un valor comprendido entre los $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de 1 – 30 segundos, o a un tratamiento de una temperatura ultra alta (UHT), a un valor de temperatura, la cual exceda de un valor de $135\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de 1 – 10 segundos, y convirtiendo así, de este modo, a un porcentaje de por lo menos un 90 % de los microorganismos, en microorganismos no replicantes.

35 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la citada composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, comprende un porcentaje de grasa correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 4 %, en peso, hasta un 40 %, en peso, referido al peso en seco, un porcentaje de hidratos de carbono, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 12 %, en peso, hasta un 70 %, en peso, referido al peso en seco, y un porcentaje de proteínas, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 12 %, en peso, hasta un 50 %, en peso, referido al peso en seco.

40 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la citada composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, comprende un porcentaje de grasa correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 10 %, en peso, hasta un 20 %, en peso, referido al peso en seco, un porcentaje de hidratos de carbono, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 30 %, en peso, hasta un 60 %, en peso, referido al peso en seco, y un porcentaje de proteínas, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 20 %, en peso, hasta un 35 %, en peso, referido al peso en seco.

50 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la citada composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, comprende un porcentaje de fibra dietética, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,5 %, en peso, hasta un 40 %, en peso, referido al peso en seco, siendo dicho porcentaje de fibra dietética, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,5 %, en peso, hasta un 30 %, en peso, referido al peso en seco, siendo dicho porcentaje de fibra dietética, de una forma más preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 20 %, en peso, referido al peso en seco, y siendo dicho porcentaje de fibra dietética, de la forma mayormente preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 10 %, en peso, referido al peso en seco.

60 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, se selecciona de entre el grupos consistente en los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, las dietas nutritiva para animales de compañía o domésticos, los suplementos para animales de compañía o domésticos, los premios u obsequios para animales de compañía o domésticos, y los juguetes de productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, tales como los consistentes en juguetes susceptibles de poderse masticar y susceptibles de poderse consumir.

65

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la citada composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, comprende, de una forma adicional, prebióticos, tales como, por ejemplo, los consistentes en la oligofructosa y la inulina.

5 En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, en la citada composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, un porcentaje de por lo menos un 95 %, de los probióticos, son probióticos no replicantes, de una forma preferible, un porcentaje de por lo menos un 98 % de los probióticos, son probióticos no replicantes, de una forma mayormente preferible, un porcentaje de por lo menos un 99 % de los probióticos, son probióticos no replicantes, de una forma todavía más preferible, un porcentaje de por lo
10 menos un 99,9 % de los probióticos, son probióticos no replicantes, y de una forma ideal, la totalidad de los probióticos, son probióticos no replicantes.

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en las bifidobacterias, los lactobacilos, las
15 propionibacterias, o combinaciones de entre éstos, tales como, por ejemplo, los microorganismos de las cepas *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*,
20 *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y / o mezclas de entre éstos.

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en las bifidobacterias, los *Bifidobacterium longum* NCC 3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Bifidobacterium breve* NCC 2950 (CNCM I-3865), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (CNCM I-3446), *Lactobacillus johnsonii* La 1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 (CGMCC 1.3274), *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059 (CNCM I-4153), *Lactobacillus casei* NCC 1825 (ACA-DC 6002), *Escherichia coli* Nissle (DSM 6601), *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 (CNCM I-1198), *Lactococcus lactis* NCC 2287 (CNCM I-4154), ó combinaciones de entre éstos.
25
30

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, la composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, contiene una cantidad de microorganismos no replicantes, correspondientes a un valor de 0,005 mg – 1000 mg, por dosis diaria.
35

Las composiciones alimenticias para animales de compañía o domésticos, comprenden una variedad de composiciones, tales como, por ejemplo, las consistentes en productos alimenticios, dietas nutritivas, suplementos, obsequios o premios, y juguetes susceptibles de poderse masticar y susceptibles de poderse consumir.

40 Los animales de compañía o animales domésticos, comprenden a los animales tales como los consistentes en los perros, los gatos, los pájaros, los conejos, los conejillos de indias, las cabras, las vacas, los caballos, los cerdos, por ejemplo.

Las composiciones, pueden ser productos alimenticios, los cuales tengan una forma apropiada, tales como, por
45 ejemplo, los alimentos líquidos o los alimentos sólidos. Cuando los productos alimenticios son productos alimenticios líquidos, entonces, los microorganismos probióticos no replicantes, pueden mezclarse con los productos alimenticios en cuestión. Cuando los productos alimenticios son productos alimenticios sólidos, entonces, los microorganismos probióticos no replicantes, pueden aplicarse, a modo de recubrimiento, sobre los productos alimenticios en cuestión, o bien, éstos pueden incorporarse en el interior de los productos alimenticios en cuestión, o bien, procederse a
50 ambas cosas. Cuando los microorganismos probióticos no replicantes, se aplican a modo de recubrimiento sobre los productos alimenticios, o bien éstos se incorporan en el interior de éstos, entonces, los microorganismos probióticos en cuestión, pueden dispersarse de una forma homogénea, o bien no de una forma no homogénea, sobre los productos alimenticios, o bien, en el interior de éstos.

55 Las composiciones alimenticias para animales de compañía o domésticos, contienen, de una forma típica, una fracción de hidratos de carbono, una fracción de proteínas, y una fracción de grasas.

Los porcentajes, en caso de que no se indique de otro modo, se tratan de porcentajes en peso (% de peso), en base a la materia en seco.
60

La composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, en concordancia con la presente invención, puede comprender una fracción de hidratos de carbono, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 12 %, en peso, hasta un 70 %, en peso, de una forma preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 16 %, en peso, hasta un 65 %, en peso, de una forma más preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 20 %, en peso, hasta un 60 %, en peso, y de una forma mayormente preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 30 %, en peso, hasta un 60 %, en peso; una fracción de proteínas, correspondiente a un porcentaje
65

comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 12 %, en peso, hasta un 50 %, en peso, de una forma preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 16 %, en peso, hasta un 45 %, en peso, de una forma más preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 18 %, en peso, hasta un 40 %, en peso, y de una forma mayormente preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 20 %, en peso, hasta un 35 %, en peso; y una fracción de grasas, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 4 %, en peso, hasta un 40 %, en peso, de una forma preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 6 %, en peso, hasta un 30 %, en peso, de una forma más preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 8 %, en peso, hasta un 25 %, en peso, y de una forma mayormente preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 10 %, en peso, hasta un 20 %, en peso;

Para algunas composiciones alimenticias para animales de compañía o domésticos, tales como, por ejemplo, las consistentes en regalos (obsequios) o premios, las composiciones alimenticias en cuestión, pueden contener una cantidad de grasa, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde un 1 %, en peso, hasta un 12 % en peso (en base a la materia en seco), de forma típica, en forma de un recubrimiento, para mejorar la palatabilidad o apetitividad.

La composición para animales de compañía o domésticos, puede también comprender una fibra dietética, en una cantidad correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,5 %, en peso, hasta un 40 %, en peso, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,5 %, en peso, hasta un 30 %, en peso, de una forma más preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 20 %, en peso, y de una forma mayormente preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 10 %, en peso (en base a la materia en seco);

Pueden añadirse agentes para el equilibrio nutricional (tales como, por ejemplo, los consistentes en las vitaminas, los minerales, los elementos en trazas (oligoelementos), y las combinaciones de entre éstos. De una forma típica, tales típicos de agentes para el equilibrio nutricional, pueden añadirse en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,01 %, en peso, hasta un 15 %, en peso, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,05%, en peso, hasta un 10 %, en peso, de una forma más preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 5 %, en peso, y de una forma mayormente preferible, en una cantidad correspondiente a porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 1 %, en peso, hasta un 3 %, en peso (en base a la materia en seco);

Las cantidades específicas apropiadas, para cada uno de los ingredientes, en una determinada composición, dependerán de una gran variedad de factores, tales como los consistente en las especies de animales los cuales consumirán la composición en cuestión; dependerán así mismo, también, de los ingredientes particulares incluidos en dicha composición; éstas dependerán, así mismo, también, de la edad, del peso, del estado general de salud, del sexo y de la dieta del animal en cuestión; también dependerán, así mismo de la tasa de consumo por parte de animal en cuestión; y de conceptos por el estilo. Así, de este modo, las cantidades de los ingredientes a emplear, pueden variar de una forma muy amplia, y éstas pueden incluso desviarse de la proporciones las cuales se facilitan aquí, en este documento de solicitud de patente. La selección de tales tipos de componentes y las cantidades de los componentes en cuestión, se encuentran dentro del ámbito de los conocimientos de las personas expertas en el arte especializado de la técnica. Para algunos animales de compañía o domésticos, tales como los consistentes en los perros y en los gatos, la asociación estadounidense de los funcionarios del control de la alimentación (AFFCO – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a American Feed Control Officials] -), proporciona información sobre las cantidades recomendadas para tales tipos de ingredientes.

La fuente de las proteínas alimenticias, puede obtenerse de una variedad de fuentes, tales como las consistentes en las plantas, en los animales, o en ambas. Las proteínas de origen animal, incluyen a la carne, a los subproductos de la carne, a los lácteos, y a los huevos. Las carnes, incluyen a la pulpa de procedente de los animales de volatería, de pescado, y de animales tales como los consistentes en el ganado vacuno, en el los cerdos, en las ovejas, en las cabras y por el estilo. Los subproductos cárnicos, incluyen a los pulmones, a los riñones, al cerebro, al hígado, a los estómagos, y a los intestinos. Los ingredientes de los alimentos proteínicos, pueden también ser, así mismo, los aminoácidos y / o los péptidos. De una forma preferible, el ingrediente alimenticio proteínico, comprende a la carne, a los subproductos de la carne, a los productos lácteos, o a los huevos.

Las fuentes alimenticia de grasa y de hidratos de carbono, puede obtenerse a partir de una gran variedad de fuentes, tales como las consistentes en la grasa de los animales, en el aceite de pescado, en el aceite vegetal, en la carne, en los subproductos de la carne, en los cereales, en otras fuentes animales o de plantas, y en las mezclas de éstos. Los cereales, incluyen al trigo, al maíz, a la cebada y al arroz.

Los ingredientes de la fibra alimenticia, pueden obtenerse a partir de una gran variedad de fuentes, tales como las consistentes en las fuentes de fibras vegetales, tales como, por ejemplo, la celulosa, la pulpa de la remolacha, las cáscaras de los cacahuetes, y la fibra de soja.

De una forma particular, cuando la composición es un producto alimenticio para animales, las vitaminas y los minerales, se encuentran incluidos, de una forma preferible, en las cantidades requeridas para evitar la deficiencia y para mantener la salud. La información sobre estas cantidades, se encuentra fácilmente disponibles en el arte especializado de la técnica. El Consejo Nacional de Investigación (NRC – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a National Council Research] -), proporciona información sobre las cantidades recomendadas de tales tipos de ingredientes, para los animales de granja. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Nutrient Requirements of Swine – Requerimientos nutricionales de los animales porcinos -, (10ª Edición revisada de la National Academy Press, Wash. D.C., 1998), Nutrient Requirements of Poultry – Requerimientos nutricionales de los animales de volatería -, (9ª Edición revisada de la National Academy Press, Wash. D.C., 1994), Nutrient Requirements of Horses, - Requerimientos nutricionales de los caballos -, (5ª Edición revisada de la National Academy Press, Wash. D.C., 1989), etc. La Asociación Americana de los funcionarios del control de la alimentación (AAFCO), proporciona las cantidades recomendadas de tales tipos de ingredientes, para los perros y para los gatos. Véase, a dicho efecto, American Feed Control Officials, Inc., Publicación oficial, páginas 126 - 140 (2003). Las vitaminas las cuales son generalmente de utilidad, como aditivos de los productos alimenticios, incluyen a la vitamina A, a la vitamina B1, a la vitamina B2, a la vitamina B6, a la vitamina B12, a la vitamina C, a la vitamina D, a la vitamina E, a la vitamina H (biotina), a la vitamina K, al ácido fólico, al inositol, a la niacina y al ácido pantotérico. Los minerales y los oligoelementos (elementos de traza) los cuales son generalmente de utilidad, como aditivos para los productos alimenticios, incluyen al calcio, al fósforo, al sodio, al potasio, al magnesio, al cobre, al zinc, a la colina y al hierro.

Las composiciones en concordancia con la presente invención, pueden contener ingredientes adicionales, tales como los consistentes en las vitaminas, en los minerales, en las cargas, en los mejorantes de la palatabilidad o apetitividad, en los agentes ligantes, en los saborizantes o aromatizantes, en los estabilizantes, en los emulsionantes, en los edulcorantes, en los colorantes, en los tampones, en las sales, en los recubrimientos, y por estilo, los cuales son conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Los estabilizadores, incluyen a las sustancias las cuales tienden a incrementar el tiempo de vida de conservación de la composición en cuestión, tales como los consistentes en los conservantes, en los agentes sinérgicos, y en los secuestrantes, en los gases de envasado, en los estabilizantes, en los emulsionantes, en los espesantes, en los agentes gelificantes, y en los humectantes. Los ejemplos de agentes emulsionantes y / o de los agentes espesantes, incluyen a la gelatina, a los éteres de celulosa, al almidón, a los ésteres de almidón, a los éteres de almidón, y a los almidones modificados. Las cantidades específicas para cada componente de la composición, ingrediente alimenticio, y otros ingredientes, dependerá de una gran variedad de factores, tales como los consistentes en los componentes y en los ingredientes particulares los cuales se encuentran incluidos en la composición; la especie del paciente; la edad del paciente, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta; la tasa de consumo del paciente; el tipo de enfermedad la cual se esté tratando (en el caso en que exista alguna), y por el estilo. Así, por lo tanto, las cantidades de los ingredientes, pueden variar ampliamente, y desviarse de la proporciones preferidas, las cuales se describen aquí, en este documento de solicitud de patente. La cantidad de tales tipos de aditivos, en una composición es, de una forma típica, la correspondiente a un porcentaje que va hasta un 5 %, en peso.

