



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0417826-2 B1



(22) Data do Depósito: 17/12/2004

(45) Data de Concessão: 03/11/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UMA CEPA BIFIDOBACTÉRIA PSEUDOLONGUM PROBIÓTICA CANINA

(51) Int.Cl.: A61K 45/00.

(30) Prioridade Unionista: 19/12/2003 US 60/531,099.

(73) Titular(es): ALIMENTARY HEALTH LTD.; MARS, INCORPORATED.

(72) Inventor(es): THOMAS WILLIAM-MAXWELL BOILEAU; MICHAEL ANTHONY CEDDIA; JOHN KEVIN COLLINS; GARY MITCHELL DAVENPORT; BARRY PIUS KIELY; LIAM DIARMUID O'MAHONY; GREGORY DEAN SUNVOLD; MARK ALAN TETRICK; ROBERT JASON VICKERS.

(86) Pedido PCT: PCT US2004043072 de 17/12/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/062879 de 14/07/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/06/2006

(57) Resumo: "BIFIDOBACTÉRIA PSEUDOLONGUM PROBIÓTICA CANINA". De acordo com a presente invenção, é apresentada uma cepa de bactérias formadoras de ácido láctico da espécie *Bifidobacteria pseudolongum*, obtível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais. São apresentados, também, métodos de uso e composições compreendendo as *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção.

**"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UMA CEPA BIFIDOBACTÉRIA
PSEUDOLONGUM PROBIÓTICA CANINA"**

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de microorganismos probióticos, mais especificamente a bactérias formadoras de ácido láctico probióticas caninas, bem como métodos para o uso das mesmas.

10

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os mecanismos de defesa para proteção do trato gastrointestinal (GI) de mamíferos contra a colonização por bactérias patogênicas são altamente complexos. O trato GI da maioria dos mamíferos é colonizado por microflora nativa e por microorganismos patogênicos invasivos. Em um indivíduo saudável, essas microfloras concorrentes encontram-se em um estado de equilíbrio. A modificação do equilíbrio da microflora intestinal pode causar ou evitar diversos transtornos gastrointestinais, tanto em seres humanos como em outras espécies de mamíferos, como animais de estimação, inclusive gatos, cães e coelhos. O bem-estar de animais de estimação está estreitamente relacionado à alimentação e à saúde gastrointestinal, e a manutenção do equilíbrio da microflora intestinal nesses animais pode resultar em animais de estimação mais saudáveis.

O número e a composição da microflora intestinal tendem a ser estáveis, embora idade e dieta possam modificá-los. A acidez gástrica, a biliar, o peristaltismo intestinal e a imunidade local são fatores considerados importantes na regulação da flora bacteriana presente no intestino delgado

2

de seres humanos e diversos outros mamíferos. Freqüentemente, os transtornos gastrointestinais em animais de estimação, inclusive aqueles encontrados em cães e gatos, estão ligados à proliferação bacteriana e à produção de enterotoxinas por bactérias patogênicas. Esses fatores perturbam o equilíbrio da microflora intestinal e podem promover inflamação e respostas imunológicas aberrantes.

Ao longo dos últimos anos, pesquisas começaram a revelar algumas valiosas cepas de bactérias, e seu uso potencial como agentes probióticos. Os probióticos são considerados preparações de bactérias, sejam estas viáveis ou mortas, tendo constituintes como proteínas ou carboidratos, ou frações purificadas de fermentos bacterianos, que promovem a saúde dos mamíferos ao preservar e promover a microflora natural no trato GI, e ao reforçar os controles normais contra respostas imunológicas aberrantes. Acredita-se que as bactérias probióticas sejam mais eficazes quando derivadas da espécie à qual pertence o indivíduo que se pretende tratar, ou de espécies com parentesco próximo a esta. Portanto, existe uma necessidade por cepas probióticas derivadas de animais de estimação, para serem utilizadas para animais de estimação, que sejam diferentes daquelas derivadas de seres humanos.

O documento WO 01/90311 apresenta microorganismos probióticos isolados a partir de amostras fecais obtidas a partir de gatos e cães, as quais têm atividade probiótica. No entanto, essas bactérias foram obtidas a partir de amostras fecais, e podem não ser parte da microflora

intestinal natural presente na porção superior do trato gastrointestinal.

Conseqüentemente, existe uma necessidade pela obtenção de cepas de bactérias, mediante isolamento a partir da microflora intestinal natural presente na porção superior do trato gastrointestinal, que sejam particularmente adaptadas para animais de estimação, e que tenham sido selecionadas por suas propriedades probióticas e capacidade para sobreviver o processamento, incorporando essas cepas a composições que são adequadas a seu uso.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, é apresentada uma cepa de bactérias formadoras de ácido láctico da espécie *Bifidobacteria pseudolongum*, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais.

Em uma modalidade preferencial, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é uma *Bifidobacteria pseudolongum* tendo uma seqüência de DNA 16s-23s na região do espaçador com ao menos 93% de homologia em relação a SEQ. ID N° 1.

Em uma outra modalidade preferencial, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é *Bifidobacteria pseudolongum* AHC7 (NCIMB 41199).

Além disso, a presente invenção refere-se ao uso das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum*, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, para a manutenção e melhoria da saúde do

animal de estimação, bem como composições compreendendo as ditas bactérias formadoras de ácido láctico.

Estes e outros aspectos, bem como características e vantagens da presente invenção, ficarão aparentes aos versados na técnica a partir da leitura da presente descrição.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 demonstra a inibição da proliferação *in vitro* de *Salmonella typhimurium* pelas bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, de acordo com a metodologia apresentada no Exemplo 2.

A Figura 2 demonstra a inibição da proliferação *in vitro* de *Listeria monocytogenes* pelas bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, de acordo com a metodologia apresentada no Exemplo 2.

