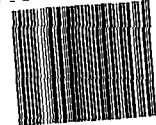


PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 108185 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 02108185 00000000 Folios: 98
Fecha (AMD): 2002-11-20 16:44:20
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SOCIETE DES PRODUITS
NESLE S.A.**

Dirección: P.O.Box 353, CH-1800
Vevey, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **JOSE ANTONIO LLOREDA**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5o.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: ZINK Ralf; RENIERO, Roberto; ROCHAT, Florence; CAVADINI, Christoph; VON DER WEID, Thierry; SCHIFRIN, Eduardo; BENYACOU, Jalil; ROSSEAU, Virginie;; PEREZ, Pablo

Dirección: Chemin de la Maison Jean 36, CH-1801 Le Mont Pelerin; 28 Rue Charles DubreuilF-14590 MOYAUX, Quartier des Tilleuls 6, CH-1820 Montreux; Chemin de Paudille 26, CH-1801 Le Mont-Pelerin; Chemin de Bellevue 25, CH-1005 Lausanne; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier; Chemin de la Grangette 92 CH-1010 Lausanne; Mykonos II-Appt A20 235, Route de Narbonne F-31400 Toulouse y Diagonal 80 N° 895 2°B, 1900 La Plata.

Nacionalidad o Domicilio: ALEMANIA, ITALIA, SUIZA, FRANCIA Y ARGENTINA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP01/06039

Fecha: Mayo 22, 2001

Publicación Internacional No. WO 01/90311 A1

Fecha: Noviembre 29, 2001

⑥

Título (54) "NUEVOS PROBIOTICOS PARA APLICACIONES DE ALIMENTO DE MASCOTAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 1/20 A23L 1/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP y EP

Mayo 25, 2000 y Abril 25, 2001

00201867.9

01201503.8

⑨

Comprobante de Pago No. 02-77,579 Fecha: Noviembre 20, 2002

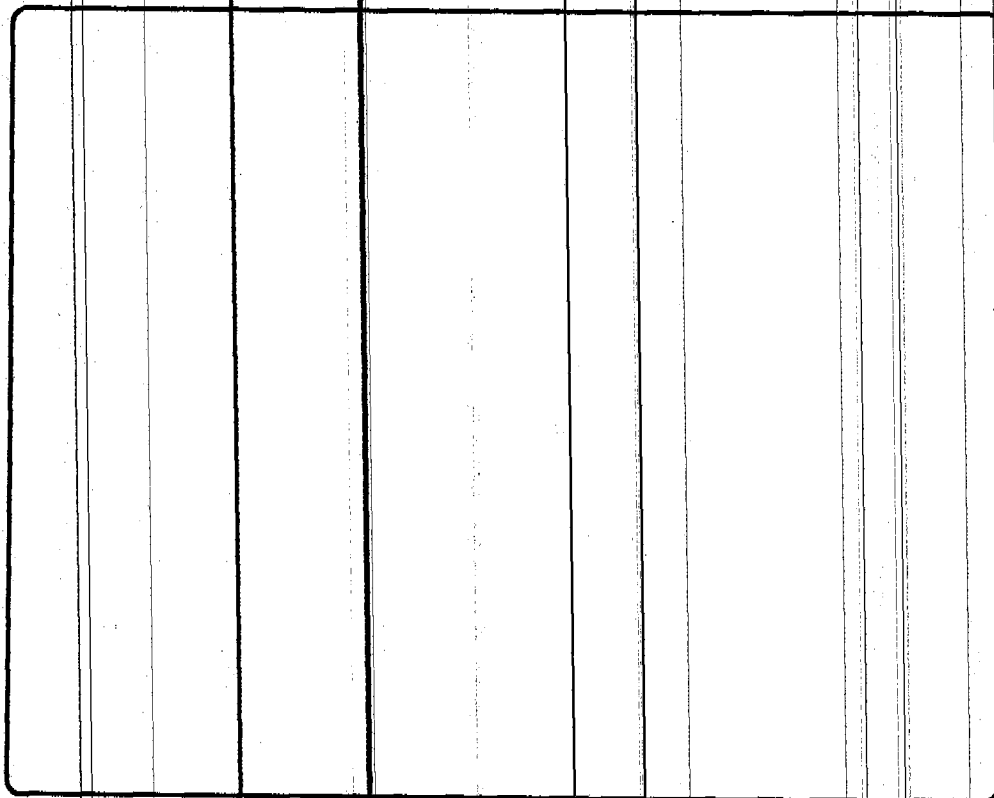
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. Protocolizado bajo el número 11.145.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Informe de Búsqueda Preliminar con su traducción y Publicación con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO LOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Btá. T.P. 10.784

4 REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/06039

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C12N1/20 A61K35/74 A23K1/00 A23K1/16 A23K1/20

/(C12N1/20, C12R1:225)

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 A61K A23K C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

BIOSIS, EPO-Internal, FSTA, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	WO 96 08261 A (THE UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES) Marzo 21, 1996 (1996-03-21) documento completo	1-31
A	US 5 968 569 A (CAVADINI C. Y COL.) Octubre 19, 1999 (1999-10-19) citado en la solicitud documento completo	1-31
A	US 5 922 375 A (LUCHANSKY J.B. Y COL.) Julio 13, 1999 (1999-07-13) documento completo	1-31
A	WO 99 17788 A (ABBOTT LABORATORIES) Abril 15, 1999 (1999-04-15) documento completo	1-31
	-/-	

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

Octubre 10, 2001

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

17/10/2001

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Moreau, J.

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Julio 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/06039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/20 A61K35/74 A23K1/00 A23K1/16 A23K1/20
 //(C12N1/20,C12R1:225)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A23K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, FSTA, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 08261 A (THE UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES) 21 March 1996 (1996-03-21) the whole document	1-31
A	US 5 968 569 A (CAVADINI C. ET AL.) 19 October 1999 (1999-10-19) cited in the application the whole document	1-31
A	US 5 922 375 A (LUCHANSKY J.B. ET AL.) 13 July 1999 (1999-07-13) the whole document	1-31
A	WO 99 17788 A (ABBOTT LABORATORIES) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document	1-31
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2001

Date of mailing of the international search report

17/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 01/06039

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9608261	A	21-03-1996	AU 687253 B2	19-02-1998
			AU 3557995 A	29-03-1996
			WO 9608261 A1	21-03-1996
			CA 2199140 A1	21-03-1996
			EP 0778778 A1	18-06-1997
			JP 10500142 T	06-01-1998
			NZ 293195 A	28-01-1999
			US 6060050 A	09-05-2000
US 5968569	A	19-10-1999	AU 5040598 A	16-07-1998
			BR 9800271 A	29-06-1999
			CA 2222758 A1	09-07-1998
			CN 1192330 A	09-09-1998
			EP 0862863 A2	09-09-1998
			JP 10191916 A	28-07-1998
US 5922375	A	13-07-1999	US 5902743 A	11-05-1999
WO 9917788	A	15-04-1999	WO 9917788 A1	15-04-1999
WO 0053202	A	14-09-2000	EP 1034787 A1	13-09-2000
			EP 1034788 A1	13-09-2000
			AU 3162700 A	28-09-2000
			AU 3162900 A	28-09-2000
			WO 0053200 A1	14-09-2000
			WO 0053202 A1	14-09-2000
			AU 3162800 A	28-09-2000
			WO 0053201 A1	14-09-2000

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

Noviembre 29 de 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 01/90311 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 1/20,
A61K 35/74, A23K 1/00, 1/16, 1/20 // (C12N 1/20, C12R
1:225)

(74) Representante Común: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.;
Chautard, Cécile, P. O. Box 353, CH-1800 Vevey, (CH)..

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP01/06039

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AU, BR, CA, CN, CO, CR,
DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MA, MX, NO, NZ, PL, SG, TR, US, ZA.

(22) Fecha de Registro Internacional: Mayo 22 de 2001 (22.05.2001)

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar
las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de
recibo de modificaciones
- Con indicación (es) en relación al material biológico depositado,
proporcionado bajo la Regla 13bis de manera separada a la descripción.

(30) Información de Prioridad:

00201867.9 Mayo 25 de 2000 (25.05.2000) EP
01201503.8 Abril 25 de 2001 (25.04.2001) EP

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a
"Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen
al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto (Estados
Unidos de América): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A (CH/CH);
P.O Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventores; e

(75)I (75)Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América
solamente): ZINK, Ralf (DE/CH); Chemin de la Maison Jean 36, CH-1801
Le Mont Pelerin (CH). RENIERO, Roberto [IT/CH]; Chemin Paudille 24,
CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH). ROCHAT, Florence [CH/CH]; Quartier des
Tilleuls 6, CH-1820 Montreux (CH). CAVADINI, Christoph [DE/FR];
Chemin de Paudille 26, CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH). VON DER WEID,
Thierry CH/AR; Chemin de Bellevue 25, CH-1005 Lausanne (CH).
SCHIFRIN, Eduardo [AR/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023
Crissier (CH). BENYACOU, Jalli (CH/CH); Chemin des Eterpeys, 21, CH-
101 Lausanne (CH). ROSSEAU, Virginie [FR/FR]; 92, Domaine des Ecots,
F-49070 St. Lambert La Potherie (FR). PEREZ, Pablo [AR/AR]; Diagonal
80 N° 895 2°B, 1900 La Plata (AR).