Las composiciones, pueden ser, o pueden contener, ingredientes para mantener o para mejorar la salud de un animal, tal como, por ejemplo, las composiciones o los ingredientes consistentes en los suplementos, las medicaciones, la hierbas, los fármacos y composiciones holísticas, y por el estilo.

Los suplementos, incluyen a los alimentos (piensos) los cuales se utilizan con otros alimentos (piensos) para mejorar el equilibrio nutricional o rendimiento del total. Los suplementos, incluyen a las composiciones las cuales se introducen de una forma no diluida, como un suplemento, a otros alimentos (piensos), y que se ofrecen como una libre elección con otras partes de la ración de un animal, las cuales se encuentran a disposición de una forma separada, o diluidas con el alimento o pienso regular del animal, para producir un alimento o pienso completo. La Asociación Americana de los Funcionarios del control de la alimentación (AAFCO) proporciona una discusión referente a los suplementos, en la Publicación oficial de la AAFCO, consistente en la "Feed Control Officials, Inc. Official Publication", página 220 (2003). Los suplementos en cuestión, pueden encontrarse a disposición en varias formas, incluyendo a los líquidos, a los jarabes, a las píldoras, a las composiciones encapsuladas, y por el estilo.

Los obsequios o premios, incluyen a las composiciones las cuales se proporcionan, a un animal, para incitar a un animal, a que éste coma durante un tiempo que no se corresponde con el tiempo o momento habitual de la comida, consistiendo, tales tipos de composiciones del tipo obsequio o premio, por ejemplo, en huesos de perros para los animales caninos. Los obsequios o premios, pueden ser nutritivos, a cuyo efecto, la composición en cuestión, comprende uno o más nutrientes, y éstos pueden tener una composición tal como la que se ha descrito anteriormente, arriba, para un producto alimenticio. Los obsequios o premios no nutritivos, abarcan a cualesquiera otros regalos (obsequios) o premios, los cuales no sean tóxicos. Los microorganismos probióticos no replicantes, se aplican, a modo de recubrimiento, sobre el obsequio o premio, o bien, éstos se incorporan en el interior del obsequio o premio, o bien, ambas cosas.

Los juguetes, incluyen a los juguetes susceptibles de poderse masticar, tales como los consistentes en los huesos artificiales. Los microorganismos probióticos no replicantes, puede formar un recubrimiento sobre la superficie del juguete, o en la superficie de un componente del juguete, el cual se incorpora parcialmente en el juguete, o bien en la totalidad del juguete, o bien ambas cosas a la vez. Los microorganismos probióticos no replicantes, son oralmente accesibles, por parte del animal pretendido como usuario. En la actualidad, existe un amplia gama de juguetes

apropiados comercializados en el mercado, tales como, por ejemplo, los correspondientes a las patentes estadounidense U S nº 5. 339. 771, y U S nº 5. 419. 283, y las referencias citadas en dichas patentes. En dichas patentes, se dan a conocer ambos tipos de juguetes, juguetes parcialmente consumibles, tales como, por ejemplo, juguetes los cuales comprenden componentes plásticos, y juguetes totalmente consumibles, tales como, por ejemplo, cueros crudos y varios huesos artificiales. De una forma adicional, se dan a conocer huesos para ambos tipos de usos, para usos por parte de los humanos y para usos por parte de no humanos, de una forma particular, para su uso por parte de animales de compañía, para su uso por parte de animales de granja, ya para su uso por parte de animales de zoológicos, y de una forma particular, para su uso por parte de perros, para su uso por parte de gatos, o para su uso por parte de pájaros.

En la preparación de las composiciones, los componentes, se ajustan de tal forma que, los microorganismos probióticos no replicantes, se encuentran presentes en la composición, a una concentración de por lo menos un porcentaje del 0,01 %, de una forma preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,01 % a un 4 % de la composición, y de una forma mayormente preferible, en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,5 % a un 2 % de la composición. Los microorganismos probióticos no replicantes, pueden incorporarse en la composición, durante el procesado de la formulación, tal como durante el mezclado y / o después del mezclado de otros componentes de la composición. La distribución de estos componentes, en la composición, se lleva a cabo mediante medios convencionales.

Las composiciones (particularmente, productos alimenticios), pueden prepararse en una forma seca, mediante la utilización de procedimientos convencionales. Los ingredientes secos, incluyendo a las fuentes de proteínas animales, la fuente de proteínas de plantas, los cereales, etc., pueden molerse y mezclarse conjuntamente. La mayor parte de los ingredientes, incluyendo a los aceites, a las grasas, a los aceites, a las fuentes de proteínas animales, etc., se añaden entonces, y se mezclan con la matriz seca. La mezcla, se procesa, a continuación, convirtiéndola en croquetas o bizcochos, o piezas o fragmentos secos similares. Las croquetas o bizcochos, se forman a menudo, mediante la utilización de un procedimiento de extrusión, en el cual, la mezcla de ingredientes secos y húmedos, se somete un procesado mecánico, a una alta presión y una alta temperatura, y ésta se fuerza a pasar a través de pequeñas aperturas, y se corta en croquetas o bizcochos, mediante el uso de un cuchillo rotativo. La croqueta o bizcocho húmedo, se seca, a continuación, y de una forma opcional, ésta se recubre con uno o con más recubrimientos tópicos, los cuales pueden incluir saborizantes o aromatizantes, grasas, aceites, materias e polvo, y por el estilo. Las croquetas o bizcochos, pueden también fabricarse, además, a partir de una masa de pasta, mediante la utilización de un proceso de horneado o cocción, en lugar de utilizar un proceso de extrusión, en donde, la masa de pasta, se coloca en el interior de un molde, antes de proceder al procesado mediante calor seco.

Los microorganismos probióticos no replicantes, pueden añadirse a la composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, en su procedimiento de preparación normal, tal como el consistente en el mezclado, la extrusión, el horneado o cocción y por el estilo, o bien, de una forma preferible, éstos se añaden después de su preparación, post extrusión, tal como mediante una proyección pulverizada (spray) o aplicación de un recubrimiento, sobre la superficie del producto alimenticio en cuestión. Esto es particularmente deseable, para productos alimenticios secos, en donde, los ramales extrusionados, entran en contacto con los microorganismos probióticos no replicantes, (o una solución la cual comprende los microorganismos probióticos no replicantes), mediante un proceso de proyección pulverizada (spray) o mediante la aplicación de un recubrimiento, sobre lo ramales, antes de que los ramales en cuestión, se corten en forma de croquetas o bizcochos, o bien, la croqueta o bizcocho, se pone en contacto con los microorganismos probióticos no replicantes, (o una solución la cual comprende los microorganismos probióticos no replicantes), mediante un proceso de proyección pulverizada (spray) o mediante la aplicación de un recubrimiento, sobre la croqueta o bizcocho, o bien, mediante la inmersión de la croqueta o bizcocho, en sí misma.

Para la aplicación tópica sobre un producto alimenticio, los microorganismos probióticos no replicantes, se mezclan con una composición de soporte, con objeto de facilitar la aplicación sobre la superficie de la composición alimenticia. Así, por ejemplo, un líquido, una suspensión, un gel ligero, o un sólido acuoso, pueden utilizarse, todos ellos, como un portador o soporte, para el compuesto o los compuestos de esta composición. Como aparato para aplicar el compuesto o los compuestos a la superficie de la composición alimenticia, se emplea un aparato de proyección pulverizada (spray), de tipo estándar, o un aparato de inmersión, de tipo estándar. Un ejemplo de tal tipo de portador o soporte, es el consisten en un subproducto animal picado o molido, tratado con proteasa, conjuntamente con aminoácidos, azúcar(es) reductor(es) y tiamina. Se procede, a continuación, a mezclar el portador o soporte con los microorganismos probióticos no replicantes, y esta preparación, se aplica, a modo de recubrimiento, sobre una croqueta o bizcocho, preparando, con ello, un producto alimenticio, seco, muy palatable o apetitoso y aceptable. Los microorganismos probióticos no replicantes, pueden simplemente mezclarse con un mejorante líquido de la palatabilidad o apetitividad, u otra composición saborizante o aromatizante, para crear un nuevo sabor o aroma sabroso, el cual, a continuación, puede aplicarse tópicamente a la composición en cuestión. Los mejorantes comerciales líquidos de la apetitividad o palatabilidad, apropiados para su uso con los microorganismos probióticos no replicantes, incluyen a cualesquiera tipos conocidos o comercialmente disponibles de mejorantes líquidos de la apetitividad o palatabilidad, los cuales se encuentren comercialmente a disposición, en el mercado, de procedencia de los proveedores de mejorantes de la apetitividad o palatabilidad de los alimentos para animales de compañía o domésticos, o de otros saborizantes o aromatizantes, los cuales son en sí mismo conocidos, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica.

Las composiciones (de una forma particular, productos alimenticios), pueden prepararse en una forma enlatada, o en forma húmeda, mediante la utilización de procedimientos convencionales de la elaboración de productos alimenticios para animales de compañía o domésticos. Los tejidos proteínicos de procedencia animal, molidos, (tales como, por ejemplo, procedentes de mamíferos, de animales de aves de corral, de pescado y / o de alimentos marinos – mariscos -), pueden mezclarse con los otros ingredientes, incluyendo a los aceites de pescado, los granos de los cereales, otros ingredientes para el equilibrio nutricional, aditivos para propósitos especiales (tales como, por ejemplo, los consistentes en mezclas de vitaminas y de minerales, sales inorgánicas, celulosa, pulpa de remolacha, agentes o cargas de relleno, y por el estilo). Puede también añadirse, así mismo, agua suficiente para realizar el procesado. Los ingredientes en forma húmeda, de una forma típica, se mezclan en un recipiente apropiado para realizar un proceso de calentamiento, al mismo tiempo que se mezclan los componentes. El calentamiento de la mezcla, puede llevarse a cabo mediante la utilización de cualquier medio apropiado, tal como el consistente en una inyección directa de vapor, o mediante la utilización de un recipiente equipado con un intercambiador de calor. A continuación de la adición del último ingrediente, la mezcla, se calienta a una temperatura correspondiente a un nivel comprendido dentro de unos márgenes que desde los 50 °F hasta los 212 °F. Las temperaturas correspondientes a un nivel el cual se encuentre fuera de estos márgenes, son en principio susceptibles de poderse aceptar, pero éstas podrían ser impracticables, desde el punto de vista comercial, sin el uso de otros auxiliares de procesado. Cuando se calienta a la temperatura apropiada, el material, se encontrará, de una forma típica, en la forma de un líquido espeso. El líquido espeso, se introduce en el interior de latas o tarros. A la lata o tarro, se le aplica una tapa de cobertura, y el recipiente de contención, se sella de una forma hermética. La lata o tarro sellado, se emplaza, a continuación, en un equipo convencional, el cual se encuentra diseñado para esterilizar los contenidos. La esterilización en cuestión, se lleva a cabo mediante el calentamiento a una temperatura correspondientes a un valor superior a los 230 °F, durante un apropiado transcurso de tiempo, el cual dependerá de la temperatura la cual se haya utilizado y de la composición en cuestión.

Para los productos alimenticios húmedos, los microorganismos probióticos no replicantes, pueden incorporarse en el interior de la composición alimenticia húmeda, conjuntamente con un portador o soporte, tal como el consistente en una composición alcohólica (a saber, propilenglicol ó dipropilenglicol), una ciclodextrina, una maltodextrina, o un almidón. De una forma alternativa, los microorganismos probióticos no replicantes, pueden introducirse y mezclarse en los materiales secos, previamente a formar la composición alimenticia húmeda.

Los obsequios o premios, pueden prepararse mediante un procedimiento de extrusión, o de horneado u cocción, similares a los procedimientos los cuales se han descrito anteriormente, arriba, para los productos alimenticios secos. Pueden también utilizarse, así mismo, otros procedimientos, para bien ya sea aplicar la composición saborizante o aromatizante, a modo de recubrimiento, sobre el exterior de la formas existentes del obsequio o regalo, o bien a inyectarla al interior de la forma existente del obsequio o premio.

Los juguetes para animales, se preparan, de una forma típica, procediendo a recubrir cualquier juguete existente, con una composición saborizante o aromatizante, la cual tenga los microorganismos probióticos no replicantes, mezclados en ésta.

La cantidad de microorganismos probióticos no replicantes, en el procedimiento par la preparación de una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, corresponde a una cantidad comprendida dentro de unos márgenes que van desde 10^9 ufc hasta 10^{12} ufc, por servicio.

Obviamente, los microorganismos no replicantes, no forman colonias y, por consiguiente, este término debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes, los cuales se obtienen a partir de 10^4 ufc y 10^{12} ucf / g de bacterias replicantes. Esto incluye a los microorganismos los cuales se encuentran inactivados, los no viables, o muertos, o los cuales se encuentran presentes como fragmentos, tales como, como DNA, o paredes celulares, o compuestos citoplásmicos. En otras palabras, la cantidad de microorganismos la cual contiene la composición, se expresa en términos de capacidad de formación de colonias (ufc), de aquella cantidad de microorganismos, como si la totalidad de los microorganismos se encontrasen vivos, de una forma independiente en cuanto al hecho de si, éstos son, de hecho, no replicantes, tales como inactivados o muertos, fragmentados, o una mezcla de cualesquier de estos estados.

La composición de productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, pueden también, comprender, así mismo, probióticos.

