

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 988**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23K 10/00 (2006.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2006 PCT/US2006/004011**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2006 WO06130188**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2006 E 06734378 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 1885383**

54 Título: **Bifidobacterias probióticas felinas**

30 Prioridad:

31.05.2005 US 686016 P
21.06.2005 US 692439 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2017

73 Titular/es:

IAMS EUROPE B.V. (50.0%)
Vosmatenweg 4
7742 PB Coevorden, NL y
ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

BOILEAU, THOMAS, WILLIAM-MAXWELL;
KIELY, BARRY, PIUS;
O'MAHONY, LIAM, DIARMUID;
MACSHARRY, JOHN y
SUNVOLD, GREGORY, DEAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 607 988 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

Bifidobacterias probióticas felinas

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 Los mecanismos de defensa para proteger el tracto gastrointestinal (GI) de mamíferos de la colonización por bacterias son muy complejos. El tracto GI de la mayoría de mamíferos está colonizado por microflora nativa y microorganismos patógenos invasivos. En un estado saludable, estas microfloras competidoras están en un estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede provocar o prevenir muchas enfermedades gastrointestinales, tanto en seres humanos como en otras especies de mamíferos, tales como animales de compañía, perros, gatos y conejos. El bienestar de los animales de compañía está estrechamente relacionado con su alimentación y su salud GI y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal en estos animales puede dar como resultado animales de compañía más saludables.

15 El número y la composición de la microflora intestinal tienden a ser estables, aunque la edad y la dieta pueden modificarlos. La acidez gástrica, la bilis, el peristaltismo intestinal y la inmunidad local son factores que se consideran importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y otros mamíferos diversos. Con frecuencia los trastornos GI de los animales de compañía, incluyendo los que se encuentran en los felinos, se relacionan con el sobrecrecimiento bacteriano y la producción de enterotoxinas por bacterias patógenas. Estos factores alteran el equilibrio de la microflora intestinal y pueden promover la inflamación y las respuestas inmunitarias aberrantes.

20 Durante los últimos años, la investigación ha comenzado a poner de relieve algunas cepas valiosas de bacterias y su uso potencial como agentes probióticos. Se considera que los probióticos son preparaciones de bacterias, ya sea viables o muertas, sus constituyentes tales como proteínas o carbohidratos, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que promueven la salud de los mamíferos mediante la preservación de la microflora natural en el tracto GI y el refuerzo de los controles normales en las respuestas inmunitarias aberrantes. Algunas personas creen que las bacterias probióticas son más eficaces cuando derivan de la especie que se tratan o de especies estrechamente relacionadas. Por tanto, existe una necesidad de cepas probióticas derivadas de animales de compañía para usarse en animales de compañía, que son diferentes a las derivadas de seres humanos.

30 El documento WO 01/90311 (US2005/0106133) desvela microorganismos probióticos aislados de muestras fecales obtenidas de gatos que tienen actividad probiótica. Sin embargo, estas bacterias se obtuvieron de muestras fecales y pueden no formar parte de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto GI.

35 En consecuencia, existe una necesidad de proporcionar cepas de bacterias que puedan obtenerse mediante el aislamiento de la microflora intestinal natural presente en la parte superior del tracto GI que estén particularmente adaptadas para los gatos y que se hayan seleccionado por sus propiedades probióticas y su capacidad para sobrevivir al procesamiento y para incorporar estas cepas en composiciones que son adecuadas para su uso.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención, se proporcionan cepas de bacterias ácido-lácticas de la reivindicación 1.

40 Además, la presente invención se dirige a proporcionar usos de bacterias ácido-lácticas que pueden obtenerse mediante el aislamiento de tracto gastrointestinal felino resecado y lavado de acuerdo con las reivindicaciones para mantener y mejorar la salud de animales de compañía, y composiciones que comprenden las bacterias ácido-lácticas.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de una lectura de la presente divulgación.

Secuencias

SEQ. ID NO. 1 - Secuencia de nucleótidos espaciadora intergénica 16s-23s de *Bifidobacterium longum* NCIMB 41290 (AHF5340).

SEQ. ID NO. 2 - Secuencia de nucleótidos espaciadora intergénica 16s-23s de *Bifidobacterium longum* NCIMB 41291 (AHF1231).

50 SEQ. ID NO. 3 - Secuencia de cebador de PCR 16s-23s izquierdo para el análisis de secuencia.

SEQ. ID NO. 4 - Secuencia de cebador de PCR 16s-23s derecho para el análisis de secuencia.

Número de depósito bacteriano

La tabla a continuación indica la especie de *Bifidobacterium* y el número de cepa para las cepas que son ejemplos de la presente invención. Las cepas bacterianas se depositan en las Colecciones Nacionales de Bacterias de Alimentos Industriales y Marinas (NCIMB, por sus siglas en inglés), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de Depósito	Secuencia 16s-23s
Bifidobacteria AHF534D	NCIMB 41290	SEQ. ID NO. 1
Bifidobacteria AHF123R	NCIMB 41291	SEQ. ID NO. 2

5

Descripción detallada de la invención

Todos los pesos, las mediciones y las concentraciones en el presente documento se miden a 25 °C sobre la composición en su totalidad, a menos que se especifique lo contrario.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes de las composiciones referidas en el presente documento son porcentajes en peso y todas las relaciones son relaciones en peso.

A menos que se indique lo contrario, todos los pesos moleculares son pesos moleculares promedio en peso.

A menos que se indique lo contrario, el contenido de todas las fuentes bibliográficas referidas en este texto se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia.

15 Excepto donde se presentan ejemplos específicos de valores medidos reales, los valores numéricos referidos en el presente documento deben considerarse calificados por la palabra "aproximadamente".

Dentro de la siguiente descripción, la abreviatura UFC ("unidad formadora de colonias") designa el número de células bacterianas revelado por los recuentos microbiológicos en placas de agar, como se entenderá habitualmente en la técnica.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "mutantes de las mismas" incluye cepas bacterianas derivadas que comprenden mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano excluyendo la secuencia intergénica 16s-23s.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "mutaciones del ADN" incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden al menos alteraciones de una sola base incluyendo supresiones, inserciones, transversiones y otras modificaciones del ADN conocidas por los expertos en la materia, incluyendo la modificación genética introducida en una secuencia nucleotídica o aminoacídica parental mientras que se mantiene al menos un 50 % de homología a la secuencia original. Preferentemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones del ADN tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 75 %, incluso más preferentemente un 85 % de homología con la secuencia parental. Como se usa en el presente documento, la "homología" de secuencia puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la homología puede determinarse usando el programa "BLAST" de algoritmo de homología on-line, disponible para el público en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

30 Como se usa en el presente documento "modificación genética" incluye la introducción de secuencias de ADN exógeno y/o endógeno en el genoma de un organismo, ya sea mediante la inserción en el genoma de dicho organismo o mediante vectores que incluyen ADN plasmídico o un bacteriófago como es sabido por un experto en la materia, teniendo dicha secuencia de ADN al menos dos bases de ácido desoxirribonucleico de longitud.

35 Como se usa en el presente documento, "animal de compañía" significa un animal doméstico. Preferentemente, "animal de compañía" significa un felino (gato), un canino (perro), un conejo, un hurón, un caballo, una vaca domésticos o similares. Más preferentemente, "animal de compañía" significa un felino doméstico.

