

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S _____

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01003087 00000002

Folios: 63

Fecha (AMD): 2001-04-17 16:49:19

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLETOS

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Re: P1.-SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. - Solicitud de
Patente de Invención para "ALIMENTO PARA MASCOTAS
DESTINADO AL TRATAMIENTO DE LA ESPECIE
HELICOBACTER EN LAS MASCOTAS".-Expediente número
01-003.087.

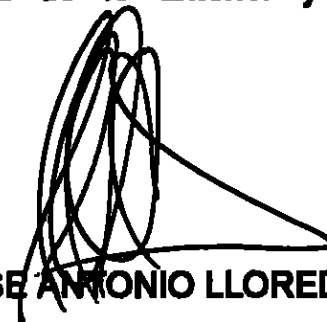
1. Me refiero a mi solicitud de patente arriba nombrada de fecha 17 de Enero de 2001.

2. Anexos me permito presentar a usted copia autentica, debidamente certificada de la solicitud de patente presentada para el invento arriba nombrado respecto de la cual reclamo prioridad, a saber la solicitud europea número 00200179.0 de 18 de Enero de 2000, junto con su traducción simple correspondiente a la totalidad de dicho documento.

3. Anexo también me permito presentar a ese Despacho recibo número 19.076, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la tasa de invocación de prioridad en el presente caso.

4. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,


JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. 10.784

Código 231

NIT : 8001760

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 01003087 00000002

Folios: 63

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 19,076
FECHA : MARZO 23 DE 2001

Fecha (ORD): 2001-04-17 16:49:19
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2899962	23/03/2001	6,273,640.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SOM: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Socete
01.003087

56 53

TRADUCCION No. 470

**TRADUCCION DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES, ALEMAN Y
FRANCES. CERTIFICACION SOLICITUD DE PATENTE, INVENCION
ALIMENTO PARA MASCOTAS PARA TRATAR ESPECIES DE
HELICOBACTER EN MASCOTAS.**

OFICINA EUROPEA DE PATENTES

CERTIFICACION

Los documentos anexos a esta certificación son copias exactas de la solicitud de patente Europea descrita en la página siguiente, de acuerdo con la versión inicialmente registrada.

Solicitud de Patente No.

00200179.0

**El Presidente de la Oficina Europea
De Patentes**

Firmado: I.L.C HATTEN-HECKMAN

La Haya, 09/01/01

54

PAGINA 2 DE LA CERTIFICACION

Solicitud No. : 00200179.0

Fecha de Registro: 18/01/00

Solicitante: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
1800 Vevey
SUIZA

Título de la Invención: Alimento para mascotas para tratar especies de helicobacter en mascotas

Prioridad Relvindicada: (en blanco)

País (en blanco) Fecha (en blanco) Número de Reg. (en blanco)

Clasificación Internacional de la Patente: A23K1/16, , A23L1/18

Estados contratantes designados en la fecha de registro:

AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR

Observaciones: (en blanco)

Sociedad
01.003.037
SS SS

PRIORIDAD

Composición de alimento para mascotas destinado al tratamiento de la especie *helicobacter* en las mascotas

La presente invención trata del uso de una cepa aislada de bacterias lácticas para la preparación de una composición de alimento destinada a la profilaxis o al tratamiento de trastornos relacionados con la infección gástrica producida por organismos semejantes al *Helicobacter* en las mascotas. La invención trata también de la composición de alimento para mascotas preparada de la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se sabe que en los seres humanos, la infección producida por el *Helicobacter pylori* patógeno puede causar gastritis y conducir a una enfermedad ulcerosa y tumores gástricos. Los métodos para el tratamiento son numerosos. Anteriormente, en la EP 577903 (Nestlé) se ha demostrado que las bacterias del ácido láctico son capaces de inhibir el *Helicobacter pylori* tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los animales domésticos carnívoros como los perros y los gatos están virtualmente todos infectados con otras especies de *Helicobacter* gástricos. La mayoría de ellos no se puede cultivar *in vitro*, pero morfológicamente se parecen al *H. heil-*

mannii. También se aisló el *H. felis* de la mucosa gástrica de los gatos y, recientemente, dos nuevas especies de *Helicobacter*, llamadas *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*, fueron aisladas de los perros. Sin embargo, el solo análisis morfológico no permite discriminar entre estas especies de *Helicobacter* y se les agrupa bajo la denominación de "Organismos semejantes al *Helicobacter* Gástrico" (GHLO).

Los GHLO colonizan el antro y/o el cuerpo de las mascotas en tanto que la colonización del *H. pylori* tiene lugar principalmente en el cuerpo. Los organismos GHLO colonizadores se localizan en la profundidad de las glándulas gástricas fúndicas y a veces se encuentran realmente dentro de los canalículos de las células parietales gástricas al igual que en la mucosidad gástrica y de las cavidades, comparados con el *H. pylori* que es conocido como bacteria no invasiva. (Dunn et al, 1997: "Los Hp se encuentran ubicados en la mucosidad adherida al epitelio de la superficie y a menudo se encuentran en las profundidades dentro de las criptas"...)

La contaminación del estómago de los perros y de los gatos por la especie *Helicobacter* es considerada un factor de riesgo importante en el desarrollo de la gastritis suave a moderada. La inflamación que se observa es comúnmente menos severa que la que se produce en el ser humano infectado con *H.*

pylori. Se pueden observar lesiones más severas tales como úlceras, linfomas y cánceres estomacales, pero la patogenicidad de los GHLO está lejos de ser aclarada.

Sin embargo, el control de la infección por los GHLO en los perros y en los gatos a un nivel bajo es reconocido por la mayoría de los veterinarios como beneficioso. Dado que no es una enfermedad totalmente reconocida que requiera terapia con medicamentos, principalmente se necesita un producto alimenticio que contenga un ingrediente activo capaz de disminuir al mínimo la infección producida por los GHLO en los perros y en los gatos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

De este modo, la presente invención se refiere al uso de por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria de ácido láctico que haya sido aislada y seleccionada por su capacidad de desplegar una poderosa actividad bactericida anti-*Helicobacter* *in vitro*, para la preparación de una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de los trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas.

En una modalidad preferida, se usan un medio fermentado por esas bacterias de ácido láctico o subfracciones de un medio

cultivado fermentado por la cepa aislada de bacterias de ácido láctico.

La cepa de bacterias de ácido láctico puede seleccionarse del grupo formado por *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

En una modalidad preferida, la cepa de bacterias lácticas se selecciona del grupo formado por *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, *Lactobacillus fermentum* NCC 2592, *Lactobacillus fermentum* NCC 2613, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I - 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Bifidobacterium sp.* NCC 2627, *Bifidobacterium sp.* NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Otro objetivo se relaciona con el método para el tratamiento o para la profilaxis de las alteraciones relacionadas con la infección producida por los GHLO en las mascotas, que comprende la administración a una mascota de una composición que contiene por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria de ácido

láctico que ha sido aislada y seleccionada por su capacidad de desplegar una poderosa actividad bactericida anti-*Helicobacter in vitro*.

Otro objetivo consiste en proporcionar una composición de alimento para mascotas que contiene por lo menos una cepa aislada de bacterias de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria láctica con las características anteriores, asociado con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

Esta composición de alimento para mascotas es capaz de disminuir la infección producida por GHLO en los perros y en los gatos de manera que la carga de los GHLO y la actividad de la ureasa se reduzcan en por lo menos 0,5 grado en el fondo y de por lo menos 0,5 grado en el antro.

El efecto de la composición sobre la gastritis crónica también fue evaluado por examen citológico de biopsia en secciones delgadas. Puede inducir una regresión de gastritis fúndica crónica, con un promedio de regresión del grado de inflamación gástrica de por lo menos 0,5 (graduada de 0 a 3).

En otra modalidad, esta composición de alimento para mascotas puede llevar a una reducción significativa de los olores del aliento que se correlacionan con el nivel de infección producida por los GHLO.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Dentro de la siguiente descripción, el término "GHLO" define los "organismos semejantes al Helicobacter Gástrico". Bajo esta denominación se agrupan especies de *Helicobacter* tales como *Helicobacter felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeroni* y *H. salomonis*, por ejemplo, que se ha demostrado que colonizan la mucosa gástrica de las mascotas.

Además, incluimos dentro del término de los "trastornos producidos por los GHLO", todos los trastornos que puedan afectar directamente el tracto gastrointestinal de las mascotas, pero también trastornos secundarios tales como síntomas de mal aliento, por ejemplo.

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

Con respecto al primer objetivo de la presente invención, éste consiste en el uso de por lo menos una cepa de bacteria de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico capaz de desplegar una poderosa actividad bactericida anti-Helico-bacter *in vitro*, para la preparación de una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de los trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas.

64
61

Estas cepas se han seleccionado de entre las cepas de bacterias lácticas con respecto a sus parámetros tecnológicos y fisiológicos, y en especial, por sus buenas características de crecimiento, por lo menos 5×10^8 bacterias/ml, de preferencia $10^6 - 10^{10}$ bact/ml, y con mayor preferencia aún $10^9 - 10^{10}$ bact/ml y su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-*Helicobacter* in vitro.

En una modalidad preferida, se puede seleccionar la cepa de bacterias de ácido láctico de entre el grupo compuesto por *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium* sp., *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

La cepa de bacterias lácticas se selecciona de preferencia de entre el grupo formado por *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM I - 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, *Lactobacillus fermentum* NCC 2592, *Lactobacillus fermentum* NCC 2613, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I - 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Bifidobacterium* sp. NCC 2627, *Bifidobacterium* sp. NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

62

Entre las diversas cepas seleccionadas de acuerdo con la presente invención, las siguientes cepas fueron depositadas a modo de ejemplo conforme al Tratado de Budapest en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, *Lactobacillus johnsonii* (NCC 533) el 30.06.92 conforme a la referencia CNCM I - 1225, *Lactobacillus paracasei* (NCC 2461) el 12.01.99 conforme a la referencia CNCM I - 2116.

La cepa de *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536) es proporcionada por Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca).

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Lactobacillus johnsonii CNCM I - 1225

- Microorganismo gram positivo, no movable, no formador de esporas
- Pequeños bastones bastante cortos y gruesos
- Microorganismo microaerófilo con metabolismo homofermentativo, producción de ácido láctico L (+) y D (-).
- Catalasa (-), producción de CO₂ (-), hidrólisis de arginina (-)
- Fermentación de azúcares: Amigdalina(+), arabinosa (-), celobiosa(+), esculina(+), fructosa(+), galactosa(-), glucosa(+), lactosa(+), maltosa(+/-), manitol(-), manosa(+), meli-

biosa(-), rafinosa(+), ribosa(-), salicilina(+), sacarosa (+), trehalosa(+).

Lactobacillus paracasei CNCM I - 2116

- Gram positivo
- Catalasa negativa,
- Arginina de forma NH₂ negativa
- Producción de CO₂ negativa
- Producción de ácido láctico L (+),
- Crecimiento en presencia de sales biliares en una concentración de hasta alrededor de 0,4%.

La cepa aislada de bacterias lácticas y/o su medio de cultivo fermentado puede usarse para la preparación de composiciones destinadas a mejorar la salud de las mascotas y, en particular, para la prevención o el tratamiento de los trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas.