(54) Título:

"NUEVOS PROBIOTICOS PARA APLICACIONES DE ALIMENTO DE MASCOTAS "

(57) Resumen: La presente invención se refiere a nuevos microorganismos bacterianos de ácido
láctico que se han aislado y seleccionado por su potencial probiótico y su uso para la preparación
y composiciones de alimento para mascotas propuestas para mejorar la salud de las mascotas, y a
composiciones que contienen los mismos.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90311 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 1/20,
A61K 35/74, A23K 1/00, 1/16, 1/20 // (C12N 1/20, C12R
1:225)

(21) International Application Number: PCT/EP01/06039

(22) International Filing Date: 22 May 2001 (22.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00201867.9 25 May 2000 (25.05.2000) HP
01201503.8 25 April 2001 (25.04.2001) HP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCI-
ETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box
353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZINK, Ralf
[DE/CH]; Chemin de la Maison Jean 36, CH-1801 Le Mont
Pelerin (CH). RENIERO, Roberto [IT/CH]; Chemin
Paudille 24, CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH). ROCHAT,
Florence [CH/CH]; Quartier des Tilleuls 6, CH-1820 Mon-
treux (CH). CAVADINI, Christoph [DE/FR]; Chemin
de Paudille 26, CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH). VON
DER WEID, Thierry [CH/AR]; Chemin de Bellevue
25, CH-1005 Lausanne (CH). SCHIFFRIN, Eduardo
[AR/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier

(CH). BENYACOU, Jalil [CH/CH]; Chemin des Eter-
peys, 21, CH-101 Lausanne (CH). ROUSSEAU, Virginie
[FR/FR]; 92, Domaine des Ecots, F-49070 St. Lambert La
Potherie (FR). PEREZ, Pablo [AR/AR]; Diagonal 80 N°
895 2°B, 1900 La Plata (AR).

(74) Common Representative: SOCIETE DES PRODUITS
NESTLE S.A.; Chautard, Cécile, P.O. Box 353, CH-1800
Vevey (CH).

(81) Designated States (national): AE, AU, BR, CA, CN, CO,
CR, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MA, MX, NO, NZ,
PL, SG, TR, US, ZA.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL PROBIOTICS FOR PET FOOD APPLICATIONS

(57) Abstract: The present invention relates to novel lactic acid bacterial micro-organisms that have been isolated and selected for their probiotic potential and their use for the preparation of petfood compositions intended to improve the health of pets, and to compositions containing the same.

WO 01/90311 A1

14
11

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente NO 6658/WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 01/06039	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 22/05/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 25/05/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7 C12N1/20		
Solicitante SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLE S.A.		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>2</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total <u> </u> de páginas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 04/12/2001	Fecha de terminación de este reporte 09/03/2002
Nombre y dirección de correo de la IPEA/ Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49 89) 2399-4465	Funcionario autorizado BOUTRUCHE J E E Teléfono No. (+49- 89) 2399 2828

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NO 6658/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 01/ 06039	International filing date (day/month/year) 22/05/2001	Priority date (day/month/year) 25/05/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N1/20		
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04/12/2001	Date of completion of this report 09/03/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer BOUTRUCHE J E E Tel. (+49-89) 2399 2828



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

12/ 47
Internation application No. PCT/EP 01/ 06039

I. Basis of report

1. The basis of international preliminary examination report is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination (Article 34 (4) (a) (i) (ii) PCT; see also international search report) in respect of:

- 2.1 Applications having an unnecessary plurality of independent claims (generally not more than 1 independent claim in the same category is necessary; Article 6 PCT);

- 2.2 unsearched subject-matter (Article 17 (2) (a), Rule 66.1 (e) PCT).

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

3. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out (Article 35 (2) and (3) (b) and Rule 70.7 and 70.8 (ii) PCT):

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as claimed in the independent claims meets the criteria mentioned in Article 33 (1) PCT, i.e. it appears to be novel, to involve an inventive step and to be industrially applicable.

NUEVOS PROBIÓTICOS PARA APLICACIONES DE ALIMENTO DE
MASCOTAS

5 La presente invención se refiere a nuevas
bacterias de ácido láctico y de manera más particular
a microorganismos de los géneros *Lactobacillus*,
Bifidobacterium y *Streptococcus* (*Enterococcus*) que se
han aislado y seleccionado por su potencial
10 probiótico. La presente invención también se refiere
a su uso en la preparación de composiciones de
alimento para mascotas, propuestas para mejorar la
salud de las mascotas y a composiciones que contienen
la misma. También se proporcionan métodos para
15 mantener o mejorar la salud de las mascotas a través
de la alimentación a una mascota de estos
microorganismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 El bienestar de los animales domésticos se
relaciona estrechamente a su alimentación. La
alimentación correcta debe dar por resultado una
mascota en forma y saludable. Además de proporcionar
valor nutritivo, la composición alimenticia influye
25 en el equilibrio de la microflora intestinal y puede
conducir o prevenir trastornos gastrointestinales.
Por lo tanto, el conocimiento con respecto a los
procesos de digestión y el tracto gastrointestinal de
los animales saludables es integral al entendimiento
30 de una práctica alimenticia factible. Como
carnívoros, los gatos y perros se caracterizan por

tracto digestivo corto y una rápida velocidad de flujo del bolo alimenticio.

Entre los constituyentes de la microflora gastrointestinal de gatos y perros, se pueden recuperar *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. y levaduras.

El número y composición de esta flora endógena tiende a ser más bien estable, aunque la edad y en un menor grado, el alimento pueden modificarla. La acidez gástrica, bilis, peristalsis intestinal e inmunidad local son factores que se consideran importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y varios otros mamíferos.

Frecuentemente, los trastornos gastrointestinales de felinos y caninos se enlazan al sobrecrecimiento bacteriano y la producción de enterotoxinas producidas por bacterias patógenas.

Durante los últimos años, la investigación se ha enfocado en algunas cepas valiosas de bacterias de ácido láctico y su uso potencial como agentes probióticos. Los probióticos se consideran que son preparaciones microbianas viables que promueven la salud de los mamíferos al conservar la microflora natural en el intestino. Los probióticos se piensa que se unen a la mucosa intestinal, colonizan el tracto intestinal y de este modo impiden la unión de microorganismos peligrosos al mismo. Un prerrequisito para su acción reside en que tienen que alcanzar la

La cepa prebiótica se puede seleccionar de lactobacilos, bifidobacterias o enterococos.

La cepa probiótica se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacterium spp.*

En una modalidad preferida, la cepa probiótica se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus reuteri* (NCC2581; CNCM I-2448), *Lactobacillus reuteri* (NCC2592; CNCM I-2592); CNCM I-2450), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC2583; CNCM I-2449), *Lactobacillus reuteri* (NCC2603; CNCM I-2451), *Lactobacillus reuteri* (NCC2613; CNCM I-2452), *Lactobacillus acidophilus* (NCC2628; CNCM I-2453), o *Bifidobacterium adolescentis* (por ejemplo NCC2627), o *Bifidobacterium sp.* NCC2657 o *enterococcus faecium* SP68 (NCIMB 10415).

La nueva cepa bacteriana se puede usar en cualquier cantidad desde aproximadamente $1.0E+04$ a aproximadamente $1.0E+12$ cfu/animal y de manera preferente $1.0E+05$ a aproximadamente $1.0E+11$ cfu/animal y día, de manera más preferente de $1.0E+07$ a $1.0E+10$ cfu/animal y día.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana como se describe anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos, para la preparación de una composición propuesta para el tratamiento y/o profilaxis de

23
20

trastornos asociados para la colonización del tracto intestinal de mascotas por microorganismos patogénicos. A menos que se indique de otro modo claramente en el contexto, la referencia "cepa" se debe entender que incluye su sobrenadante de cultivo y/o un metabolismo de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana como se describe anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o un metabolito del mismo, para la preparación de una composición propuesta para regular la respuesta inmunitaria de mascotas. Por el término "regular" la respuesta inmunitaria, se quiere decir que las cepas bacterianas descritas anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos tienen la capacidad para estimular ya sea ciertas funciones inmunitarias que son importantes a la salud de la mascota o para modular otras funciones inmunitarias que se podrían implicar potencialmente en los trastornos inmunitarios, tal como inflamación, alergia, etc. La estimulación o modulación de estas funciones inmunitarias se puede lograr al usar diferentes combinaciones de las cepas bacterianas descritas anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos.

La invención proporciona adicionalmente un método para mantener o mejorar la salud del tracto gastrointestinal, la piel y/o el sistema de pelaje o el sistema inmunitario de una mascota que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al menos una

cepa aislada como se describe anteriormente.

Además, la invención proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos asociados con la colonización del tracto gastrointestinal de mascotas por microorganismos patogénicos, que comprende el paso de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona un método para regular la respuesta inmunitaria en mascotas, que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona un método para mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en una mascota, que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

Estos microorganismos seleccionados tienen un impacto benéfico particular en mascotas en su tracto gastrointestinal, o en su piel y/o revestimiento, o su sistema inmunitario y en los efectos del envejecimiento.