Cepas de Bifidobacteria ácido-láctica

40 El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de bacteria ácido-láctica del género *Bifidobacteria* como se define en las reivindicaciones que puede obtenerse mediante el aislamiento de tracto gastrointestinal felino resecado y lavado, que tiene actividad probiótica en animales. Los probióticos son microorganismos, ya sea viables o muertos, composiciones procesadas de microorganismos, sus constituyentes tales como proteínas o carbohidratos o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que afectan beneficiosamente a un hospedador. El uso general de bacterias probióticas es en forma de células viables. Sin embargo, puede extenderse a células no viables tales como cultivos inactivados o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos inactivados térmicamente o microorganismos inactivados por la exposición al pH alterado o sometidos a presión. Para los fines de la presente invención, se pretende adicionalmente que "probióticos" incluya los metabolitos generados por los microorganismos de la presente invención durante la

5 fermentación, si no se indican por separado. Estos metabolitos pueden liberarse al medio de fermentación o pueden almacenarse dentro del microorganismo. Como se usa en el presente documento "probiótico" también incluye bacterias, homogeneizados bacterianos, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes de fermentos bacterianos y mezclas de los mismos, que realizan funciones beneficiosas para el animal hospedador cuando se administran a una dosis terapéutica.

10 Se ha descubierto que las bacterias ácido-lácticas del género *Bifidobacteria* que pueden obtenerse por aislamiento directamente del tracto GI resecado y lavado de mamíferos, son adherentes al tracto GI después de la alimentación de células bacterianas viables y también son significativamente inmunomoduladoras cuando se proporcionan como alimento a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la *Bifidobacteria* que puede obtenerse por aislamiento a partir de tracto GI resecado y lavado, se asocia estrechamente a los tejidos de la mucosa intestinal. Sin quedar ligado adicionalmente a teoría alguna, se cree que esto da como resultado la *Bifidobacteria* probiótica de la presente invención generando respuestas alternativas del hospedador que dan como resultado su acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas que pueden obtenerse mediante aislamiento de tracto gastrointestinal resecado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped a través de la interacción directa con el epitelio de la mucosa y las células inmunitarias del hospedador. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo tradicional de acción asociado a las bacterias probióticas, es decir, la prevención de la adherencia de los patógenos al intestino mediante la oclusión y la competencia por los nutrientes, da como resultado la *Bifidobacteria* de la presente invención que es altamente eficaz como organismo probiótico.

20 La *Bifidobacteria* de la presente invención, como se define en las reivindicaciones y que puede obtenerse por aislamiento a partir de tracto GI felino resecado y lavado, tiene actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un número de cepas/especies bacterianas patógenas. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicativa de actividad probiótica potencial *in vivo* en animales, preferentemente animales de compañía tales como felinos. Las bacterias ácido-lácticas de la presente invención tienen preferentemente actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Eschericia coli*, más preferentemente una mezcla de estas cepas, más preferentemente aún, todas estas cepas.

30 Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas de la presente invención puede ser resultado de un número de diferentes acciones de las bacterias ácido-lácticas del presente documento. Previamente se ha sugerido en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto GI después del consumo oral mediante la prevención de la adhesión de organismos patógenos a la mucosa intestinal por oclusión. Esto requiere el consumo oral de células bacterianas "vivas" o viables con el fin de que una colonia de bacterias se establezca en el intestino. Sin embargo, se cree que la *Bifidobacteria* de la presente invención, que puede obtenerse por aislamiento a partir de tracto GI felino resecado y lavado, mientras que ejerce cierto efecto probiótico debido a la oclusión si se administra en forma viable, puede entregar un efecto probiótico sustancial, ya sea en forma viable o no viable, debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que ya sea destruyen o inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos y/o alteran la competencia inmunitaria del animal hospedador. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias de la presente invención pueden administrarse ya sea como cultivos viables o no viables o productos de fermentación purificados y aun así entregar un efecto terapéutico beneficioso al animal hospedador.

40 Preferentemente, las bacterias ácido-lácticas de la presente invención son capaces de mantener la viabilidad después del tránsito por el tracto GI. Esto es deseable con el fin de que los cultivos vivos de las bacterias se tomen por vía oral y para que se produzca la colonización en el intestino y el colon después del tránsito a través del esófago y el estómago. La colonización del intestino y el intestino por las bacterias ácido-lácticas de la presente invención es deseable para los beneficios probióticos a largo plazo que se entregarán al hospedador. La dosificación oral de células no viables o de aislados purificados de las mismas induce beneficios temporales, pero como las bacterias no son viables, no son capaces de crecer y entregar de forma continua un efecto probiótico *in situ*. Como resultado, esto puede requerir la administración de dosis al hospedador con regularidad con el fin de mantener los beneficios para la salud. Por el contrario, las células viables que son capaces de sobrevivir el tránsito gástrico en la forma viable, y, posteriormente, colonizar mediante la adhesión y la proliferación en la mucosa del intestino, son capaces de entregar efectos probióticos de forma continua *in situ*.

55 Por tanto, se prefiere que las bacterias ácido-lácticas de la presente invención mantengan la viabilidad después de su suspensión en un medio que tenga un pH de 2,5 durante 1 hora. Como se usa en el presente documento, "mantener la viabilidad" significa que al menos el 25 % de las bacterias inicialmente suspendidas en los medios de ensayo son viables usando el procedimiento de recuento de placas conocido por los expertos en la materia. Preferentemente, "mantener la viabilidad" significa que al menos el 50 % de las bacterias inicialmente suspendidas son viables. Es deseable que las bacterias ácido-lácticas de la presente invención mantengan la viabilidad después de la exposición a un pH bajo ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos en el estómago y el intestino superior *in vivo* después del consumo oral en animales.

60 Además, se prefiere que las bacterias ácido-lácticas de la presente invención tengan un crecimiento de al menos el 66 % cuando están en presencia de al menos un 0,3 % de sales biliares porcinas. Crecimiento, como se usa en el

presente documento se describe con más detalle en el ejemplo 3. Más preferentemente, las bacterias de la presente invención tienen un crecimiento de al menos el 66 % cuando están en presencia de al menos un 1 % de sales biliares felinas. Sin quedar ligado por teoría alguna, se cree que las bacterias ácido-lácticas de la presente invención, capaces de mantener la viabilidad en presencia de al menos un 0,3 % de sales biliares porcinas, son capaces de sobrevivir a las condiciones presentes en el intestino. Se cree que esto es resultado de la adición de bilis porcina al medio de cultivo imitando las condiciones del intestino.

Más aún, se prefiere que las bacterias ácido-lácticas de la presente invención tengan una adherencia significativa a las células epiteliales del intestino *in vitro*. Como se usa en el presente documento, "adherencia significativa" significa que al menos el 1 % del número total de bacterias ácido-lácticas coincubadas con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a las células epiteliales. Más preferentemente, al menos el 1,5 % de las células bacterianas coincubadas se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la adherencia de las células epiteliales del intestino *in vitro* es indicativa de la capacidad de las bacterias ácido-lácticas para colonizar el tracto GI de un animal *in vivo*.

La cepa de bacterias ácido-lácticas de acuerdo con la presente invención es de una especie seleccionada entre el grupo que comprende *Bifidobacterium longum*.

La secuencia polinucleotídica intergénica 16s-23s es conocida por los expertos en la materia como la secuencia de ADN en el genoma bacteriano que puede utilizarse con el fin de identificar diferentes especies y cepas de bacterias. Esta secuencia polinucleotídica intergénica puede determinarse mediante el procedimiento que se detalla a continuación en el ejemplo 4.

La cepa de bacterias ácido-lácticas se selecciona entre el grupo que comprende *Bifidobacteria* que tiene una secuencia polinucleotídica 16s-23s de acuerdo con la SEC. ID NO. 1 o SEQ. ID NO. 2. La cepa de bacterias ácido-lácticas de acuerdo con la presente invención se selecciona entre *Bifidobacterium longum* NCIMB 41290 (AHF5340) o *Bifidobacterium longum* NCIMB 41291 (AHF1231).