A Figura 3 demonstra a inibição da proliferação *in vitro* de *Listeria innocua* pelas bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, de acordo com a metodologia apresentada no Exemplo 2.

A Figura 4 demonstra a inibição da proliferação *in vitro* de *Escherichia coli* 0157H45 pelas bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, de acordo com a metodologia apresentada no Exemplo 2.

A Figura 5 demonstra a estabilidade na presença de ácido *in vitro* das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, de acordo com a metodologia apresentada no Exemplo 3.

A Figura 6 demonstra as características de proliferação das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, na presença de 0,5%, 1% e 5% de sais biliares de porco.

5 A Figura 7 demonstra a capacidade *in vitro* das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção para aderir às células epiteliais HT-29 do intestino.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

SEQÜÊNCIAS

10 SEQ. ID Nº 1 - seqüência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s-23s de *Bifidobacteria pseudolongum* AHC7 (NCIMB 41199).

SEQ. ID Nº 2 - seqüências iniciadoras para análise de seqüência 16s-23s de DNA.

NÚMEROS DE DEPÓSITO DAS BACTÉRIAS

A Tabela abaixo indica as cepas de *Bifidobacteria pseudolongum* que são exemplos da presente invenção. As cepas bacterianas estão depositadas junto ao "National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria" (NCIMB), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de depósito	Seqüência 16s-23s
<i>Bifidobacteria pseudolongum</i> AHC7	NCIMB 41199	SEQ. ID Nº 1

Todos os pesos, medidas e concentrações na presente invenção são medidos a 25 °C na composição em sua totalidade, exceto onde indicado em contrário.

P10417826

19
2

Exceto onde indicado em contrário, todas as porcentagens das composições aqui mencionadas são porcentagens em peso, e todas as razões são razões em peso.

Exceto onde indicado em contrário, todos os pesos
5 moleculares são pesos moleculares médios ponderais.

Exceto onde indicado em contrário, o conteúdo de todas as fontes de literatura mencionadas neste texto estão aqui incorporadas em sua totalidade, por referência.

Exceto onde são apresentados exemplos específicos
10 de valores reais medidos, os valores numéricos aqui mencionados devem ser considerados como sendo qualificados pela expressão "cerca de".

No âmbito da descrição apresentada a seguir, a abreviação UFC ("unidade formadora de colônia") designa o
15 número de células bacterianas revelado por contagens microbiológicas em placas de ágar, como é de entendimento comum na técnica.

Para uso na presente invenção, o termo "mutantes dessas cepas" inclui cepas bacterianas derivadas, tendo ao
20 menos 93% de homologia, de preferência ao menos 96% de homologia e, com mais preferência, 98% de homologia com a sequência de polinucleotídeo do espaçador intergênico 16s-23s de uma cepa mencionada, porém compreendendo mutações de DNA em outras sequências de DNA no genoma bacteriano.

25 Para uso na presente invenção, o termo "mutações de DNA" inclui mutações naturais ou induzidas compreendendo ao menos alterações de base única, inclusive deleções, inserções, transversões e outras modificações de DNA

P10417828



conhecidas pelos versados na técnica, inclusive modificação genética introduzida em um nucleotídeo ou sequência de aminoácidos original (pai), mantendo-se ao menos 50% de homologia com a sequência-pai. De preferência, a sequência
5 compreendendo a mutação ou mutações de DNA tem ao menos 60%, com mais preferência ao menos 75% e, com mais preferência ainda, 85% de homologia com a sequência-pai. Para uso na presente invenção, a sequência de "homologia" pode ser determinada mediante o uso de técnicas-padrão conhecidas
10 pelos versados na técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada mediante o uso do algoritmo de homologia "BLAST" disponível publicamente online, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Para uso na presente invenção, o termo "modificação genética" inclui a introdução de sequências de DNA exógenas e/ou endógenas no genoma de um organismo, seja por meio de inserção no genoma do dito organismo, seja por meio de vetores, inclusive DNA de plasmídios ou bacteriófagos, conforme é de conhecimento do versado na técnica, sendo que a
15 dita sequência de DNA tem um comprimento de ao menos duas bases de ácido desoxirribonucléico.

Para uso na presente invenção, o termo "animal de estimação" significa um animal doméstico. De preferência, "animal de estimação" significa animais domésticos como
25 cães, gatos, coelhos, furões, cavalos, vacas ou similares. Com mais preferência, "animal de estimação" significa um cão ou gato doméstico.

P10417828

Cepas de Bifidobacteria pseudolongum

O primeiro aspecto da presente invenção compreende uma cepa de *Bifidobacteria pseudolongum*, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais. Os probióticos consistem em microorganismos viáveis ou mortos, composições processadas de microorganismos, seus constituintes como proteínas ou carboidratos, ou frações purificadas de fermentos bacterianos, que afetam de modo benéfico um hospedeiro. O uso geral de bactérias probióticas se dá sob a forma de células viáveis. No entanto, isso pode ser estendido a células não-viáveis, como culturas mortas ou composições contendo fatores benéficos expressos pelas bactérias probióticas. Isso pode incluir microorganismos mortos por meios térmicos, por exposição a um pH alterado, ou submetidos a pressão. Para o propósito da presente invenção, o termo "probióticos" destina-se a incluir, ainda, os metabólitos gerados pelos microorganismos da presente invenção durante a fermentação, caso estes não sejam separadamente indicados. Esses metabólitos podem ser liberado no meio de fermentação, ou podem ser armazenados no interior do microorganismo. Para uso na presente invenção, o termo "probiótico" inclui, também, bactérias, homogenatos bacterianos, proteínas bacterianas, extratos bacterianos, sobrenadantes de fermento bacteriano e misturas desses itens, os quais exercem funções benéficas ao animal hospedeiro, quando administrados em uma dose terapêutica.