También puede ser usada en otros trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO tal como el mal aliento. En realidad, la presencia de GHLO en el estómago de los perros y de los gatos puede tener clara influencia en el mal aliento al producir gran cantidad de amoníaco de la urea. Este amoníaco puede aparecer en el aliento después de la eructación. El mal aliento podría relacionarse también con

62
64

la presencia de GHLO en el estómago por la producción de compuestos volátiles de sulfuro.

También se puede usar una subfracción del medio de cultivo fermentado por la cepa de bacterias de ácido láctico aislada.

La cepa de bacterias de ácido láctico de acuerdo con la invención puede usarse en su forma viable o inactivada.

En una modalidad preferida, la cepa de bacterias lácticas se usa en presencia de su medio de crecimiento fermentado. Ese medio puede ser esterilizado solo o con alimento, extruido o deshidratado por aspersión, enfriado o en almacenaje, por ejemplo.

Las bacterias de ácido láctico o el medio de fermentación equivalente puede usarse de manera que la cantidad disponible para la mascota corresponda a alrededor de $10^3 - 10^{14}$ ufc al día. Esta cantidad depende del peso del animal y es preferible de alrededor de $10^9 - 10^{12}$ ufc/día para los perros y $10^7 - 10^{11}$ ufc/día para los gatos.

En otra modalidad, la invención trata de un método para el tratamiento o la profilaxis de trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas, que comprende la administración a una mascota de una composición que contiene por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria de ácido

68 65

láctico que tenga las características anteriores. La cantidad disponible para la mascota puede corresponder a aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc al día y es preferible que sea de aproximadamente 10^9 - 10^{12} ufc/día para los perros y 10^7 - 10^{11} ufc/día para los gatos.

El segundo objetivo principal de la presente invención se relaciona con una composición de alimento para mascotas que contenga por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o medio de crecimiento fermentado. Esa bacteria de ácido láctico tiene las características anteriores, asociadas con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

La cepa y/o su medio fermentado puede seleccionarse de una o más bacterias lácticas adecuadas para consumo animal por su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-*Helicobacter in vitro*.

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

La composición del alimento para mascotas nutricionalmente completo de acuerdo con la invención puede ser un producto de alimentación para mascotas en forma de polvo, seco o húmedo, enfriado o en almacenaje.

También puede ser un suplemento dietético para mascotas o composiciones farmacéuticas.

El alimento para mascotas nutricionalmente completo puede ser de cualquier forma adecuada, por ejemplo, en forma seca, en forma semi-húmeda y en forma húmeda. Estos alimentos para mascotas pueden ser producidos de manera convencional. Además de las cepas de bacterias y/o su medio fermentado, estos alimentos para mascotas pueden incluir una o más de una fuente de almidón, una fuente de proteína y una fuente de lípidos.

Fuentes adecuadas de almidón son, por ejemplo, granos y legumbres como el maíz, arroz, trigo, centeno, avena, soya y mezclas de los mismos.

Las fuentes adecuadas de proteínas pueden seleccionarse de cualquier fuente adecuada de proteína animal o vegetal, por ejemplo, carne y comida, comida de ave, harina de pescado, concentrados proteicos de soya, proteínas de leche, gluten y otros semejantes. Para animales de más edad, se prefieren como fuentes de proteínas las que contienen proteína de alta calidad.

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

70
67

La elección de las fuentes de almidón, proteínas y lípidos serán en gran medida determinadas por las necesidades de nutrición del animal, consideraciones de palatabilidad y el tipo de producto que se produce. Para mascotas de mayor edad, el alimento de las mascotas contiene de preferencia menos grasa que el alimento para mascotas más jóvenes. Además, las fuentes de almidón pueden incluir una o más de arroz, centeno, trigo y maíz.

Además, según se desee, también se pueden incorporar a los alimentos para mascotas diversos otros ingredientes, por ejemplo, azúcar, sal, especias, condimentos, vitaminas, minerales, agentes saborizantes, grasas y otros semejantes.

Para los alimentos secos para mascotas, un proceso adecuado es el cocimiento por extrusión, aunque se puede usar horneado y otros procedimientos adecuados. Cuando se usa el cocimiento por extrusión, el alimento seco para mascotas se proporciona comúnmente en forma de galleta desmenuzada ("kibble"). Si se usa un probiótico, el probiótico puede ser agregado a los otros ingredientes del alimento seco para mascotas antes del procesamiento. Un proceso adecuado se encuentra descrito en la solicitud de patente europea No.0850569; cuya divulgación se incorpora por referencia. Si se usa un microorganismo probiótico, el organismo queda mejor revestido en el alimento

seco para mascotas o agregado a éste. En la solicitud de patente europea No.0862863, se describe un proceso adecuado cuya divulgación se encuentra incorporada por referencia.

Para el caso de los alimentos húmedos, se pueden usar los procedimientos que se describen en las patentes de los Estados Unidos 4.781.939 y 5.132.137 para producir productos de imitación de la carne. Las divulgaciones de estas patentes se encuentran incorporadas por referencia. También se pueden usar otros procedimientos para producir productos del tipo trozos; por ejemplo, cocimiento en un horno de vapor. De manera alternativa, se pueden producir productos del tipo pastel, emulsificando un material de carne adecuado para producir una emulsión de carne, agregando un agente adecuado para cuajar en forma de gel y calentando la emulsión de carne antes de llenar las latas u otros envases.

La cantidad de prebióticos en el alimento para mascotas es de preferencia de alrededor del 20% por peso; especialmente de alrededor del 10% por peso. Por ejemplo, el prebiótico puede comprender de alrededor del 0,1% a alrededor del 5% por peso del alimento para mascota. En el caso de los alimentos para mascotas que usan achicoria como prebiótico, la achicoria puede ser incluida hasta comprender alrededor del 0,5% a al-

72
69

rededor del 10% por peso de la mezcla alimenticia; con mayor preferencia, de alrededor del 1% a alrededor del 5% por peso. Si se usa un microorganismo probiótico, el alimento para mascotas contiene de preferencia de alrededor de 10^4 a alrededor de 10^{10} células del microorganismo probiótico por gramo del alimento para mascotas; con mayor preferencia, de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^8 células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para mascotas puede contener de alrededor del 0,5% a alrededor del 20% por peso de la mezcla del microorganismo probiótico; de preferencia de alrededor del 1% a alrededor del 6% por peso; por ejemplo, de alrededor del 3% a alrededor del 6% por peso.

Los alimentos para mascotas pueden contener otros agentes activos tales como ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga incluyen el ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linoleico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado constituyen una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y ácido docosahexanoico. El aceite de borraja, aceite de semilla de grosella negra y aceite de la hierba del asno constituyen fuentes adecuadas de ácido gamma-linoleico. Los aceites de azafrán, aceites de maravilla, aceites de maíz y aceites de porotos de soya son fuentes adecuadas de ácido linoleico.

73
70

Si es necesario, los alimentos para mascotas se complementan con minerales y vitaminas para que queden nutricionalmente completos.

Además, si se desea, la cepa de bacterias puede encapsularse, por ejemplo, en una matriz de azúcar, matriz de grasa o matriz de polisacáridos.

La cantidad de alimento para mascotas que deba ser consumida por la mascota para obtener un efecto beneficioso dependerá del tamaño de la mascota, del tipo de mascota y de la edad de la mascota. Sin embargo, comúnmente sería adecuada una cantidad del alimento para mascotas para proporcionar una cantidad diaria de alrededor de 10^3 - 10^{14} ufc de por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o el medio de fermentación equivalente. De preferencia se administra alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc/día a los perros ó 10^7 - 10^{11} ufc/día a los gatos.

La composición de acuerdo con la invención está particularmente destinada a la profilaxis o el tratamiento de infecciones relacionadas con los GHLO en las mascotas. También está destinada a mantener sana la función digestiva en las mascotas y a prevenir una reinfección por cepas patógenas tales como los GHLO, por ejemplo. Así, esta composición puede también ser usada con adyuvante de una antibioterapia contra la infestación causada por los GHLO.

71

El efecto de la composición de acuerdo con la invención sobre los GHLO fue evaluada por un examen histológico de secciones de biopsia (ver ejemplo 2). Si el número de GHLO por sección es de ninguna bacteria (grado "0"); menos de 5 bacterias (grado "1"); entre 5 y 20 bacterias (grado "2") y más de 20 bacterias (grado "3"). Esta composición de alimento para mascotas puede disminuir la infección producida por GHLO en los perros y en los gatos de manera que la carga de los GHLO y la actividad de la ureasa en el fondo se reduzca por lo menos en 0,5 grado y en por lo menos 0,5 grado en el antro.

El efecto de la composición sobre la gastritis crónica también fue evaluado mediante examen citológico de secciones delgadas de biopsia. La clasificación histológica de la gastritis crónica es la siguiente:

- grado 0: fibrosis superficial, 0 neutrófilos, 0-10 linfocitos y células de plasma, sin agregados, epitelio normal;
- gastritis crónica suave - grado 1: gastritis crónica superficial 10-15 linfocitos o células de plasma involucrando el tejido intersticial superficial, agregados <2, epitelio normal,
- gastritis crónica moderada -grado 2: gastritis crónica intersticial, 10 - 50 o más linfocitos o células de plasma in-

72

volucrando todo el grosor de la mucosa, agregados >3, epitelio normal,

- gastritis crónica severa - grado 3: gastritis atrófica 10 - 50 o más linfocitos o células de plasma, agregados >3, cambios glandulares en el epitelio.

Esta composición puede inducir a la regresión de la gastritis fúndica crónica con una regresión mediana del grado de inflamación gástrica de por lo menos alrededor de 0,5.

Esta composición ha probado también inducir una reducción significativa del mal aliento. Así, está destinada a tratar o prevenir trastornos secundarios relacionados con la infección producida por los GHLO tal como el mal aliento en las mascotas.

Además, las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden estar destinadas a mejorar la longevidad de los perros.

Los siguientes ejemplos se dan solamente a modo de ilustración y de ninguna manera deberán interpretarse como limitantes del tema de la presente aplicación. Todos los porcentajes se dan por peso a menos que se indique de otro modo.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Selección de la cepa bacteriana

7/10
73

Para seleccionar la cepa bacteriana de acuerdo con la presente invención, se pueden incubar GHLO (bacterias 10^7) cultivables a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 1-2 h en presencia de diluciones de sobrenadantes del crecimiento de esa cepa bacteriana (BS) en DMEM. A continuación de la incubación, se centrifuga la mezcla de GHLO-BS a $12'000\text{ g}$ durante 3 minutos, el "pellet" se lava entonces con 1 ml de 0,9% de NaCl y se vuelve a suspender en 500 μl de la prueba de ureasa rápida (Jatrox[®]-H.p.-test, Procter & Gamble Pharmaceuticals GmbH, Witterstadt, Alemania). Los cambios colorimétricos proporcionales a la actividad de la ureasa son determinados por análisis fotométricos con una densidad óptica de 550 nm.

La viabilidad bacteriana se estima antes y después de la incubación con LS mediante diluciones en serie de placas de los GHLO en placas de suero (GC. agar, Gibco BRL, Paisley, Escocia) complementadas con 10% de suero de caballo, Inotec, y con 1% de Isovitale X (Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, MD) y se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC).