La cepa de bacterias ácido-lácticas del género *Bifidobacteria* obtenible mediante el aislamiento a partir de tracto GI felino resecado y lavado puede usarse para entregar un beneficio probiótico después del consumo oral en animales, preferentemente animales de compañía o seres humanos. Este beneficio probiótico generalmente mantiene y mejora la salud general del animal. Los elementos no limitantes de la salud y la fisiología animales que se benefician ya sea en el alivio terapéutico de los síntomas o en la prevención de enfermedades mediante profilaxis, incluyen trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, cáncer (especialmente los de los sistemas gastrointestinal e inmunológico), enfermedades diarreicas, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de las articulaciones, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fúngicas, enfermedades periodontales, enfermedades urogenitales, traumatismo asociado a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, aumento de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, cicatrización de heridas, úlceras, infección de la barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedades coronarias, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedades renales, trastornos del sistema nervioso central, enfermedades hepáticas, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos y trastornos epidérmicos. Se prefieren el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o la prevención de la diarrea; la regulación del sistema inmunitario, preferentemente el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes y de la inflamación; el mantenimiento o la mejora de la salud de la piel y/o el sistema de pelaje, preferentemente el tratamiento o la prevención de la enfermedad atópica de la piel; la mejora o la reducción de los efectos del envejecimiento, incluyendo los niveles de conciencia y de actividad mental; la prevención de trastornos asociados al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y la mejora de la salud de las articulaciones por lo cual mejora la movilidad.

El tratamiento de los trastornos desvelados anteriormente puede medirse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los trastornos inflamatorios incluyendo las enfermedades autoinmunes y la inflamación, pueden detectarse y supervisarse usando ensayos *in vivo* de la función inmunitaria tales como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de los linfocitos citolíticos naturales, la respuesta de anticuerpos a las vacunas, la hipersensibilidad de tipo retardado y mezclas de los mismos. Dichos procedimientos se describen brevemente en el presente documento, pero son bien conocidos por los expertos en la materia.

1. Blastogénesis de linfocitos: Este ensayo mide la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos aislados de sangre entera fresca de animales de ensayo y de control a diversos mitógenos y es una medida de la función global de los linfocitos T y B. Brevemente, se aislaron mononucleocitos de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononucleocytes*) de la sangre entera mediante procedimientos de centrifugación por densidad Ficoll-Hypaque conocidos por los expertos en la materia. Los PBMC aislados se lavaron dos veces en medio celular RPMI 1640 complementado con HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomina. Las células lavadas se resuspendieron en RPMI 1640, se contaron y la densidad celular se ajustó apropiadamente. Las 2×10^5 células se expusieron a un intervalo de concentraciones (0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$) de diversos mitógenos, algunos ejemplos de los cuales incluyen el mitógeno de ombú (Gibco), la fitohemaglutinina (Gibco) y la conconavalina A (Sigma)

por triplicado durante 72 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % con suero fetal bovino al 10 % (Sigma). A las 54 horas las células se pulsaron con ³H-timidina 1 µCi y las células se recogieron y los conteos de centelleo se leyeron en un TopCount NXT a las 72 horas.

5 2. Actividad de linfocitos citolíticos naturales: Como se describe en el documento US 6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de los linfocitos citolíticos naturales aislados de la sangre entera fresca de animales de ensayo y de control. Los linfocitos citolíticos naturales son un componente de la función inmunitaria innata de un mamífero. Se usaron células de adenocarcinoma de tiroides felina como células diana en la evaluación de la actividad citotóxica de los linfocitos NK. Esta línea celular previamente demostró ser susceptible a la destrucción mediante linfocitos NK felinos. Las células diana se cultivaron en un matraz T75 con 20 ml de medio mínimo esencial (MEM; Sigma Chem Co., San Luis, MO) complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Cuando confluyeron, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se resuspendieron a 5×10⁵ células/ml en medio completo (RPMI-1640 + FCS al 10 % + 100 U/ml de penicilina + 100 µg/ml de estreptomina). Se pipetearon alícuotas de 100 µl por triplicado de las células diana en placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Mass.) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia de las células. Después se añadieron linfocitos (células efectoras; 100 µl) aislados mediante separación Ficoll-Hypaque (como se ha descrito anteriormente) a las células diana para proporcionar una relación de efector/célula diana (E:T) de 10:1. Después de 10 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 20 µl de un sustrato que contenía 5 µg de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37 °C, después de lo cual el MTT sin metabolizar se retiró por aspiración. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 200 µl de etanol al 95 %. La densidad óptica se midió a 570 nm usando un lector de microplacas. El porcentaje de lisis específica de linfocitos NK se calculó como se indica a continuación:

$$25 \quad \text{Citotoxicidad específica (\%)} = 100 \times \{1 - [(DO \text{ de células diana y células efectoras} \\ - DO \text{ de células efectoras}) / (DO \text{ de células diana})]\}$$

30 3. Respuesta de anticuerpos a las vacunas: A los sujetos de ensayo se les proporciona un conjunto de (hasta 5) vacunas después de al menos 12 semanas de alimentación probiótica o control. Las vacunas pueden ser una mezcla de vacunas nuevas y redundantes. Los ejemplos no limitantes de conjuntos de vacunas que pueden usarse incluyen mezclas de vacunas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Los ejemplos no limitantes de vacunas adecuadas para su uso en el presente documento incluyen el virus del moquillo felino, el adenovirus, el coronavirus, el virus paragripal y el parvovirus. El historial de vacunas del sujeto de ensayo determinará las vacunas que se usarán. Los anticuerpos específicos a las vacunas administradas se miden en la sangre durante 3 semanas y la duración y la fuerza de la respuesta se comparan en los grupos de control y de alimentación probióticos.

35 4. Hipersensibilidad de tipo retardada: Un procedimiento *in vivo*, no invasivo, de evaluación del estado del sistema inmunitario. Este ensayo comprende una inyección intradérmica del mitógeno policlinal Fitohemaglutinina (PHA) en combinación con glóbulos rojos de oveja una vacuna multivalente, histamina (100 µl de fosfato de histamina 0,0275 g/l; Greer, Lenoir, NC) o PBS (100 µl de solución salina tamponada con fosfato, 8,5 g/l; Sigma). La respuesta inmunitaria al antígeno se registra como espesor de pliegue cutáneo usando calibradores en intervalos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Un aumento en el espesor del pliegue cutáneo es indicativo de una mayor respuesta de hipersensibilidad que debería disminuirse mediante el tratamiento con las bacterias de la presente invención.

Se describen procedimientos adicionales para determinar el efecto de las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención en el documento US 6.133.323 y el documento US 6.310.090.

45 Además, la mejora de los efectos de la edad puede determinarse usando absorciometría dual de rayos X o TC para medir la composición corporal, incluyendo la masa grasa corporal, la masa magra y el contenido mineral de los huesos. De forma similar, este procedimiento puede usarse para determinar los cambios en la anatomía tales como la pérdida de peso o la densidad ósea en los sujetos después de la infección.

50 La *Bifidobacteria* de la presente invención también puede usarse en un procedimiento para reducir los niveles de estrés en animales de compañía. Pueden medirse concentraciones de hormonas de estrés en sangre incluyendo la epinefrina, la norepinefrina, la dopamina, el cortisol, la proteína C reactiva y otras proteínas de fase aguda para determinar los niveles de estrés y su reducción o mantenimiento. Estas hormonas son biomarcadores reconocidos de estrés y pueden medirse fácilmente usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Adicionalmente, la medida directa del tamaño suprarrenal como marcador *in vivo* de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal puede medirse mediante formación de imágenes por CT.