Tienen un impacto benéfico particular en los patógenos intestinales tal como las cepas *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* u otras Enterobacteriaceae patogénicas que colonizan mascotas o parásitos tal como helmintos (*Toxocara spp.*) protozoarios (*Cryptosporidium spp.*,

Giardia spp., *Pentatrichomonas hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*,...) o levaduras.

Combinados con el alimento, estos microorganismos ejercen de manera particular sus efectos benéficos probióticos en el buen sabor, digestión y salud del intestino, función inmunitaria y condiciones sanitarias, estas últimas por medio de la contribución a una reducción del volumen fecal y al menos una desodorización parcial de las heces caninas. De esta manera, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, una composición de alimento para mascotas comprende un microorganismo que tiene una alta actividad prebiótica en mascotas y que es capaz de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de una mascota que lo ingiere.

Por consiguiente, la invención se refiere a una composición de alimento para mascotas propuesta para la salud del tracto gastrointestinal de las mascotas, que contiene al menos una cepa prebiótica aislada como se describe anteriormente y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

Finalmente, la invención se refiere a una composición de alimento para mascotas propuesta para la salud de la piel y/o pelaje de mascotas, que contiene al menos una cepa aislada como se describe anteriormente y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

En una modalidad, el soporte ingerible

crioprotectores se demostró claramente a 4°C y 20°C como se indica por la prueba acelerada de almacenamiento.

Estas cepas se pueden caracterizar por tiempos cortos de generación, altas cuentas (más de 1.0E+08 cfu/ml) durante su fase estacionaria y estabilidad en altos números a 8 y 24 horas post-inoculación, estabilidad a liofilización seguido ya sea por condiciones de almacenamiento, resistencia a concentraciones fisiológicas de bilis encontradas en el duodeno (2% de bilis) y su baja inhibición cuando crecen en la presencia de hasta 4% de bilis. Adicionalmente, los resultados de los análisis de ADN se tomaron en cuenta para seleccionar bacterias representativas de la diversidad investigada.

Las cepas propuestas para la salud de perros y gatos pueden crecer hasta al menos 1.0E+06 cfu/ml en la presencia de hasta 2.0% de sales biliares. Las cepas también pueden crecer hasta al menos 1.0E+06 cfu/ml después de aproximadamente 2 horas a un intervalo de pH de aproximadamente 3.4 a aproximadamente 4.2.

Las cepas bacterianas de acuerdo con la intención se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium* sp.

Las siguientes cepas *Lactobacillus reuteri*

18

bifidobacteria de gatos (NCC2627) y una bifidobacteria de perros (NCC2657) se probaron adicionalmente para su actividad potencial probiótica en mascotas (ver Ejemplos 3 y 4).

En otra modalidad, la presente invención se refiere al uso de cepas bacterianas como se describe anteriormente, para la preparación de una composición alimenticia capaz de mejorar o mantener la salud de las mascotas.

Se pueden usar en forma viable, forma inactividad, como un sobrenadante de un cultivo o fracciones de la misma, por ejemplo, paredes cerebrales, peptidoglicano, citoplasma, proteínas purificadas, metabolitos funcionales, moléculas bioactivas.

De manera preferente, se usan en una cantidad de aproximadamente $1.0E+04$ cfu/g a aproximadamente $1.0E+11$ cfu/g y de manera preferente de $1.0E+05$ cfu/g a aproximadamente $1.0E+10$ cfu/g, de manera más preferente de $1.0E+06$ cfu/g a $1.0E+09$ cfu/g.

En una modalidad preferida, se pueden usar como adjuntos dietéticos para mejorar la calidad del alimento para mascotas y se pueden incluir en una cantidad desde aproximadamente $1.0E+04$ cfu/g a aproximadamente $1.0E+11$ cfu/g. Como adjuntos dietéticos, se pueden encapsular o se pueden proporcionar en la forma de polvo y empacar en unión con, o de manera separada de una comida principal, esté seca o húmeda. A manera de ejemplo, un polvo que contiene microorganismos seleccionados de acuerdo con

la invención, o componentes o porciones del sobrenadante de sus cultivos en metabolitos seleccionado, se pueden empacar en sobrecitos en una forma de polvo o en un gel o lípido u otro portador adecuado. Estas unidades empacadas de manera separada se pueden proporcionar conjuntamente con una comida principal o en paquetes de varias unidades para el uso con una comida principal o tratamiento, de acuerdo a las instrucciones del usuario. En otro ejemplo, las cepas probióticas se pueden proporcionar en una unidad de empaque de varias cámaras junto con un segundo componente ingerible, por ejemplo, una comida abundante húmeda o con un contenido medio de humedad, o un lote de tamaño de porción de productos molidos secos en una configuración de bolsa flexible. Una primera cámara en la bolsa contendrá la cepa prebiótica y una segunda cámara sellada, separada contendrá el segundo componente ingerible.

Estos microorganismos seleccionados tienen un impacto benéfico particular en mascotas en su tracto gastrointestinal, en su piel y pelaje, en su sistema inmunitario, en la salud dental u oral, en sus huesos y en los efectos del envejecimiento.

También se encuentra que mejoran el buen sabor de la comida, digestión, función inmunitaria y funciones sanitarias (reducción de volumen fecal y desodorización parcial de las heces caninas) en mascotas.

La presente invención también se refiere a una composición de alimento para mascotas para mejorar o mantener la salud de mascotas, la cual

contiene al menos una cepa probiótica que contiene los rasgos anteriores, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

Se puede administrar a la mascota como un complemento de su dieta normal o como un componente de un alimento para mascota nutricionalmente completo, al menos una cepa bacteriana que tiene los rasgos anteriores y/o su sobrenadante de cultivo o una fracción de la misma y/o sus metabolitos.

La composición de alimento para mascotas, nutricionalmente completa de acuerdo con la invención puede estar en la forma de polvo, seco o en un producto de alimento para mascotas, húmedo, molido o auto-estable. Estos alimentos para mascotas se pueden producir por maneras conocidas en la técnica con la condición que donde se desee la actividad de microorganismo, se tome cuidado para asegurar la supervivencia del microorganismo. Aparte de las cepas bacterianas y/o su medio fermentado, estos alimentos para mascotas pueden incluir cualquiera de una fuente de almidón, una fuente de proteína y una fuente de lípidos.

Las fuentes de almidón adecuadas son por ejemplo, granos y legumbres, tal como maíz, arroz, trigo, cebada, avena, soya y mezclas de éstas.

Las fuentes de proteína adecuada se pueden seleccionar de cualquier fuente de proteína animal o vegetal adecuada; por ejemplo carne y comida, carne de aves de corral, carne de pescado, concentrado de proteína de soya, proteínas lácteas, gluten y similares. Para animales de varios años, se prefiere

que esta fuente de proteína contenga una proteína de alta calidad.

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

La elección de las fuentes de almidón, proteína y lípido se determinarán ampliamente por las necesidades nutricionales del animal, consideraciones de buen sabor y el tipo de producto aplicado. Para mascotas con varios años, el alimento para mascotas contiene de manera preferente, proporcionalmente menos grasa que los alimentos para mascotas jóvenes. Adicionalmente, las fuentes de almidón pueden incluir uno o más de arroz, cebada, trigo y maíz.

Adicionalmente, también se pueden incorporar conforme se desee en el alimento para mascotas, varios ingredientes diferentes, por ejemplo, azúcar, sal, especies, agentes de sazón, vitaminas, minerales, agentes saborizantes, grasas y similares.

Para los alimentos secos para mascotas, un proceso adecuado es la cocción por extrusión, aunque se puede usar el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cuece por extrusión, el alimento seco para mascotas usualmente se proporciona en la forma de un producto molido. Si se usa un carbohidrato prebiótico, el prebiótico se puede mezclar con los otros ingredientes del alimento seco para mascotas antes del procesamiento. En la solicitud de Patente Europea No. 0850569, se describe un proceso adecuado; la descripción de la cual se incorpora por referencia. Si se usa un microorganismo probiótico y

32
38

si se desea la actividad en el producto final, el organismo se reviste mejor o se rellena en el alimento seco para mascotas. En la solicitud de patente Europea No. 0862863 se describe un proceso adecuado; la descripción del cual se incorpora como referencia. Donde no se requiera la supervivencia del microorganismo, se puede adicionar a la mezcla de pre-extrusión, como puede ser el sobrenadante de su cultivo o metabolito, como se desee.

Para alimentos húmedos, los procesos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,781,939 y 5,132,137 se pueden usar para producir productos de carne simulada. La descripción de estas patentes se incorporan como referencia. También se pueden usar otros procesamientos para producir productos tipo trozo; por ejemplo la cocción en un horno de vapor. De manera alternativa, los productos tipo pan se pueden producir al emulsionar un material de carga adecuado para producir una emulsión de carne, adicionando un agente adecuado de formación de gel, y calentando la emulsión de carne antes del relleno en botes u otros recipientes. Como en el caso de la producción de alimentos secos para mascotas, donde no es esencial la supervivencia de las especies probióticas elegidas, se puede adicionar a la mezcla de alimentación antes de la cocción o calentamiento, o en cualquier etapa apropiada conveniente en el proceso de producción.