“Prebiótico” significa sustancias alimenticias, las cuales fomentan el crecimiento de los probióticos en los intestinos. Éstos no se descomponen en el estómago y / o en el intestino superior ni se absorben en el tracto GI (tracto gastrointestinal) de la persona la cual los ingiere, sino que, éstos se fermentan mediante la microflora gastrointestinal y / mediante los probióticos. Los probióticos, se definen, por ejemplo, por parte de Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid, en Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, - Modulación dietética de la microbiota colónica humana: Introducción del concepto de prebióticos -, J. Nutr. 1995 125: 1401 - 1412.

Los prebióticos los cuales pueden utilizarse, de una forma particular, no se encuentran limitados, y éstos incluyen a todas la sustancias las cuales fomentan el crecimiento de los probióticos en los intestinos. De una forma preferible,

éstos pueden seleccionarse de entre grupo consistente en los oligosacáridos, los cuales, de una forma opcional, contienen fructosa, galactosa, manosa; las fibras dietéticas, de una forma particular, las fibras solubles, la fibras de soja, la inulina; o mezclas de entre éstos. Los probióticos preferidos, son los fructo-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (IOS), los isomalto-oligosacáridos, los xilo-oligosacáridos, los oligosacáridos de la soja, glicosilucrosa (GS), la lactosucrosa (LS), la lactulose (LA), los palatinosa-oligosacáridos (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), las gomas y / o los hidrolizados de éstas, las pectinas y / o los hidrolizados de éstas.

Los ejemplos típicos de los prebióticos, son los oligosacáridos y la inulina.

La cantidad de prebióticos en la composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, depende de su capacidad para fomentar el desarrollo de las bacterias del ácido láctico. Como norma general, la composición, puede contener una cantidad de tales tipos de prebióticos, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde un 0,1 % hasta un 20 % (en peso, relativo al contenido de materia seca).

Se da a conocer una composición para animales de compañía o domésticos, la cual comprende, por ejemplo, una cantidad de probióticos no replicantes, correspondiente a una tasa de por lo menos 10^3 ufc, por g de prebiótico, siendo dicha cantidad, de una forma preferible, la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes que van desde 10^4 ufc / g hasta 10^7 ufc / g de prebiótico.

Los inventores, se sorprendieron al constatar el hecho de que, por ejemplo, en términos de un efecto de potenciación inmune y / o en términos de un efecto antiinflamatorio, los microorganismos probióticos no replicantes, puede incluso ser más efectivos que los microorganismos probióticos replicantes.

Este hecho, es sorprendente, puesto que, los probióticos, se definen, a menudo, como "microorganismos vivos", los cuales, cuando se administran en unas cantidades apropiadas, confieren unos beneficios saludables al huésped (véase, a dicho efecto, las instrucciones facilitadas por las organizaciones internacionales FAO / WHO – (FAO, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Food and Agricultura Organization of the United Nations – [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura], y WHO, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a World Health Organization –[Organización Mundial de la Salud] -). La amplia mayoría de la literatura que se ha publicado, correspondiente a la arte de la técnica especializada, aborda el tema de los probióticos vivos. De una forma adicional, diversos estudios, han investigado los beneficios para la salud proporcionados por las bacterias no replicantes y, la mayoría de ellos, indican el hecho de que, la inactivación de los probióticos, por ejemplo, mediante un tratamiento de calor, conduce a una pérdida de sus supuestos beneficios para la salud (véase, a dicho efecto, Rachmilewitz, D., et al., 2004, Gastroenterology,- Gastroenterología -, 126: 520 - 528; Castagliuolo, et al., 2005, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43: 197 - 204; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, Br. J. Nutr. 86: 285 -2 89; Kaila, M., et al., 1995, Arch. Dis. Child 72: 51 - 53.). Algunos estudios, mostraron el hecho de que, los probióticos muertos, pueden contener algunos efectos para la salud (véase, a dicho efecto, Rachmilewitz, D., et al., 2004, Gastroenterology, - Gastroenterología - 126: 52 - 528; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, Br. J. Nutr. 86: 285 - 289), pero, de una forma clara, los probióticos vivos, se vieron, en el arte especializado de la técnica, hasta el momento, como siendo los más rendibles.

Los microorganismos probióticos "no replicantes" (o no replicables), incluyen a las bacterias probióticas, las cuales se han tratado mediante calor. Esto incluye a los microorganismos los cuales se encuentran inactivados, muertos, que no son viables, y / o que éstos se encuentran presentes como fragmentos, tales como los consistentes en el DNA, los metabolitos, los compuestos citoplásmicos, y / o materiales de paredes celulares.

" No replicante" (o no replicable); significa el hecho de que no pueden detectarse células viables y / o unidades de formación de colonias, mediante los procedimientos clásicos de replicación microbiológica en placas. Tales tipos de replicación micrológica en placas, se encuentran resumidos en el libro especializado de microbiología, escrito publicado por parte de James Monroe Jay, Martin J. Loessner, y David A. Golden. en el año 2005, con el título de Modern food microbiology -, Microbiología moderna de los alimentos -, 7ª Edición, Springer Science, New York, N. Y. de 790 páginas. De una forma típica, la ausencia de células viables, puede exhibirse del siguiente modo: no existen colonias visibles sobre las placas de agar, o no existe ninguna turbidez incrementante en el medio líquido de crecimiento, después de la inoculación mediante diferentes concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicantes") e incubación bajo unas condiciones apropiadas (en una atmósfera aeróbica y / o anaeróbica, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 24 horas).

Los probióticos, se definen como "Preparaciones celulares microbianas, o compuestos de células microbianas con un efecto beneficioso para la salud o el bienestar del huésped". (Véase, a dicho efecto, Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined", - Probióticos: Cómo de deben definirse éstos -, Trends Food Sci. Technol. (Tendencias de la Tecnología de la Ciencia Alimentaria), 1999: 10 107 - 10).

Las composiciones, pueden comprender microorganismos probióticos y / o microorganismos probióticos no replicantes, en una cantidad la cual sea suficiente como para producir, por lo menos parcialmente, un beneficio para la salud. Una cantidad apropiada para lograr dicho beneficio, se define como "una cantidad terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este propósito, dependerán del número un gran número de factores, los cuales son conocidos por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como los

consistentes en el peso corporal y en el estado general de salud del animal, y del efecto de la matriz del producto alimenticio.

5 En las aplicaciones profilácticas, las composiciones, se administran, a un consumidor el cual sea susceptible de poder sufrir un trastorno o desorden, o de otro modo, el cual se encuentre en riesgo de sufrirlo, en una cantidad la cual sea suficiente como para por lo menos reducir parcialmente el riesgo de sufrir del desorden o trastorno en cuestión. Tal cantidad, se define como siendo "una dosis profiláctica efectiva". De un nuevo, otra vez, las cantidades precisa, dependerán del número un gran número de factores, tales como los consistentes en el peso corporal y en el estado general de salud del animal, y del efecto de la matriz del producto alimenticio.

10 Aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, serán capaces de ajustar la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis profilácticamente efectiva, de una forma apropiada.

15 De una forma general, la composición, puede contener microorganismos probióticos no replicantes, en una dosis terapéuticamente efectiva, y / o en una dosis profilácticamente efectiva.

20 Así, por ejemplo, la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis profilácticamente efectiva, puede ser la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales se encuentran situados entre los 0,005 mg – 1000 mg de microorganismos probióticos no replicantes, por dosis diaria.

25 Se da a conocer el hecho de que, los microorganismos no replicantes, pueden encontrarse presentes en una cantidad equivalente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes los cuales van desde 10^4 ufc hasta las 10^9 ufc /g de composición en seco, e incluso de una forma más preferible, en una cantidad equivalente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes situados entre 10^5 ufc y 10^9 ufc / g de composición en seco.

30 Los probióticos, pueden convertirse en no replicantes, mediante cualquier procedimiento el cual sea conocido en el arte especializado de la técnica.

35 Las tecnologías las cuales se encuentran hoy en día a disposición, para convertir las cepas probióticas en no replicantes son, de una forma usual, las consistentes en un tratamiento de calor, la irradiación y, la luz UV, o bien el uso de agentes químicos (formalina, paraformaldehído).

40 En términos de cantidades numéricas, por ejemplo, los microorganismos no replicantes tratados las consistentes en "una alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo", pueden encontrarse presentes en la composición, en una cantidad correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes situados entre 10^4 y 10^{12} equivalentes de ufc / g de composición en seco.

45 Sería preferible el hecho de utilizar una técnica para convertir los probióticos en no replicantes, el cual sea relativamente sencillo de aplicar, en unas circunstancias industriales, en la industria alimentaria.

50 La mayoría de los productos los cuales se encuentran hoy en día disponibles en el mercado, y que contienen probióticos, se tratan mediante calor, durante su proceso de producción. Sería así por lo tanto conveniente, el hecho de poder tener la capacidad de tratar los probióticos mediante calor, bien ya sea conjuntamente con el producto producido, o por lo menos, de una forma similar, mientras que, al mismo tiempo, se conserven o se mejoren sus propiedades beneficiosas, o que incluso ganen una nueva propiedad beneficiosa para el consumidor.

55 Sin embargo, no obstante, la inactivación de los microorganismos probióticos, mediante tratamientos por calor, se encuentra asociada, según la literatura especializada, de una forma general, con por lo menos una pérdida parcial de la actividad probiótica.

60 Los presentes inventores, han encontrado ahora, de una forma sorprendente, el hecho de que, la conversión de los microorganismos probióticos en no replicantes, tal como, por ejemplo, mediante un tratamiento de calor, no tiene como resultado una pérdida de los beneficios para la salud de lo probióticos en cuestión, sino que, muy al contrario, ello puede mejorar los beneficios existentes para la salud, e incluso generar nuevos beneficios para la salud.

65 Así, de este modo, se da a conocer una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, en donde los microorganismos probióticos no replicantes, se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento de calor.

70 Tal tipo de tratamiento por calor, puede llevarse a cabo a una temperatura correspondiente a un valor de por lo menos 71,5 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 1 segundo.

75 Los tratamientos por calor durante un prologado transcurso de tiempo, o los tratamiento por calor durante un corto transcurso de tiempo, son los que pueden utilizarse.

80 A escalas industriales, se prefieren, hoy en día, de una forma usual, los tratamientos de calor durante un corto transcurso de tiempo, tales como los consistentes en los tratamientos por calor del tipo UHT (de sus iniciales en

idioma inglés, correspondientes a Ultra High Temperature – [Temperatura ultra alta] -). Esta clase de tratamiento por calor, reduce el tiempo de procesado, reduciendo, con ello, el deterioro de los nutrientes.

5 Los inventores, han demostrado, por primera vez, el hecho de que, los microorganismos probióticos, tratados por calor, a unas altas temperaturas, durante unos cortos transcurros de tiempo, exhiben unos perfiles inmunes antiinflamatorios, de una forma independiente con respecto a sus propiedades iniciales. De una forma particular, mediante la utilización de este tratamiento por calor, o bien se desarrolla un nuevo perfil antiinflamatorio, o bien se mejora un perfil antiinflamatorio ya existente.

10 Es por lo tanto ahora posible, el poder generar microorganismos probióticos no replicantes, con perfiles antiinflamatorios, mediante la utilización de unos parámetros específicos del tratamiento mediante calor, el cual corresponda a los típicos tratamientos por calor industrialmente aplicables, incluso si las contrapartes u homólogos vivos, no son cepas antiinflamatorias.

15 El tratamiento de alta temperatura, puede ser un tratamiento del de tipo de alta temperatura / corto transcurso de tiempo (HTST – [de sus iniciales en idioma inglés], o bien un tratamiento del tipo de temperatura ultra alta (UHT – [de sus iniciales en idioma inglés] -).

20 Los microorganismos, pueden someterse a un tratamiento de alta temperatura, a un nivel de 120 °C – 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 1 – 30 segundos.

Este tratamiento de alta temperatura, convierte a los microorganismos, por lo menos en parte, en no replicantes.

25 El tratamiento de alta temperatura, puede llevarse a cabo a la presión atmosférica normal, pero éste puede también llevarse a cabo a una alta presión. La presión típica, es la correspondiente a una presión comprendida dentro de unos márgenes los cuales van desde 1 bar hasta 5 bar, siendo ésta, de una forma preferible la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 1 – 10 bar y, de una forma más preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 2 bar hasta 5 bar. Obviamente, se prefiere el hecho de que, los probióticos, se traten mediante calor, en un medio, el cual o bien se trate de un líquido, o bien se trate de sólido, cuando se procede a aplicar el calor. Una presión ideal a ser aplicada, dependerá así, por lo tanto, de la naturaleza de la composición a la cual se agregarán los microorganismos, y de la temperatura que se utilice.

35 El tratamiento de alta temperatura, puede llevarse a cabo a una temperatura correspondiente a un valor comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 120 – 140 °C.

40 El tratamiento de alta temperatura, puede llevarse a cabo durante un corto transcurso de tiempo, comprendido entre los 1 – 30 segundos, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente a un transcurso de tiempo de 5 – 15 segundos.

45 Estos determinados rangos de tiempo establecidos, se refieren al transcurso de tiempo durante el cual, los microorganismos probióticos, se someten a la determinada temperatura establecida. Deberá tomarse debida nota, en cuanto al hecho de que, en dependencia de la naturaleza y de la cantidad de la composición en la cual se agregan los microorganismos, y en dependencia de la arquitectura del aparato de calentamiento el cual se utilice, puede diferir el tiempo de la aplicación del calor.

50 La composición y / o los microorganismos, se tratan mediante un tratamiento de alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo (HTST – [de sus iniciales en idioma inglés] -), o mediante un tratamiento de temperatura ultra alta (UHT – [de sus iniciales en idioma inglés] -).