Más aún, el mantenimiento o la mejora de la salud de la piel y/o del sistema de pelaje de animales de compañía, incluyendo la enfermedad atópica de la piel, pueden medirse usando evaluaciones de la piel y el pelaje realizadas por dos personas capacitadas. Los ejemplos de los criterios examinados durante dichas evaluaciones incluyen:

60 a) Índice de muda: Se asignó un índice de muda a cada sujeto de ensayo mediante la recolección del pelo producido durante una sesión de cepillado normalizada. El pelo se retuvo y se pesó y los sujetos control y de

ensayo se compararon.

b) Evaluaciones subjetivas de piel/pelaje: Panelistas entrenados evaluaron subjetivamente la piel y el pelaje mediante la evaluación de la muda, la caspa, el brillo, la uniformidad, la suavidad y la densidad.

5 c) Evaluación funcional de la piel: La función de barrera de la piel puede evaluarse limpiando la superficie de la piel con una gasa empapada en acetona. Esta técnica altera eficazmente la barrera de la piel mediante la eliminación de capas de una sola célula de grosor y fracciones lipídicas asociadas de la capa córnea. La alteración de la barrera se cuantifica midiendo el aumento de la pérdida de agua transepidérmica (PATE) y el grado de enrojecimiento del sitio lesionado usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Se obtuvieron puntuaciones del enrojecimiento (eritema) usando el sistema de cámara e iluminación descrito
10 anteriormente. Se obtuvieron lecturas de PATE y puntuaciones de enrojecimiento inmediatamente antes y después de la alteración y en los extremos del intervalo de tiempo, cinco y 24 horas, para evaluar las propiedades protectoras y cicatrizantes de la piel.

15 El tratamiento o la prevención de la diarrea en animales de compañía puede medirse usando puntuaciones de heces. Las puntuaciones de heces pueden registrarse diariamente de acuerdo con las siguientes directrices y los grupos de control y de ensayo pueden compararse antes y después de la alimentación con la bacteria de acuerdo con la presente invención.

Puntuación: 5 Extremadamente secas

20 Estas heces son duras y no se adhieren a las superficies. Las heces rodarán cuando se presionen. No se realizan muescas cuando las heces se recogen. Las heces suelen defecarse en grupos de deposiciones individuales en lugar de en una unidad completa. Las heces mantienen su forma original después de la recolección.

Puntuación: 4 Firmes (heces ideales)

Estas heces son firmes, bien formadas y cilíndricas. Estas heces no se desmoronan fácilmente al recogerlas. Estas heces pueden dejar residuos en las superficies y los guantes. Estas heces con frecuencia se defecan como una unidad. Las heces mantienen su forma original después de la recolección.

25 Puntuación: 3 Blandas, con forma

Estas heces son blandas, sin embargo, hay formas definidas. Estas heces se desmoronarán fácilmente y definitivamente dejarán residuos en las superficies y los guantes. Las heces con frecuencia pierden su forma original después de la recolección. Estas heces con frecuencia están presentes con otra puntuación pero pueden comprender toda muestra de heces.

30 Resultado: 2 Blandas, sin forma

35 Estas heces son blandas y no tendrán forma cilíndrica. La forma con frecuencia asociada a un "2" es una forma de "hamburguesa vacuna". Estas heces perderán su forma original cuando se recojan y definitivamente dejarán residuos en las superficies y los guantes. Esta puntuación de heces con frecuencia está presente con otra puntuación pero puede comprender toda la muestra de heces. Esta muestra de heces puede extenderse en un área de varias pulgadas.

Puntuación: 1 Líquidas

40 Esta puntuación de heces siempre parecerá líquida y puede o no puede haber materia en forma de partículas presente. Estas heces con frecuencia se defecan en grupos de pilas en lugar de en una unidad completa. Con frecuencia hay mucosidad presente con esta muestra de heces. Esta muestra de heces es muy difícil de recoger y siempre se deja residuos en las superficies y los guantes. Esta muestra de heces puede extenderse en un área de varias pulgadas.

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

45 Además, el tratamiento de la infección gastrointestinal en animales de compañía puede comprender la mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía. La mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía preferentemente comprende la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales de compañía pueden enumerarse usando el procedimiento convencional de recuento en placa conocido por los expertos en la materia. Más preferentemente, las bacterias patógenas se seleccionan entre el grupo que consiste en *Clostridios*,
50 *Escherichia*, *Salmonella*, bacteroides y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitantes de cepas adecuadas de bacterias patógenas incluyen *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de los mismos.

El procedimiento de uso de las bacterias de la presente invención como se definen en las reivindicaciones también puede incluir el tratamiento, ya sea profiláctico o terapéutico del tracto urinario de mamíferos, preferentemente de

animales de compañía. Los ejemplos no limitantes de tratamiento del tracto urinario incluyen el tratamiento o la prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento o la prevención de enfermedades renales, incluyendo cálculos del tracto urinario, el tratamiento o la prevención de infecciones de la vejiga y similares. Sin quedar ligado por teoría alguna, se cree que las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención son útiles en la prevención de estas dolencias como resultado de su capacidad de degradar el ácido oxálico, como se demuestra *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario que puede formar precipitados insolubles que dan como resultado infecciones renales, de la vejiga y otras infecciones del tracto urinario. Al degradar el ácido oxálico y por tanto evitar potencialmente su precipitación y acumulación en el tracto urinario, las bacterias de la presente invención pueden tratar y prevenir infecciones y otras dolencias del tracto urinario. La degradación del ácido oxálico puede medirse *in vitro* utilizando el kit de ensayo de ácido oxálico n.º del catálogo 755699 disponible en el mercado de Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

La *Bifidobacteria* de la presente invención puede usarse en un procedimiento para mejorar o mantener la salud de los animales de compañía que comprende mejorar la digestión de la fibra. La mejora de la digestión de la fibra es deseable, ya que promueve el crecimiento de dichas bacterias probióticas, además de la microflora endógena beneficiosa, que ayuda en la supresión de algunas bacterias potencialmente patógenas. Además, se ha documentado en los seres humanos una disminución en la cantidad de metabolitos tóxicos y enzimas perjudiciales que son resultado de la fermentación colónica (Tomomatsu, H. "Health effects of oligosaccharides", (1994) *Food Technol*, 48, 61-65). La digestión de la fibra puede determinarse usando el procedimiento descrito en Vickers y col. (2001), "Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by feline colonic microflora", *Am. J. Vet. Res.* 61 (4), 609-615, con la excepción de que en lugar de inocular usando muestras fecales diluidas cada experimento usó cultivos puros de las cepas bacterianas de interés.

Las cepas probióticas felinas de la presente invención pueden usarse para reducir el mal olor de las heces y la orina y simultáneamente en la caja de arena mediante la reducción de la producción de compuestos en las heces y la orina que causan el mal olor. Los ejemplos no limitantes de compuestos que causan mal olor incluyen amoníaco, indoles, fenoles, aminas, ácidos grasos de cadena ramificada y compuestos volátiles que contienen azufre. Sin desear quedar limitado por teoría alguna, se cree que la reducción de los niveles de estos compuestos en las heces o la orina de un animal de compañía reduce el mal olor asociado a las heces o la orina. Además, para los animales de compañía que usan una caja de arena, existe una disminución simultánea del mal olor en la caja de arena.