La cantidad de probiótico en el alimento para mascotas es de manera preferente menor de aproximadamente 20 % en peso y de manera adicional,

preferentemente menos de 10 % en peso. Por ejemplo, el probiótico puede comprender de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5 % en peso del alimento para mascotas. Para los alimentos para mascotas, que usan achicoria como el prebiótico, la achicoria se puede incluir para comprender desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10 % en peso de la mezcla alimenticia, de manera más preferente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso.

Los alimentos para mascotas pueden contener otros agentes activos tal como ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga, adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linoleico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico, y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. El aceite de borraja, aceite de semilla de grosella negra, y el aceite de primavera vespertina son fuentes adecuadas de ácido gamma-linoleico. Los aceites de cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y aceites de soya son fuentes adecuadas de ácido linoleico.

Si es necesario, los alimentos para mascotas se complementan con minerales y proteínas de modo que son nutricionalmente completos.

Adicionalmente, si se desea, la cepa bacteriana se puede encapsular; por ejemplo en una matriz de azúcar, matriz de grasa o matriz de polisacárido. También se puede revestir como se describe en EP 862 863.

La nueva cepa probiótica se usa de manera

preferente de modo que el alimento para mascotas contiene de manera preferente cerca $1.0E+04$ a aproximadamente $1.0E+10$ células del microorganismo probiótico por gramo del alimento para mascotas; de manera más preferente cerca de $1.0E+06$ a aproximadamente $1.0E+08$ células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para mascotas puede contener aproximadamente 0.005% a aproximadamente 10 % en peso de la mezcla del microorganismo probiótico. Contiene de manera preferente cerca de 0.02% a aproximadamente 6 % en peso y de manera más preferente cerca de 1 % a aproximadamente 6 % en peso.

La cantidad del alimento para mascotas que se va a consumir por la mascota para obtener un efecto benéfico dependerá del tamaño de la mascota, el tipo de mascota y la edad de la mascota. Sin embargo, una cantidad del alimento para mascotas para proporcionar una cantidad diaria de aproximadamente $1.0E+03$ - $1.0E+14$ cfu de al menos una cepa de bacteria de ácido láctico y/o el medio de fermentación equivalente, usualmente serán adecuados. De manera preferente, se administran cerca de $1.0E+09$ a $1.0E+11$ cfu/día para perros y $1.0E+07$ a $1.0E+10$ cfu/día para gatos.

La composición de acuerdo con la invención tiene una alta actividad probiótica y/o se encuentra que es particularmente efectiva para mejorar y/o mantener la función digestiva saludable en mascotas, y mejorar y mantener el tracto gastrointestinal, piel y/o pelaje, y/o sistema inmunitario, salud de las

mascotas. Esta composición tiene un impacto benéfico en los efectos del envejecimiento en gatos y perros.

La presente invención no se limita en el alcance por las modalidades específicas descritas en la presente. Los ejemplos se persiguen por una breve descripción de las Figuras.

FIGURAS

Figura 1: Proliferación de linfocitos de células mononucleares de la sangre periférica, canina (PMBC) en la estimulación con mitógenos o ésteres de forbol. Las PMBC de perros alimentados durante 4 semanas con (barras negras) o sin (barras blancas) *L. acidophilus* NCC2628 se estimularon con diferentes mitógenos a dosis (μ /ml) indicadas en la gráfica. Los mitógenos con PHA (Fitohemaglutina), conA (concanavalina A), PWM (mitógeno de hierba) y éster de forbol son PMA/iono (miristato-acetato de forbol e ionomicina). $*=P<0.05$, prueba t de Student.

Figura 2: Citocinas producidas por leucocitos caninos estimulados con diferentes cepas de probióticos. Los leucocitos de perros adultos normales se estimularon con diferentes cepas de lactobacilos aisladas de mascotas durante 18 horas. Los cultivos de control contuvieron medio solo (control negativo) o un aislado de lactobacilo humano ST12 (control positivo). La identificación de las citocinas se hizo por TR-PCR. Su cuantificación se realizó al explorar los agarogeles teñidos con bromuro de etidio y determinar el píxel relativo de cada banda usando el programa NIH Image. Los resultados se expresan como las medias de dos

API-50CH y Rapid-ID32A (BioMérieux) para lactobacilos y bifidobacterias, respectivamente. Se congelaron y se depositaron cepas puras a -80°C en la colección de cultivos Nestec (NCC).

5 Todas las bacterias se cultivaron en un medio de caldo para los ensayos. Una muestra de cada cepa reactivada se almacenó a -80°C en 1 ml de crioprotector (40% de glicerol + 60% de LL). Los cultivos se mantuvieron al subcultivar en una base
10 semanal un inóculo al 1% en 10 ml de medio de cultivo en incubación anaeróbica a 37°C . Se cultivaron los lactobacilos en MRS durante 18 horas. Las bifidobacterias se cultivaron ya sea en MRS + 0.05 % (p/v) clorhidrato de L-cisteína (MRS-C) durante 32
15 horas o en BHI + 0.05% de clorhidrato de L-cisteína (BHI-C) durante 48 horas iniciando con un inóculo al 5%.

 Todos los cultivos se almacenaron a $+4^{\circ}\text{C}$ entre las diferentes transferencias. En general se
20 obtuvo la anaerobiosis usando un sistema anaeróbico de hidrógeno-dióxido de carbono (GasPak, Becton Dickinson, USA). Las bifidobacterias se mantuvieron siempre en estas jarras durante su periodo de almacenamiento.

25 Ejemplo 2: Selección de cepas bacterianas

 Este examen *in vitro* se basó en las características de producción para una aplicación industrial de células viables, su capacidad para
30 sobrevivir la inhibición o condiciones gastrointestinales perjudiciales y su diversidad genómica. La diversidad de la cepa o similitud

genómica de estas cepas no caracterizadas se tomó en cuenta, usando RAPD y ribotipificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento Bacteriano

5 Las cepas que son capaces de producir rápidamente un alto número de células tienen que ser identificadas. Su ciclo de crecimiento bacteriano se puede caracterizar por una fase de retraso corto, un tiempo de regeneración corto, altas cuentas máximas y
10 una fase estacionaria larga. Por lo tanto, se compararon cepas al considerar tres variables: la duración de su fase de retraso, su tiempo de generación (en horas) y sus cuentas máximas, que correspondieron a las características más
15 importantes.

Para lactobacilos:

Se inocularon 200 ml de caldo MRS preincubado a 37°C con 1% de su cultivo fresco. Se recolectaron muestras de un ml a cada hora después de
20 la inoculación durante ocho horas. Se tomó una muestra final después de 24 horas. Un ml de cada muestra se diluyó en serie 10 veces en TS para enumeración. Se cultivaron los cultivos en agar MRS (técnica de puesta en placa por derrame),
25 anaeróbicamente, 37°C, durante 48 horas. Todas las placas con los números de colonia entre 30 y 350 se registraron como unidades formadoras de colonia (cfu) por ml de cultivo y por lo tanto se tomaron en consideración para enumeraciones.

Para bifidobacterias en (MRS-C):

En ensayos preliminares, todas las cepas se

Para lactobacterias				
Substrato	Composición		PH	Referencias
MRS	MRS sin azúcar (Difco)	35 g.l ⁻¹	6.5	De Man adn al. (1960)
	Glucosa	20 g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		

Para bifidobacterias				
Sustrato	Composición		PH	Referencias
MRS-C	MRS sin azúcar (Difco)	35 g.l ⁻¹	6.0	Pacher and Kneifel (1996)
	Glucosa	20 g.l ⁻¹		
	L-cisteína-HCl (Fluka)	0.5g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		
TPYG (Extracto de tripticasa-peptona-levadura)	Tripticasa (BBL)	50 g.l ⁻¹	7.0	
	Peptona (Difco)	5 g.l ⁻¹		
	Extracto de levadura	20 g.l ⁻¹		
	(Difco)	4 g.l ⁻¹		
	Glucosa (Merck)	1 g.l ⁻¹		
	L-cisteína-HCl (Fluka)	1 g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		

Se obtuvieron medios sólidos por la adición de agar Difco Bacto (15 g.l⁻¹). Los medios se sometieron a autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los medios líquidos para las bifidobacterias ya sea se almacenaron bajo condiciones anaeróbicas o se desgasificaron antes de la utilización.

Resistencia a pH gástrico y bilis

Cuando se ingirieron, los microorganismos han sobrevivido al estómago y las condiciones del duodeno para ser capaces de ejercer una actividad

benéfica en el tracto gastrointestinal de animal. El pH gástrico y las sales biliares son los principales componentes responsables de la regulación de la flora bacteriana. Por lo tanto, tiene que ser valorado el grado de resistencia de las cepas a la acidez y bilis.

La fisiología del tracto digestivo de gatos y perros difiere de humanos. El pH promedio pH 3.4 y 4.2, respectivamente en perros y gatos. Una bilis reconstituida de mascotas se recomendó para los ensayos (Tabla 4). La concentración biliar en el intestino delgado varía en un intervalo de 0.5 a 2% cuando se digiere el alimento.