55 El tratamiento de UHT, es un tratamiento de calentamiento consistente en un procesado a temperatura ultra alta, o un tratamiento de calentamiento consistente en un tratamiento a ultra calor (tratamiento ultra-térmico) (ambos abreviados como UHT), el cual involucra la esterilización, por lo menos parcial, de una composición, procediendo a calentar dicha composición, durante un corto transcurso de tiempo, de alrededor de 1 – 10 segundos, a una temperatura la cual exceda de 135 °C (275 °F), la cual es la temperatura que se requiere para matar a las esporas bacterianas, en la leche. Así, por ejemplo, el hecho de procesar la leche de este modo, mediante unas temperaturas las cuales excedan de los 135 °C, permite al proceder a reducir la carga bacteriana en el necesario tiempo de retención (hasta 2 – 5 segundos), facilitando una operación de flujo continuo.

60 Existen dos tipos principales de sistemas de UHT: el sistema directo y el sistema indirecto. En el sistema directo, los productos, se tratan mediante la inyección de vapor, o mediante la infusión de vapor, mientras que, en el sistema indirecto, los productos, se tratan mediante calor, mediante la utilización de un intercambiador de calor de placas, mediante un intercambiador de calor tubular, o mediante un intercambiador de calor de superficie raspada. Las combinaciones de los sistemas de UHT, pueden aplicarse en cualquier etapa o en múltiples etapas, en el proceso de preparación del producto.

65

- Un tratamiento de HTST (de alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo – [HTST, de sus iniciales en idioma inglés correspondientes a High Temperature / Short Time] -) se define del siguiente modo: Procedimiento de pasteurización, diseñado con objeto de lograr una reducción correspondiente a un valor de 5 log, eliminando (matando) a un porcentaje del 99,9999 % del número de microorganismos viables en la leche. Esto se considera como siendo apropiado para destruir casi la totalidad de los fermentos o levaduras, de los hongos o mohos, y las bacterias usuales de la putrefacción, y así mismo, también, para asegurar una apropiada destrucción de los organismos patógenicos usuales resistentes al calor. En los procesos de HTST, la leche, se calienta a una temperatura de 71,7 °C (161 °F), durante un transcurso de tiempo de 15 – 20 segundos.
- Se da a conocer el hecho de que, la pasteurización “flash” (de evaporación instantánea), consiste en un procedimiento de pasteurización por calor de las bebidas percederas, tales como las consistentes en los jugos de frutas y de vegetales, la cerveza, y los productos lácteos. El procedimiento en cuestión, se lleva a cabo previamente a proceder a llenar los recipientes de contención, con objeto de matar o eliminar los microorganismos de la putrefacción, con objeto de convertir a los productos en más seguros en cuestión, en más seguros y ampliar, con ello, su tiempo de vida de conservación. El líquido, se mueve en forma de un flujo continuo controlado, mientras que éste se somete a unas temperaturas correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 71,5 °C (160° F) hasta los 74 °C (165 °F), durante un transcurso de tiempo que va desde los 15 segundos hasta los 30 segundos.
- Se da a conocer el hecho de que, el término “tratamiento de alta temperatura y reducido transcurso de tiempo”, debe incluir a los tratamientos de alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST), los tratamientos de UHT, y la pasteurización “flash” (de evaporación instantánea),
- Puesto que, tal tipo de tratamiento por calor, proporciona probióticos no replicantes, con un perfil antiinflamatorio mejorado; la composición en cuestión, puede ser para su uso en la prevención o el tratamiento de los trastornos o desórdenes inflamatorios.
- Los trastornos o desórdenes inflamatorios, los cuales pueden tratarse o prevenirse mediante la composición en concordancia con la presente invención, no se encuentran particularmente limitados. Así por ejemplo, éstos pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en las inflamaciones agudas, tales como las sepsis o septicemia; las quemaduras; y la inflamación crónica, tal como la consistente en la enfermedad inflamatoria del intestino, tal como, por ejemplo, las consistentes en la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerante, la reservoritis; la enterocolitis necronizante; la inflamación de la piel, tal como la consistente en la inflamación de la piel inducida por la radiación UV, o la inflamación de la piel inducida por agentes químicos, es eczema, la piel reactiva; el síndrome de intestino irritable, la inflamación de los ojos; la alergia, el asma; y las combinaciones de entre éstos.
- Se dan a conocer tratamientos los cuales convierten a los microorganismos prebióticos en no replicantes, tales como los consistentes en un tratamiento por calor, pueden llevarse a cabo a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 70 °C – 150 °C, durante un transcurso de tiempo el cual se encuentra comprendido entre los 3 minutos y las 2 horas, pudiéndose llevar a cabo, de una forma preferible, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 80 °C – 140 °C, durante un transcurso de tiempo el cual se encuentra comprendido entre los 5 minutos y los 40 minutos.
- Mientras que, la tecnología correspondiente al arte anterior de la técnica especializada, enseña el hecho de que, las bacterias convertidas en no replicantes, mediante la utilización de tratamientos de alta temperatura durante un prolongado transcurso de tiempo, de una forma usual, son menos eficientes que las células vivas, en términos de ejercer sus propiedades probióticas, se ha demostrado el hecho de que, los probióticos tratados mediante un tratamiento de calor, durante un prolongado transcurso de tiempo, son superiores, en cuanto a lo referente a sus propiedades de estimular el sistema inmune, en comparación con sus homólogos vivos.
- Se da también a conocer, así mismo, una composición la cual comprende microorganismos probióticos, los cuales se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento por calor, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 70 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 3 minutos.
- Los efectos potenciadores o estimulantes inmunes de los probióticos no replicantes, se han confirmado, mediante una elaboración del perfil inmunológico *in vitro*. Este modelo *in vitro* utilizado, hace uso de la elaboración de los perfiles de las citocinas, procedentes de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs), y ésta es bien aceptada, en el arte especializado de la técnica, como un modelo estándar, para los tests de ensayo de los compuestos inmunomoduladores (véase, a dicho efecto, Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research, - Diario de la investigación de los lácteos -, 70, 165 - 173; Taylor et al., 2006, Clinical and Experimental Allergy, - Alergia clínica y experimental -, 1227 - 1235; Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, - Diario de gastroenterología -, 14, 1192 - 1203).
- En ensayo de PBMC (células mononucleares de la sangre periférica), *in vitro*, se ha venido utilizado por parte de diversos autores / equipos de investigación, por ejemplo, para clasificar los probióticos, en concordancia con su perfil inmune, a saber, en concordancia con sus características antiinflamatorias o proinflamatorias (véase a dicho efecto, el trabajo de Kekkonen et al., 2008, en World Journal of Gastroenterology, - Diario mundial de la gastroenterología –

, 14, 1192 - 1203). Así, por ejemplo, este ensayo , ha mostrado el poder permitir la predicción de un efecto antiinflamatorio, de los candidatos probióticos, en modelos de ratón de la colitis intestinal (véase, a dicho efecto, el trabajo de Foligne, B., et al., 2007, World J. Gastroenterol., - Diario mundial de la gastroenterología -, 13: 236 - 243). De una forma adicional, este ensayo, se utiliza, de una forma regular, como referencias de lectura, en ensayos clínicos, éste ha mostrado conducir a resultados los cuales son coherentes con las conclusiones clínicas (véase, a dicho efecto, el trabajo de Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research, - Diario de investigación de los lácteos -, 70, 165 - 173; Taylor et al., 2006, en Clinical and Experimental Allergy, - Alergia clínica y experimental -, 36, 1227 - 1235).

Las enfermedades alérgicas, se han venido incrementando de una forma ininterrumpida, con respecto a las décadas pasadas, y estas se consideran, en la actualidad, por parte de la WHO (Organización Mundial de la Salud), como siendo enfermedades epidémicas. De una forma general, la alergia, se considera como siendo el resultado de un desequilibrio entre las respuestas de las células Th1 y TH2 del sistema inmune, y que conduce a una fuerte tendencia hacia la producción de los mediadores de la células Th2. Así, por lo tanto, la alergia, puede mitigarse, regularse a la baja, o prevenirse o evitarse, procediendo a restaurar un equilibrio apropiado entre los brazos Th1 y Th2 del sistema inmune. Esto implica la necesidad de reducir las respuestas celulares Th2, o de intensificar, por los menos de una forma transitoria, la respuestas celulares Th1. Éstas últimas, serían características de una respuesta potenciadora inmune, a menudo acompañada de, por ejemplo, unos altos niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-12. (véase, a dicho efecto, los trabajos de Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, - Diario mundial de la gastroenterología -, 14, 1192 - 1203; y de Viljanen M. et al., 2005, Allergy, - Alergia -, 60, 494 - 500).

La composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, permite así, de este modo, el poder tratar o prevenir los trastornos los cuales se encuentran relacionados con una defensa inmune la cual se encuentre comprometida.

Así, por consiguiente, los trastornos ligados a una defensa inmune comprometida, los cuales pueden tratarse o prevenirse, no se encuentran particularmente limitados. 33

Así, por ejemplo, éstos pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en las infecciones, de una forma particular, las infecciones víricas, las infecciones fúngicas y / o las infecciones por parásitos; las deficiencias de fagocitos; unos niveles bajos o graves de inmunodepresión, tales como aquéllos inducidos por estrés o por fármacos inmunodepresivos, la quimioterapia o de radioterapia; los estados naturales o sistemas inmunes menos inmunocompetentes, tales como aquéllos de los neonatos o recién nacidos; las alergias; y las combinaciones de entre éstos.

La composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, permite así mismo, también, el mejorar o incrementar la respuesta inmune del animal, a las vacunas, de una forma particular, de las vacunas por vía oral.

Por lo menos un porcentaje del 90 % de los probióticos, son no replicantes, siendo dicho porcentaje de probióticos no replicantes, de una forma preferible, de por lo menos un 95 %, de una forma más preferible, de por lo menos un 98 %, de la forma mayormente preferible, de por lo menos un 99 %, de una forma ideal, de por lo menos un 99,9 % y, de la forma la más ideal, la totalidad de éstos son no replicantes.

Se da a conocer el hecho de que, la totalidad de los microorganismos, son no replicantes.

Así, por consiguiente, en la composición en concordancia con la presente invención, por lo menos un porcentaje del 90 % de los probióticos, pueden ser no replicantes, pudiendo ser dicho porcentaje de probióticos no replicantes, de una forma preferible, de por lo menos un 95 %, de una forma más preferible, de por lo menos un 98 %, de la forma mayormente preferible, de por lo menos un 99 %, de una forma ideal, de por lo menos un 99,9 % y, de la forma la más ideal, la totalidad de éstos podrán ser probióticos no replicantes.

Para los propósitos de la presente invención, pueden utilizarse todos los microorganismos probióticos.

Así, por ejemplo, los microorganismos probióticos, pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en las bifidobacterias, los lactobacilos, las propionibacterias, ó las combinaciones de entre éstos, tales como, por ejemplo, los *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y / o las mezclas de entre éstos.

La composición en concordancia con la presente invención, comprende, por ejemplo, microorganismos probióticos seleccionado de entre el grupo consistente en los *Bifidobacterium longum* NCC 3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Bifidobacterium breve* NCC 2950 (CNCM I-3865), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (CNCM I-3446), *Lactobacillus johnsonii* La 1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 (CGMCC 1.3274), *Lactobacillus reuteri*

DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059 (CNCM I-4153), *Lactobacillus casei* NCC 1825 (ACA-DC 6002), *Escherichia coli* Nissle (DSM 6601), *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 (CNCM I-1198), *Lactococcus lactis* NCC 2287 (CNCM I-4154), o las combinaciones de entre éstos.

- 5 La totalidad de estas cepas, o bien se depositaron según el Tratado de Budapest y / o bien éstas se encuentran comercialmente disponibles en el mercado.

Las cepas, se depositaron según el Tratado de Budapest, del siguiente modo:

- 10 *Bifidobacterium longum* NCC 3001: ATCC BAA-999
Bifidobacterium longum NCC 2705: CNCM I-2618
Bifidobacterium breve NCC 2950 CNCM I-3865
Bifidobacterium lactis NCC 2818: CNCM I-3446
15 *Lactobacillus paracasei* NCC 2461: CNCM I-2116
Lactobacillus rhamnosus NCC 4007: CGMCC 1.3724
Streptococcus thermophilus NCC 2019: CNCM I-1422
Streptococcus thermophilus NCC 2059: CNCM I-4153
Lactococcus lactis NCC 2287: CNCM I-4154
20 *Lactobacillus casei* NCC 4006: CNCM I-1518
Lactobacillus casei NCC 1825: ACA-DC 6002
Lactobacillus acidophilus NCC 3009: ATCC 700396
Lactobacillus bulgaricus NCC 15: CNCM I-1198
Lactobacillus johnsonii La1 CNCM I-1225
Lactobacillus reuteri DSM17983 DSM17983
25 *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 ATCC55730
Escherichia coli Nissle 1917: DSM 6601

Las cepas denominadas como ATCC, se depositaron en el Depósito de Patentes de la ATCC, (ATCC Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, USA.

- 30 Las cepas denominadas como CNCM, se depositaron en la COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (COLECCIÓN NACIONAL DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS) (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15, Francia

- 35 Las cepas denominadas como CGMCC, se depositaron en el organismo China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, (Centro de Colección General de Cultivos Microbiológicos, Instituto de Microbiología, Academia China de las Ciencias), Zhongguancun, P.O.Box2714, Beijing 100080, China.

- 40 Las cepas denominadas como ACA-DC, se depositaron en el organismo Greek Coordinated Collections of Microorganisms, Dairy Laboratory, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, - Colecciones Griegas Coordinadas Microorganismos, Laboratorio de lácteos, Departamento de la Ciencia y de la Técnica de los Alimentos, Universidad Agrícola de Atenas -, 75, Iera odos, Botanikos, Atenas, 118 55, Grecia.