Descobriu-se que as cepas de *Bifidobacteria pseudolongum*, obteníveis mediante isolamento direto a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos, são aderentes ao trato GI em seguida à alimentação com células bacterianas viáveis, e apresentam, também, uma ação imunomodulatória significativa quando fornecidas aos animais sob suas formas viáveis, não-viáveis ou fracionadas. Sem se ater à teoria, acredita-se que as *Bifidobacteria pseudolongum* obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado mantenham estreita associação com os tecidos mucosos intestinais. Sem se ater à teoria, acredita-se que isso resulte na geração, pelas *Bifidobacteria pseudolongum* probióticas da presente invenção, de respostas alternativas no hospedeiro, as quais resultam em sua ação probiótica. Descobriu-se que as bactérias probióticas obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado podem modular o sistema imune do hospedeiro por meio de interação direta com o epitélio mucoso e com as células imunes do hospedeiro. Essa imunomodulação, em conjunto com o mecanismo tradicional de ação associado às bactérias probióticas, isto é, a prevenção da aderência de patógenos aos intestinos, mediante oclusão e competição por nutrientes, faz das *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção organismos probióticos altamente eficazes.

As *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, apresentam

63

atividade microbicida *in vitro* contra diversas cepas/espécies bacterianas patogênicas, conforme medido por meio das zonas de inibição ou pelos testes de inibição de proliferação bacteriana conhecidos pelos versados na técnica. Sem se ater à teoria, acredita-se que essa atividade microbicida *in vitro* indique o potencial de atividade probiótica *in vivo* em animais, de preferência animais de estimação como cães e gatos. As bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção apresentam, de preferência, atividade microbicida *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* ou *Eschericia coli*, com mais preferência uma combinação dessas cepas e, com mais preferência ainda, todas essas cepas.

Sem se ater à teoria, acredita-se que a atividade microbicida das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção possa ser o resultado de várias ações diferentes realizadas pelas bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção. Foi sugerido anteriormente, na técnica, que diversas cepas de bactérias isoladas a partir de amostras fecais exercem seu efeito probiótico no trato gastrointestinal, após seu consumo oral ao impedir, mediante oclusão, a fixação de organismos patogênicos à mucosa intestinal. Isto exige o consumo oral de células bacterianas "vivas" ou viáveis, para que uma colônia de bactérias se estabeleça nos intestinos. No entanto, acredita-se que as *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a

partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, embora exerçam algum efeito probiótico mediante oclusão se fornecidos sob uma forma viável, possam oferecer um efeito probiótico substancial em suas formas tanto viáveis como
5 não-viáveis devido à produção, durante a fermentação *in vitro*, de uma ou mais substâncias que ou matam os microorganismos patogênicos ou inibem sua proliferação, e/ou que alteram a imunocompetência do animal hospedeiro. Essa forma de atividade probiótica é desejável, já que as
10 bactérias da presente invenção podem ser fornecidas sob a forma de culturas viáveis ou não-viáveis, ou como produtos de fermentação purificados e, ainda assim, proporcionar um efeito terapêutico benéfico ao animal hospedeiro.

De preferência, as bactérias *Bifidobacteria*
15 *globosum* da presente invenção são capazes de manter sua viabilidade após trânsito pelo trato GI. Isso é desejável, para que as culturas de bactérias vivas possam ser administradas por via oral, e para que ocorra a colonização dos após o trânsito através do esôfago e do estômago. A
20 colonização dos intestinos pelas bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção é desejável para proporcionar ao hospedeiro benefícios probióticos de longo prazo. A dosagem oral de células não-viáveis ou isolados purificados das mesmas induz benefícios temporários mas,
25 como as bactérias não são viáveis, não são capazes de se proliferar e proporcionar, de maneira contínua, um efeito probiótico *in situ*. Como resultado, isto pode exigir que o hospedeiro receba doses regularmente, de modo a manter os

benefícios de saúde. Em contraste, as células viáveis capazes de sobreviver ao trânsito gástrico em sua forma viável e, subsequente, colonizar os intestinos mediante adesão à mucosa intestinal e proliferação sobre a mesma, são capazes de proporcionar de maneira contínua os efeitos probióticos *in situ*.

Portanto, é preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção mantenham sua viabilidade após a suspensão em um meio com pH 2,5 durante 1 hora. Para uso na presente invenção, o termo "manter a viabilidade" significa que ao menos 25% das bactérias inicialmente em suspensão no meio de teste são viáveis, usando-se o método de contagem em placas conhecido pelos versados na técnica. De preferência, o termo "manter a viabilidade" significa que ao menos 50% das bactérias inicialmente em suspensão são viáveis. É desejável que as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção mantenham sua viabilidade após a exposição a um baixo pH, já que isso imita a exposição aos sucos gástricos no estômago e no intestino superior *in vivo*, após a consumo oral por animais.

Além disso, é preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção apresentem uma proliferação de ao menos 33% quando na presença de ao menos 0,5% de sais biliares de porco. A proliferação, para uso na presente invenção, é descrita com mais detalhes no Exemplo 3. Com mais preferência, as bactérias da presente invenção apresentam uma proliferação de ao menos 33% quando

na presença de ao menos 1% de sais biliares de porco. Sem se ater à teoria, acredita-se que as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção que sejam capazes de manter a proliferação na presença de ao menos 0,5% de sais biliares de porco, sejam capazes de sobreviver às condições presentes nos intestinos. Acredita-se que isso seja um resultado da adição de bÍlis de porco ao meio de cultura, reproduzindo as condições do intestino.