De acuerdo a los valores de pH extremos encontrados en gatos y perros, las cuentas viables después de 10 minutos a pH 2.6 y después de dos horas a ya sea pH 3.4 (cepas aisladas de perros) ó pH 4.2 (cepas aisladas de gatos) no deben estar por debajo de $1.0E+06$ cfu/ml.

Resistencia a pH gástrico

Todos los lactobacilos se inocularon a 1% en caldo MRS y se cultivaron anaeróbicamente a 37°C durante la noche. Las bifidobacterias, inoculadas a 5% en BHI-C, se cultivaron 48 horas a 37°C bajo condiciones anaeróbicas. Los cultivos se distribuyeron en tubos de reacción de dos ml (Eppendorf) y se centrifugaron a $3,500 \times g$ /10min/20°C. Las células se lavaron tres veces con solución Ringer. La resistencia a las condiciones ácidas del estómago se valoró in vitro en tres jugos gástricos simulados con niveles de pH de 2.6, 3.4 y 4.2

reconstituida de mascota se determinó.

Se consideraron dos cuentas viables significativamente diferentes cuando la desviación de $\log_{10}$ estaba por arriba de 0.25. Cada cepa se caracterizó por dos variables:

- la concentración máxima de sal biliar probada donde no se encontró diferencia significativa con el control.

- la velocidad de la disminución en la viabilidad cuando se incrementa la concentración biliar en el medio de crecimiento.

Las cepas caracterizadas por una pérdida superior a un $\log_{10}$ de sus cuentas viables cuando la concentración biliar aumenta en pasos de 1% se considero sensible a la bilis. Una reducción superior a un $\log_{10}$ entre células cultivadas en la presencia de 0 y 2% de bilis, y un $\log_{10}$ por ciento adicional de bilis (por arriba de 2%) se consideró aceptable. Adicionalmente, se deben detectar solo cepas que produzcan más de $1.0E+06$ cfu/ml cuando se cultivan en la presencia de hasta 2% de sales biliares, a fin de producir un efecto en el tracto gastrointestinal.

La bilis reconstituida en mascota a partir de gatos o perros se preparó como se indica en la tabla 4, y se esterilizó por filtración antes del uso. En un primer ensayo, se cultivaron lactobacilos anaeróbicamente durante 24 horas en calco MRS a 37°C y se transfirieron en el caldo MRS fresco más bilis de mascota, reconstituida, estéril, al 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4% durante 18 horas adicionales. Las muestras se diluyeron en serie 10 veces en TS para

enumeración. Las diluciones $1.0E-03$ y $1.0E-05$ se colocaron en placas de agar MRS, usando un WASP («Whitley Automatic Spiral Plater»; Don Whitley Scientific Limited, Inglaterra). Cuando se secaron, las placas se invirtieron e incubaron 48 horas a 37°C en
5 jarras anaeróbicas. Floch y al. (1972) definieron una inhibición como significativa cuando al menos 2 logs en la prueba comparada con el tubo de control cultivado se redujeron. En base a esto, todos los
10 lactobacilos sensibles a las concentraciones biliares en el primer ensayo y los dos lactobacilos resistentes a la bilis al 4% se probaron similarmente en la presencia de bilis al 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4%. La segunda prueba se enfocó a una capacidad de
15 repetición y se estabilizó si el número de bacterias viables disminuyó dramáticamente con el incremento de la concentración biliar.

Por otra parte, se señala que estas cepas son resistentes a la bilis durante este periodo de 18
20 horas. Se establecieron curvas de crecimiento en la presencia de sales biliares para determinar si la fase de retraso y la velocidad de crecimiento se afectaron o no. Los ensayos se emprendieron con lactobacilos cultivados en caldo MRS complementario
25 con bilis reconstituida de mascota, al 1%, de acuerdo al protocolo descrito para la medición de crecimiento anterior.

Las bifidobacterias se subcultivaron y crecieron 32 horas/ 37°C /anaeróbicamente, usando caldo
30 MRS-C con bilis reconstituida de mascota al 0, 1, 2, 3 y 4%. Se aplicó el mismo método de numeración a

(método de colocación en placa por derrame) y se distribuyeron en frascos (0.5 ml por ampolleta). Las muestras se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido y se secaron al vacío durante 18 horas. Después de la liofilización, se introdujo un nitrógeno a través de la válvula de admisión de aire del liofilizador y se sellaron todas las ampolletas. Todos los frascos se almacenaron a $+4^{\circ}\text{C}$ y $+20^{\circ}\text{C}$ durante seis meses. El número de células viables por ampolleta (para cada medio de bacterias y suspensión) se determinó mensualmente.

RESULTADOS

En la estructura de la selección de probióticos potenciales para gatos y perros, los resultados de este examen *in vitro* para 20 lactobacilos y 18 bifidobacterias, en base a sus potenciales de crecimiento, resistencia a la liofilización con almacenamiento subsecuente, resistencia al pH gástrico y concentraciones biliares encontradas en el tracto gastrointestinal de gatos y perros se presentan en la Tabla 5.

Los 20 lactobacilos se clasificaron con respecto a los criterios que se pueden cumplir en el estudio corriente. Cuatro cepas mostraron tener buenos resultados con respecto a sus características de crecimiento, resistencia al pH gástrico, resistencia a bilis y su supervivencia durante el almacenamiento después de la liofilización: *L. reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *L. reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450), *L. reuteri* NCC2603 (CNCM I-2451), y *L. reuteri* NCC2613 (CNCM I-2452). Se cumplieron las

gástrico promedio durante al menos dos horas.

La cepa NCC2627 fue mucho más resistente que la NCC2623 y NCC2635, mientras que estas tres cepas tuvieron un patrón cercano por ribotipificación, indicando por lo tanto una probable relación cercana (digestión con dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *EcoRV*).

Las diez bifidobacterias aisladas de perros mostraron solo dos diferentes patrones cuando se caracterizaron por ribotipificación. Por lo tanto, los ensayos de resistencia a bilis se llevaron a cabo solo con cuatro cepas (dos de cada grupo): NCC2657, NCC2660, NCC2671 y NCC2677. Estas cuatro cepas fueron todas resistentes a la concentración máxima de la bilis que se puede encontrar *in vivo* (2% de bilis) y las cepas NCC2660 y NCC2657 no tuvieron disminución en las cuentas viables cuando se sometieron a un valor máximo de 4% de bilis. Como consecuencia, todas las bifidobacterias aisladas de las heces de perros son más bien resistentes a altas concentraciones de bilis.

Considerando las características de crecimiento, estas diez bacterias de este modo se pueden dividir en dos grupos:

- cepas resistentes a bilis y con buenas características de crecimiento: NCC2657, NCC2651, NCC2663 y NCC2667

- cepas resistentes a bilis pero con características de crecimiento no adecuadas potencialmente para producción industrial: NCC2660, NCC2671, NCC2677, NCC2647, NCC2654 y NCC2674.

Adicionalmente, los resultados de los análisis de ADN se tomaron en cuenta para seleccionar las bacterias representativas de la diversidad investigada.

Ejemplo 3: Eficacia de colonización en gatos

Se probaron *L. reuteri* NCC2581, *L. reuteri* NCC2592, *L. rhamnosus* NCC2583 y *bifidobacterium* sp. NCC2627 en ensayos de alimentación para evaluar su capacidad para sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal de gatos.

Se sometieron 16 gatos machos y hembras tan iguales como sea posible a 3 días de adaptación con un menú Friskies Grand. El protocolo de alimentación consistió en 7 días con "Menu Friskies Grand" y 7 días de prueba con "Menu Friskies Grand" que contiene una de las cepas mencionadas anteriormente: *L. reuteri* (NCC2581) (dieta A), *L. reuteri* (NCC2592) (dieta B), *L. rhamnosus* (NCC2583) (dieta C) y *Bifidobacterium* sp. (NCC2627) (dieta D). La asignación de dieta fue la siguiente:

Gato No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Periodo 1	A	D	C	B	D	A	A	C	B	A	B	C	B	D	C	D
Periodo 2	B	A	D	A	C	C	D	A	C	B	C	D	D	A	B	B

Estas cepas se prepararon en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable para aplicar estas ocho diferentes bacterias con respecto a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probados. Todas las cepas se examinaron con 4 g de Trehalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para

36

mezclar las cepas preparadas con la matriz de alimento para los animales. Las cepas bacterianas se prepararon en tubos plásticos individuales ($1.0E+0.9$ cfu/día) y se adicionaron diariamente en una parte del alimento para asegurarse que se comerán las bacterias totales.

Se obtuvieron muestras fecales frescas para analizar los números de población bacteriana y se compararon con la línea base (sin bacterias adicionales).

Se recolectaron heces en el día 7 y 8 (línea base),

14 y 15

21 y 22 (línea base)

28 y 29

Se usa una sonda rectal estéril para obtener una muestra fecal de la menos 0.1 g. Esta muestra se pesa exactamente y se mezcla 0.1 g con 10 ml de solución fisiológica (Ringer) que contiene 10% de glicerol. Esta solución luego transfiere en criotubos de 1 ml y se congelan en nitrógeno líquido. Todas las muestras entonces se almacenan a -80°C hasta el análisis.