- 45 Las cepas denominadas como DSM, se depositaron en la institución DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, - Colección Alemana de Microorganismos y Estructuras Celulares GmbH (DSMZ)-, Inhoffenstr. 7 B¹, 38124 Braunschweig, ALEMANIA.

- 50 Aquellas personas expertas en el arte de la técnica especializada, entenderán el hecho consistente en que, éstos pueden combinar libremente todos los aspectos de la presente invención, los cuales se han descrito aquí, en este documento, sin salirse del ámbito de la presente invención, tal y como ésta se da a conocer.

Otras ventajas y características de la presente invención, resultarán evidente, a raíz de los ejemplos y de las figuras los cuales se facilitan abajo, a continuación.

- 55 Las figuras 1 A y B, muestran la mejora de los perfiles inmunes antiinflamatorios, tratados mediante procesos de "altas temperaturas durante un corto transcurso de tiempo".

- 60 La figura 2, muestra cepas probióticas las cuales no son antiinflamatorias, las cuales se convierten en antiinflamatorias, a saber, que éstas exhiben unos pronunciados perfiles inmunes antiinflamatorios, *in vitro*, después de haberse tratado mediante procesos de "altas temperaturas durante un corto transcurso de tiempo".

- 65 Las figuras 3 A y B, muestran cepas probióticas, las cuales se utilizan en productos los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, y las cuales exhiben unos perfiles inmunes antiinflamatorios mejorados o nuevos, *in vitro*, después de haberse tratado mediante "altas temperaturas durante un corto transcurso de tiempo".

Las figuras 4 A y B, muestran cepas iniciadoras lácteas (a saber, cepas iniciadoras Lc1), las cuales exhiben unos perfiles inmunes antiinflamatorios, mejorados o nuevos, in vitro, después del tratamiento por calor a altas temperaturas.

5 La figura 5, muestra una cepa probiótica, no antiinflamatoria, la cual exhibe perfiles inmunes antiinflamatorios, in vitro, después de haberse tratado mediante tratamientos del tipo HTST.

10 La figura 6: Muestra el análisis principal de componentes en datos de PBMC (Células Mononucleares de la Sangre Periférica – [PBMC, de sus siglas en inglés correspondientes a Peripheral Blood Mononuclear Cells] -) (IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10) generados con probióticos y cepas iniciadoras lácteas, en sus formas vivas y tratadas por calor (a una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos). Cada uno de los puntos, representa una cepa, bien ya sea viva, o bien ya sea tratada mediante calor, identificada mediante su número de NCC, o mediante su nombre.

15 La figura 7, muestra las ratios o factores de relación correspondientes a los cocientes IL-12p40 / IL-10 de las cepas vivas y de las cepas tratadas por calor (85 °C, 20 minutos). El tratamiento por calor, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, conduce, globalmente, a un incremento de las ratios o factores de relación correspondientes a los cocientes IL-12p40 / IL-10, de una forma opuesta a lo que ocurre mediante los tratamientos de “alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo” de la presente invención (Figuras 1, 2, 3, 4
20 y 5).

La figura 8, muestra la mejora de la secreción de citocinas, in vitro, a partir de las PBMCs (células mononucleares de la sangre periférica), estimuladas mediante bacterias tratadas por calor.

25 La figura 9, muestra el porcentaje de la intensidad de las diarreas, observado en ratones sensibilizados a la OVA (ovalbúmina), estimulados con solución salina (control negativo), en ratones sensibilizados a la OVA, estimulados con OVA (control positivo) y en ratones sensibilizados a la OVA, estimulados con OVA y *Bifidobacterium breve* NCC2950, tratado con calor, o vivo. Los resultados obtenidos, se muestran como los porcentajes de la intensidad de las diarreas (valor medio \pm error estándar de la media (mean \pm SEM – [SEM, de las siglas en inglés correspondientes a standard error of the mean] -) de 4 experimentos independientes), con un porcentaje correspondiente a un 100 % de la intensidad de las diarreas, correspondiente a los síntomas desarrollados en el grupo de control positivo (es decir, en el grupo correspondiente a los ratones sensibilizados y estimulados mediante el alérgeno).

35 **Ejemplo 1:**

Metodología

Preparaciones bacterianas

40 Los beneficios para la salud proporcionados por los probióticos vivos, en el sistema inmunitario del huésped, se consideran, de una forma general, como siendo específicos de la cepa. Los probióticos los cuales inducen unos altos niveles de IL-10 y / o los cuales inducen unos altos niveles de citocinas proinflamatorias, in vitro (ensayo de PBMC), han mostrado ser potentes cepas antiinflamatorias, in vivo, (Foligné, B., et al., 2007, World J.Gastroenterol. 13: 236 - 243).

50 Se procedió a utilizar diversas cepas de probióticos, para investigar las propiedades antiinflamatorias de los probióticos tratados mediante calor. Estas cepas eran las consistentes en *Bifidobacterium longum* NCC 3001, *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Bifidobacterium breve* NCC 2950, *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus casei* NCC 4006, *Lactobacillus acidophilus* NCC 3009, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002 (NCC 1825), y *Escherichia coli* Nissle. Se procedió así mismo, también, a someter a test de ensayo, diversas cepas de cultivo iniciadoras, incluyendo a algunas cepas, las cuales se utilizan, comercialmente, para producir productos fermentados de Lc1, de Nestlé, consistentes en las cepas: *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 y
55 *Lactococcus lactis* NCC 2287.

60 Se procedió a cultivar células bacterianas, en unas condiciones optimizadas para cada una de las cepas, en los biorreactores de 5 – 15 l. Para ello, son susceptibles de poderse utilizar cualesquiera medios de cultivo los cuales son típicos en el arte especializado de la técnica. Tales medios de cultivos, son conocidos, por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica. Cuando se procedió a ajustar el valor pH, a un nivel de 5,5, se utilizó, para ello, un solución básica, al 30 % (bien ya sea a base de NaOH, o bien ya sea a base de Ca(OH)₂), añadiéndola de una forma continua. Cuando fuere adecuado, se procedió a mantener unas condiciones anaeróbicas, mediante el gaseado del espacio de cabeza, con CO₂. El *E. coli*, se cultivó bajo una condiciones aeróbicas estándar.

65 Las células bacterianas, se recolectaron mediante centrifugación (5. 000 x g, a una temperatura de 4 °C), y se volvieron a suspender en una solución salina de tampón fosfato (PBS), en unos volúmenes apropiados, con objeto de alcanzar una concentración final de aprox. 10⁹ – 10¹⁰ ufc / ml. Una parte de la preparación, se congeló, a una

temperatura de – 80 °C, con un porcentaje de glicerol del 15 %. Otra parte de las células, se trató, por calor, mediante:

- 5 - Temperatura ultra alta: a una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos; mediante inyección indirecta de vapor.
- Alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST): a una temperatura de 74 °C, 90 °C, y 120°C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, mediante inyección indirecta de vapor.
- 10 - Baja temperatura, durante un prolongado transcurso de tiempo (85 °C, 20 minutos), en un baño de agua.

Después de haber procedido al tratamiento, las muestras, se mantuvieron congeladas, a una temperatura de – 80 °C, hasta su uso.

15 Establecimiento de los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas, in vitro:

Se procedió a evaluar los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas, y tratadas mediante calor (a saber, la capacidad de dichas preparaciones para inducir la secreción de citocinas específicas, a partir de las células de sangre humana, in vitro). Se aislaron las células mononucleares de la sangre periférica, humana (PBMCs), a partir de filtros de sangre. Después de haber procedido a la separación, mediante el gradiente de la densidad de las células, las células mononucleares, se recolectaron y se lavaron dos veces, con solución salina de Hank, equilibrada. A continuación, se procedió a resuspender las células en Medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Iscove's Modified Dulbecco's Medium] -, de la firma Sigma), suplementado con un 10 % de suero bovino (de ternera) fetal (de procedencia de la firma Bioconcept, París, Francia), un 1 % de L-glutamina (de la firma Sigma), un 1% de penicilina / estreptomina (de la firma Sigma), y un 0,1 %, de gentamicina (de la firma Sigma). Se procedió, a continuación, a cultivar las células consistentes en las PBMCs (a razón de 7×10^5 células / pozo), con bacterias vivas, y tratadas mediante calor (equivalente a 7×10^6 ufc/pozo), en placas de cultivo, de 48 pozos, durante un transcurso de tiempo de 36 horas. Se procedió, a continuación, a someter a test de ensayo, las bacterias vivas y tratadas mediante calor, en las PBMCs procedentes de 8 individuos donantes, divididas en dos experimentos por separado. Después de una incubación durante un transcurso de tiempo de 36 horas, se procedió a congelar las placas de cultivo, y éstas se mantuvieron, a una temperatura de – 20°C, hasta proceder a la medición de las citocinas. Se procedió, a continuación, a llevar a cabo, en paralelo, el establecimiento de los perfiles de las citocinas (a saber, en el mismo experimento, en el mismo lote de la PBMCs), para las bacterias vivas, y para sus homólogos tratados por calor.

Se procedió a determinar los niveles de las citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), en los sobrenadantes de los cultivos celulares, después de una incubación de un transcurso de tiempo de 36 horas, mediante ensayos ELISA (kits de ensayo consistentes en los R&D DuoSet para la IL-10 humana, BD OptEIA para la IL12p40 humana, BD OptEIA para la TNF- α humana, BD OptEIA para la IFN- γ humana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las IFN- γ , IL-12p40, y TNF- α , son citocinas proinflamatorias, mientras que, la IL10, es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados obtenidos, se expresan como valores medios (pg / ml) \pm error estándar de la media (mean \pm SEM) de 4 donantes individuales, y éstos son representativos de dos experimentos individuales, llevados a cabo, cada uno de ellos, con 4 donantes. Se procede a calcular la ratio o factor de relación IL-12p40 / IL10, para cada una de las cepas, como un valor predictivo del efecto antiinflamatorio in vivo (Foligné, B., et al., 2007, World J.Gastroenterol. 13: 236 - 243).

Los valores numéricos de las citocinas (pg / ml) determinados mediante ensayos ELISA (véase anteriormente, arriba), se transfirieron a un sistema de software informático, del tipo "BioNumerics v5.10 software" (de la firma Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se procedió a llevar a cabo, a continuación, un Análisis de Componentes Principales (PCA – de sus siglas en inglés, correspondientes a Principal Component Analysis – [técnica de dimensionado de la clase PCA] -), en este conjunto de datos. En este análisis, se incluyó la substracción de los valores medios, con respecto a los caracteres, y la división de las variancias con respecto a los caracteres.

Resultados

55 Perfiles antiinflamatorios generados mediante los tratamientos del tipo de temperatura ultra alta (UHT) / alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST):

Se procedió a someter las cepas probióticas las cuales estaban bajo investigación, a unas series de tratamientos de calor (Temperatura Ultra Alta (UHT), Alta Temperatura durante un Corto Transcurso de Tiempo (HTST), y a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos), y sus perfiles inmunológicos, se compararon con aquéllos de las células vivas, in vitro. Los microorganismos vivos (probióticos y / o cultivos iniciadores lácteos), inducían diferentes niveles de la producción de citocinas, cuando éstos se incubaban con PBMCs humanas (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, 4 y 5). El tratamiento mediante calor de estos microorganismos, modificaban los niveles de citocinas producidos por las PBMCs, de una forma dependiente de la temperatura. Los tratamientos de "alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo" (a una temperatura de 120 °C, ó de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15"), generaban bacterias no replicantes, con perfiles inmunológicos antiinflamatorios (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, y 4). De hecho, las cepas tratadas mediante tratamientos del tipo UHT (a

una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos), inducían menos citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), mientras que, de una forma simultánea, mantenían o inducían la producción adicional de IL-10 (en comparación con sus homólogos vivos). Las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL10, eran inferiores, para cualesquiera de las cepas tratadas mediante tratamientos del tipo UHT o semejantes, en comparación con las ratios o factores de relación de las células vivas, (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3 y 4). Esta observación, era también válida para las bacterias tratadas mediante tratamientos del tipo HTST o semejantes, a saber, tratadas a una temperatura de 120°C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3 y 4), o bien, a una temperatura de 74 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos (véase, a dicho efecto, la figura 5). Los tratamientos por calor (es decir, los tratamientos del tipo UHT ó los tratamientos del tipo HTST), tenían un efecto similar, en los perfiles inmunológicos de las cepas de probióticos, in vitro (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2 3 y 5) y en los cultivos iniciadores lácteos (véase, a dicho efecto, la figura 4). EL análisis de los componentes principales, en los datos de las PBMCs generados con cepas de probióticos y con cepas iniciadoras lácteas, vivas, tratados mediante calor (a una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15”), revelaron el hecho de que, las cepas vivas, se extendían a lo largo de la totalidad del eje de la x, ilustrando el hecho de que, las cepas, exhibían unos perfiles inmunológicos muy diferentes, in vitro, desde los bajos inductores (en la parte izquierda), hasta los altos inductores (en lado derecho) de las citocinas proinflamatorias. Las agrupaciones de las cepas tratadas por calor, en el lado izquierdo del gráfico, muestran el hecho de que, la citocinas proinflamatorias, se encuentran mucho menos inducidas, mediante las cepas tratadas por calor (véase, a dicho efecto, la figura 6). Como contraste de ello, las bacterias tratadas mediante calor, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, inducían más citocinas proinflamatorias y menos IL-10, que las células vivas, dando como resultado unas ratios o factores de relación más altos IL-12p40 / IL-10 (véase, a dicho efecto, la figura 7).

Los perfiles antiinflamatorios, se mejoran o se generan, mediante tratamientos del tipo UHT ó del tipo HTST.