El procedimiento de uso de las bacterias ácido-lácticas de la presente invención como se define en las reivindicaciones implica normalmente el consumo oral por el animal. El consumo oral puede tener lugar como parte de la ingestión alimentaria normal o como complemento a la misma. El consumo oral normalmente se produce al menos una vez al mes, preferentemente al menos una vez a la semana, más preferentemente al menos una vez por día. Las bacterias ácido-lácticas de la presente invención pueden administrarse al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz para mantener o mejorar la salud del animal, preferentemente un animal de compañía. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" con referencia a las bacterias ácido-lácticas, significa la cantidad de bacterias suficiente para proporcionar el efecto deseado o el beneficio a un animal hospedador que necesita tratamiento, pero lo suficientemente baja para evitar efectos adversos tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica, coherente con una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa en la manera de la presente invención. La "cantidad terapéuticamente eficaz" específica variará con factores tales como la afección particular que se trata, el estado físico del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si existe), la forma de dosificación específica que se usa, el vehículo empleado, la solubilidad de la forma de dosificación y el régimen de dosificación particular.

Preferentemente, las bacterias ácido-lácticas se proporcionan al animal de compañía a una dosis de desde 1,0E+04 a 1,0E+14 UFC por día, más preferentemente de 1,0E+06 a 1,0E+12 UFC por día. La composición preferentemente puede contener al menos un 0,001 % de 1,0E+04 a 1,0E+12 UFC/g de las bacterias ácido-lácticas del género *Bifidobacteria* que pueden obtenerse mediante el aislamiento a partir de tacto GI felino resecado y lavado. Las bacterias ácido-lácticas pueden administrarse al animal, ya sea en forma viable o como células inactivadas o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de fermentación de las bacterias ácido-lácticas de la presente invención o cualquier mezcla de los mismos.

Preferentemente, las bacterias ácido-lácticas o una fracción purificada o aislada de las mismas, se usan para preparar una composición que tiene por objeto mantener o mejorar la salud de un animal. Como se ha indicado anteriormente, la composición puede ser parte de la ingesta dietética normal o un complemento. Cuando la composición comprende parte de la ingesta dietética normal, la composición puede estar en forma de un alimento para animales seco tal como galletas o croquetas, un alimento de grano procesado, un alimento para animales húmedo, yogures, salsas, masticables, golosinas y similares.

Dichas composiciones pueden comprender componentes adicionales. Otros componentes son beneficiosos para su inclusión en las composiciones utilizadas en el presente documento, pero son opcionales para los fines de la invención. Por ejemplo, las composiciones alimentarias están preferentemente equilibradas nutricionalmente. En una realización, las composiciones alimentarias pueden comprender, sobre la base de materia seca, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 % de proteína en bruto, preferentemente de aproximadamente el 22 % a aproximadamente el 40 % de proteína en bruto, en peso de la composición alimentaria. El material

proteínico en bruto puede comprender cualquier material que tenga un contenido proteínico de al menos aproximadamente el 15 % en peso, cuyos ejemplos no limitantes incluyen proteínas vegetales tales como soja, semilla de algodón y cacahuete, proteínas animales tales como caseína, albúmina y tejido cárnico. Los ejemplos no limitantes de tejidos cárnicos útiles en la presente invención incluyen la carne fresca y las comidas secas o procesadas tales como la harina de pescado, la harina de aves de corral, la harina de carne, la harina de huesos y similares. Otros tipos de fuentes de proteínas en bruto adecuadas incluyen el gluten de trigo o el gluten de maíz y proteínas extraídas de fuentes microbianas tales como la levadura.

Además, las composiciones alimentarias pueden comprender, sobre la base de materia seca, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 35 % de grasa, preferentemente de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % de grasa, en peso de la composición alimentaria. Más aún, las composiciones alimentarias que comprenden las bacterias ácido-lácticas de la presente invención también pueden comprender de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 25 % de la fibra dietética total. Las composiciones también pueden comprender una fuente de almidón múltiple como se describe en el documento WO99/51108.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender adicionalmente una fuente de hidratos de carbono. Son fuentes ilustrativas los granos o cereales tales como arroz, maíz, milo, sorgo, cebada, alfalfa, trigo y similares. Además, las composiciones también pueden contener otros materiales tales como suero de leche desecado y otros subproductos lácteos.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención como se definen en las reivindicaciones también pueden comprender un prebiótico. "Prebiótico" incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del animal de compañía y por tanto promueven el crecimiento o el desarrollo de bacterias ácido-lácticas en el tracto gastrointestinal del animal de compañía, a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en particular ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Los ejemplos no limitantes de prebióticos adecuados incluyen los oligosacáridos, tales como la inulina y sus productos de hidrólisis habitualmente conocidos como fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos u oligoderivados de almidón. Los prebióticos pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede proporcionarse en forma de material vegetal que contiene la fibra. Los materiales vegetales adecuados incluyen espárragos, alcachofas, cebollas, trigo o achicoria o residuos de estos materiales vegetales. Como alternativa, la fibra prebiótica puede proporcionarse como un extracto de inulina, por ejemplo los extractos de achicoria son adecuados. Pueden obtenerse extractos de inulina adecuados de Orafiti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, con la marca comercial "Raftiline". Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftiline (g) ST que es un polvo blanco fino que contiene de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 94 % en peso de inulina, hasta aproximadamente el 4 % en peso de glucosa y fructosa y de aproximadamente el 4 al 9 % en peso de sacarosa. Como alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido tal como se obtiene de Orafiti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, con la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina puede proporcionarse en forma de Raftilose (g) P95. De otro modo, los fructooligosacáridos pueden obtenerse hidrolizando inulina, mediante procedimientos enzimáticos o usando microorganismos.

Para los alimentos secos para animales de compañía un procedimiento adecuado es la cocción por extrusión, aunque pueden usarse el horneado y otros procedimientos adecuados. Cuando se cocina por extrusión, el alimento seco para animales de compañía se proporciona generalmente en forma de una croqueta. Si se usa un prebiótico, el prebiótico puede mezclarse con los otros ingredientes del alimento seco para animales de compañía antes del procesamiento. Un procedimiento adecuado se describe en la solicitud de patente europea N.º 0850569. Si se usa un microorganismo probiótico, el organismo mejor se aplica como revestimiento o se introduce en el alimento seco para animales de compañía. Un procedimiento adecuado se describe en la publicación de patente europea número EP 0 862 863.

Para los alimentos húmedos, pueden usarse los procedimientos descritos en las patentes de los EE.UU. 4.781.939 y 5.132.137 para producir productos cárnicos simulados. También pueden utilizarse otros procedimientos para la producción de productos de tipo trocitos; por ejemplo la cocción en un horno de vapor. Como alternativa, pueden producirse productos de tipo barra mediante la emulsión de un material cárnico adecuado para producir una emulsión cárnica, la adición de un agente gelificante adecuado y el calentamiento de la emulsión cárnica antes del llenado de latas u otros recipientes. Las composiciones alimentarias húmedas típicas pueden comprender de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % de proteína, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % de grasa y de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 7 % de fibra. Los ingredientes no limitantes que pueden utilizarse en las composiciones de alimentos húmedos incluyen pollo, pavo, ternera, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de ternera, hígado de pollo, arroz de cervecera, sémola de maíz, harina de pescado, huevo, pulpa de remolacha, cloruro, harinas de linaza, cordero, subproductos de ternera, subproductos de pollo y mezclas de los mismos.

En otra realización, las composiciones complementarias tales como galletas, masticables y otras golosinas pueden comprender, sobre la base de materia seca, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 % de proteína o de aproximadamente el 22 % a aproximadamente el 40 % de proteína, en peso de la composición complementaria. Como otro ejemplo, las composiciones complementarias pueden comprender, sobre la base de materia seca, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 35 % de grasa o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente

el 30 % de grasa, en peso de la composición complementaria. Se conocen habitualmente en la técnica alimentos y composiciones complementarias que tienen por objeto su uso por felinos o felinos.