Las poblaciones endógenas de lactobacilos, Bacteroides, Enterobacteriaceae, Enterococcus, bifidobacterias y *Clostridium perfringens* se contaron. Se detectaron bacterias en medios selectivos o semiselectivos. Se realizaron diluciones en serie cien veces en solución de Ringer que contiene 0.5% de caseína, de las soluciones en el intervalo de -2 a -8. Cajas de Petri de varios medios selectivos se inocularon e incubaron (ver Tabla a continuación)

	NCC 2581		NCC 2592		NCC 2583		NCC 2627	
	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante
Lactobacilos	6.38	7.63	6.12	7.62	5.31	7.47	6.69	7.65
	±2.25	±1.23	±2.45	±1.58	±2.04	±1.23	±1.44	±1.45
Bifidobacterias	7.17	7.64	7.57	6.31	6.43	6.80	8.04	6.07
	±1.82	±0.42	±1.68	±2.26	±2.25	±2.19	±1.03	±2.32
Enterobacteriaceae	4.25	4.27	4.37	4.58	5.09	4.40	4.59	3.64
	±1.71	±1.20	±1.35	±1.45	±1.50	±0.63	±1.42	±0.64
Bacteroides	6.05	5.54	5.94	6.15	6.19	5.52	6.00	5.48
	±1.38	±0.49	±0.99	±0.99	±0.97	±0.46	±1.11	±0.50
C.perfrin	4.09	3.84	3.61	3.30	4.16	3.34	3.84	3.57
	±1.22	±1.00	±0.57	±0.57	±1.64	±0.11	±0.89	±0.56

Durante el tratamiento se observó un incremento de las cuentas fecales de lactobacilos, debido a las ingestiones de las bacterias probióticas citadas. No se observó incremento drástico en la cuenta de enterobacteriaceae que reflejan que no hay daño en el ecosistema intestinal relacionado al uso de los probióticos relacionados.

Ejemplo 4: Eficacia de colonización en perros

Se probaron *L. reuteri* NCC2603, *L. reuteri* NCC2613, *L. acidophilus* NCC2628 y *bifidobacterium* sp. NCC2657 en pruebas de alimentación para evaluar su capacidad para sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal de perros.

Se sometieron 10 perros, 5 hembras y 5 machos de 4 a 7 años de edad, a esta prueba específica. El protocolo de alimentación consistió en 5 días de adaptación con "Friskies Vitality" con/sin achicoria y 5 días de prueba con "Friskies Vitality"

con/sin achicoria y 3 días de adaptación, 5 días de prueba con "Friskies Vitality" con/sin achicoria + bacteria: *L. reuteri* NCC2603 (dieta E), *L. reuteri* NCC21613 (dieta F), *L. acidophilus* NCC2628 (dieta G) y *bifidobacterium* sp. NCC2657 (dieta H). La asignación de dieta fue como sigue:

Perro No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Periodo 1	E	E	E	E	E	F	F	F	F	F
Periodo 2	G	G	G	G	G	H	H	H	H	H

Estas cepas se prepararon en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable para aplicar estas ocho diferentes bacterias con respecto a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probados. Todas las cepas se mezclaron con 4 g de trihalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para mezclar las cepas preparadas con la matriz de alimentación para los animales. Las cepas bacterianas se prepararon en tubos plásticos individuales ($5.0E+09$ cfu/día) y se adicionaron diariamente en una parte del alimento para asegurarse que se ingieren las bacterias totales.

Se obtuvieron muestras fecales frescas para analizar los números de población bacteriana y se compararon con la línea base (sin bacterias adicionadas).

Se recolectaron heces el día 7 y 8 (línea base),

14 y 15

21 y 22 (línea base)

Durante el tratamiento no se observó cambio principal en las cuentas fecales de los lactobacilos, debido a las ingestiones de las bacterias probióticas seleccionadas excepto en el caso de la cepa *L. acidophilus* NCC2628. Bajo las condiciones de prueba, el efecto inhibidor en *C. perfringens* puesto que el nivel basal de *C. perfringens* fue muy bajo. No se observó incremento drástico en la cuenta de enterobacteriaceae que reflejan que no hay disturbio del ecosistema intestinal relacionado al uso de los probióticos seleccionados.

Ejemplo 5: Efecto de lactobacilos y sus metabolitos en la viabilidad de *Giardia intestinalis*

Se estudia el efecto de los sobrenadantes de filtrados de cultivo de cepas de lactobacilos aisladas de gatos y perros.

Materiales y métodos

Cepas y cultivos bacterianos: Los microorganismos que corresponden al género *Lactobacillus* fueron de la colección de cultivo Nestlé. Las bacterias se cultivaron en el medio MTY1. Los sobrenadantes que contienen metabolitos de lactobacilos se neutralizaron a pH6 y se esterilizaron por filtración.

Se realizaron controles al acidificar el medio MTY1 con ácido láctico al mismo pH que uno de los cultivos bacterianos. Posteriormente, el pH se ajustó a pH 6 con NaOH 0.1 N. El origen de la cepa bajo estudio y el pH de los sobrenadantes y controles se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Cepa	Origen	pH de sobrenadante	pH control
<i>G. reuteri</i> NCC2581	Gato	6.63	6.63
<i>G. rhamnosus</i> NCC2583	Gato	6.50	5.97
<i>G. reuteri</i> NCC2592	Gato	6.04	5.98
<i>G. reuteri</i> NCC2603	Perro	6.04	5.99
<i>G. reuteri</i> NCC2613	Perro	6.07	5.95
<i>G. acidophilus</i> NCC2628	Perro	6.01	5.93

Parásitos: La cepa WB de *Giardia intestinalis* (ATCC 30957) se compró a la colección americana de Cultivo de Especies (Rockville, E.U.A.). Se cultivaron trofozoitos en el medio TYI-S-33 modificado de Keister's que contiene por litro: extracto de caseína (Difco), 20g; extracto de levadura (BBL), 10g; dextrosa (Merck), 10g; bilis bovina (Difco), 0.75g; NaCl (Merck), 2g; L-cisteína.HCl (Sigma), 2g; Sal sódica de ácido ascórbico (Fluka), 0.2g; K_2HPO_4 (Merck), 0.6g; citrato de amonio férrico (Sigma), 22.8 mg; suero de bovino adulto (Sigma), 100 ml; penicilina/estreptomicina (Gibco, 1000 IU/ml), 15 ml. Se ajustó el pH a 6.9 con NaOH 5N antes de la esterilización con filtración (tamaño de poro de 0.22 μ m).

Se cultivaron parásitos en matraces de cultivo de tejido de poliestireno (LUX, Miles Laboratorios, Inc., Naperville IL 60540) rellenos con 40 ml de medio de cultivo. Se realizaron los subcultivos al descargar el sobrenadante sin

concentración, morfina, pancreatina). El jugo del intestino delgado canino, simulado contuvo bilis canina reconstituida (0.345 g/l tauroquenodesoxicolato, Sigma, Alemania; 0.7 g/l de taurodesoxicolato, Sigma, Alemania, 3.04 g/l de taurocolato, Sigma, Alemania; 0.006 g/l de colato, Fluka, Suiza), morfina porcina (1.9 g/l Sigma, Alemania), pancreatina porcina (2.42 g/l Sigma, Alemania) y solución de electrolitos (5 g/l de NaCl, 0.6 g/l de KCl, 0.25 g/l de CaCl₂, todo de Merck, Alemania). El pH del jugo se ajustó a pH 6.5 ± 0.5 con NaOH 0.1 N.

Cepas y condiciones de cultivo

Patógenos del intestino delgado

Se seleccionaron cuatro cepas potencialmente patógenas: *S. Typhimurium* SL1344, *E. coli* ETEC 08:H9 y *E. coli* 0149:K88 (aislado patógeno canino) y un aislado clínico de *Sh. dysenteriae* (origen humano, amablemente proporcionado por el Centre Hospitalier Universitaire, Vaudoise-CUV Lausana, Suiza). Con la excepción de *S. typhimurium* SL1344 propagado en caldo Luria Bertani (Difco, E.U.A.), todo el enterobacteriaceae se cultivó en caldo de infusión de cerebro-corazón (Difco, E.U.A.) a 37°C bajo agitación (240 rpm).

Bacteria de ácido láctico

Se seleccionaron un amplio intervalo de lactobacilos de origen canino y felino que incluyen: *L. acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453), *L. rahmnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *L. reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *L. reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450) de la

66 69
colección de cultivos Nestlé (NCC, Nestlé, Suiza) y se examinaron en el modelo de intestino delgado canino para la supervivencia, actividad fisiológica y efectos inhibitorios en los patógenos del intestino delgado, mencionados con anterioridad. Los lactobacilos se cultivaron anaeróbicamente (anaerocult Oxoid, Inglaterra) en el caldo Man Rogosa Sharp (Difco, E.U.A.), a 37°C.