EJEMPLO 2

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

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

El comité ético de la Escuela de Veterinaria de Lyon, Francia, aprobó el estudio. En el estudio se incluyeron nueve sabuesos machos que habían contraído naturalmente una infección gástrica con GHLO. Los perros variaban en peso entre 10 y 14 kilos y en edad entre 3 y 4 años. Se instalaron a los perros en casas para perros individuales con idénticas condiciones de higiene y alimentación (Escuela de Veterinaria de Lyon, Francia). Las casas se limpiaban y desinfectaban diariamente. A los perros se les alimentó regularmente a las 8 a.m. y ellos tenían acceso constante al agua durante el estudio. A través de todo el estudio, se les alimentó con una dieta específica: VITALITY® - Friskies, Francia (anexo A).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Antes del tratamiento, se había confirmado la infección gástrica producida por GHLO en los 9 sabuesos, evaluando la identificación de los GHLO (histobacteriología), la actividad de la ureasa gástrica (Jatrox® test) y la presencia de gastritis crónica (histopatología), en biopsias fúndicas y/o antrales del estomago. A todos los perros con infección por GHLO se les sometió a un tratamiento durante 13 días corridos. La detección de la infección gástrica por GHLO mediante

22
75

estas pruebas más la prueba de aliento de ^{13}C -urea se repitió tres veces: antes del tratamiento [D_0], al final del tratamiento [D_{13}] y 30 días después del final del tratamiento [D_{43}].

TRATAMIENTO

El tratamiento consistió en un consumo diario de una preparación de leche acidificada fermentada por *L. johnsonii* NCC 533 durante 13 días corridos. La preparación de leche acidificada debía ser enteramente comida antes de la dieta específica (240 g de "VITALITY®"/perro).

PRUEBAS DE EVALUACION

- *Examen clínico*: durante todo el estudio, los perros fueron observados por dos veterinarios de la Escuela de Veterinaria de Lyon, Francia. Las observaciones clínicas tenían que registrarse en el formulario de informes de casos.
- *Biopsia gástrica*: la endoscopia gástrica se realizó con anestesia (Ketamine, IMALGENE®, 5 mg/kg - IM). A los perros se les dejó en ayunas durante 24 horas. La endoscopia se realizó con un videogastroscoPIO Olympus® GIFK/XV10. En cada día de evaluación, tenían que sacarse 12 biopsias del fondo y del antro. Había que usar inmediatamente dos biopsias fúndicas y antrales para medir la actividad de la ureasa de los GHLO. Había que guardar cuatro biopsias fúndicas y antrales

en una solución de "bouin" antes de usarlas en histobacteriología e histopatología.

- *Identificación de los GHLO (histobacteriología)*: La identificación de los GHLO se hizo mediante un examen histológico de secciones de biopsia. Se tiñeron secciones de tejidos con tinción tipo Giemsa y se evaluaron mediante microscopios ópticos (x 1.000). Se hace una evaluación semicuantitativa de los GHLO tomando en cuenta la localización en el estómago y la profundidad de la contaminación extracelular. Si el número de GHLO por sección es de ninguna bacteria (grado "0"); menos de 5 bacterias (grado "1"); entre 5 y 20 bacterias (grado "2") y más de 20 bacterias (grado "3"). Para cada biopsia fúndica y antral, se hicieron dos secciones, luego se evaluaron y el resultado fue el promedio de las dos evaluaciones (Ref. Willard M.D. Caracterización del pequeño sobrecrecimiento bacteriano intestinal de desarrollo natural en 16 perros pastores alemanes *J. Am Vet Med Assoc*, 1994, 204, 1201-1206).

- *Actividad de la ureasa gástrica (Jatrox®- H.P. test, Procter & Gamble, Alemania)*: El principio de la prueba consiste en que la urea en el medio de la prueba es dividida por la ureasa presente en los GHLO. El alza en el valor del pH asociada con la división de la urea produce un cambio de color

20
77

en el medio indicador (rojo fenol) de amarillo a rosado/rojo. Se aplicaron las pruebas a las biopsias inmediatamente después de sus muestras. Después de la introducción de la biopsia en el medio indicador, se leyó la prueba Jatrox® a los 180 minutos mediante un fotómetro con un detector ultravioleta que fue colocado en 550 nm para su lectura con una referencia a 650 nm. La actividad de la ureasa en las biopsias fúndicas y antrales fue el promedio de dos medidas ópticas.

- Prueba de aliento de ^{13}C -urea: La prueba de UBT se realizó dos horas después de la anestesia para la endoscopia de manera que ésta no influyera en los resultados de la UBT. La UBT se hizo con los perros en ayunas, sin anestesia. La primera vez, los perros comieron una comida de prueba, que consistía en la mitad de su ingesta diaria, es decir 120 g de VITALITY®/perro. En una segunda vez, a los perros se les administró oralmente 7,5 mg de ^{13}C -urea/perro (MASS TRACE, Woburn - USA). Las muestras exhaladas de $^{13}\text{CO}_2$ se obtuvieron antes de la comida de prueba [TB], luego 40 minutos después de la administración de ^{13}C -urea [T40]. Después, se les dio a los perros la segunda mitad de su ingesta diaria de alimento. Las muestras de $^{13}\text{CO}_2$ exhaladas se analizaron con un espectrómetro de masa por relación de isótopos de gas (FINNIGAN MAT, Bremen, Alemania). Para normalizar los resultados entre los la-

boratorios, se usó un análogo de la norma internacional para la referencia ^{13}C - (Viennaa Pee Dee Belemnite o VPDB). El exceso de porcentaje de átomos para $^{13}\text{CO}_2$ se definió como la diferencia (valor delta, δ) en porcentaje de átomos $^{13}\text{CO}_2$ entre la muestra de base (la muestra antes de la comida de prueba y la administración de ^{13}C [TB] y las muestras obtenidas después de 40 minutos [T40] x 1000 (44,45). Los resultados se expresan como un exceso de δ $^{13}\text{CO}_2$ (δ ‰).

- *Histopatología (citología)*: La histopatología se realizó mediante la prueba citoloBT, se realizó por examen citológico de secciones delgadas de biopsia. Se tñeron las secciones de impresión con Hematoxilina-Foloxina-Safranina (Hematoxylin-Pholoxin-Saffron) (HPS) y se observaron al microscopio. Los criterios para los diagnósticos histológicos de las biopsias gástricas se basan en el número de cada tipo de célula que es el promedio de tres campos vistos a un aumento de 400x y la cantidad de agregados linfocíticos que es el número en una muestra a un aumento de 200x. La clasificación histológica de la gastritis crónica es la siguiente:

- grado 0: fibrosis superficial, 0 neutrófilos, 0-10 linfocitos y células de plasma, sin agregados, epitelio normal;

- gastritis crónica suave - grado 1: gastritis crónica superficial 10-15 linfocitos o células de plasma involucrando el tejido intersticial superficial, agregados <2, epitelio normal,
- gastritis crónica moderada - grado 2: gastritis crónica intersticial, 10-50 o más linfocitos o células de plasma involucrando todo el grosor de la mucosa, agregados >3, epitelio normal,
- gastritis crónica severa - grado 3: gastritis atrófica, 10-50 o más linfocitos o células de plasma, agregados >3, cambios en el epitelio glandular (atrofia).

(Ref.: P. Lecoindre, M. Chevallier, R. Gillard y F. Daurin.- Pequeño sobrecrecimiento bacteriano y enfermedades inflamatorias del intestino en los perros. Evaluación de la eficacia terapéutica de la asociación de la Espiramicina con el Metro-nidazol. Revue Méd. Vét., 1998; 149:843-852).

ANALISIS ESTADISTICO

Cada resultado de las pruebas de diagnóstico fue el promedio de dos medidas de distintas biopsias. La normalidad o no normalidad de la distribución del resultado había sido examinada por el procedimiento Wilk-Shapiro.

83
80

Los efectos del tratamiento y postratamiento fueron evaluados usando una prueba Wilcoxon Signed Rank (WSRT) y/o t-test pareada ("Paired t-test").

Todos los cálculos estadísticos se efectuaron con un programa de software (Statistix®, Excel Microsoft®). Un valor-P < 0,05 se consideró significativo.

RESULTADOS

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

Tabla 1: histobacteriología *in fundus*

	Fondo/Cuerpo (grado)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	3	1	2	-2	1	-1
B02	3	2	3	-1	1	0
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	3	2	1	-1	-1	-2
B06	3	0	3	-3	3	0
B07	3	1	2	-2	1	-1
B08	3	3	2	0	-1	-1
B09	3	1	1	-2	0	-2
B10	3	1	3	-2	2	0
Mediana	3	1	2	-2	1	-1

84
81

Nbr. < 0	-	-	-	8	3	6
Nbr. = 0	-	-	-	1	1	3
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	0
n	9	9	9	9	9	9
Promedio	2,9	1,3	1,9	-1,6	0,6	-1
+SEM	0,11	0,29	0,35	0,29	0,47	0,29

	D ₁₄ vsD ₀	D ₄₃ vsD ₁₄	D ₄₃ vsD ₀
WSRT	0,0143	0,3270	0,0360

TABLA 2: Histobacteriología in Antrum

	Antro (grado)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	1	1	2	0	1	1
B02	1	1	2	0	1	1
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	2	1	2	-1	1	0
B06	2	1	1	-1	0	-1
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	2	0	2	-2	2	0
B10	2	1	1	-1	0	-1
Mediana	2	1	1	-1	1	0

85
82

Nbr. < 0	-	-	-	6	1	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	3	4
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	2
n	9	9	9	9	9	9
Promedio	1,6	0,8	1,3	-0,8	0,6	-0,2
+ - SEM	0,18	0,15	0,24	0,22	0,29	0,32

	D ₁₄ vsD ₀	D ₄₃ vsD ₁₄	D ₄₃ vsD ₀
WSRT	0,0360	0,1422	0,5896

Al final del período del tratamiento ([D₀] a [D₁₄]), la mediana de la carga bacteriana con GHLO disminuyó significativamente en grados del "3" al "1" en el fondo (P= 0,0143) y del "2" al "1" en el antro (P= 0,0360).

Entre el inicio del tratamiento y el fin del estudio ([D₀] a [D₄₃]), la mediana de la carga bacteriana con GHLO disminuyó significativamente en grados del "3" al "2" en las biopsias fúndicas (P< 0,0360). En las biopsias antrales no hubo diferencia significativa.