Las cepas tratadas mediante tratamientos UHT ó HTST, exhibían unos perfiles anti-inflamatorios, de una forma independiente de sus perfiles inmunológicos iniciales respectivos (células vivas). Las cepas de probióticos, las cuales se conocen como siendo antiinflamatorias, in vivo, y que exhiben perfiles antiinflamatorios, in vitro (*B. longum* NCC 3001, *B. longum* NCC 2705, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818), mostraron exhibir unos perfiles antiinflamatorios, in vitro, después de los tratamientos del tipo “corto transcurso de tiempo, alta temperatura”. Tal y como se muestra en la figura 1, las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10 de las cepas de *Bifidobacterium*, tratadas con mediante tratamientos del tipo UHT o similares, eran inferiores que aquéllos correspondientes a sus homólogos, exhibiendo así, de este modo, unos perfiles anti-inflamatorios mejorados de las muestras tratadas mediante tratamientos del tipo UHT o semejantes. De una forma más llamativa, la generación de perfiles antiinflamatorios, mediante los tratamientos del tipo UHT o semejante, o del tipo HTST o semejantes, se confirmó así mismo, también, para las cepas vivas no antiinflamatorias. Ambas cepas, las correspondientes a las *L. rhamnosus* NCC 4007 y *L. paracasei* NCC 2461, vivas, exhibían unas altas ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10, in vitro. (véanse, a dicho efecto, las figuras 2 y 5). Las dos cepas vivas, mostraron así mismo, también, el hecho de no ser protectoras contra la colitis inducida por TNBS, en los ratones. Las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10 inducidos mediante las cepas de *L. rhamnosus* NCC 4007 y de *L. paracasei* NCC 2461, se redujeron, de una forma extremadamente remarcable, después de los tratamientos del tipo “alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo” (UHT ó HTST), alcanzando unos niveles tan bajos, como aquéllos los cuales se obtenían mediante las cepas de *Bifidobacterium*. Estos reducidos valores de las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10, se deben a los bajos niveles de la producción de IL-12p40, combinada con la ausencia de cambios (*L. rhamnosus* NCC 4007) o la extremadamente remarcable inducción de las secreción de IL 10 (*L. paracasei* NCC 2461), (véase, a dicho efecto, la figura 2).

Como consecuencia de ello:

- 50 - Los perfiles antiinflamatorios de los microorganismos vivos, pueden mejorarse, mediante tratamientos por calor del tipo UHT ó semejantes, y del tipo HTST ó semejantes (tales como por ejemplo, los microorganismos correspondientes a las cepas *B. longum* NCC 2705, *B. longum* NCC 3001, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818).
- 55 - Los perfiles antiinflamatorios, pueden generarse a partir de microorganismos vivos no antiinflamatorios (tales como, por ejemplo, los microorganismos correspondientes a las cepas de *L. rhamnosus* NCC 4007, *L. paracasei* NCC 2461, los microorganismos correspondientes a los iniciadores lácteos *S. thermophilus* NCC 2019), tratados mediante tratamientos por calor del tipo UHT o semejantes, o del tipo HTST ó semejantes.
- 60 - Los perfiles antiinflamatorios, se demostraron así mismo, también, para las cepas aisladas de productos comercialmente disponibles (Figuras 3 A y B), la cuales incluían un cepa probiótica de *E. coli*.

El impacto de los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, fueron similares, para todos los probióticos e iniciadores lácteos sometidos a test de ensayo, tales como, por ejemplo, los lactobacilos, las bifidobacterias y los estreptococos.

Se procedió a aplicar los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, a diversos lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos, los cuales exhibían diferentes perfiles inmunológicos in vitro. Todas estas cepas, inducían citocinas menos pro-inflamatorias, después de los tratamientos del tipo UHT / HTST, que las correspondientes a sus homólogos (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, 4, 5 ó 6), demostrándose, con ello, el hecho consistente en que, el efecto de los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, sobre las propiedades inmunológicas de las bacterias no replicantes resultantes, pueden generalizarse para todos los probióticos, de una forma particular, para los lactobacilos y para las lactobacterias y para las cepas específicas de *E. coli*, y para todos los cultivos de iniciadores lácteos, de una forma particular, para los estreptococos, para los lactococos y para los lactobacilos.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)

Metodología

Preparaciones bacterianas

Se procedió a utilizar cinco cepas de probióticos, con objeto de investigar las propiedades estimulantes inmunológicas de los probióticos no replicantes: 3 bifidobacterias (*B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *B. breve* NCC2950) y 2 lactobacilos (*L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007).

Las células bacterianas, se hicieron crecer, cultivándolas en medio de cultivo MRS, mediante fermentación en lotes, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 16 – 18 horas, sin ningún tipo de control del valor pH. Se procedió a centrifugar las células en cuestión (5. 000 x g, a una temperatura de 4 °C), y éstas se resuspendieron en tampón fosfato salino (solución salina tamponada), previamente a diluirse en agua salina, con objeto de alcanzar la concentración final, la cual era la correspondiente a 10 E 10 ufc / ml. Se procedió, a continuación, a someter a las cepas de *B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007) a un tratamiento por calor, correspondiente a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos. La cepa de *B. breve* NCC295, se sometió a un tratamiento por calor, correspondiente a una temperatura de 90 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en un baño de agua. Se procedió a alicuotar (es decir, a dividir en alícuotas), las suspensiones bacterianas tratadas por calor, y éstas se conservaron, congeladas, a una temperatura de – 80 °C, en un tampón del tipo PBS – glicerina al 15 %, hasta su uso.

Establecimiento de los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas, in vitro:

Se procedió a evaluar los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas, y tratadas mediante calor (a saber, la capacidad de dichas preparaciones para inducir la secreción de citocinas específicas, a partir de las células de sangre humana, in vitro). Se aislaron las células mononucleares de la sangre periférica, humana (PBMCs), a partir de filtros de sangre. Después de haber procedido a la separación, mediante el gradiente de la densidad de las células, las células mononucleares, se recolectaron y se lavaron dos veces, con solución salina de Hank, equilibrada. A continuación, se procedió a resuspender las células en Medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Iscove's Modified Dulbecco's Medium] -, de la firma Sigma), suplementado con un 10 % de suero bovino (de ternera) fetal (de procedencia de la firma Bioconcept, París, Francia), un 1 % de L-glutamina (de la firma Sigma), un 1% de penicilina / estreptomina (de la firma Sigma), y un 0,1 %, de gentamicina (de la firma Sigma). Se procedió, a continuación, a cultivar las células consistentes en las PBMCs (a razón de 7 x 10⁵ células / pozo), con bacterias vivas, y tratadas mediante calor (equivalente a 7 x 10⁶ ufc/pozo), en placas de cultivo, de 48 pozos, durante un transcurso de tiempo de 36 horas. Se procedió, a continuación, a someter a test de ensayo, las bacterias vivas y tratadas mediante calor, en las PBMCs procedentes de 8 individuos donantes, divididas en dos experimentos por separado. Después de una incubación durante un transcurso de tiempo de 36 horas, se procedió a congelar las placas de cultivo, y éstas se mantuvieron, a una temperatura de – 20°C, hasta proceder a la medición de las citocinas. Se procedió, a continuación, a llevar a cabo, en paralelo, el establecimiento de los perfiles de la citocinas (a saber, en el mismo experimento, en el mismo lote de la PBMCs), para las bacterias vivas, y para sus homólogos tratados por calor.

Se procedió a determinar los niveles de las citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), en los sobrenadantes de los cultivos celulares, después de una incubación de un transcurso de tiempo de 36 horas, mediante ensayos ELISA (kits de ensayo consistentes en los R&D DuoSet para la IL-10 humana, BD OptEIA para la IL12p40 humana, BD OptEIA para la TNF- α , BD OptEIA para la IFN- γ humana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las IFN- γ , IL-12p40, y TNF- α , son citocinas proinflamatorias, mientras que, la IL10, es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados obtenidos, se expresan como valores medios (pg / ml) \pm error estándar de la media (mean \pm SEM) de 4 donantes individuales, y éstos son representativos de dos experimentos individuales, llevados a cabo, cada uno de ellos, con 4 donantes.

Efecto in vivo del *Bifidobacterium breve* NCC2950, en la prevención de las diarreas alérgicas

Se procedió a utilizar un modelo de la diarrea alérgica del ratón, con objeto de someter a test de ensayo, el efecto estimulante de la Th1, de la cepa de *Bifidobacterium breve* NCC2950 (véase a dicho efecto, (Brandt E.B et al. JCI 2003; 112 (11): 1666 - 1667). A continuación de haber procedido a la sensibilización (2 inyecciones intraperitoneales

de Ovalbúmina (OVA) y sulfato aluminico potásico, en un intervalo de tiempo de 14 días; días 0 y 14), se procedió a estimular, oralmente, a los ratones machos de la raza Balb / c, con OVA, 6 veces (en los días 27, 29, 32 34, 36, 39), dando como resultado unos síntomas clínicos transitorios (diarrea) y cambios en los parámetros inmunológicos (concentración en el plasma de IgE total, Ige OVA-específico, proteasa 1 de los mastocitos del ratón, a saber, MMCP-1. La cepa *Bifidobacterium breve* NCC2950, viva, o tratada por calor, a una temperatura de 90 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, se administró, mediante la utilización de una sonda esofágica, 4 días antes de proceder a la sensibilización a la OVA (en los días, - 3, - 2, - 1, 0, y en los días 11, 12, 13 y 14), y durante el período de estimulación (en los días 23 a 39). Se procedió a utilizar una dosis diaria bacteriana de aprox. 10⁹ unidades de formación de colonias (UFC), o equivalentes, de ufc / ratón.

Resultados

Inducción de la secreción de citocinas “proinflamatorias”, después del tratamiento por calor

Se procedió a evaluar la capacidad de las cepas bacterianas estimuladas por calor, in vitro, para estimular la secreción de citocinas, mediante células mononucleares de la sangre periférica, (PBMC). Se procedió a comparar los perfiles inmunológicos basados en cuatro citocinas, después de haber procedido a la estimulación de las PBMCs, mediante bacterias tratadas por calor, con respecto a los inducidos por células bacterianas, vivas, en el mismo ensayo in vitro.

Las preparaciones tratadas mediante calor, se colocaron en placas, y éstas se evaluaron, en cuanto a lo referente a la ausencia de cualesquiera recuentos viables. Las preparaciones bacterianas tratadas mediante calor, no produjeron colonias, después de su colocación en placas.

Los probióticos inducían diferentes niveles de producción de citocinas, y dependientes de la cepas, cuando éstos se incubaron con PBMCs humanas (véase, a dicho efecto, la figura 8). El tratamiento por calor de los probióticos, modificaba los niveles de citocinas producidas por las PBMCs, si éstos se comparaban con sus homólogos vivos. Las bacterias tratadas por calor, inducían más citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , e IL-12p40), que las inducidas por sus homólogos. Como contraste de ello, las bacterias tratadas por calor, inducían unas cantidades similares o inferiores de IL-10, en comparación con las células vivas (véase, a dicho efecto, la figura 8). Estos datos, muestran el hecho de que, las bacterias tratadas mediante calor, son más aptas, para estimular el sistema inmunológico, que sus homólogos vivos, y así, por lo tanto, éstas, tienen una mayor capacidad para estimular las defensas inmunológicas debilitadas. En otras palabras, los datos in vitro, ilustran un efecto estimulante inmunológico mejorado, de las cepas bacterianas, después de haber sido sometidos al tratamiento mediante calor.

Con objeto de ilustrar el efecto mejorado de la cepa de *B. breve* NCC2950 (en comparación con las células vivas), en el sistema inmunológico, ambas cepas de *B. breve* NCC2950, es decir, la cepa de *B. breve* NCC2950 viva, y la cepa de *B. breve* NCC2950 tratada por calor, (cepa A), se sometieron a tests de ensayo, en un modelo animal, de la diarrea alérgica.

Al compararse con el grupo de control positivo, la intensidad de la diarrea, había descendido de una forma significativa y consistente, después del tratamiento con la cepa de *B. breve* NCC2950 tratada por calor (en un porcentaje correspondiente a un valor del 41,1 % \pm 4,8 %), mientras que, la intensidad de la diarrea, había descendido en únicamente un porcentaje del 20 \pm 28,3 %, después del tratamiento con la cepa de *B. breve* NCC2950, viva. Estos resultados, demuestran el hecho de que, la cepa de *B. breve* NCC2950 tratada mediante calor, exhibe unos efectos protectores mejorados, contra la diarrea alérgica, que la correspondiente a su homólogo vivo (véase, a dicho efecto, la figura 9).

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se mostró el hecho de que, la capacidad de los probióticos, para mejorar las defensas inmunológicas, se incrementaba, después del tratamiento por calor.

Ejemplo adicional:

Mediante la utilización de la composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, puede prepararse mediante la utilización de técnicas estándar, de la forma que se ha descrito en esta solicitud de patente.