Los alimentos para animales de compañía pueden contener otros agentes activos tales como ácidos grasos de cadena larga y cinc. Los ácidos grasos de cadena larga adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido gamma linolénico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y ácido docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semilla de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linolénico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también pueden usarse en los sustratos de revestimiento mencionados anteriormente. El cinc puede proporcionarse en diversas formas adecuadas, por ejemplo como sulfato de cinc u óxido de cinc. Además, muchos ingredientes utilizados habitualmente en alimentos para animales de compañía son fuentes de ácidos grasos y de cinc. Se ha observado que la combinación de achicoria, como fuente de prebióticos, con un aceite rico en ácido linoleico, tal como el aceite de soja, proporciona ventajas inesperadas, indicadoras de un efecto sinérgico.

Cuando la composición está en forma de una salsa, la composición comprende preferentemente al menos el 10 % de un caldo o una materia prima, cuyos ejemplos no limitantes incluyen materia prima vegetal, ternera, pollo o jamón. Las composiciones en salsa típicas pueden comprender de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 % de proteína en bruto, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 % de grasa en bruto y de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % de fibra.

Otros ejemplos no limitantes de complementos adecuados para su uso en el presente documento incluyen polvos, suspensiones en aceite, suspensiones a base de leche, quesos, composiciones a base de manteca de cacao y píldoras o cápsulas. Cuando la composición está en forma de una píldora, se requieren agentes aglutinantes adecuados para mantener la píldora en una forma sólida comprimida. Los ejemplos no limitantes de agentes aglutinantes adecuados incluyen las gomas naturales tales como la goma de xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otros conocidos por los expertos en la materia. Cuando la composición está en forma de una cápsula, la composición se encapsula preferentemente usando tecnologías conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos no limitantes de materiales de encapsulación adecuados incluyen el alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginatos y gelatina. Las composiciones a base de yogur pueden comprender de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % de proteína, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % de hidratos de carbono, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % de fibra, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % de grasa y de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 % de un vehículo líquido tal como la leche.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no tienen por objeto limitar el ámbito de la misma de ninguna manera.

Ejemplo 1: Aislamiento de bacterias ácido-lácticas a partir de tractos GI felinos

Se obtuvieron muestras intestinales felinas de gatos sanos presentados a los veterinarios locales para la eutanasia iniciada y aprobada por el dueño. Todos los animales estaban sanos y libres de enfermedades. Se diseccionaron el colon, el colon medio, el ciego y el íleon de cada gato con el fin de exponer la mucosa.

Los sobrenadantes se retiraron después de la agitación del tejido de la mucosa (agitado con formación de vórtice durante 1 minuto) y después de la homogeneización mecánica del tejido. Cada sobrenadante se sembró en placas con agar de Mann Rogosa Sharpe (MRS). Éstas se incubaron anaeróticamente, usando el sistema Anerocult GasPak, durante 48 horas a 37 °C. Las colonias aisladas de las placas se volvieron a sembrar en estrías en MRS y se volvieron a cultivar anaeróticamente en las mismas condiciones. Las colonias aisladas se volvieron a sembrar en estrías otras 4 veces con el fin de purificar una sola cepa. Se evaluó la morfología y el aspecto microscópico de las colonias. Los aislados adecuados se ensayaron para determinar la reacción de Gram y la actividad de la catalasa. La identificación de los bacilos grampositivos, catalasa negativos se realizó mediante el ensayo de API (API 50CHL, BioMérieux). Las células recogidas se lavaron dos veces con tampón de fosfato 0,05 M (pH 6,5) y cisteína-HCl (500 mg/l), seguido de ultrasonidos. La centrifugación retiró los desechos celulares. Los sobrenadantes se incubaron con NaF (6 mg/ml) y yodoacetato de Na (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante incubación con HCl de hidroxilamina (pH 6,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se controló el desarrollo de color después de la adición de HCl (4 M), FeCl₃·6H₂O (al 5 % (p/v) en HCl 0,1 M) y fructosa-6-fosfato (sal de Na). La formación de fosfato de acetilo a partir de fructosa-6-fosfato se evidencia por el color rojizo formado por el quelato férrico de su hidroxamato.

Ejemplo 2: Detección de actividad antimicrobiana

Cada una de las cepas bacterianas ácido-lácticas aisladas se incubó anaeróticamente en caldo MRS. Se aplicaron puntualmente 2 µl de cada cultivo en placas de agar MRS y se incubaron anaeróticamente durante la noche. Se

5 cultivaron previamente *Salmonella typhimurium* y *E. Coli* enteropatógena (ExPEC) durante la noche y se inocularon 100 µl en agar fundido (al 1 % v/v). Este cultivo indicador se vertió sobre la superficie de las placas de MRS inoculadas. Después de la incubación durante la noche, se midieron las zonas de inhibición alrededor de la colonia probiótica. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en tres ocasiones separadas. Además, la incorporación del tampón betaglicerofosfato al 2 % en el agar permitió la evaluación de la contribución de la producción de ácido a la inhibición de patógenos observada *in vitro*.

Los datos presentados en la Tabla 2 demuestran claramente que las cepas de bacterias ácido-lácticas de la presente invención que pueden obtenerse mediante el aislamiento a partir del tracto GI felino resecado y lavado tienen una actividad antimicrobiana significativa *in vitro*, indicativa de actividad probiótica potencial.

10

Tabla 2

	AHF534D	1231
<i>S. typhimurium</i>	5,5	3,67
ExPEC	6,17	6

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

Tolerancia al pH

15

Se recogieron células bacterianas de cultivos de una noche, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se volvieron a suspender en caldo MRS/TPY ajustado con HCl 1 M a pH 2,5. Las células se incubaron anaeróticamente a 37 °C y su supervivencia se midió a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos usando el procedimiento de recuento de placas conocido por los expertos en la materia. La Tabla 3 resume estos datos por cepa.

Tabla 3

Supervivencia de las cepas en un entorno de pH bajo (pH 2,5). Los datos son el log de los recuentos de UFC.						
CEPA	TIEMPO (min)					
	0	30	60	120	180	360
AHF5340	8,34	8,22	8,29	8,19	8,26	8,12
AHF1231	9,10	9,06	9,07	9,04	8,97	8,91

20

Resistencia a la bilis

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

25

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

30

Una vez que el crecimiento de las colonias en presencia de sales biliares se comparó con los controles, a los descriptores de crecimiento se les proporcionaron valores numéricos de 0, 1, 2 o 3 (-; +; ++, +++ respectivamente) y después se expresaron como porcentaje, donde 3 representa el 100 %.

La Tabla 4 demuestra que la *Bifidobacterium* de la presente invención muestra claramente una resistencia a las sales biliares, siendo capaz de crecer y formar colonias a un nivel de al menos el 66 % en la mayoría de los casos cuando se expone a sales biliares porcinas al 0,3 %.

35

Tabla 4

Supervivencia de las cepas en diversas concentraciones de bilis porcina								
CEPA	PORCENTAJE DE BILIS (%)							
	0	0,3	0,5	1	2	5	7,5	10
AHF5340	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
AHF1231	+++	++	+	-	-	-	-	-

Además, con el fin de evaluar cualquier diferencia en la capacidad de las cepas de colonizar el tracto GI de los gatos, las cepas bacterianas se sembraron en estrías sobre agar MRS complementado con bilis felina al 0,5 %, 1 %

y 2 % (p/v). Se obtuvo bilis felina de gatos sometidos a endoscopia en un entorno clínico durante un procedimiento no-terminal. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas y el crecimiento se registró después de 48 horas. El crecimiento se comparó con placas de control por un observador experimentado y el crecimiento de las colonias se describió como:

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

10 Una vez que el crecimiento de las colonias en presencia de sales biliares se comparó con los controles, a los descriptores de crecimiento se les proporcionaron valores numéricos de 0, 1, 2 o 3 (-; +; ++, +++ respectivamente) y después se expresaron como porcentaje, donde 3 representa el 100 %.