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

86
83

TABLA 3: Actividad de la ureasa gástrica (prueba Jatrox®) en el fundus

	Fondo/Cuerpo (densidad óptica)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	0,43	0,34	0,43	-0,09	0,09	0,01
B02	0,42	0,39	0,44	-0,04	0,05	0,01
B04	0,54	0,00	0,44	-0,53	0,44	-0,10
B05	0,47	0,31	0,49	-0,16	0,18	0,02
B06	0,44	0,42	0,43	-0,02	0,01	-0,01
B07	0,52	0,40	0,41	-0,11	0,01	-0,11
B08	0,68	0,31	0,40	-0,37	0,09	-0,28
B09	0,45	0,35	0,38	-0,10	0,02	-0,08
B10	0,44	0,32	0,43	-0,13	0,01	-0,01
Mediana	0,46	0,34	0,43	-0,12	0,09	-0,01
Nbr. < 0	-	-	-	9	0	6
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	0	9	3
n	9	9	9	9	9	9
Promedio	0,49	0,32	0,43	-0,17	0,11	-0,06
+ - SEM	0,03	0,04	0,01	0,06	0,04	0,03

	D ₁₄ vsD ₀	D ₄₃ vsD ₁₄	D ₄₃ vsD ₀
--	----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

84

Prueba-t	0,0155	0,0381	0,0921
pareada			

TABLA 4: actividad de la ureasa gástrica (prueba Jatrox®) en el Autrum

	Antro (densidad óptica)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	0,31	0,00	0,00	-0,31	0,00	-0,31
B02	0,33	0,05	0,00	-0,28	-0,05	-0,33
B04	0,41	0,00	0,00	-0,41	0,00	-0,41
B05	0,46	0,00	0,00	-0,46	0,00	-0,46
B06	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
B07	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00
B08	0,00	0,07	0,00	0,07	-0,07	0,00
B09	0,05	0,00	0,00	-0,05	0,00	-0,05
B10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mediana	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
Nbr. < 0	-	-	-	6	2	6
Nbr. = 0	-	-	-	2	7	3
Nbr. > 0	-	-	-	1	0	0
n	9	9	9	9	9	9
Promedio	0,20	0,01	0,00	-0,19	-0,01	-0,20

88
85

+SEM	0,06	0,01	0,00	0,07	0,01	0,06
------	------	------	------	------	------	------

	D ₁₄ vsD ₀	D ₄₃ vsD ₁₄	D ₄₃ vsD ₀
Prueba-t pareada	0,0197	0,1756	0,0123

○

Al final del período de tratamiento ([D₀] a [D₁₄]), el promedio de la actividad de la ureasa disminuyó de manera significativa del 35% en el fondo (P= 0,0155) y 93% en el antro (P= 0,0197).

Veintinueve días después del fin del tratamiento ([D₁₄] a [D₄₃]), el promedio de la actividad de la ureasa aumentó de manera significativa del 35% en las biopsias fúndicas (P = 0,0381), pero todavía permanecía más baja que al inicio del tratamiento. La actividad de la ureasa antral no se modificó y permaneció nula.

○

Actividad de la ureasa global (prueba del aliento ¹³C-urea):
Los resultados se dan en la Tabla 5.

TABLA 5: Actividad de la ureasa global (prueba del aliento ¹³C-urea)

	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	34	6	55	-28	49	21

89
88

B02	18	26	21	8	-5	3
B04	165	24	50	-141	26	-116
B05	15	7	6	-8	-1	-9
B06	18	20	19	2	-1	1
B07	12	13	22	1	9	10
B08	47	17	15	-30	-2	-32
B09	20	10	9	-10	-1	-11
B10	32	9	13	-23	4	-19
Mediana	20	13	20	-10	-1	-9
Nbr. < 0	-	-	-	6	5	5
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	3	4	4
n	9	9	9	9	9	9
Promedio	40	14	23	-26	9	-17
+-SEM	16	3	6	15	6	-13

	D ₁₄ vsD ₀	D ₄₃ vsD ₁₄	D ₄₃ vsD ₀
WSRT	0,0494	0,4772	0,3433

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

90
87

Al final de 29 días después de terminado el tratamiento ([D₁₄] a [D₄₃]), el enriquecimiento del ¹³C- del ¹³CO₂ exhalado no se modificó de manera significativa.

Gastritis crónica (prueba de aliento ¹³C-urea): Los resultados se dan en las Tablas 6 y 7 a continuación.

TABLA 6: Histopatología *in fundus*

	Fondo/Cuerpo (grado)					
	Inclusión	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -Incl.	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -Incl.
B01	2	1	0	-1	-1	-2
B02	1	0	0	-1	0	-1
B04	2	0	0	-2	0	-2
B05	1	1	1	0	0	0
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	0	-1	0	-1
B08	1	0	0	-1	0	-1
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	2	0	0	-2	0	-2
Mediana	1	0	0	-1	0	-1
Nbr. < 0	-	-	-	8	1	7
Nbr. = 0	-	-	-	1	7	2
Nbr. > 0	-	-	-	0	1	0
n	9	9	9	9	9	9

94
88

Promedio	1,3	0,2	0,2	-1,1	0,0	-1,1
+SEM	0,17	0,15	0,15	0,20	0,17	0,26

	D ₁₄ -Incl.	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -Incl.
WSRT	0,0143	0,7500	0,0225

TABLA 7: Histopatología in antrum

	Antro (grado)					
	Inclusión	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -Incl.	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -Incl.
B01	1	2	0	1	-2	-1
B02	1	0	2	-1	2	1
B04	0	0	0	0	0	0
B05	0	1	1	1	0	1
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	1	1	0	0	-1	-1
Mediana	1	0	1	0	0	0
Nbr. < 0	-	-	-	4	2	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	4	4
Nbr. > 0	-	-	-	2	3	2

89

n	9	9	9	9	9	9
Promedio	0,8	0,6	0,7	-0,2	0,1	-0,1
+ -SEM	0,15	0,24	0,24	0,28	0,39	0,26

	D ₁₄ -Incl.	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -Incl.
WSRT	0,5294	0,8336	0,7874

Al final del período del tratamiento ([Incl.] a [D14]) la mediana de la gastritis crónica disminuyó de manera significativa en grados del "1" al "0" en el fondo (P = 0,0143). Esta disminución se mantuvo hasta el fin del estudio. Ninguna modificación significativa del grado de la mediana se notó en las biopsias antrales.

CONCLUSION

	TRATAMIENTO ([D ₁₄] vs [D ₀]) - <i>Dieta específica</i> <i>+ L. Johnsonii NCC 533</i> <i>preparación de leche fermentada</i>		POSTRATAMIENTO ([D ₄₃] a [D ₁₄]) <i>Dieta específica</i>	
	FONDO	ANTRO	FONDO	ANTRO
GHLO ⁽²⁾ - a	(-) *	(-) *	ns	ns

23
90

Actividad de la urea- sa ⁽¹⁾ - b	(-)*	(-)*	(+)*	ns
Actividad de la urea- sa ⁽²⁾ - c	(-) *		ns	

	([D ₁₄] vs Inclusión)		([D ₄₃] vs [D ₁₄])	
Gastritis crónica ⁽²⁾ - d	(-)*	ns	ns	ns

⁽¹⁾t-test pareada; ⁽²⁾ Prueba Wilcoxon Signed Rank - (-) (+) variación negativa o positiva - P<0,05 - ^aHistobacteriología - ^b Prueba Jatrox® - ^cPrueba de aliento ¹³ C-Urea - ^d Histopatología.

En los perros que tienen una infección gástrica producida por los GHLO con una gastritis crónica, el consumo de una preparación de leche acidificada fermentada por *L. johnsonii* NCC 533 logró obtener:

- en el fondo y en el antro, una disminución significativa de la carga de los GHLO y la actividad de la ureasa y la regresión de la gastritis crónica durante el tratamiento,

92
91

- en el fondo, una regresión significativa de la gastritis crónica que se mantuvo después de terminado el tratamiento,
- sin efecto colateral

EJEMPLO 3: Alimento seco para perros

Se hace una mezcla alimenticia de alrededor del 58% por peso de maíz, alrededor del 5,5% por peso de gluten de maíz, alrededor del 22% por peso de alimento de ave, 2,5% de achicoria seca, leche fermentada mediante cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM I - 1225) y *Lactobacillus paracasei* (CNCM I - 2116) de manera que la cantidad correspondiente para el perro es de alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc/día y sales, vitaminas y minerales que completan el resto.

La mezcla alimenticia se coloca en un preacondicionador y se humedece. El alimento humedecido se coloca entonces en una cocina extrusora y se gelatiniza. La matriz gelatinizada que sale de la extrusora es forzada a través de un molde y extruida. El material extruido se corta en pedazos adecuados como alimento para perros, se seca alrededor de 110°C durante alrededor de 20 minutos y se enfría para formar los pellets. Este alimento seco para perros puede mejorar la salud de la mascota y especialmente previene los trastornos relacionados con la infección por GHLO en las mascotas.

95
92

EJEMPLO 4

Se realiza un ensayo en un grupo de 20 sabuesos machos que habían contraído de manera natural una infección gástrica producida por los GHLO. A todos los perros se les dio primero un antibiótico, un tratamiento clásico para la erradicación de los GHLO, que comprendía la administración de dos antibióticos diferentes (Espiramicina y Metronidazol) y un antisecretor tal como el Omeprazol durante una semana.

Después de 7 días de tratamiento, la mitad de los perros tenían GHLO negativos, es decir, no se detectó ningún organismo *Helicobacter* mediante histobactereología, ninguna actividad de ureasa gástrica y un valor de la prueba de aliento ^{13}C -Urea inferior al 5% de aumento sobre la línea de base en 40 minutos.

Después del tratamiento, la mitad de los perros fue alimentada con el producto Friskies Menu Energy, que es un alimento seco para perros que se encuentra en el comercio, como alimento de control. A los 10 perros restantes se les alimentó con un alimento de prueba correspondiente al producto Friskies Menu Energy, excepto que contiene pellets de leche en polvo fermentada por cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) y *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116) de ma-

96
93

nera que la cantidad para un perro es de alrededor de 10^9 - 10^{12} ufc/día.

La prueba de aliento de ^{13}C -Urea y la detección del *Helipobacter* mediante histobacteriología fueron medidas de nuevo 6 semanas después de la alimentación mediante estas dos dietas diferentes. El resultado muestra que el 20% de los perros alimentados con el producto normal Friskies Menu Energy fue positivo en 6 semanas. Todos los perros alimentados con el alimento de prueba fueron negativos después de 6 semanas.

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

EJEMPLO 5

Alimento enlatado para mascotas

Se prepara una mezcla de un 73% de ave, pulmones de cerdo e hígado de vacuno (molido), 16% de harina de trigo, 2% tinturas y 9% de leche fermentada por cepas de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM - I 1225) y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), vitaminas y sales inorgánicas. Esta mezcla es emulsionada a 12°C y es extruida en forma de budín que luego es cocido a una temperatura de 90°C. Se enfría a 30°C y se corta en trozos. El 45% de estos trozos se mezcla con el 55% de una salsa preparada de 98% de agua, 1% de tintura y 1% de go-

97 94

ma de guar. Se llenaron y se esterilizaron latas de estaño a 125°C durante 40 minutos.

Esta composición húmeda está destinada a prevenir o tratar los trastornos relacionados con la infección por GHLO en las mascotas.

EJEMPLO 6: Efecto sobre el mal aliento

Se alimentaron 10 perros con GHLO en el estómago con la misma dieta del ejemplo 2 durante dos semanas. El mal aliento se midió en cada perro al inicio y al término del tratamiento con la ayuda de un halitómetro.

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

Además, hubo una clara correlación entre el nivel de infección por *Helicobacter* y el mal aliento.

REIVINDICACIONES

1. Uso de por lo menos una cepa de bacterias lácticas y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria láctica que ha sido aislada y seleccionada por su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-*Helicobacter* *in vitro*, caracterizado porque sirve para la preparación de una

77
95

composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la bacteria de ácido láctico se usa en forma de un medio fermentado por esa bacteria de ácido láctico o una subfracción del medio de cultivo fermentado por la bacteria de ácido láctico.