Além disso, é preferencial que as bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção apresentem adesão significativa a células epiteliais de intestino, *in vitro*. Para uso na presente invenção, o termo "adesão significativa" significa que ao menos 4% do número total de bactérias formadoras de ácido láctico co-incubadas com as células epiteliais *in vitro* aderem às ditas células. Com mais preferência, ao menos 6% das células bacterianas co-incubadas aderem às células *in vitro*. Sem se ater à teoria, acredita-se que a aderência a células epiteliais de intestino *in vitro* seja uma indicação da capacidade das bactérias formadoras de ácido láctico para colonizar o trato GI de um animal *in vivo*.

A seqüência de polinucleotídeo intergênico 16s-23s é conhecida pelos versados na técnica como a seqüência de DNA, no genoma bacteriano, que pode ser usada para identificar diferentes espécies e cepas de bactérias. Essa seqüência de polinucleotídeo intergênico pode ser determinada pelo método detalhado abaixo, no exemplo 4.

Em uma modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de *Bifidobacteria pseudolongum* tem uma sequência de polinucleotídeo intergênico 16s-23s que apresenta ao menos 93%, de preferência ao menos 96% e, com mais preferência, ao menos 99% de homologia com a sequência de polinucleotídeo de acordo com a SEQ. ID N° 1. Com mais preferência, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção tem uma sequência de polinucleotídeo 16s-23s de acordo com a SEQ. ID N° 1. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção é a cepa *Bifidobacteria pseudolongum* NCIMB 41199 (AHC7), ou uma mutação da mesma.

A cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Bifidobacteria pseudolongum*, obténível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, pode ser usado para proporcionar benefícios probióticos em seguida ao consumo via oral em animais, de preferência animais de estimação ou seres humanos. Esses benefícios probióticos geralmente mantêm ou melhoram a saúde geral do animal. Os elementos não-limitadores de saúde e fisiologia animal que são beneficiados, seja terapeuticamente pelo alívio de sintomas, ou profilaticamente pela prevenção de doenças, incluem transtornos inflamatórios, imunodeficiência, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, câncer (particularmente aqueles dos sistemas gastrointestinal e imune), doença diarréica, diarréia associada ao uso de

antibióticos, apendicite, transtornos autoimunes, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, amiloidose, artrite reumatóide, artrite, mobilidade das articulações, diabetes mellitus, resistência à insulina, infecções bacterianas, infecções

5 virais, infecções fúngicas, doença periodontal, doença urogenital, trauma associado a cirurgia, doença metastática induzida por cirurgia, sepse, perda de peso, ganho de peso, acúmulo excessivo de tecido adiposo, anorexia, controle de febre, caquexia, cura de ferimentos, úlceras, infecção da

10 barreira intestinal, alergia, asma, transtornos respiratórios, transtornos circulatórios, doença cardíaca coronariana, anemia, transtornos do sistema de coagulação sangüínea, doença renal, transtornos do sistema nervoso central, doença hepática, isquemia, transtornos nutricionais,

15 osteoporose, transtornos endócrinos e transtornos da epiderme. São preferenciais o tratamento do trato gastrointestinal, inclusive tratamento ou prevenção de diarreia; regulação do sistema imune, de preferência tratamento ou prevenção de doença autoimune e inflamação;

20 manutenção ou melhoria da saúde da pele e/ou da pelagem, de preferência tratamento ou prevenção de doença atópica da pele; melhoria ou redução dos efeitos do envelhecimento, inclusive consciência mental e níveis de atividade; e prevenção da perda de peso durante e após uma infecção.

25 O tratamento dos transtornos apresentados acima pode ser medido mediante o uso de técnicas conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, transtornos inflamatórios, inclusive doença autoimune e inflamação, podem ser

detectados e monitorados utilizando-se testes de função imune *in vivo*, como blastogênese de linfócitos, atividade de células "Natural Killer", resposta de anticorpos a vacinas, hipersensibilidade de tipo retardado e combinações desses
5 itens. Esses métodos são brevemente descritos na presente invenção, mas bem conhecidos pelos versados na técnica.

1. Blastogênese de linfócitos: Este ensaio mede a resposta proliferativa *in vitro* de linfócitos isolados a partir de sangue integral fresco obtido de animais
10 de teste e de controle para diversos mitogênicos, e é uma medida da função geral das células T e B. Em resumo, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, ou "peripheral blood mononucleocytes") são isolados a partir de sangue integral por meio de
15 métodos Ficoll-Hypaque de centrifugação por densidade, conhecidos pelos versados na técnica. As PBMCs isoladas são lavadas duas vezes em meio celular RPMI 1640 suplementado com HEPES, L-glutamina e penicilina/estreptomicina. As células lavadas são
20 ressuspensas em RPMI 1640 e contadas, e a densidade de células é adequadamente ajustada. As 2×10^5 células são expostas a uma gama de concentrações (de $0,1 \mu\text{g/mL}$ a $100 \mu\text{g/mL}$) de diversos mitogênicos, exemplos dos quais incluem mitogênio de caruru-de-cacho (Gibco),
25 fitoemaglutinina (Gibco) e concanavalina A (Sigma), em triplicata, durante 72 horas a 37°C e 5% de CO_2 com 10% de soro fetal bovino (Sigma). A 54 horas, as células são pulsadas com $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -timidina e

coletadas, e as contagens de cintilação são lidas em um TopCount NXT a 72 horas.