Determinación de cuentas de células viables

10 Se diluyeron muestras en amortiguador de fosfato estéril (NaH_2PO_4 , pH 7, 0.2M) y se colocaron en placa superficial de diluciones de 10 veces en placas de agar: agar MRS (Difco, E.U.A.) para lactobacilos, agar Salmonella-typhimurium (Oxoid, Inglaterra) para *S. typhimurium* y *Sh. dysenteriae*, y agar Sorbitol-Mac-Conkey (Oxoid, Inglaterra) para *E. coli*. Se incubaron placas de agar 48 horas a 37°C de manera anaeróbica para lactobacilos, y 24 horas a 37°C para enterobacteriaceae. Para pruebas de co-
20 cultivo, se inhibió el crecimiento de enterobacteriaceae en agar MRS por la adición de polimixina (Oxoid, Inglaterra).

Experimentos de co-cultivos entre bacterias de ácido láctico (LAB) y patógenos

25 Se realizaron experimentos de co-cultivo con LAB probióticas, potenciales y cepas patógenas a 37°C en 20 ml (tubos Falcon) de jugo simulado del intestino delgado, canino con diferentes fuentes de carbón (azúcar, alimento para mascota) para favorecer
30 la actividad metabólica de los cultivos. Las LAB se inocularon a 10×10^8 cfu/ml, patógenos a 10×10^2

de prueba con "Friskies Vitality" con/sin achicoria + bacterias de *L. acidophilus* de NCC2628.

Se preparó *L. acidophilus* NCC2628 en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable con respecto a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probado. Las bacterias se mezclaron con 4 g de trehalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para mezclar las bacterias preparadas con una matriz de alimento para los animales. Se prepararon bacterias en tubos de plástico individuales ($5.0E+09$ cfu/día) y se adicionaron diariamente en una parte del alimento para asegurarse que las bacterias totales se comerán.

Se recolectó sangre de los perros después de cuatro semanas de administración de los prebióticos. La sangre se fraccionó a través de una vacuina Vacutainer® (Becton Dickinson, Mountain View, CA), se recuperaron las PBMC de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se estimularon células con diferentes mitógenos o ésteres de forbol que inducen una fuerte proliferación de células T (conavalina A (conA), fitohemaglutinina (PHA)), de células B (mitógeno de hierba (PWM)), y de todas las células (forbol-mixtato-acetato/ionomicina (PMA/Iono)). Se incubaron 10^5 células por cavidad con mitógenos o los ésteres de forbol (las dosis respectivas se indican en la Figura 1) en un volumen final de 200 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 complementado con suero de berrero vegetal al 10% y antibióticos en placas de cultivo de fondo plano de 96 cavidades (Nunc).

Se administraron células en atmósfera de CO₂ al 5% humidificada a 37°C durante 48 horas. Las células se marcaron por impulsos con 1 µCi de [³H]timidina (Amercham Pharmacia Biotech, Suiza) durante 18 horas adicionales. Las células luego se recolectaron en filtros de nitrocelulosa (Parckard TopCount; Suiza) y la [³H] unida se midió con conteo por escintilación (TopCount, Packard, Suiza). Se calculó la proliferación celular como la media (cuentas por minuto (c.p.m.)) (±SD) de los triplicados.

Resultados:

Figura 1: Hubo un incremento claro en la proliferación celular en respuesta a todos los mitógenos en el grupo de los perros alimentados con *L. acidophilus* NCC2628 en comparación con el grupo de control. Este incremento fue significativo en cultivos estimulados con los ésteres de forbol PMA + ionomicina. Estos datos muestran que las células linfocitos de los perros alimentados con probióticos son más reactivas en la activación *in vitro* y sugiere que el sistema inmunitario de los perros alimentados con probióticos se ha estimulado.

Ejemplo 10: Modulación *in vitro* de funciones inmunitarias por cepas de lactobacilus aisladas de mascotas.

Un examen *in vitro* de las diferentes cepas de lactobacilus aisladas de mascotas, descritas anteriormente, se ajustó para determinar su potencial de modulación inmunitaria. Para este fin. se midió su capacidad para inducir las citocinas pro-

inflamatorias (IL-12, IFN γ) y/o citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) (Anand A.C., Adya C.M. 1999, *Trop. gastroenterol.*; 20(3):97-106; Spelberg B., Edwards J.E. Jr. 2001, *Clin. Infect. Dis.*; 33(1):76-102). Esto tiende en las cepas candidatas potenciales de selección para funciones inmunitarias anti-patógenicas o anti-cáncer, fuertes así como funciones antagonísticas contra patologías intestinales canicas tal como alergia e inflamación (enfermedades inflamatorias en el intestino). Se establecieron cultivos adicionales con el medio solo (control negativo), con la cepa SF68 de *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415, Cerbios-Pharma, Suiza) y con un aislado de lactobacilo humano ST11 (NCC2461, CNCM I-2116) (control positivo).

Método:

Perfiles de citosina inducidos por diferentes cepas probióticas en leucocitos caninos:

La sangre de perros adultos normales se trató 5 minutos a temperatura ambiente con amortiguador de lisis ACK (150 mM de NH $_4$ Cl, 1 mM de KH $_2$ PO $_4$ y 0.1 mM de Na $_2$ EDTA en H $_2$ O, pH = 7.4). Los leucocitos se lavaron dos veces con el medio RPMI (sin antibióticos y se sembraron a 2.10 ^{6} células/ml en placas de cultivo de tejido de 24 cavidades. Se adicionó 1 ml de una suspensión bacteriana (descrita posteriormente) que contiene 10 ^{6} CFU a cada cavidad.

Para el tratamiento de control, se adicionó al medio solo a los leucocitos. Las muestras se incubaron 18 horas a 37°C y CO $_2$ al 5%. Subsecuentemente, se recolectaron los leucocitos, se

completo como el alimento "A" para mascotas, pero está complementado con una mezcla en polvo de los microorganismos probióticos seleccionados, alimentados de un sobrecito. La mezcla comprende cantidades substancialmente iguales de *L. acidophilus* NCC2628 y *Bifidobacterium sp.* NCC2657. Se rocía sobre el alimento en cada comida que se sirve, la dosis suministrada que es de aproximadamente 10E8 cfu/día.

El alimento "C" para mascotas es un alimento seco para mascotas, nutricionalmente completo que es substancialmente idéntico al alimento "A" para mascotas, pero que contiene 1.2% en peso de un sobrenadante seco de un cultivo de *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415).

Se usan 30 perros en el estudio. Los perros se pre-alimentan durante 8 semanas usando alimento "A" para mascotas. Los perros luego se dividen en 3 grupos de 10 perros cada uno, designados grupos A, B y C y se alimentan con las dietas correspondientemente nombradas durante 8 semanas.

Los perros tienen acceso libre a agua y se alimentan una vez al día. La prevalencia de caspa en el pelaje se determina por un panel de valoración de 30 miembros al comienzo y luego de 7 semanas.

Los perros se peinan antes de la evaluación por el panel y los miembros del panel no comparan las notas durante la evaluación.

En esta evaluación, los perros se presentan a cada uno de los panelistas individuales en 20 diferentes parejas. Se pregunta a los panelistas que

indiquen en sus hojas de registro qué perro del par presentado exhibe (1) menos caspa, (2) mayor brillo de pelaje y (3) menor olor de pelaje.

La condición completa de pelaje de todos los perros es visual y táctilmente buena como se puede esperar de perros saludables, normales. Sin embargo, los perros que se alimentan con la dieta "C" se encuentran que tienen menos caspa que aquellos alimentados con la dieta "A" de control. Estos alimentados en la dieta "D" tienen un pelaje notablemente más brillante y exhiben notablemente menos olor de pelaje que los de "A". Estas características se encuentran que no difieren significativamente de forma estadística cuando se comparan con los perros en el grupo B.

Ejemplo 12:

Se elabora una mezcla de alimentación de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 23% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 15% en peso de carne y harina, sales, vitaminas y minerales que constituyen el resto.

La mezcla de alimentación se alimenta en un pre-acondicionador y se humecta. Esta mezcla se adiciona a un polvo que contiene una mezcla de las siguientes cepas de lactobacilos: *Lactobacillus* *hamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus* *acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) y *Enterococcus* *faecium* SF68 (NCIMB 10415). El polvo se dispersa de una manera substancialmente a todo lo largo de la mezcla. Esta mezcla de alimentación humectada luego se alimenta en el extrusor-hornillo y se gelatiniza.

la matriz gelatinizada que deja el extrusor se fuerza a través de una boquilla y se extruye. El producto extruido se corta en piezas adecuadas para alimentar los perros, se seca aproximadamente a 110°C durante aproximadamente 20 minutos, y se enfría para formar gránulos. Las piezas extruidas se verifican para la actividad de bacterias de las cepas adicionadas. No se detecta nada.

Ejemplo 13:

10 Se usan en el estudio 24 perros. Se incluyen perros jóvenes y viejos, estos últimos que son de 8 a 12 años de edad. Los perros viejos seleccionados, exhiben signos externos de inflamación de articulaciones en proporción con sus edades y
15 parecen experimentar alguna dificultad en el movimiento a veces. Ciertos movimientos parecen ser dolorosos. Estos síntomas frecuentemente se observan en perros viejos y se cree que están relacionados a la condición artrítica.