3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la cepa de bacterias de ácido láctico se selecciona del grupo compuesto por *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la cepa de bacterias lácticas se selecciona del grupo compuesto por *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM I - 1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I - 2116) y *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las bacterias de ácido láctico

7996

o el medio de fermentación equivalente se usa de manera que la cantidad disponible para la mascota sea de alrededor de $10^3 - 10^{14}$ ufc/al día.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las bacterias de ácido láctico o el medio de fermentación equivalente se usa en una cantidad de alrededor de $10^9 - 10^{12}$ ufc/día para los perros y $10^7 - 10^{11}$ ufc/día para los gatos.

7. Un método para el tratamiento o para la profilaxis de los trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas, caracterizado porque comprende la administración a una mascota de una composición que contiene por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria de ácido láctico que ha sido aislada y seleccionada por su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-Helicobacter in vitro.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque se administra alrededor de $10^3 - 10^{14}$ ufc de las bacterias lácticas o su medio de fermentación equivalente al día a la mascota.

9. Una composición de alimento para mascotas caracterizada porque contiene una cantidad eficaz de por lo menos una cepa

100 97

de bacterias lácticas aislada y/o su medio de crecimiento fermentado, dichas bacterias lácticas son aisladas y seleccionadas por su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-Helicobacter in vitro donde esta composición está asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque la bacteria de ácido láctico se usa en forma de un medio fermentado por una bacteria de ácido láctico viable o inactivada o una subfracción del medio de cultivo fermentado por la bacteria de ácido láctico.

100 97

11. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 9 ó 10, caracterizada porque la cepas de bacterias de ácido láctico se selecciona del grupo formado por *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

100 97

12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada porque la cepa de bacterias lácticas se selecciona del grupo compuesto por *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM I - 1225), *Lactobacillus paracasei*

NOA 98

NCC 2461 (CNCM I - 2116), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada porque la cantidad de la cepa de bacterias de ácido láctico o el medio de fermentación equivalente disponible para la mascota corresponde a alrededor de 10^3 - 10^{14} cfu al día.

14. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada porque reduce la infección producida por GHLO en los perros y en los gatos de manera que la carga de los GHLO y la actividad de la ureasa en el fondo se reduce en por lo menos 0,5 grado y en por lo menos 0,5 grado en el antro. *clo...*

15. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada porque induce una regresión de la gastritis fúndica crónica, con una regresión mediana del grado de la inflamación gástrica de por lo menos alrededor de 0,5. *clo*

16. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada porque reduce el mal aliento de las mascotas. *clo*

Título:

~~A02~~
99

Alimento para mascotas destinado al tratamiento de la especie
helicobacter en las mascotas

Resumen:

Uso de por lo menos una cepa de bacterias lácticas y/o un medio fermentado por a lo menos una bacteria láctica que ha sido aislada y seleccionada por su capacidad para desplegar una poderosa actividad bactericida anti-Helicobacter in vitro, para la preparación de una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de trastornos relacionados con la infección producida por los GHLO en las mascotas y las composiciones de alimentos para mascotas que contienen la misma.



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

01.003.087
100
400

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

00200179.0

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 09/01/01
LA HAYE, LE



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

404
101

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 00200179.0

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 18/01/00 ✓

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
1800 Vevey
SWITZERLAND

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Pet food for treating helicobacter species in pets

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Anzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification Internationale des brevets:
A23K1/16, A23K1/18

Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LU/LV/MC/NL/PT/SE/SK
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

105
102

Pet food composition for treating helicobacter species in pets

The present invention relates to the use of an isolated strain of lactic bacteria for the preparation of a food composition intended for the prophylaxis or treatment of disorders related to gastric infection by *Helicobacter*-like-organisms in pets. The invention also relates to pet food composition prepared thereof.

Background of the invention

It is known that in humans, infection with the pathogenic *Helicobacter pylori* can cause gastritis, and lead to ulcerative disease and gastric tumors. The methods of treatment are numerous. It has been shown previously in EP 577903 (Nestlé) that lactic acid bacteria are able to inhibit *Helicobacter pylori* both *in vitro* and *in vivo*.

Domestic carnivores such as dogs and cats are virtually all infected with other species of gastric *Helicobacters*. Most of them cannot be cultured *in vitro*, but morphologically resemble *H. helmanni*. *H. felis* was also isolated from cat gastric mucosa and, recently, two new *Helicobacter* species, named *H. bizzozeroni* and *H. salomonis*, were isolated from dogs. However, the only morphological analysis does not allow to discriminate between these *Helicobacter* species and are grouped under the denomination of "Gastric *Helicobacter* like organisms" (GHLOs).

GHLOs colonize the antrum and/or the corpus of pets while *H. pylori* colonization mainly takes place in the corpus. Colonizing GHLOs organisms are located deep in the gastric fundic glands and sometimes are found actually within gastric parietal cell canaliculi as well as in the pits and gastric mucus, compared to *H. pylori* which is known as a non invasive bacteria. (Dunn et al, 1997 : "Hp are located in the mucus adherent to the surface epithelium and are often found deep within the crypts"...)

The contamination of cat and dog stomach by *Helicobacter* species is considered as an important risk factor to develop mild to moderate gastritis. The inflammation observed is usually less severe than the one occurring in human infected with *H. pylori*. More severe lesions such as stomach ulcers, lymphomas and cancers can be observed but the pathogenicity of GHLOs is far from being clarified.

NO 6210/EP

52

2

Nevertheless, controlling the infection by GHLOs in cat and dog to a low level is recognized by most veterinarians as a benefit. Since it is not a fully recognized disease requiring drug therapy, a food product containing an active ingredient capable of minimizing GHLO infection in cats and dogs is mostly required.

Summary of the invention

Thus, the present invention relates to the use of at least one strain of lactic acid bacteria and /or a medium fermented by at least one lactic acid bacteria that have been isolated and selected for its ability to display a strong anti-Helicobacter bactericidal activity *in vitro*, for the preparation of a composition intended for the prophylaxis or the treatment of disorders related to GHLOs infection in pets.

In a preferred embodiment, a fermented medium by a lactic acid bacteria, or subfractions of cultured medium fermented by the isolated strain of lactic acid bacteria are used.

The lactic acid bacteria strain may be selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

In a preferred embodiment the lactic acid bacteria strain may be selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, *Lactobacillus fermentum* NCC 2592, *Lactobacillus fermentum* NCC 2613, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Bifidobacterium sp.* NCC 2627, *Bifidobacterium sp.* NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Another objet relates to a method for the treatment or for the prophylaxis of disorders related to GHLOs infection in pets, which comprises administering to a pet a composition containing at least one strain of lactic acid bacteria and /or a medium fermented by at least one lactic acid bacteria that have been isolated

18-01-2000

2000 15:04

NESTEC VEVEY

EP00200179.0

12888

N0589

P SPEC

3

106
103

and selected for its ability to display a strong anti-*Helicobacter* bactericidal activity *in vitro*.

A further object is to provide a pet food composition containing at least an isolated strain of lactic acid bacteria and /or a medium fermented by at least one lactic bacteria having the above traits, associated with an ingestible support or a pharmaceutical matrix,

This pet food composition is able to decrease GHLO infection in cats and dogs so that the GHLOs load and the urease activity are reduced of at least 0,5 grade in the fundus and of at least 0,5 grade in the antrum.

The effect of the composition on chronic gastritis was also evaluated by cytological examination of biopsy on thin sections. It can induce a regression of chronic fundic gastritis, with an average regression of the grade of gastric inflammation (graded from 0 to 3) of at least 0.5.

In another embodiment, this pet food composition may induce a significant reduction of breath odors which are correlated with the level of infection by GHLOs.

Detailed description of the invention

Within the following description, the term "GHLOs" defines the "Gastric *Helicobacter*-like-organisms". Species of *Helicobacter* such as *Helicobacter felis*, *H. heilmannii*, *H. bilrothi* and *H. salomonis*, for example, which have been shown to colonize the gastric mucosa in pets, are grouped under this denomination.

Moreover, we include within the terms "GHLOs disorders", all disorders which may affect directly the gastro intestinal tract of pets, but also secondary disorders such as bad breath symptoms, for example.

Finally, "NCC" designates Nestlé Culture Collection (Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Switzerland).

With respect to the first object of the present invention, the use of a at least one lactic acid bacteria strain and/or a medium fermented by at least one strain of lactic acid bacteria that is able to display a strong anti-*Helicobacter*

NO 6210/EP

53

4

bactericidal activity *in vitro*, for the preparation of a composition intended for the prophylaxis or the treatment of disorders related to GHLOs infection in pets, is concerned.

These strains have been selected among lactic bacteria strains with regard to their technological and physiological parameters and in particular for their good growth characteristics, at least 5×10^8 bacteria /ml, preferably 10^8 - 10^{10} bact/ml, most preferably 10^9 - 10^{10} bact/ml and their ability to display a strong anti-*Helicobacter* bactericidal activity *in vitro*.

In a preferred embodiment the lactic acid bacteria strain may be selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuterus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

The lactic bacteria strain is preferably selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, *Lactobacillus fermentum* NCC 2592, *Lactobacillus fermentum* NCC 2613, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus ruminis* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Bifidobacterium sp.* NCC 2627, *Bifidobacterium sp.* NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Among the various strains selected in accordance with the present invention, the following strains were deposited by way of example under the Budapest Treaty at the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, *Lactobacillus johnsonii* (NCC 533) on the 30.06.92 under the reference CNCM I-1225, and *Lactobacillus paracasei* (NCC 2461) on the 12.01.99 under the reference CNCM I-2116.

The strain of *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536) is provided by Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hørsholm, Denmark).

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE SELECTED STRAINS

NO 6210/EP

104

***Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225**

- Gram positive microorganism, non-motile, non-sporing
- Fairly short and thick rodlets
- Microaerophilic microorganism with homofermentative metabolism, production of L (+) and D (-) lactic acid.
- Catalase (-), production of CO₂ (-), hydrolysis of arginine (-)
- Fermentation of sugars: Amygdaline (+), arabinose (-), cellobiose (+), esculine (+), fructose (+), galactose (-), glucose (+), lactose (+), maltose (+/-), mannitol (-), mannose (+), melibiose (-), raffinose (+), ribose (-), salicine (+), sucrose (+), trehalose (+).

***Lactobacillus paracasei* CNCM I-3116**

- Gram positive
- Catalase negative,
- NH₃ from arginine negative,
- CO₂ production negative
- production of L(+) lactic acid,
- growth in the presence of bile salts in a concentration of up to about 0.4%.

The isolated strain of lactic bacteria and/or its fermented medium of culture may be used for the preparation of compositions intended for improving pet health, and particularly for the prevention or treatment of disorders related to GHLOs infection in pets.

They can also be used in other disorders related to GHLOs infection such as bad breath odors. In fact, the presence of GHLOs in cat and dog stomach may have a clear influence in breath odors by producing large quantity of ammonia from urea. This ammonia can appear in breath after eructation. Bad breath could be also related to the presence GHLOs in stomach by the production of sulfide volatiles compounds.

A subfraction of cultured medium fermented by the isolated strain of lactic acid bacteria may also be used.

The lactic acid bacteria strain according to the invention, may be used in its viable or inactivated form.