2. Atividade de células "Natural Killer": Conforme descrito em US 6.310.090, este ensaio mede a atividade efetora *in vitro* de células "natural killer" (NK) isoladas a partir de sangue integral fresco de animais de teste e de controle. As células "natural killer" são um componente da função imune inata de um mamífero. Células de adenocarcinoma de tiróide canina foram usadas como células-alvo na avaliação da atividade citotóxica de células NK. Foi anteriormente demonstrado que essa linhagem de células é suscetível à morte por células NK caninas. As células-alvo foram cultivadas em um frasco T75 com 20 mL de meio mínimo essencial (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA.), suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Quando confluentes, as células-alvo foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes e ressuspensas a 5×10^5 células/mL em meio completo (RPMI-1640 + 10% FCS+100 U/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomicina). Triplicatas de alíquotas de 100 µL das células-alvo foram pipetadas em placas com 96 cavidades de fundo em U (Costar, Cambridge, Massachussets, EUA) e incubadas durante 8 horas para permitir a aderência das células. Os linfócitos (células efetoras, 100 µL) isolados por meio de separação Ficoll-Hypaque (conforme descrito acima) foram, então, adicionados às células-alvo para se obter

71

uma razão entre células efetoras e células alvo (E:A) de 10:1. Após 10 horas de incubação a 37 °C, foram adicionados 20 µL de um substrato contendo 5 µg de brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT). A mistura foi incubada durante 4 horas a 37 °C, após os quais o MTT não-metabolizado foi removido por aspiração. Os cristais de formazan foram dissolvidos mediante a adição de 200 µL de etanol a 95%. A densidade óptica (DO) foi medida em 570 nm, utilizando-se um leitor de microplacas. A porcentagem de morte celular específica para célula NK foi calculada conforme exposto a seguir:

$$\text{Citotoxicidade específica (\%)} = 100 \times \{1 - [(DO \text{ de células-alvo e células efetoras} - DO \text{ de células efetoras}) / (DO \text{ de células-alvo})]\}$$

3. Resposta de anticorpos a vacinas: Os indivíduos de teste receberam um conjunto (até 5) de vacinas após ao menos 12 semanas de alimentação probiótica ou de controle. As vacinas podem ser uma mistura de vacinas novas e redundantes. Alguns exemplos não-limitadores de conjuntos de vacina que podem ser usado incluem misturas de vacinas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Alguns exemplos não-limitadores de vacinas adequadas ao uso na presente invenção incluem cinomose canina, adenovírus, coronavírus, parainfluenza, e parvovírus. A história de vacinação do indivíduo

determinará as vacinas a serem utilizadas. As quantidades, no sangue, de anticorpos específicos para as vacinas administradas são medidas durante 3 semanas, sendo comparadas a duração e a intensidade da resposta nos grupos com alimentação de controle e probiótica.

4. Hipersensibilidade de tipo retardado: Um método *in vivo* não-invasivo para avaliação do estado do sistema imune. Este teste compreende uma injeção intradérmica do mitogênio policlonal fitoemaglutinina (PHA) em combinação com eritrócitos de ovelha, uma vacina multivalente, histamina (100 μ L de fosfato de histamina a 0,0275 g/L, Greer, Lenoir, NC), ou PBS (100 μ L de solução salina tamponada com fosfato a 8,5 g/L, Sigma). A resposta imunológica ao antígeno é registrada como espessura da dobra de pele, usando calibres, em intervalos de tempo de 0, 24, 48 e 72 horas após a injeção. Um aumento na espessura da dobra de pele indica uma maior resposta de hipersensibilidade, que deve diminuir mediante o tratamento com as bactérias da presente invenção.

Métodos adicionais para a determinação do efeito das bactérias *Bifidobacteria* da presente invenção são descritos em US6.133.323 e US6.310.090.

Além disso, a melhoria quanto aos efeitos do envelhecimento pode ser determinada mediante o uso de absorptometria de dupla emissão de raios X ou tomografia computadorizada para medir a composição corporal, inclusive massa corporal gorda, massa corporal magra e conteúdo

mineral ósseo. De modo similar, esse método pode ser usado para determinar alterações de anatomia como perda de peso ou densidade óssea em indivíduos, após infecção.

As *Bifidobacteria* da presente invenção também podem
5 ser usadas em um método para redução dos níveis de estresse em animais de estimação. As concentrações sanguíneas de hormônios de estresse, inclusive epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol e proteína C-reativa, podem ser medidas para determinar os níveis de estresse e sua redução ou
10 manutenção. Esses hormônios são reconhecidos biomarcadores de estresse, e podem ser prontamente medidos mediante o uso de técnicas conhecidas pelos versados na técnica.

Além disso, a manutenção ou a melhoria da saúde da pele e/ou da pelagem de animais de estimação, inclusive
15 de doença atópica da pele, pode ser medida mediante o uso de avaliações de pele e pelagem conduzidas por dois indivíduos treinados. Exemplos de critérios examinados durante essas avaliações incluem:

- a) Índice de queda de pêlos: Um índice de queda de pêlos é
20 atribuído a cada indivíduo de teste mediante a coleta de pêlos produzidos durante uma sessão de escovação padronizada. Os pêlos são retidos e pesados, e os indivíduos de controle e de teste são comparados.
- b) Avaliações subjetivas de pele/pelagem: Examinadores
25 treinados avaliam subjetivamente as condições de pele e pelagem, mediante a determinação de queda de pêlos, caspa, brilho, uniformidade, maciez e densidade.

c) Avaliação funcional da pele: A função de barreira da pele pode ser avaliada mediante a esfregação da superfície da pele com uma gaze encharcada em acetona. Essa técnica perturba, de maneira eficaz, a função de barreira da pele ao remover da camada córnea camadas celulares individuais, juntamente com as frações de lipídio a estas associadas. A perturbação da barreira é quantificada por meio da medição do aumento na perda transepidérmica de água (PTEA) e do grau de vermelhidão do local ofendido, mediante o uso de métodos conhecidos pelos versados na técnica. As pontuações para vermelhidão (eritema) são obtidas mediante o uso do sistema de câmera e iluminação anteriormente descrito. Os registros de PTEA e as pontuações de vermelhidão são obtidos imediatamente antes e depois da perturbação, bem como nos pontos finais às cinco e às 24 horas, para avaliar as propriedades de proteção e cura da pele.