20 Se usan tres alimentos secos para mascotas en el estudio. Designados A, B y C. El alimento A es un alimento seco para mascotas nutricionalmente completo (ALPO de Beffy Dinner). Esto es el alimento de control.

25 Los 24 miembros de los seleccionados se prealimentan durante 8 semanas usando alimento A para mascotas. Los perros luego se dividen en 3 grupos, A, B y C cada uno que tiene 8 perros y la misma proporción de jóvenes y viejos dentro del
30 mismo. Cada grupo luego se alimenta con las siguientes dietas respectivas durante 8 semanas.

Grupo	Alimento para mascotas
A	A
B	B
C	C

El alimento B para mascotas es un alimento seco para mascotas nutricionalmente completo que substancialmente es idéntico al alimento "A" para mascotas pero que contiene un revestimiento que constituye el 2% de su peso, el revestimiento comprende los microorganismos de *Enterococcus faecium* 5 568 (NCIMB 10415). La cantidad de alimento alimentado diariamente a cada perro se calcula de acuerdo a la masa individual corporal, de modo que la 10 dosis de $1.0E+09$ cfu/día.

La dieta C comprende productos molidos, extruidos producidos en el Ejemplo 12 anterior. La cantidad de alimento alimentado diariamente a cada perro se calcula de acuerdo a la masa corporal 15 individual, de modo que la dosis de microorganismos es de $1.0E+11$ cfu/día.

Los perros tienen acceso libre al agua y se alimentan una vez al día. Se une un medidor de actividad al collar de cada perro y las mediciones se 20 toman diariamente. Los perros también se evalúan visualmente para la actividad por personal de la perrera.

La condición de todos los perros es visual y táctilmente buena como se puede esperar de perros 25 saludables, normales. Sin embargo, los perros en los grupos que reciben las dietas B y C de alimento para mascotas son notablemente más activas que sus

contrapartes en la dieta A. En las lecturas del medidor soportan esas observaciones.

Adicionalmente, los perros más viejos en los grupos B y C, después de que se alimentan de las dietas B y C durante el periodo de prueba, parecen exhibir pocos signos externos de inflamación de articulaciones locales. Adicionalmente, los perros parecen experimentar menos niveles de dolor en el movimiento físico y se mueven más libremente que antes. Se puede concluir que las dietas B y C parecen proporcionar alivio con respecto a ciertas señales de envejecimiento y mejorar la motilidad de las mascotas más antiguas.

Ejemplo 14: Alimento seco para gatos

Se elabora una mezcla de alimento de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 6% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 23% en peso de harina de pollo, sales, vitaminas y minerales que substituyen el resto.

La mezcla de alimentación se alimenta en el pre-acondicionador y se humecta. La alimentación humectada luego se alimenta en un extrusor-hornillo y se gelatiniza. La matriz gelatinizada que deja el extrusor se fuerza a través de una boquilla y se extruye. El producto extruido se corta en piezas adecuadas para alimentar a los gatos, se seca a aproximadamente 110°C durante aproximadamente 20 minutos, y se enfría para formar gránulos: en este punto, se proporciona un polvo liofilizado de una o más cepas de las siguientes especies de lactobacilos, para la aplicación a los gránulo: *Lactobacillus*

Lactobacillus rhamnosus NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453), o *Enterococcus faecalis* NCLBM-10415). De esta manera, se proporciona suficiente polvo de modo que la cantidad de consumo dietético correspondiente para el gato es de aproximadamente $1.0E+07-1.0E+9$ cfu/día. Algo del polvo se mezcla en una primera masa de gránulos y se empolsa. Una segunda cantidad del polvo se mide y se mezcla con un portador lípido que luego se rocía en una segunda masa de gránulos. Los gránulos se empolsan después de que el revestimiento se ha secado de manera suficiente a $50-60^{\circ}\text{C}$ durante algunos minutos.

Ejemplo 15: Alimento en bote para mascotas y complemento

Se prepara una mezcla de 73% de carne de ave de corral, pulmones de cerdo e hígado de res (molido), 16% de harina de trigo, 2% de tintes, vitaminas y sales inorgánicas. Esta mezcla se emulsiona a 12°C y se extruye en la forma de un budín que luego se cuece a una temperatura de 90°C . Se enfía a 30°C y se corta en trozos. Se mezclan 45% de estos trozos con 55% de una salsa preparada de 98% de agua, 1% de tinte y 1% de goma de guar. Se rellenan de botes de hojalata y se utilizan a 125°C durante 40 minutos. Como un complemento prebiótico que se va a mezclar con el alimento para mascotas antes de servir, el empaque adicional en la forma de sobrecitos con cepas de las siguientes especies de lactobacilos se proporcionan *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus rhamnosus NCC2583 (CNCM I-2449),
Lactobacillus reuteri NCC2613 (CNCM I-2451),
Lactobacillus reuteri NCC2613 (CNCM I-2452),
Lactobacillus acidophilus NCC2628 (CNCM I-2453).

5 7. Uso de una cepa aislada de bacterias de
ácido láctico y/o su sobrenadante de cultivo y/o un
metabolito de la misma, que tiene alta actividad
probiótica en mascotas, para la preparación de una
composición propuesta para el mantenimiento o mejora
10 de la salud de las mascotas.

8. El uso según la reivindicación 7, en
donde la cepa tiene capacidad para crecer produciendo
al menos $1.0E+06$ cfu/ml en la presencia de hasta 2.0%
de sales biliares o para producir al menos $1.0E+06$
15 cfu/ml después de aproximadamente 2 horas a un
intervalo de pH de 3.4 a aproximadamente 4.2.

9. El uso según la reivindicación 7 u 8, en
donde la bacteria de ácido láctico se selecciona del
género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o *Enterococcus*.

20 10. El uso según cualquiera de las
reivindicaciones 7 a 9, en el cual la cepa se
selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus*
reuteri, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*
animalis, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus*
25 *johansonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*
paracasei, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus*
fermentum, *Bifidobacterium* sp, *Enterococcus faecium* y
Enterococcus sp.

11. El uso según cualquiera de las
30 reivindicaciones 7 a 10, en el cual la cepa es
Lactobacillus reuteri NCC2581 (CNCM I-2448)

86

Lactobacillus reuteri NCC2592 (CNCM I-2450),
Lactobacillus rhamnosus NCC2583 (CNCM I-2449),
Lactobacillus reuteri NCC2603 (CNCM I-2451),
Lactobacillus reuteri NCC2613 (CNCM I-2452),
5 *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453),
Enterococcus faecium SF68 (NCIMB 10415).

12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde la cepa seca está contenida en la composición en una cantidad de
10 aproximadamente $1.0E+04$ cfu/animal y día a aproximadamente $1.0E+12$ cfu/animal y día.

13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para la preparación de una composición propuesta para el tratamiento y/o
15 profilaxis de trastornos asociados con la colonización del tracto gastrointestinal de mascotas por microorganismos patógenos.

14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para la preparación de una
20 composición propuesta para regular el sistema inmunitario de mascotas.

15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para la preparación de una composición propuesta para mantener o mejorar la
25 salud de la piel y/o sistema de pelaje de mascotas.

16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para la preparación de una composición propuesta para la mejora o reducción de los efectos de envejecimiento en mascotas.

30 17. Composición de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de bacterias

de ácido láctico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociado con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

5 18. Composición de alimento para mascotas propuesta para la salud del tracto gastrointestinal de mascotas, que contiene al menos una cepa aislada de bacterias de ácido láctico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un
10 sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociado con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

15 19. Composición de alimento para mascotas propuesta para la salud de la piel y/o pelaje de mascotas, que contiene al menos una cepa aislada de bacterias de ácido láctico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociado con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

20 20. Composición de alimento para mascotas propuesta para regular el sistema inmunitario de mascotas, que contiene al menos una cepa aislada de bacterias de ácido láctico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociado
25 con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

21. Composición de alimento para mascotas propuesto para mejorar o reducir los efectos de envejecimiento en mascotas, que contiene al menos una
30 cepa aislada de bacterias de ácido láctico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un

88

sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma, asociado con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

22. Una composición según una de las reivindicaciones 17 a 21, en donde la cepa aislada está en una cantidad de aproximadamente $1.0E+04$ cfu/animal y se dice que es de aproximadamente $1.0E+12$ cfu/animal y día.

23. Una composición según una de las reivindicaciones 17 a 22, que contiene adicionalmente un prebiótico.

24. Una composición según una de las reivindicaciones 17 a 23, que está en la forma de i) un alimento para mascotas en una forma de polvo, seca o húmeda, molida o estable en anaquel; ii) en la forma de un adjunto dietético o un completo.

25. Un adjunto dietético o un complemento según la reivindicación 24, que se proporciona junto con un alimento para mascotas en un empaque adicional tal como un sobrecito.

26. Un método para mantener o mejorar la salud del tracto gastrointestinal de una mascota, que comprende alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un sobrenadante de su cultivo y/o un metabolito de la misma.

27. Un método para mantener o mejorar la salud de la piel y/o del sistema de pelaje de una mascota, que comprende alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al