NO 6210/EP

54

6

In a preferred embodiment the lactic bacteria strain is used in the presence of its fermented growth medium. The said medium can be either sterilized alone or with a food, extruded or spray-dried, chilled or shelf stable, for example.

5 The lactic acid bacteria or the equivalent fermentation medium may be used so that the amount available for the pet may correspond to about 10^3 - 10^{14} cfu per day. This amount depends on the animal weight, and it is preferably of about 10^9 - 10^{12} cfu /day for dogs and 10^7 - 10^{11} cfu /day for cats.

10 In another embodiment, the invention relates to a method for the treatment or for the prophylaxis of disorders related to GHLOs infection in pets, which comprises administering to a pet a composition containing at least one strain of lactic acid bacteria and /or a medium fermented by at least one lactic acid bacteria having the above traits. The amount available for the pet may correspond
15 to about 10^3 - 10^{14} cfu per day, and it is preferably of about 10^9 - 10^{12} cfu /day for dogs and 10^7 - 10^{11} cfu /day for cats.

The second main object of the present invention relates to a pet food composition containing at least an isolated strain of lactic acid bacteria and/or its
20 fermented growth medium, said lactic bacteria having the above traits, associated with an ingestible support or a pharmaceutical matrix.

The strain and/or its fermented medium may be selected from one or more lactic bacteria suitable for animal consumption for their ability to display a strong
25 anti-Helicobacter bactericidal activity *in vitro*.

At least one bacterial strain having the above traits and/or its fermented medium may be administered to the pet as a supplement to the its normal diet or as a component of a nutritionally complete pet food.
30

The nutritionally complete pet food composition according to the invention may be in powdered, dried form or a wet, chilled or shelf stable pet food product.

35 It can also be dietary supplements for pets or pharmaceutical compositions.

The nutritionally complete pet food may be in any suitable form; for example in dried form, semi-moist form and wet form. These pet foods may be produced as is conventional. Apart from the bacteria strains and/or its fermented

NO 6210/EP

medium, these pet foods may include any one or more of a starch source, a protein source and lipid source.

Suitable starch sources are, for example, grains and legumes such as corn, rice, wheat, barley, oats, soy, and mixtures of these.

Suitable protein sources may be selected from any suitable animal or vegetable protein source; for example meat and meal, poultry meal, fish meal, soy protein concentrates, milk proteins, gluten, and the like. For elderly animals, it is preferred for the protein source to contain a high quality protein.

Suitable lipid sources include meats, animal fats and vegetable fats.

The choice of the starch, protein and lipid sources will be largely determined by the nutritional needs of the animal, palatability considerations, and the type of product produced. For elderly pets, the pet food preferably contains proportionally less fat than pet foods for younger pets. Further, the starch sources may include one or more of rice, barley, wheat and corn.

Further, various other ingredients, for example, sugar, salt, spices, seasonings, vitamins, minerals, flavouring agents, fats and the like may also be incorporated into the pet food as desired.

For dried pet foods a suitable process is extrusion cooking, although baking and other suitable processes may be used. When extrusion cooked, the dried pet food is usually provided in the form of a kibble. If a probiotic is used, the probiotic may be admixed with the other ingredients of the dried pet food prior to processing. A suitable process is described in European patent application No 0850569; the disclosure of which is incorporated by reference. If a probiotic micro-organism is used, the organism is best coated onto or filled into the dried pet food. A suitable process is described in European patent application No 0862863; the disclosure of which is incorporated by reference.

For wet foods, the processes described in US patents 4,781,939 and 5,132,137 may be used to produce simulated meat products. The disclosures of these patents are incorporated by reference. Other procedures for producing chunk type products may also be used; for example cooking in a steam oven. Alternatively, loaf type products may be produced by emulsifying a suitable meat

NO 6210/EP

55

8

material to produce a meat emulsion, adding a suitable gelling agent, and heating the meat emulsion prior to filling into cans or other containers.

The amount of probiotic in the pet food is preferably about 20% by weight; especially about 10% by weight. For example, the probiotic may comprise about 0.1% to about 5% by weight of the pet food. For pet foods which use chicory as the probiotic, the chicory may be included to comprise about 0.5% to about 10% by weight of the feed mixture; more preferably about 1% to about 5% by weight.

If a probiotic microorganism is used, the pet food preferably contains about 10^4 to about 10^{10} cells of the probiotic microorganism per gram of the pet food; more preferably about 10^4 to about 10^8 cells of the probiotic microorganism per gram. The pet food may contain about 0.5% to about 20% by weight of the mixture of the probiotic microorganism; preferably about 1% to about 6% by weight; for example about 3% to about 6% by weight.

The pet foods may contain other active agents such as long chain fatty acids. Suitable long chain fatty acids include alpha-linoleic acid, gamma linoleic acid, linoleic acid, eicosapentanoic acid, and docosahexanoic acid. Fish oils are a suitable source of eicosapentanoic acids and docosahexanoic acid. Borage oil, blackcurrent seed oil and evening primrose oil are suitable sources of gamma linoleic acid. Safflower oils, sunflower oils, corn oils and soy bean oils are suitable sources of linoleic acid.

If necessary, the pet foods are supplemented with minerals and vitamins so that they are nutritionally complete.

Further, if desired, the bacteria strain may be encapsulated; for example in a sugar matrix, fat matrix or polysaccharide matrix.

The amount of the pet food to be consumed by the pet to obtain a beneficial effect will depend upon the size of the pet, the type of pet, and age of the pet. However an amount of the pet food to provide a daily amount of about 10^3 - 10^{14} cfu of at least one lactic acid bacteria strain and/or the equivalent fermentation medium, would usually be adequate. Preferably about 10^9 - 10^{13} cfu /day for dogs or 10^7 - 10^{11} cfu /day for cats are administered.

The composition according to the invention is particularly intended for the prophylaxis or the treatment of infections related to GHLOs in pets. It is also

NO 6210/EP

106

intended for maintaining healthy digestive function in pets and preventing reinfection by pathogenic strains such as GHLOs, for example. Thus, this composition may also be used as adjuvant of an antibiotherapy against GHLOs infestation.

5

10

The effect of the composition according to the invention on GHLOs was evaluated by a histologic examination of biopsy sections (see example 2). If the number of GHLOs per section is no bacteria (grade" 0"); less than 5 bacteria (grade" 1"); between 5 and 20 bacteria (grade" 2") and more than 20 bacteria (grade" 3"). This pet food composition is able to decrease GHLO infection in cats and dogs so that the GHLOs load and the urease activity in the fundus are reduced of at least 0,5 grade and of at least 0,5 grade in the antrum.

15

The effect of the composition on chronic gastritis was also evaluated by cytological examination of biopsy thin sections. The histological classification of chronic gastritis is :

20

25

- grade 0: superficial fibrosis, 0 neutrophils, 0-10 lymphocytes and plasma cells, no aggregates, normal epithelium;
- mild chronic gastritis - grade 1: chronic superficial gastritis, 10-15 lymphocytes or plasma cells involving the superficial interstitial tissue, aggregates <2, normal epithelium,
- moderate chronic gastritis - grade 2: chronic interstitial gastritis, 10-50 or more lymphocytes or plasma cells involving the full thickness of the mucosa, aggregates >3, normal epithelium
- severe chronic gastritis - grade 3 : atrophic gastritis, 10-50 or more lymphocytes or plasma cells, aggregates >3, glandular epithelium changes.

30

This composition can induce a regression of chronic fundic gastritis, with a median regression of the grade of gastric inflammation of at least about 0.5.

35

This composition has also been shown to induce a significant reduction of breath odors. Thus, it is intended for treating or preventing secondary disorders related to GHLOs infection such as bad breath odors of pets.

Further, the compositions according to the present invention may also be intended for improving longevity of dogs.

NO 6210/EP

56

10

The following examples are given by way of illustration only and in no way should be construed as limiting the subject matter of the present application. All percentages are given by weight unless otherwise indicated.

5

Examples

Example 1 : Selection of bacterial strain

10

In order to select bacterial strain according to the present invention, cultivable GHLOs (10^7 bacteria) may be incubated at 37°C under 5% CO₂ for 1-2 hrs in presence of serial dilutions of said bacterial strain growth supernatant (BS) in DMEM. Following incubation, GHLOs-BS mixture is centrifuged at 12'000 g for 3 minutes, the pellet is then washed with 1 ml of 0.9% NaCl, and

15

resuspended in 500 µl of rapid urease test (Jatraz®-H.p.-test, Procter&Gamble Pharmaceuticals GmbH, Weiterstadt, Germany). The colorimetric changes, proportional to urease activity, are determined by photometric analysis at an optical density of 550 nm.

20

Bacterial viability is estimated before and after incubation with LS by plating serial dilutions of GHLOs on serum plates (GC agar, Gibco BRL, Paisley, Scotland) supplemented with 10% horse serum, Inotec, and with 1% Isovitale X (Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, MD), and counting colony forming units (CFU).

25

Example 2

The effects of a supplement with fermentation medium of *Lactobacillus* on *Helicobacter* spp. infection in dogs is studied.

30

MATERIALS AND METHODS

Animals

35

The ethical committee at the Veterinary School of Lyon - France, approved the study. Nine male beagles, which had naturally contracted a gastric infection with GHLOs, were included in the study. The dogs ranged in weight from 10 to 14 kg and age from 3 to 4 years. The dogs were housed in individual kennels with

NO 6210/EP

AAO

167

identical conditions of hygiene and feeding (Veterinary School of Lyon - France). The kennels were cleaned and disinfected daily.

5 The dogs were regularly fed at 8 a.m. and they had constantly access to water throughout the study. During the whole study, they were fed with a specific diet: VITALITY® - Friskies, France (annexe A).

Experimental design

10 Before the treatment, the gastric infection with GHLOs had been confirmed in the 9 beagles by evaluating the identification of GHLOs (histobacteriology), the gastric urease activity (Jatrox® test) and the presence of chronic gastritis (histopathology) in fundic and/or antral biopsies of the stomach. All dogs with GHLOs infection were subjected to a treatment for 13 days running. The detection of gastric infection with GHLOs by these tests plus the 15 ¹³C-urea breath test was repeated three times: before the treatment [D₀], at the end of the treatment [D13] and 30 days after the end of the treatment [D₄₃].

Treatment

20 The treatment was composed by a daily consumption of one acidified milk preparation fermented by *L. johnsonii* NCC 533 for 13 days running. The acidified milk preparation had to be entirely eaten before the specific diet (240 g "VITALITY®" / dog).

Evaluation tests

- 30 ○ Clinical examination: during the whole study, the dogs were watched by two veterinary surgeons of the Veterinary School of Lyon - France. The clinical observations had to be recorded in the case report form.
- 35 ○ Gastric biopsy: the gastric endoscopy was realised under anaesthesia (ketamine, IMALGENE®, 5 mg / kg - IM). The dogs were fasted for 24 hours. The endoscopy was carried out with a videogastroscope Olympus® GIFK/XV10. At each evaluation day, 12 biopsies had to take from fundus and antrum. Two fundic and antral biopsies had to be immediately used to measure the urease activity of GHLOs. Four fundic and antral biopsies had to had to keep in a "bouin" solution before being used for histobacteriology and histopathology.