O tratamento ou prevenção de infecções gastrointestinais, inclusive diarreia, em animais de estimação pode ser medido utilizando-se um método de pontuação das fezes. A pontuação das fezes pode ser registrada diariamente, de acordo com as seguintes diretrizes, sendo os grupos de controle e de teste comparados antes e depois da alimentação com as bactérias, de acordo com a presente invenção.

Pontuação: 5 Extremamente seca

Estas fezes são duras e não aderem a superfícies. Estas fezes rolam quando empurradas. Não são produzidas

indentações quando estas fezes são apanhadas. Estas fezes são freqüentemente defecadas em grupos de unidades individuais, em vez de uma unidade completa. Estas fezes mantêm seu formato original após a coleta.

5 Pontuação: 4 Firme (fezes ideais)

Estas fezes são firmes, bem formadas e cilíndricas. Estas fezes não se rompem facilmente quando apanhadas. Estas fezes podem deixar resíduos sobre superfícies e luvas. Estas fezes são freqüentemente
10 defecadas como uma só unidade. Estas fezes mantêm seu formato original após a coleta.

Pontuação: 3 Mole, com formato

Estas fezes são moles, no entanto têm formatos definidos. Estas fezes se rompem facilmente e,
15 definitivamente, deixam resíduos sobre superfícies e luvas. Estas fezes freqüentemente perdem seu formato original após a coleta. Estas fezes freqüentemente se apresentam em conjunto com outra pontuação, mas podem compreender a totalidade da amostra.

20 Pontuação: 2 Mole, sem formato

Estas fezes são moles e não apresentam formato cilíndrico. O formato freqüentemente associado a um "tipo 2" é aquele conhecido como "excremento de vaca". Estas fezes perdem o formato original quando coletadas, e definitivamente
25 deixam resíduos sobre superfícies e luvas. Estas fezes freqüentemente se apresentam em conjunto com outra pontuação, mas podem compreender a totalidade da amostra. Estas amostras podem se espalhar por uma área de vários centímetros.

Pontuação: 1 Líquida

As fezes com esta pontuação sempre parecerão líquidas, e pode ou não haver a presença de matéria particulada. Estas fezes são freqüentemente defecadas em grupos de montes, em vez de uma unidade completa. Muco está freqüentemente presente nas amostras deste tipo. As amostras deste tipo de fezes são de coleta muito difícil, e sempre deixa resíduos em superfícies e luvas. Estas amostras podem se espalhar por uma área de vários centímetros.

Além disso, são registradas outras observações, inclusive: presença de sangue, de objetos estranhos ou de muco nas fezes.

Além disso, o tratamento de infecção gastrointestinal em animais de estimação pode compreender a otimização da ecologia microbiana dos mesmos. A otimização da ecologia microbiana em animais de estimação compreende, de preferência, a redução dos teores de bactérias patogênicas nas fezes dos mesmos. Os teores de bactérias patogênicas presentes nas fezes de animais de estimação podem ser enumerados mediante o uso do método padrão de contagem em placa, conhecido pelos versados na técnica. Com mais preferência, as bactérias patogênicas são selecionadas a partir do grupo consistindo em *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, bacteroides e combinações desses itens. Alguns exemplos não-limitadores de cepas de bactérias patogênicas adequadas incluem *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e combinações desses itens.

O método de uso das bactérias da presente invenção pode incluir, também, o tratamento profilático ou terapêutico do trato urinário de mamíferos, de preferência animais de estimação. Alguns exemplos não-limitadores de tratamentos do trato urinário incluem tratamento ou prevenção de infecções do trato urinário, tratamento ou prevenção de doenças renais, inclusive cálculos renais, tratamento ou prevenção de infecções na bexiga, e similares. Sem se ater à teoria, acredita-se que as bactérias *Bifidobacteria* da presente invenção são úteis na prevenção dessas doenças como resultado de sua capacidade para degradar o ácido oxálico, conforme demonstrado *in vitro*. O ácido oxálico é um subproduto do metabolismo urinário que pode formar precipitados insolúveis, os quais resultam em infecções nos rins, na bexiga e em outras partes do trato urinário. Ao degradar o ácido oxálico e, portanto, potencialmente evitar sua precipitação e acúmulo no trato urinário, as bactérias da presente invenção podem tratar e prevenir infecções e outras doenças do trato urinário. A degradação do ácido oxálico pode ser medida *in vitro* mediante o uso do kit para testes de ácido oxálico cat # 755699, disponível comercialmente junto à Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

As *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção podem ser usadas em um método para a melhoria ou manutenção da saúde de animais de estimação, compreendendo a melhoria da digestão de fibras. A melhoria da digestão de fibras é desejável, pois promove a proliferação das ditas

bactérias probióticas, bem como da microflora endógena benéfica, o que auxilia na supressão de algumas bactérias potencialmente patogênicas. Além disso, uma diminuição na quantidade de metabólitos tóxicos e enzimas nocivas que resultam da fermentação colônica foi documentada em seres humanos (Tomomatsu, H. "Health effects of oligosaccharides", (1994) *Food Technol*, **48**, 61-65). A digestão de fibras pode ser determinada mediante o uso do método descrito em Vickers et al. (2001), "Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora", *Am. J. Vet. Res.* **61** (4), 609-615, exceto pelo fato de que em vez de inocular usando amostras fecais diluídas, cada experimento utilizou culturas puras das cepas bacterianas em questão.