Ingrediente	g / 100 g
Grasa	15
Proteína	29
Hidratos de carbono	46
Fibra dietética	7
Agentes para el equilibrio nutricional	2
Lactobacillus johnsonii La 1 sometido a un tratamiento de calor durante un corto tiempo	1

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para la preparación de una composición alimenticia para animales de compañía, la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes, en una cantidad que va desde las 10^6 ufc, hasta las 10^{12} ufc, por servicio, comprendiendo, el citado procedimiento, el proceso de tratar los microorganismos probióticos en cuestión, mediante un tratamiento de alta temperatura / un corto transcurso de tiempo (HTST), a una temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de 1 – 30 segundos, o a un tratamiento de una temperatura ultra alta (UHT), a un valor de temperatura, la cual exceda de un valor de $135\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de 1 – 10 segundos, y convirtiendo así, de este modo, a un porcentaje de por lo menos un 90 % de los microorganismos, en microorganismos no replicantes.
- 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, la citada composición alimenticia para animales de compañía, comprende un porcentaje que va de un 4 % a un 40 % en peso, en seco, de grasa, un porcentaje que va de un 12 % a un 70 % en peso, en seco, de hidratos de carbono, y un porcentaje que va de un 12 % a un 50 % en peso, en seco, de proteínas.
- 3.- Un procedimiento, según la reivindicación 2 en donde, la citada composición alimenticia para animales de compañía, comprende un porcentaje que va de un 10 % a un 20 % en peso, en seco, de grasa, un porcentaje que va de un 30 % a un 60 % en peso, en seco, de hidratos de carbono, y un porcentaje que va de un 20 % a un 35 % en peso, en seco, de proteínas.
- 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde, la citada composición alimenticia para animales de compañía, comprende un porcentaje que va de un 0,5 % a un 40 % en peso, en seco, de fibras dietéticas, siendo dicho porcentaje de fibras dietéticas, de una forma preferible, de un 0,5 % a un 30 % en peso, en seco, de una forma más preferible, de un 1 % a un 20 % en peso, en seco, y de una forma mayormente preferible, de un 1 % a un 10 %, en peso, en seco.
- 5.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición alimenticia para animales de compañía, se selecciona de entre el grupo consistente en productos alimenticios para animales de compañía, dietas nutricionales para animales de compañía, suplementos para animales de compañía, obsequios o premios para animales de compañía, y juguetes alimentarios para animales de compañía, tales como los consistentes en juguetes masticabas y consumibles.
- 6.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición alimenticia, comprende adicionalmente, prebióticos, tales como, por ejemplo, los consistentes en oligofructosa e inulina.
- 7.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, en la citada composición alimenticia, por lo menos un porcentaje del 95 %, de una forma preferible, por lo menos, un porcentaje del 98 %, de una forma más preferible, por lo menos, un porcentaje del 99 %, de una forma mayormente, por lo menos un porcentaje del 99,9 %, y de una forma ideal, la totalidad de los probióticos, son no replicantes.
- 8.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en las bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias, o combinaciones de entre éstas, tales como, por ejemplo, los consistentes en los *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetyllactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y / o mezclas de entre éstos.
- 9.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en los *Bifidobacterium longum* NCC 3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM 1-2618), *Bifidobacterium breve* NCC 2950 (CNCM 1-3865), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (CNCM I-3446), *Lactobacillus johnsonii* La 1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 (CGMCC 1.3274), *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059 (CNCM 1-4153), *Lactobacillus casei* NCC 1825 (ACA-DC 6002), *Escherichia coli* Nissle (DSM 6601), *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 (CNCM 1-1198), *Lactococcus lactis* NCC 2287 (CNCM I-4154), ó combinaciones de entre éstos.
- 10.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición alimenticia para animales de compañía, contiene 0,005 mg – 1000 mg de microorganismos no replicantes, por dosis diaria.