57

12

- 5 ○ **Identification of GHLOs (histobacteriology):** the identification of GHLOs was made by a histologic examination of biopsy sections. The tissue sections were stained with a Giemsa-type stain and evaluated by light microscopy (x 1000). A semi-quantitative evaluation of the GHLOs is done taking into account the localisation in the stomach and the deepness of the extracellular contamination. If the number of GHLOs per section is no bacteria (grade" 0"); less than 5 bacteria (grade" 1"); between 5 and 20 bacteria (grade" 2") and more than 20 bacteria (grade" 3"). For each fundic and antral biopsy, two sections were made, then evaluated, and the result was the mean of two evaluations (Ref. Willard M.D, Characterization of naturally developing small intestinal bacterial overgrowth in 16 German Shepherd Dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1994, 204, 1201-1206).
- 10
- 15 ○ **Gastric urease activity (Jatraz[®] - H.P. test, Procter & Gamble, Germany):** the principle of the test is that the urea in the test medium is split by the urease present in the GHLOs. The rise in the pH value associated with the splitting of the urea causes a colour change in the indicator medium (phenol red) from yellow to pink/red. The biopsies were tested immediately after their specimen. After the introduction of the biopsy in the indicator medium, the Jatraz[®] test was read at 180 minutes by a photometer with an ultraviolet detector which was set at 550 nm for reading with a reference at 650 nm. The urease activity in fundic and antral biopsies was the mean of two optical measures.
- 20
- 25 ○ **¹³C-urea breath test:** the UBT test was realised two hours after the anaesthesia for endoscopy, so that this one did not influence the results of the UBT. The UBT were made in fasting dogs, without anaesthesia. At a first time, the dogs ate a test meal, which was half of their daily intake; namely 120g VITALITY[®] / dog. At a second time, the dogs had an oral administration of 7.5mg ¹³C-urea / dog (MASS TRACER, Woburn - USA). The ¹³CO₂ breathed out samples were obtained before the test meal [TB], then 40 minutes after administration of ¹³C-urea [T40]. After, the dogs had the second half of their daily food intake. The ¹³CO₂ urea breathed out samples were analysed with a gas isotope ratio mass spectrometer (FINNIGAN MAT, Bremen - Germany). To standardise the interlaboratory results, an analogue of international standard for ¹³C-reference (Vienna Pee Dee Belemnite or VPDB) was utilised. The atom percent excess for ¹³CO₂ was defined as the difference (delta value, δ) in atom percent ¹³CO₂ between the baseline sample (sample before test meal and ¹³C
- 30
- 35

AA
108

administration [TB]) and samples obtained after at 40 minutes [T40] x 1000 (44,45). Results are expressed as an excess $\delta^{13}\text{CO}_2$ (‰).

- 5 o **Histopathology (cytology):** the histopathology was made by cytoloBT test was made by cytological examination of biopsy thin sections. The impression sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) and observed by microscopy. The criteria for histological diagnoses of gastric biopsies relies on the number of each cell type which is the mean of three fields viewed at x400 magnification and the amount of lymphocytic aggregates which is the number in a sample at x200 magnification. The histological classification of chronic gastritis is :

- 10 - grade 0: superficial fibrosis, 0 neutrophils, 0-10 lymphocytes and plasma cells, no aggregates, normal epithelium;
- 15 - mild chronic gastritis – grade 1: chronic superficial gastritis, 10-15 lymphocytes or plasma cells involving the superficial interstitial tissue, aggregates <2, normal epithelium,
- 20 - moderate chronic gastritis – grade 2: chronic interstitial gastritis, 10-50 or more lymphocytes or plasma cells involving the full thickness of the mucosa, aggregates >3, normal epithelium
- severe chronic gastritis – grade 3 : atrophic gastritis, 10-50 or more lymphocytes or plasma cells, aggregates >3, glandular epithelium changes (atrophy).

25 (Ref : P. Lecoindre, M. Chevallier, R. Gillard and F. Daurin.- Small intestinal bacterial overgrowth and inflammatory bowel diseases in dogs. Evaluation of the therapeutic efficacy of Spiramycine-Metronidazole association. *Revue Méd. Vét.* 1998;149:843-852).

Statistical analysis

30 Each result of diagnostic tests was the mean of two measures from distinct biopsies. The normality or non-normality of the result distribution had been examined by the Wilk-Shapiro procedure.

35 The effects of the treatment and post-treatment were evaluated by using a Wilcoxon Signed Rank test (WSRT) and/or Paired t-test.
All statistical calculations were performed with a software program (Statistix®, Excel Microsoft®). A P-value < 0.05 was considered as significant.

58

14

RESULTS

Kinetic of gastric GHLOs load : The results are presented in Tables 1 and 2.

Table 1 : Histobacteriology in fundus

	Fundus / Corps (grade)				$D_{14} - D_0$	$D_{28} - D_{14}$	$D_{28} - D_0$
	D_0	D_{14}	D_{28}				
B01	3	1	2		-2	1	-1
B02	3	2	3		-1	1	0
B04	2	1	0		-1	-1	-2
B05	3	2	1		-1	-1	-2
B06	3	0	3		-3	3	0
B07	3	1	2		-2	1	-1
B08	3	3	2		0	-1	-1
B09	3	1	1		-2	0	-2
B10	3	1	3		-2	2	0
Median	3	1	2		-2	1	-1
Nbr. < 0	-	-	-		8	3	6
Nbr. = 0	-	-	-		1	1	3
Nbr. > 0	-	-	-		0	5	0
n	9	9	9		9	9	9
Mean	2.9	1.3	1.9		-1.6	0.6	-1
+ SEM	0.11	0.29	0.35		0.29	0.47	0.29

	D_{14} vs D_0	D_{28} vs D_{14}	D_{28} vs D_0
WERT	0.0143	0.3270	0.0360

Table 2 : Histobacteriology in Antrum

	Antrum (grade)				$D_{14} - D_0$	$D_{28} - D_{14}$	$D_{28} - D_0$
	D_0	D_{14}	D_{28}				
B01	1	1	2		0	1	1
B02	1	1	2		0	1	1
B04	2	1	0		-1	-1	-2
B05	2	1	2		-1	1	0
B06	2	1	1		-1	0	-1
B07	1	0	1		-1	1	0
B08	1	1	1		0	0	0
B09	2	0	2		-2	2	0
B10	2	1	1		-1	0	-1
Median	2	1	1		-1	1	0
Nbr. < 0	-	-	-		6	1	3
Nbr. = 0	-	-	-		3	3	4
Nbr. > 0	-	-	-		0	5	2
n	9	9	9		9	9	9
Mean	1.6	0.8	1.3		-0.8	0.6	-0.2
+ SEM	0.18	0.15	0.24		0.22	0.29	0.32

109

	D ₁₄ vs D ₀	D ₄₃ vs D ₁₄	D ₄₃ vs D ₀
WERT	0.0360	0.1422	0.5896

At the end of running of treatment ([D₀] to [D14]), the median bacterial load with GHLOs was significantly decreased to grade from "3" to "1" in the fundus (P= 0.0143) and from "2" to "1" in the antrum (P= 0.0360).

Between the start of treatment and the end of study ([D₀] to [D43]), the median bacterial load with GHLOs was significantly decreased to grade from "3" to "2" in fundic biopsies (P<0.0360). In antral biopsies, there is no significantly difference.

Gastric urease activity (Jatrox[®] test) : The results are presented in Tables 3 and 4.

Table 3 : Gastric urease activity (Jatrox[®] test) in fundus

	Fundus / Corps (optical density)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ - D ₀	D ₄₃ - D ₁₄	D ₄₃ - D ₀
B01	0.43	0.34	0.43	-0.09	0.09	0.01
B02	0.42	0.39	0.44	-0.04	0.05	0.01
B04	0.54	0.00	0.44	-0.53	0.44	-0.10
B05	0.47	0.31	0.49	-0.16	0.18	0.02
B06	0.44	0.42	0.43	-0.02	0.01	-0.01
B07	0.52	0.40	0.41	-0.11	0.01	-0.11
B08	0.68	0.31	0.40	-0.37	0.09	-0.28
B09	0.43	0.33	0.38	-0.10	0.02	-0.08
B10	0.44	0.32	0.43	-0.13	0.01	-0.01
Median	0.46	0.34	0.43	-0.12	0.09	-0.01
Nbr. < 0	-	-	-	9	0	6
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	0	9	3
n	9	9	9	9	9	9
Mean	0.49	0.32	0.43	-0.17	0.11	-0.06
+/- SEM	0.03	0.04	0.01	0.06	0.04	0.03

	D ₁₄ vs D ₀	D ₄₃ vs D ₁₄	D ₄₃ vs D ₀
Faired t-test	0.0155	0.0381	0.0921

59

Table 4 : Gastric urease activity (Jstrox[®] test) in Antrum

	Antrum (optical density)					
	D ₀	D ₁₄	D ₂₉	D ₁₄ - D ₀	D ₂₉ - D ₁₄	D ₂₉ - D ₀
B01	0.31	0.00	0.00	-0.31	0.00	-0.31
B02	0.33	0.03	0.00	-0.28	-0.03	-0.33
B04	0.41	0.00	0.00	-0.41	0.00	-0.41
B05	0.46	0.00	0.00	-0.46	0.00	-0.46
B06	0.28	0.00	0.00	-0.28	0.00	-0.28
B07	0.00	0.00	0.00	-0.02	0.00	0.00
B08	0.00	0.07	0.00	0.07	-0.07	0.00
B09	0.03	0.00	0.00	-0.03	0.00	-0.03
B10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Median	0.28	0.00	0.00	-0.28	0.00	-0.28
Nbr. < 0	-	-	-	6	2	6
Nbr. = 0	-	-	-	2	7	3
Nbr. > 0	-	-	-	1	0	0
n	9	9	9	9	9	9
Mean	0.30	0.01	0.00	-0.19	-0.01	-0.20
+ SEM	0.06	0.01	0.00	0.07	0.01	0.06

	D ₁₄ vs D ₀	D ₂₉ vs D ₁₄	D ₂₉ vs D ₀
Paired t-test	0.0197	0.1756	0.0123

5 At the end of the running of treatment ([D₀] to [D₁₄]), the mean of urease activity decreased significantly of 35% in fundus (P=0.0155) and 93% in antrum (P=0.0197).

10 Twenty-nine days after the end of treatment ([D₁₄] to [D₂₉]), the mean urease activity increased significantly of 35% in fundic biopsies (P=0.0381) but still remained lower then at the beginning of the treatment. The antral urease activity was not modified and stayed null.

15 Global urease activity (¹³C-urea breath test) :

 The results are given in Table 5.

18-01-2000

2000 16:11

NESTEC VEVEY

EP00200179.0

2000

N0589

P SPEC

17

Table 5 : Global urease activity (^{13}C -urea breath test)

	D_0	D_{14}	D_{29}	$D_{14} - D_0$	$D_{29} - D_{14}$	$D_{29} - D_0$
B01	34	6	53	-28	49	21
B02	18	26	21	8	-5	3
B04	165	24	50	-141	26	-116
B05	13	7	6	-8	-1	-9
B06	18	20	19	2	-1	1
B07	12	13	22	1	9	10
B08	47	17	15	-30	-2	-32
B09	20	10	9	-10	-1	-11
B10	32	9	13	-23	4	-19
Median	20	13	20	-10	-1	-9
Nbr. < 0	-	-	-	6	5	5
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	3	4	4
n	9	9	9	9	9	9
Mean	40	14	23	-26	9	-17
+ SEM	16	3	6	13	6	13

	D_{14} vs D_0	D_{29} vs D_{14}	D_{29} vs D_0
WILCOX	0.0494	0.4772	0.3433

Between the start and the end of the treatment ($[D_0]$ to $[D_{14}]$), the median ^{13}C -enrichment of 35% $^{13}\text{CO}_2$ -breathed out decreased significantly ($P=0.049$).