O método de uso das bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção tipicamente envolve o consumo oral pelo animal. O consumo oral pode ocorrer como parte da ingestão dietária normal, ou sob a forma de um suplemento à mesma. O consumo oral tipicamente ocorre ao menos uma vez por mês, de preferência ao menos uma vez por semana e, com mais preferência, ao menos uma vez por dia. As bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção podem ser administradas ao animal de estimação em uma quantidade terapeuticamente eficaz para manter ou melhorar a saúde do animal, de preferência um animal de estimação. Para uso na presente invenção, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz", no que se refere às bactérias formadoras de ácido láctico, significa aquela



quantidade de bactérias que é suficiente para proporcionar o efeito ou benefício desejado a um animal hospedeiro precisando de tratamento, porém baixa o suficiente para evitar efeitos adversos como toxicidade, irritação ou
 5 resposta alérgica, proporcionalmente a uma relação risco/benefício razoável quando usada do modo indicado na presente invenção. A "quantidade terapeuticamente eficaz" específica irá variar conforme fatores como a condição específica sendo tratada, as condições físicas do usuário,
 10 a duração do tratamento, a natureza da terapia simultânea (caso haja), a forma de dosagem específica a ser utilizada, o veículo empregado, a solubilidade da forma de dosagem, e o regime de dosagem específico.

De preferência, as bactérias formadoras de ácido
 15 láctico são fornecidas ao animal de estimação em uma dose na faixa de $1,0E+04$ a $1,0E+14$ UFC por dia e, com mais preferência, na faixa de $1,0E+06$ a $1,0E+12$ UFC por dia. A composição pode conter, de preferência, ao menos 0,001% de *Bifidobacteria pseudolongum*, na faixa de $1,0E+04$ a
 20 $1,0E+12$ ufc/g, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado. As bactérias do tipo *Bifidobacteria pseudolongum* podem ser administradas ao animal em sua forma viável, sob a forma de células mortas, ou como destilados, isolados ou outras
 25 frações dos produtos de fermentação das bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção, ou qualquer mistura desses materiais.

De preferência, as bactérias *Bifidobacteria pseudolongum*, ou uma fração purificada ou isolada das mesmas, são usadas para preparar uma composição destinada a manter ou melhorar a saúde de um animal. Conforme indicado
5 acima, a composição pode ser parte da ingestão dietária normal, ou pode ser um suplemento. Nos casos em que a composição faz parte da ingestão dietária normal, esta pode estar sob a forma de um alimento seco para animais, como biscoitos ou ração, um alimento à base de grãos processados,
10 um alimento úmido para animais, iogurtes, molhos, itens mascáveis, petiscos e similares.

Essas composições podem compreender outros componentes. Outros componentes são benéficos para inclusão nas composições usadas na presente invenção, mas são
15 opcionais para os propósitos da invenção. Por exemplo, as composições alimentícias são, de preferência, nutricionalmente balanceadas. Em uma modalidade, as composições alimentícias podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 20% a cerca de 50% e, de
20 preferência, de cerca de 22% a cerca de 40% de proteína bruta, em peso da composição alimentícia. O material de proteína bruta pode compreender qualquer material tendo um teor de proteínas de ao menos cerca de 15% em peso, sendo que alguns exemplos não-limitadores destes incluem
25 proteínas vegetais como feijão soja, caroço de algodão e amendoim, e proteínas animais como caseína, albumina e tecido cárneo. Alguns exemplos não-limitadores de tecido cárneo útil à presente invenção incluem carne fresca e

farinhas secas ou processadas, como farinha de peixe, farinha de aves, farinha de carne, farinha de ossos e similares. Outros tipos de fontes adequadas de proteína bruta incluem glúten de trigo ou de milho, e proteínas
5 extraídas de fontes microbianas, como levedura.

Além disso, as composições alimentícias podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 5% a cerca de 35% e, de preferência, de cerca de 10% a cerca de 30% de gordura, em peso da composição alimentícia. Além disso, as
10 composições alimentícias compreendendo as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção podem, também, compreender de cerca de 4% a cerca de 25% de fibra dietária total. As composições podem, também, compreender múltiplas fontes de amido, conforme descrito em WO99/51108.

15 As composições da presente invenção podem conter, ainda, uma fonte de carboidrato. São fontes ilustrativas os grãos ou cereais como arroz, milho, milo, sorgo, cevada, alfafa, trigo e similares. Além disso, as composições também podem conter outros materiais, como soro de leite
20 seco e outros subprodutos lácteos.

As composições compreendendo as bactérias da presente invenção podem, também, compreender um prebiótico. O termo "prebiótico" inclui substâncias ou compostos que são fermentados pela flora intestinal do animal de estimação e,
25 conseqüentemente, promovem a proliferação ou o desenvolvimento de bactérias formadoras de ácido láctico no trato gastrointestinal do dito animal, em detrimento de bactérias patogênicas. O resultado dessa fermentação é uma

liberação de ácidos graxos, em particular ácidos graxos de cadeia curta, no cólon. Isto tem o efeito de reduzir o valor de pH no cólon. Alguns exemplos não-limitadores de prebióticos adequados incluem oligossacarídeos, como inulina e seus produtos de hidrólise conhecidos como frutooligosacarídeos, galactooligosacarídeos, xilooligosacarídeos, ou oligoderivados de amido. Os prebióticos podem ser fornecidos sob qualquer forma adequada. Por exemplo, o prebiótico pode ser fornecido sob a forma de material de origem vegetal contendo essas fibras. Os materiais de origem vegetal adequados incluem aspargo, alcachofras, cebolas, trigo ou chicória, bem como resíduos desses materiais de origem vegetal. Alternativamente, a fibra prebiótica pode ser fornecida sob a forma de um extrato de inulina, sendo adequados, por exemplo, os extratos de chicória. Os extratos de inulina adequados podem ser obtidos junto à Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, sob a marca registrada "Raftiline". Por exemplo, a inulina pode ser fornecida sob a forma de Raftiline (g) ST, que é um pó branco fino que contém de cerca de 90% a cerca de 94%, em peso, de inulina, até cerca de 4%, em peso, de glicose e frutose, e de cerca de 4% a 9%, em peso, de sacarose. Alternativamente, a fibra pode estar sob a forma de um frutooligosacarídeo como aquele obtido junto à Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, sob a marca registrada "Raftilose". Por exemplo, a inulina pode ser fornecida sob a forma de fornecida sob a forma de Raftilose (g) P95. De outro modo, os frutooligosacarídeos

podem ser obtidos pela hidrólise da inulina por meio de métodos enzimáticos, ou mediante o uso de microorganismos.