La Tabla 5 demuestra que la *Bifidobacterium* de la presente invención muestra claramente una resistencia a las sales biliares felinas, siendo capaz de crecer y formar colonias a un nivel de al menos el 66 % en la mayoría de los casos cuando se expone a sales biliares felinas al 1 %.

15

Tabla 5

Supervivencia de las cepas en diversas concentraciones de bilis felina				
CEPA	PORCENTAJE DE BILIS (%)			
	0	0,5	1	2
AHF5340	+++	+++	++	++
AHF1231	+++	++	++	+

Adhesión celular epitelial al intestino

La estirpe celular epitelial humana, HT-29, se usó para evaluar las propiedades de adhesión de cepas seleccionadas. Las células epiteliales se cultivaron de sistemáticamente como una monocapa en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 % en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternera fetal al 10 % (FCS), pen/strep, glutamina y fungizona. Para los fines experimentales, las células epiteliales se sembraron a una concentración de 5 × 10⁵ células/ml (volumen total de 3 ml) por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos (Sarstedt). Después de la incubación durante 7 días, para permitir la diferenciación, las monocapas epiteliales se lavaron con medio sin antibiótico que contenía FCS al 10 %.

25 Se añadieron suspensiones bacterianas más/en DMEM sin antibiótico a cada pocillo y las células se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las monocapas se lavaron tres veces con PBS. Las células epiteliales se lisaron en H₂O desionizada y el número de bacterias adherentes se enumeró usando el procedimiento de recuento de placas conocido por los expertos en la materia. La adhesión se expresó como porcentaje del número de bacterias inicialmente sembradas en las placas. La *Bifidobacteria longum* AHF534D tuvo un nivel de adhesión del 1,7 %, mientras que la *Bifidobacteria longum* AHF1231 tuvo un nivel de adhesión del 44,1 %.

30

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

Los aislados de *Bifidobacterium* felina se centrifugaron en tubos de materia prima y el sedimento resultante se lisó en 100 µl de Solución de Extracción y 25 µl de solución de Preparación Tisular (Sigma, Kit XNAT2), se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las muestras se incubaron después durante 5 minutos a 95 °C y después se añadieron 100 µl de Solución de Neutralización (kit XNAT2). Después, la solución de ADN genómico se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop y se almacenó a 4 °C.

35

Se realizó la PCR usando los cebadores espaciadores intergénicos (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' e IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' Bridgidi y col. 2000, *System Appl. Microbiol.*, 23, 391-399 (2000)). Las condiciones de ciclación fueron 94 °C durante 3 min (1 ciclo), 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s (28 ciclos). La reacción de PCR contenía 4 µl (50 ng) de ADN, la mezcla de PCR (kit XNAT2), cebador IGS L y R 0,4 µM (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf. Los productos de PCR (10 µl) se desarrollaron junto a un marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb, Roche) en un gel teñido con EtBr con agarosa al 2 % en TAE, para determinar el perfil de IGS.

40

Los productos de PCR de la *Bifidobacterium* (banda única) se purificaron usando el kit de purificación de PCR Promega Wizard.

45

Los productos de PCR purificados se secuenciaron usando las secuencias de cebadores (véase anteriormente) para la región espaciadora intergénica. Los datos de secuencia se investigaron frente a la base de datos de nucleótidos NCBI para determinar la identidad de la cepa mediante homología de nucleótidos.

Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con la base de datos de secuencias en línea "BLAST", disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para determinar la homología con secuencias 16s-23s bacterianas depositadas. Las coincidencias más aproximadas para *Bifidobacterium longum* NCIMB 41290 (AHF5340) y *Bifidobacterium longum* NCIMB 41291 (AHF1231) fue la cepa *Bifidobacterium longum* NCC2705, que tenía una puntuación de porcentaje de homología del 95 % y del 94 %, respectivamente.

Ejemplo 5: Composiciones de ejemplo

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

Ingrediente	Porcentaje basado en el peso			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej.4
Granos de cereales	hasta 100	hasta 100	hasta 100	hasta 100
Harina de subproductos de aves de corral	43,5	40	45	35
Grasa de aves de corral	1,28	1,02	1,16	1,35
Producto de huevo	2,4	2,1	2,5	2,2
Harina de hígado de pollo	1,0	1,0	1,0	1,0
Levadura de cerveza seca	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monosódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato de calcio	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloruro de potasio	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerales	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloruro de sodio	0,03	0,03	0,03	0,03
Probiótico (1×10^{10} ufc/g de NCIMB 41290 en aceite de girasol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1×10^{10} ufc/g de NCIMB 41291 en aceite de girasol)	-	0,5	1	0,4

10

Los Ejemplos 5 a 7 son ejemplos de composiciones de alimentos húmedos para animales de compañía que comprenden el probiótico *Bifidobacteria longum* de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje basado en el peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	hasta 38	hasta 47	hasta 50
Hígado aves de corral	hasta 25	hasta 20	hasta 15
Productos de aves de corral	25	20	20
Arroz de cervecería	5	7	10
Producto de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de ave	2,9	3,0	3,2
Materia prima de pollo	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1
Minerales	0,05	0,1	0,1
Probiótico (1×10^{10} ufc/g de NCIMB 41290)	4	5	6

Los Ejemplos 8 a 10 son ejemplos de composiciones de complementadas con yogur que comprenden el probiótico *Bifidobacteria longum* de la presente invención.

15

Ingrediente	Porcentaje basado en el peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Leche	38	42	48
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1×10^{10} ufc/g de NCIMB 41291)	4	5	6

La mención de cualquier documento citado en la Descripción Detallada de la invención no debe interpretarse como una admisión de que es técnica anterior con respecto a la presente invención.

5 Original (para PRESENTACIÓN)

0-1	Formulario PCT/RO/134 (SAFE) Indicaciones relativas al microorganismo o microorganismos u otro material biológico depositados (Regla PCT 13bis)	
0-1-1	Preparado usando	PCT-SAFE [Modo fácil] Versión 3.51.001.176 MT/FOP 20060101/0.20.4rc.2.7
0-2	Solicitud Internacional N.º	
0-3	Referencia del expediente del solicitante o del agente	P-171&+/CB
1	Las indicaciones que se hacen a continuación se refieren al microorganismo o microorganismos u otro material biológico depositados referidos en la descripción en:	
1-1	página	2
1-2	línea	24
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución depositaria	NCIMB NCIMB Ltd.
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido
1-3-3	Fecha de depósito	7 diciembre de 2005 (07.12.2005)
1-3-4	Número de registro	NCIMB 41290
1-4	Indicaciones adicionales	Bifidobacterium longum (AHF5340)
1-5	Estados designados para los que se hacen las indicaciones	Todas las designaciones
1-6	Suministro de indicaciones por separado	Recepción del depósito y prueba de viabilidad de la institución depositaria para proporcionarse a la entrada en la fase nacional según sea necesario.
	Estas indicaciones se presentarán a la Oficina Internacional más tarde	
2	Las indicaciones que se hacen a continuación se refieren al microorganismo o microorganismos u otro material biológico depositados referidos en la descripción en:	
2-1	Página	2
2-2	línea	25
2-3	Identificación del depósito	
2-3-1	Nombre de la institución depositaria	NCIMB NCIMB Ltd.
2-3-2	Dirección de la institución depositaria	Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido
2-3-3	Fecha de depósito	20 octubre de 2005 (20.10.2005)
2-3-4	Número de registro	NCIMB 41291
2-4	Indicaciones adicionales	Bifidobacterium longum (AHF1231)
2-5	Estados designados para los que se hacen las indicaciones	todas las designaciones