Fig. 1 A

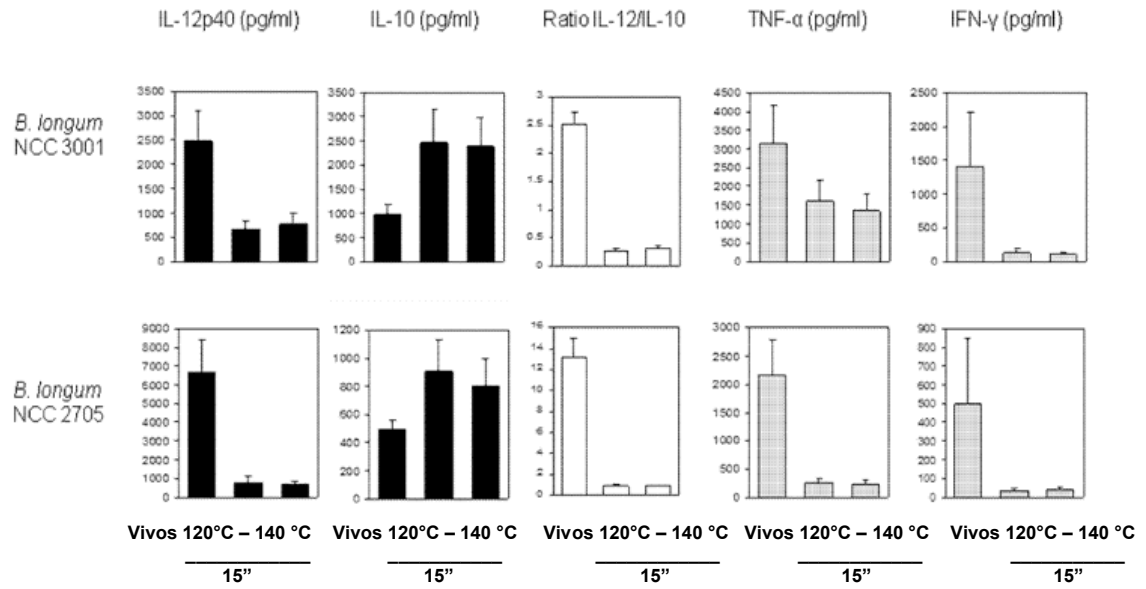


Fig. 1 B

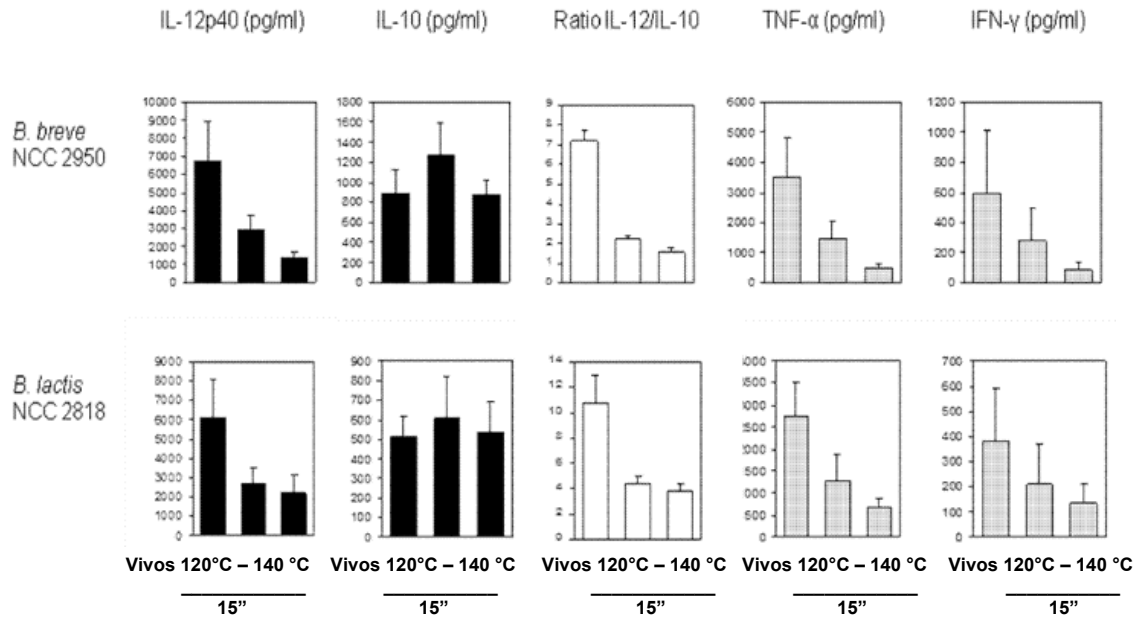


Fig. 2

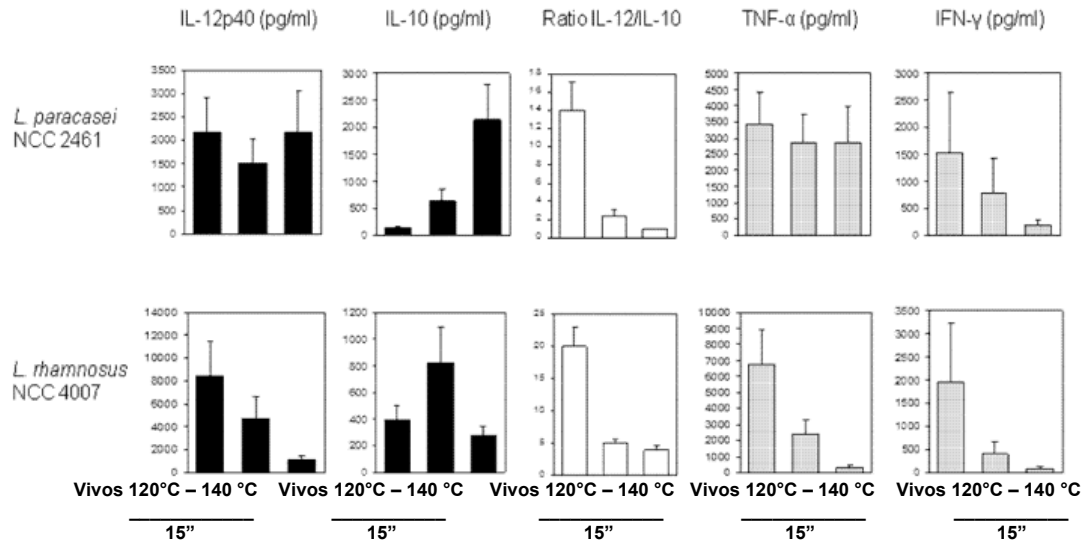


Fig. 3 A

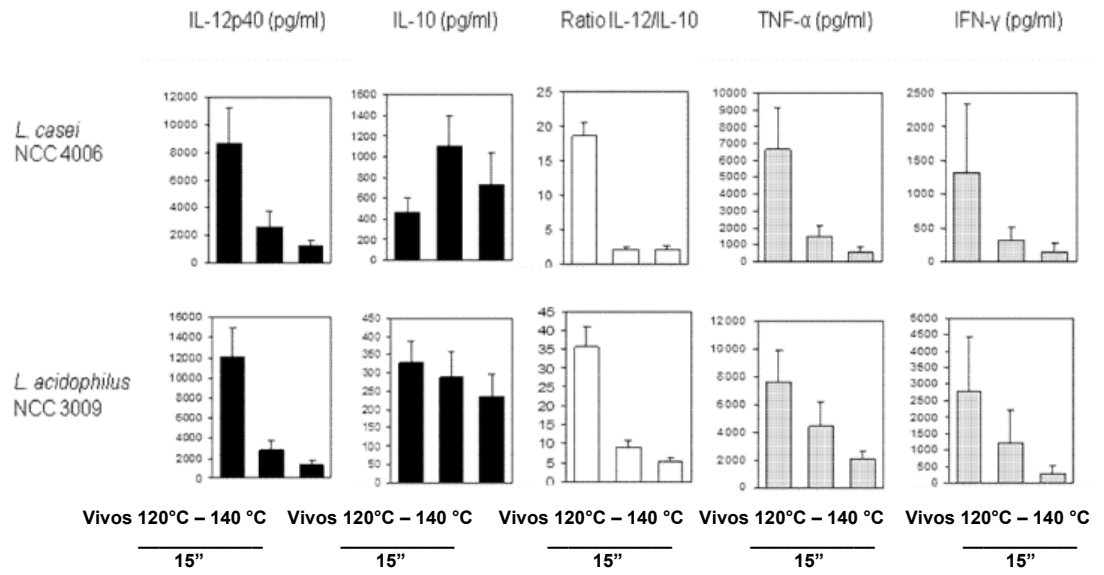


Fig. 3 B

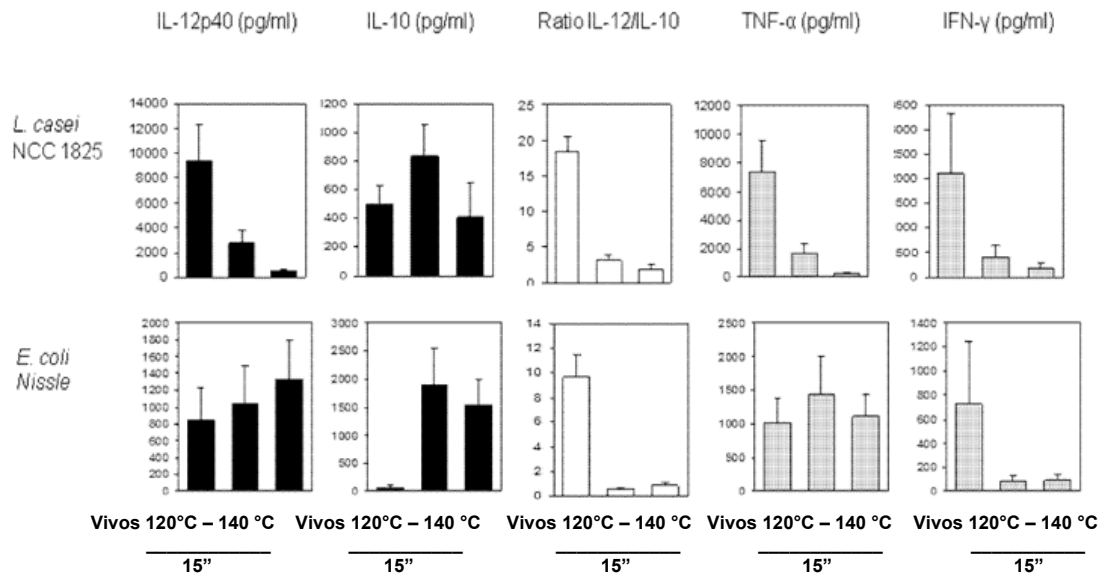


Fig. 4 A

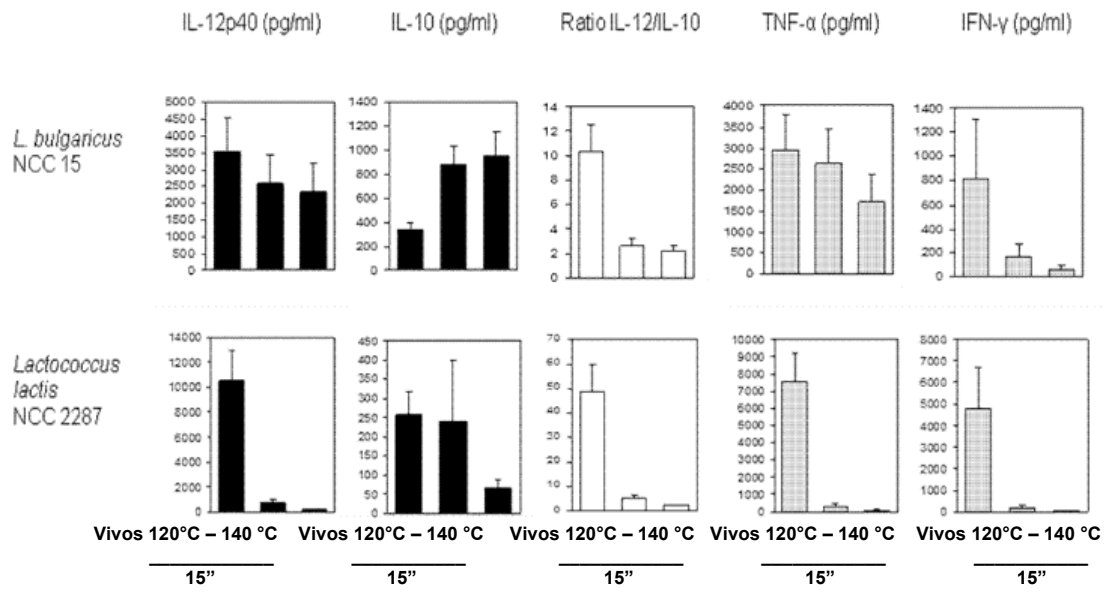


Fig. 4 B

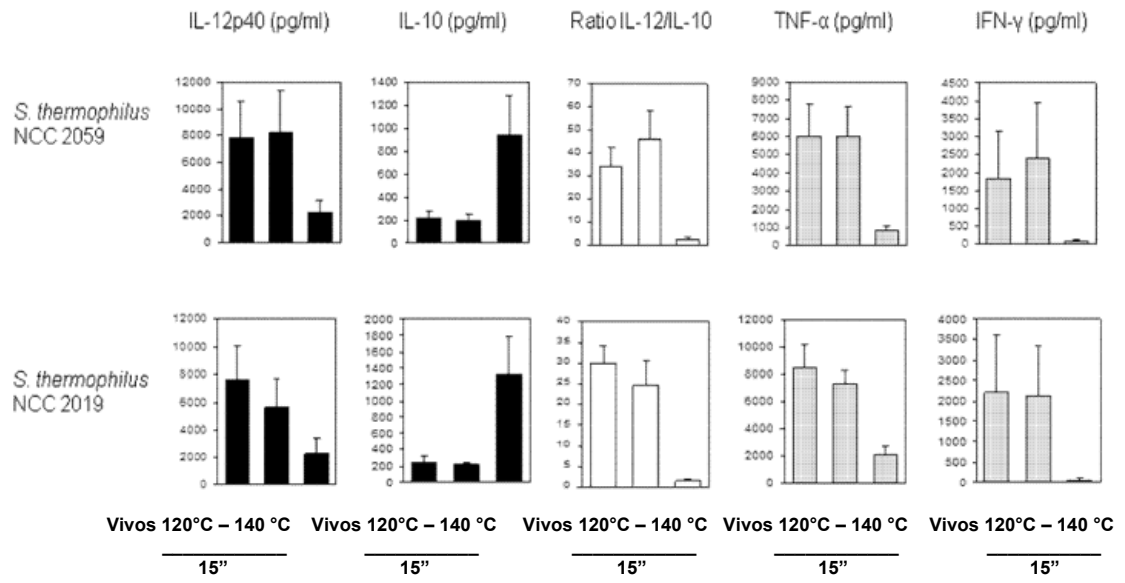


Fig. 5

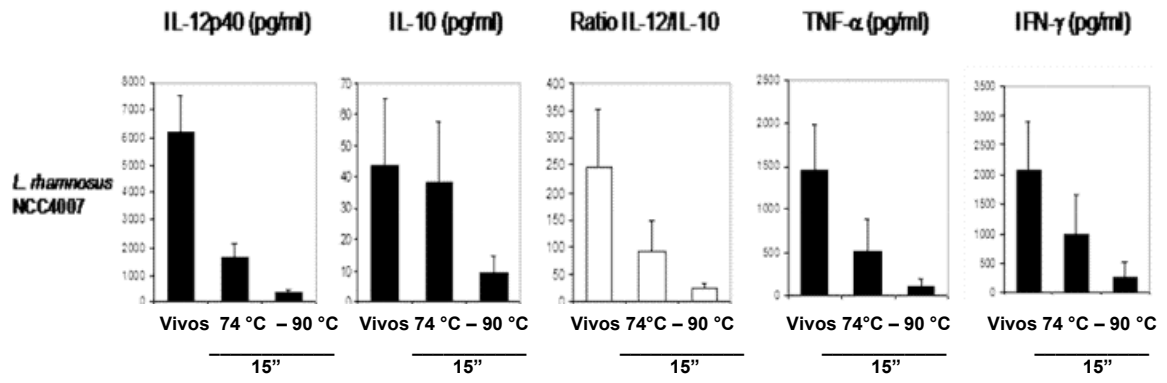


Fig. 6

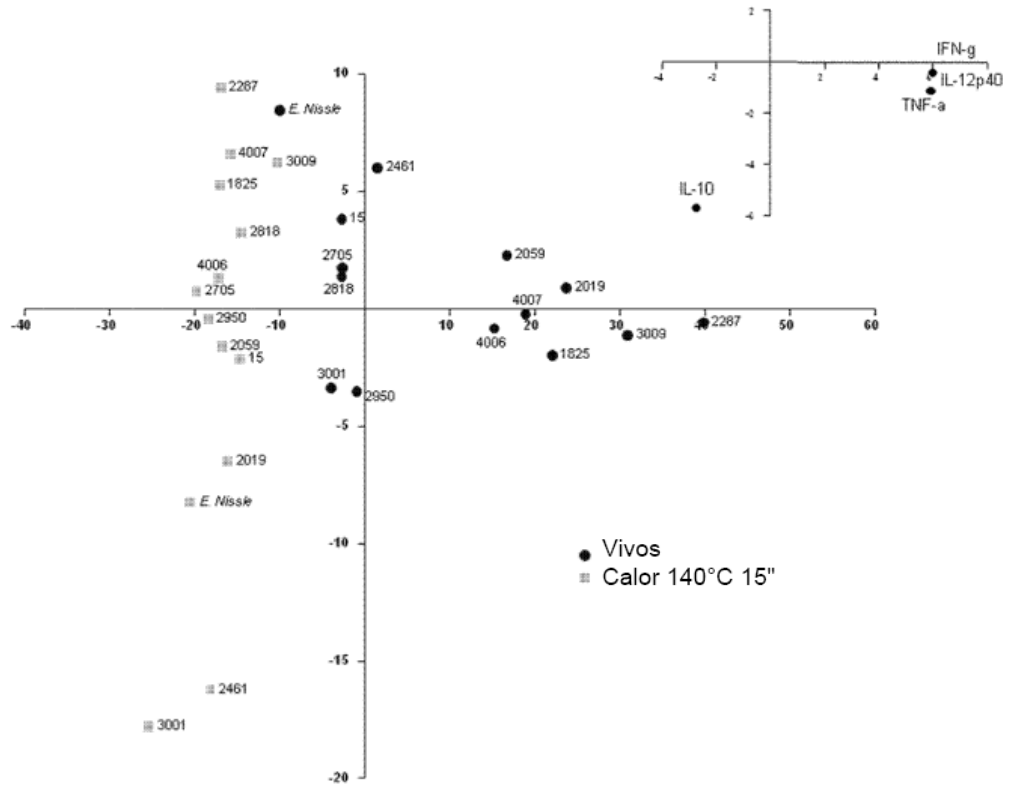


Fig. 7

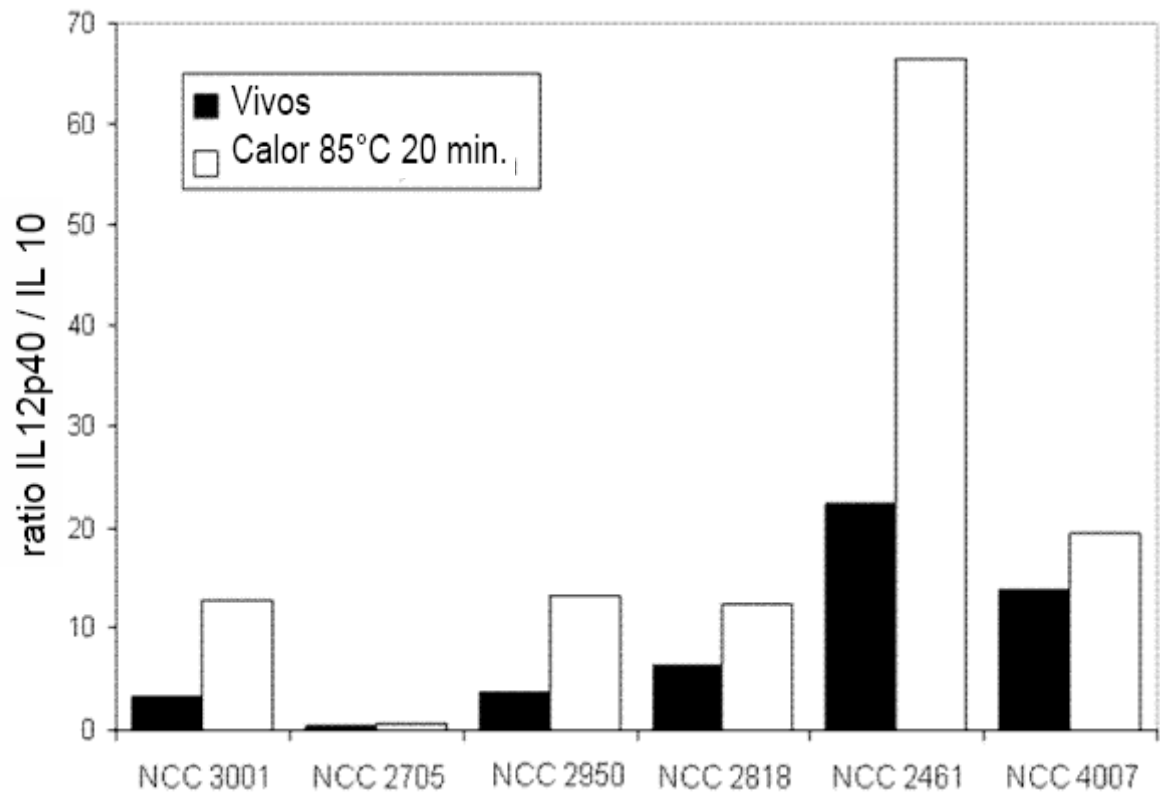


Fig. 8

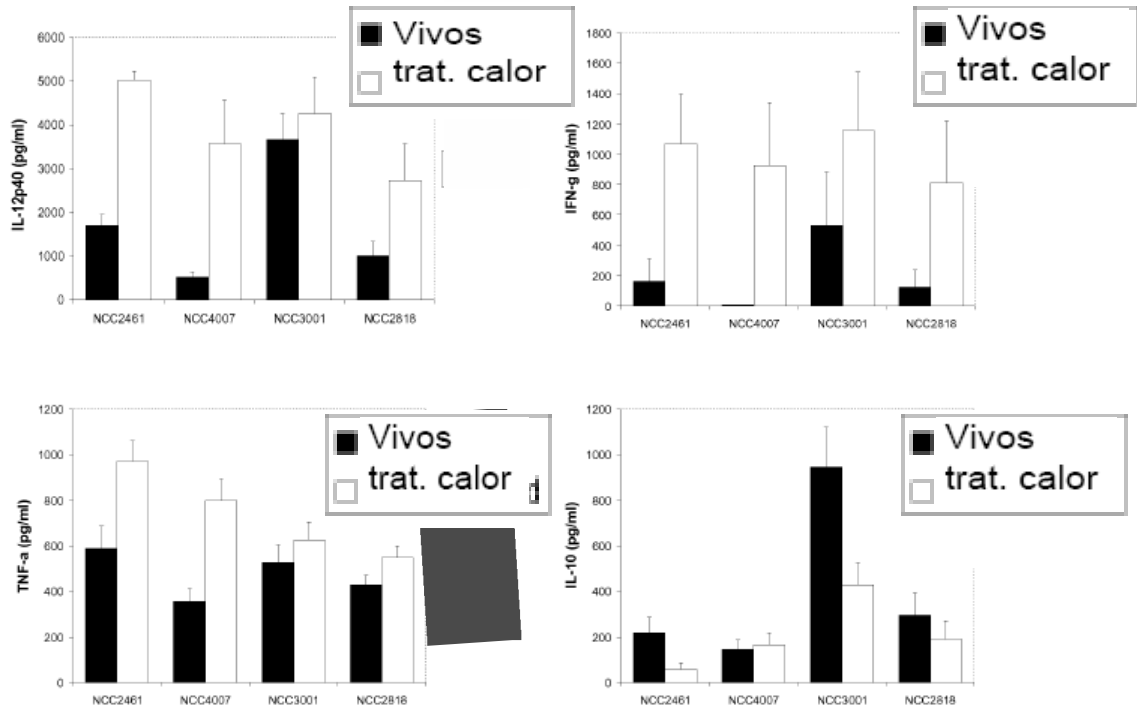


Fig. 9