At the end of 29 days after the end of treatment ($[D_{14}]$ to $[D_{29}]$), the ^{13}C -enrichment of $^{13}\text{CO}_2$ -breathed out was not significantly modified.

Chronic gastritis (^{13}C -urea breath test) :

The results are given in Tables 6 and 7.

NO 6210/EP

Printed:09-01-2001

17

Table 6 : Histopathology in fundus

	Fundus / Corps (grade)					
	Inclusion	D ₁₄	D ₀	D ₁₄ - Incl.	D ₀ - D ₁₄	D ₀ - Incl.
B01	2	1	0	-1	-1	-2
B02	1	0	0	-1	0	-1
B04	2	0	0	-2	0	-2
B05	1	1	1	0	0	0
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	0	-1	0	-1
B08	1	0	0	-1	0	-1
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	2	0	0	-2	0	-2
Median	1	0	0	-1	0	-1
Nbr. < 0	-	-	-	8	1	7
Nbr. = 0	-	-	-	1	7	2
Nbr. > 0	-	-	-	0	1	0
n	9	9	9	9	9	9
Mean	1.3	0.2	0.2	-1.1	0.0	-1.1
+ SEM	0.17	0.15	0.15	0.20	0.17	0.26

	D ₁₄ - Incl.	D ₀ - D ₁₄	D ₀ - Incl.
WERT	0.0143	0.7500	0.0225

Table 7 : Histopathology in antrum

	Antrum (grade)					
	Inclusion	D ₁₄	D ₀	D ₁₄ - Incl.	D ₀ - D ₁₄	D ₀ - Incl.
B01	1	2	0	1	-2	-1
B02	1	0	2	-1	2	1
B04	0	0	0	0	0	0
B05	0	1	1	1	0	1
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	1	1	0	0	-1	-1
Median	1	0	1	0	0	0
Nbr. < 0	-	-	-	4	2	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	4	4
Nbr. > 0	-	-	-	2	3	2
n	9	9	9	9	9	9
Mean	0.8	0.6	0.7	-0.2	0.1	-0.1
+ SEM	0.15	0.24	0.24	0.28	0.39	0.26

	D ₁₄ - Incl.	D ₀ - D ₁₄	D ₀ - Incl.
WBRD	0.5294	0.8336	0.7874

174
111

At the end of running of treatment ([Incl.] to [D14]), the median chronic gastritis was significantly decreased to grade from "1" to "0" in the fundus ($P=0.0143$). This decrease was maintained until the end of the study. Any significant modification of median grade had not showed in antral biopsies.

CONCLUSION

	TREATMENT ([D ₀] vs [D ₁₄]) Specific diet + <i>L. johnsonii</i> NCC 533 fermented milk preparation		POST-TREATMENT ([D ₀] vs [D14]) Specific diet	
	FUNDUS	ANTRUM	FUNDUS	ANTRUM
GHLOs ^{(2)-a}	(-)*	(-)*	ns	ns
Urease Activity ^{(1)-b}	(-)*	(-)*	(+)*	ns
Urease Activity ^{(2)-a}	(-)*		ns	

	([D ₀] vs Inclusion)		([D ₀] vs [D ₁₄])	
Chronic Gastritis ^{(2)-d}	(-)*	ns	ns	ns

⁽¹⁾ Paired t-test; ⁽²⁾ Wilcoxon Signed Rank test - (-) (+) negative or positive variation -

P < 0.05 - ^a Histobacteriology - ^b Jatrox[®] test - ^c C-Urea Breath test - ^d Histopathology

In dogs having a gastric GHLOs infection with a chronic gastritis, the consumption of an acidified milk preparation fermented by *L. johnsonii* NCC 533 was able to obtain:

- in fundus and in antrum, a significant decrease of GHLOs load and the urease activity and the regression of chronic gastritis during the treatment,
- in fundus, a significant regression of chronic gastritis that was maintained after the end of treatment,
- no side effect.

Example 3: dry dog food

NO 6210/EP

61

20

A feed mixture is made up of about 58% by weight corn, about 5.5% by weight of corn gluten, about 22% by weight of chicken meal, 2.5% dried chicory, fermented milk by strains of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) and *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116) so that the corresponding amount for the dog is about 10^9 - 10^{12} cfu / day, and salts, vitamins and minerals making up the remainder.

The feed mixture is fed into a preconditioner and moistened. The moistened feed is then fed into an extruder-cooker and gelatinised. The gelatinised matrix leaving the extruder is forced through a die and extruded. The extrudate is cut into pieces suitable for feeding to dogs, dried at about 110°C for about 20 minutes, and cooled to form pellets.

This dry dog food is able to improve pet health, and particularly prevents disorders related to GHLOs infection in pets.

Example 4

A trial is conducted on a panel of 20 male beagles, which had naturally contracted a gastric infection with GHLOs. All dogs were first given an antibiotic a classical treatment for eradication of GHLOs, comprising administering two different antibiotics (Spiramycin and Metronidazole) and one antisecretory like Omeprazole during 1 week.

After 7 days of treatment, half the dogs were GHLOs negative, i.e. no *Helicobacter* organisms were detected by histobacteriology, no gastric urease activity and a ^{13}C -Urea Breath test value lower than 5 % of increase over baseline at 40 minutes.

After the treatment, half of the dogs were fed with Friskies Menu Energy product, which is dried dog food available on the market, as a control food. The 10 remaining dogs were fed with a test food corresponding to the Friskies Menu Energy product except that it contains pellets of dry fermented milk by strains of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) and *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116), so that the amount for a dog is of about 10^9 - 10^{12} cfu/ day.

The ^{13}C -Urea Breath test and *Helicobacter* detection by histobacteriology were measured again 6 weeks after feeding these two different diets. The result shows that 20% of the dogs fed with normal Friskies Menu Energy product,

NO 6210/EP

AS
112

became positive in 6 weeks. All dogs fed with the test food were negative after 6 weeks.

This composition is efficient as an adjuvant in antibiotherapies for GHLOs reinfestation prevention.

Example 5: canned pet food

A mixture is prepared from 73 % of poultry carcass, pig lungs and beef liver (ground), 16 % of wheat flour, 2 % of dyes and 9 % of fermented milk by strains of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) and *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), vitamins, and inorganic salts. This mixture is emulsified at 12°C and extruded in the form of a pudding which is then cooked at a temperature of 90°C. It is cooled to 30°C and cut in chunks. 45 % of these chunks are mixed with 55 % of a sauce prepared from 98 % of water, 1 % of dye and 1 % of guar gum. Tinplate cans are filled and sterilized at 125°C for 40 min.

This wet composition is intended for preventing or treating disorders related to GHLOs infection in pets.

Example 6: Effect on bad breath odors

10 dogs with GHLOs in stomach were fed with the same diet that in example 2 for 2 weeks. The breath odor was measured in each dogs at the beginning and at the end of the treatment by the help of an halitometer.

This experiment showed that feeding the dogs with a composition containing an acidified milk preparation fermented by *L. johnsonii* NCC 533 induces an significant reduction of breath odors.

Furthermore there was clear correlation between the level of infection by helicobacter and the breath odors.

62

22

Claims

1. The use of at least one strain of lactic bacteria and / or a medium fermented by at least one lactic bacteria that have been isolated and selected for its ability to display a strong anti-Helicobacter bacteriocidal activity *in vitro*, for the preparation of a composition intended for the prophylaxis or the treatment of disorders related to GHLOs infection in pets.
2. The use according to claim 1, wherein the lactic acid bacteria is used in the form of a fermented medium by the said lactic acid bacteria, or a subfraction of cultured medium fermented by the lactic acid bacteria.
3. The use according to any of preceding claims, wherein the lactic acid bacteria strain is selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus actiophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.
4. The use according to any of preceding claims, wherein the lactic acid bacteria is selected from the group consisting of the strains *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).
5. The use according to any of preceding claims, wherein the lactic acid bacteria or the equivalent fermentation medium is used so that the amount available for the pet is of about 10^3 - 10^{14} cfu per day.
6. The use according to any of preceding claims, wherein the lactic acid bacteria or the equivalent fermentation medium is used in an amount of about 10^6 - 10^{13} cfu /day for dogs and 10^7 - 10^{11} cfu /day for cats.
7. A method for the treatment or for the prophylaxis of disorders related to GHLOs infection in pets, which comprises administering to a pet a composition containing at least one strain of lactic acid bacteria and /or a medium fermented by at least one lactic acid bacteria that have been isolated and selected for its ability to display a strong anti-Helicobacter bacteriocidal activity *in vitro*.

NO 6210/EP

113

8. A method according to claim 7, wherein about 10^3 - 10^{14} cfu of the lactic bacteria or its equivalent fermentation medium is administered per day to the pet.

9. A pet food composition containing an effective amount of at least one isolated strain of lactic bacteria and/or its fermented growth medium, said lactic bacteria being isolated and selected for its ability to display a strong anti-*Helicobacter* bactericidal activity *in vitro*, associated with an ingestible support or a pharmaceutical matrix.

10. A composition according to claim 9, wherein the lactic acid bacteria is used in the form of a fermented medium by a lactic acid bacteria viable or inactivated, or a subfraction of cultured medium fermented by the lactic acid bacteria.

11. A composition according to claims 9 or 10, wherein the lactic acid bacteria strain is selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

12. A composition according to any of claims 9 to 11, wherein the lactic acid bacteria strain is selected from the group consisting of the strains *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (CNCM-I 2116), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

13. A composition according to any of claims 9 to 12, wherein the amount of lactic acid bacteria strain or the equivalent fermentation medium available for the pet is corresponding to about 10^3 - 10^{14} cfu per day.

14. A composition according to any of claims 9 to 13, which reduces GHLO infection in cats and dogs so that the GHLOs load and the urease activity in the fundus are reduced of at least 0.5 grade and of at least 0.5 grade in the antrum.

15. A composition according to any of claims 9 to 14, which induces a regression of chronic fundic gastritis, with a median regression of the grade of gastric inflammation of at least about 0.5.

16. A composition according to any of claims 9 to 13, which reduces bad breath odors of pets.

NO 6210/EP

18-01-2000

2000 16:13

NESTEC VEVEY

EP00200179.0

2000

N2589

P. SPEC

63

24

Abstract**Pet food for treating helicobacter species in pets**

- 5 The use of at least one strain of lactic bacteria and / or a medium fermented by at least one lactic bacteria that have been isolated and selected for its ability to display a strong anti-Helicobacter bactericidal activity *in vitro*, for the preparation of a composition intended for the prophylaxis or the treatment of disorders related to GHLOs infection in pets and pet food compositions
- 10 containing same.

NO 6210/EP

Printed:09-01-2001

24