(continuación)

2-6	Suministro de indicaciones por separado	Recepción del depósito y prueba de viabilidad de la institución depositaria para proporcionarse a la entrada en la fase nacional según sea necesario.
	Estas indicaciones se presentarán a la Oficina Internacional más tarde	
PARA EL USO DE LA OFICINA RECEPTORA SOLAMENTE		
0-4	Este formulario se recibió con la solicitud internacional: (sí o no)	
0-4-1	Oficial autorizado	
PARA EL USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL SOLAMENTE		
0-5	Este formulario fue recibido por la Oficina Internacional el:	
0-5-1	Oficial autorizado	

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Alimentary Health The Iams Company Boileau, Thomas Kiely, Barry MacSharry, John O'Mahony, Liam Sunvold, Gregory
- <120> Bifidobacterias probióticas felinas
- 10 <130> P171P2&
- <140> Aún no asignado
- <141> 21-06-2005
- 15 <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 500
- <212> ADN
- <213> *Bifidobacterium longum*
- 25 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3)..(3)
- <223> n es a, c, g, o t
- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (6)..(6)
- <223> n es a, c, g, o t
- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (475)..(475)
- <223> n es a, c, g, o t
- 40 <400> 1

ES 2 607 988 T3

```

tcngngntgc tgggatacct cctttctacg gagaatgcag gatgccgttc ggcgtccggt    60
gcgaaccctc ccgcgcgatg gtcgcgtgtg gacgggttgc tgggtgtggaa gatgtcgttg    120
gctttgcccc gccggtcgtg cggtggggtgc cgggggtggtg cggatgcgct tttgggctcc    180
cggatcgcca ccccaggctt ttgcctggcg cgattcgatg cccgtcgtgc ctgcgggccg    240
gccgtgtgcc ggtctggtcg gcgtggcggg gcgtgggtggc ttgagaactg gatagtggac    300
gcgagcaaaa caagattttt tttgtgtcct tgttttgctg ttgatttcga atcgaactct    360
attgttcggt tcgatcgttt tgtgatcatt tttagtgtga tgatttgcg tctgggaatt    420
tgctagagga atcttgccg gcacatcatgt tgcgtgtgtg ttgcttgcaa gggcntatgg    480
tggatgcctt gccaccaga                                     500

```

```

5 <210> 2
  <211> 500
  <212> ADN
  <213> Bifidobacterium

10 <220> P-171&+ Sequence List.txt
  <221> misc_feature
  <222> (3)..(3)
  <223> n es a, c, g, o t

15 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (6)..(6)
  <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (441)..(441)
  <223> n es a, c, g, o t

25 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (452)..(452)
  <223> n es a, c, g, o t

30 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (475)..(475)
  <223> n es a, c, g, o t

35 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (485)..(485)
  <223> n es a, c, g, o t

<400> 2

```

ES 2 607 988 T3

```

tcnggngtgc tggggatacc tcctttctac ggagaatgca ggatgctggt cggcgtccgg      60
tgcgaaccct cccgcgcggt ggtcgcggtg ggacggggtg ctggtgtgga agatgctggt      120
ggctttgccc cggcggtcgt gcggtgggtg ccgggggtgg gcggatgcmc ttttgggctc      180
ccggatcggc accccaggct tttgcctggc gcgattcgat gcccgtcgtg cctgcgggcc      240
ggccgtgtgc cggctctggtc ggcgtggcgg tgcgtggtgg cttgagaact ggatagtgga      300
cgcgagcaaa acaagggttt tttgtgtctt tgttttctg ttgatttcga atcgaactct      360
attgttcggt tcgatcgttt tgtgatcatt tttagtgtga tgatttctg tctgggaatt      420
tgctagagga atcttgcggc ncatgcatgt tncgtgtgtg ttgcttgcaa gggcntatgg      480
tggangcctt gccaccaga                                500

```

```

5 <210> 3
  <211> 18
  <212> ADN
  <213> Artificial

10 <220>
   <223> Cebador PCR artificial

   <400> 3
   gctggtcac ctcttctc          18

15 <210> 4
   <211> 18
   <212> ADN
   <213> Artificial

20 <220>
   <223> Secuencia PCR artificial

   <400> 4
   ctggtgcaa ggcattca

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de bacterias ácido-lácticas del género *Bifidobacterium* que puede obtenerse mediante el aislamiento a partir de tracto gastrointestinal felino resecado y lavado que tiene actividad probiótica; en la que la cepa se selecciona entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* NCIMB 41290 (AHF5340) que tiene una secuencia polinucleotídica intergénica 16s-23s de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, *Bifidobacterium longum* NCIMB 41291 (AHF1231) que tiene una secuencia polinucleotídica intergénica 16s-23s de acuerdo con la SEC. ID NO. 2 y mezclas de las mismas.
2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un crecimiento de al menos el 66 % después de 48 horas cuando se cultiva en presencia de sales biliares al 0,5 %.
- 10 3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1 capaz de mantener la viabilidad después de 1 hora a pH 2,5.
4. Una composición que comprende una cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que puede obtenerse mediante el aislamiento de tracto gastrointestinal felino resecado y lavado que tiene actividad probiótica y un vehículo.
- 15 5. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que dicha composición es un alimento para animales de compañía.
6. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que la composición es un alimento para gatos.
7. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que la composición es un alimento húmedo para animales o un alimento seco para animales.
- 20 8. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que la composición está en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en croquetas, alimentos masticables y galletas.
9. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que dicha composición es un complemento alimentario para animales de compañía.
10. La composición de acuerdo con la Reivindicación 9 en la que la composición está en forma de una salsa, un yogur, queso u otros productos lácteos y en forma de cápsulas, comprimidos o píldoras.
- 25 11. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 que comprende al menos el 0,001 % de desde 1,0E+04 UFC/g hasta 1,0E+12 UFC/g de la cepa de acuerdo con la Reivindicación 1.
12. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que la cepa de acuerdo con la Reivindicación 1 está en forma de células viables.
- 30 13. La composición de acuerdo con la Reivindicación 4 en la que la cepa de acuerdo con la Reivindicación 1 está en forma de células no viables o de las fracciones activas constituyentes de las mismas.
14. Un uso de la composición de acuerdo con la Reivindicación 4 para reducir el mal olor asociado a las heces o la orina de un animal de compañía.
15. Un uso de la composición de acuerdo con la Reivindicación 4 para reducir el mal olor asociado a una caja de arena de un animal de compañía.
- 35 16. Un uso de cepas de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 - 13 para mantener o mejorar la salud de un animal de compañía, en el que dicho animal de compañía es un gato.
- 40 17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en la regulación o la mejora del sistema inmunitario; el tratamiento o la prevención de la enfermedad atópica de la piel y la infección gastrointestinal, dolencias del tracto urinario, en los que dicha dolencia del tracto urinario comprende la infección del tracto urinario y cálculos del tracto urinario; la mantención o la mejora de la salud de la piel y/o del sistema de pelaje y; la mejora de la ecología microbiana; la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces, en las que dichas bacterias patógenas se seleccionan entre el grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella* y mezclas de los mismos; de un animal de compañía, en la que el animal de compañía es un gato.