Para alimentos secos para animal de estimação, um processo adequado é a cocção com extrusão, embora assamento e outros processos adequados possam ser usados. Quando cozido com extrusão, o alimento seco para animais de estimação é geralmente fornecido sob a forma de uma ração. Se for usado um prebiótico, este pode ser misturado, antes do processamento, aos demais ingredientes do alimento seco para animais de estimação. Um processo adequado é descrito no Pedido de Patente Européia N° 0850569. Se for usado um microorganismo probiótico, é melhor que este seja aplicado como um revestimento ou um recheio no alimento seco para animais de estimação. Um processo adequado é descrito na publicação de patente européia número EP 0 862 863.

Para alimentos úmidos, os processos descritos nas patentes U.S. N° 4.781.939 e 5.132.137 podem ser usados para produzir produtos cárneos simulados. Outros procedimentos para a produção de produtos em pedaços também podem ser usados como, por exemplo, cozimento em um forno a vapor. Alternativamente, produtos em filão podem ser produzidos mediante a emulsificação de um material cárneo adequado para produzir uma emulsão de carne, adicionando-se um agente gelificante adequado e aquecendo-se a dita emulsão de carne, antes de acondicionar a mesma em latas ou outros recipientes. As composições alimentícias úmidas típicas podem compreender de cerca de 5% a cerca de 15% de proteína, de cerca de 1% a cerca de 10% de gordura, e de cerca de 1% a

cerca de 7% de fibra. Exemplos não-limitadores de ingredientes que podem ser usados em composições alimentícias úmidas incluem frango, peru, carne bovina, pescado branco, caldo de frango, caldo de peru, caldo de carne bovina, fígado de frango, quirela de arroz, grits de milho, farinha de peixe, ovos, polpa de beterraba, cloreto, farelo de linhaça, cordeiro, subprodutos de carne bovina, subprodutos de frango e misturas desses itens.

Em outra modalidade, as composições de suplemento como biscoitos, itens mascáveis e outros petiscos podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 20% a cerca de 60% de proteína, ou de cerca de 22% a cerca de 40% de proteína, em peso da composição de suplemento. Como outro exemplo, as composições de suplemento podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 5% a cerca de 35% de gordura, ou de cerca de 10% a cerca de 30% de gordura, em peso da composição de suplemento. As composições alimentícias e de suplemento destinadas ao uso por cães ou gatos são de conhecimento comum na técnica.

Os alimentos para animal de estimação podem conter outros agentes ativos, como ácidos graxos de cadeia longa e zinco. Os ácidos graxos de cadeia longa adequados incluem ácido alfa-linoléico, ácido gama-linolênico, ácido linoléico, ácido eicosapentanóico e ácido docosaexanóico. Os óleos de peixe são uma fonte adequada de ácidos eicosapentanóicos e ácido docosaexanóico.

O óleo de borragem, o óleo de semente de groselha negra e o óleo de prímula são fontes adequadas de ácido

gama-linolênico. Os óleos de cártamo, os óleos de girassol, os óleos de milho e os óleos de soja são fontes adequadas de ácido linoléico. Esses óleos também podem ser usados nos substratos para revestimento mencionados acima. O zinco
5 pode ser fornecido de diversas formas adequadas, por exemplo como sulfato de zinco ou óxido de zinco. Além disso, muitos ingredientes comumente usados em alimentos para animal de estimação são fontes de ácidos graxos e de zinco. Tem sido observado que a combinação de chicória,
10 como uma fonte de prebiótico, com um óleo rico em ácido linoléico, como o óleo de soja, proporciona benefícios inesperados, que sugerem um efeito sinérgico.

Nos casos em que a composição está sob a forma de um molho, esta compreende, de preferência, ao menos 10% de
15 um caldo, sendo que alguns exemplos não-limitadores destes incluem caldos de vegetais, de carne bovina, de frango ou de presunto. As composições de molho típicas podem compreender de cerca de 0,5% a cerca de 5% de proteína bruta, de cerca de 2% a cerca de 5% de gordura bruta, e de
20 cerca de 1% a cerca de 5% de fibra.

Alguns outros exemplos não-limitadores de suplementos adequados ao uso na presente invenção incluem pós, suspensões de óleo, suspensões à base de leite e queijos, bem como pílulas ou cápsulas. Nos casos em que a
25 composição está sob a forma de uma pílula, agentes de ligação adequados são necessários para manter a pílula sob uma forma sólida e comprimida. Alguns exemplos não-limitadores de agentes de ligação adequados incluem as

gomas naturais como goma xantana, pectinas, lecitinas, alginatos e outras conhecidas pelos versados na técnica. Nos casos em que a composição está sob a forma de uma cápsula, esta é de preferência encapsulada mediante o uso

5 de tecnologias conhecidas pelos versados na técnica. Alguns exemplos não-limitadores de materiais de encapsulação adequados incluem álcool polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP), alginatos e gelatina. As composições à base de iogurte podem compreender de cerca de 1% a cerca de

10 5% de proteína, de cerca de 10% a cerca de 20% de carboidrato, de cerca de 1% a cerca de 5% de fibra, de cerca de 1% a cerca de 5% de gordura e de cerca de 50% a cerca de 90% de um veículo líquido, como leite.

EXEMPLOS

15 Esses exemplos são fornecidos para ilustrar a invenção, e não se destinam a limitar, em nenhum aspecto, o escopo da mesma.

Example 1: isolamento de bactérias *Bifidobacteria pseudolongum* a partir de trato gastrointestinal canino

20 Amostras de intestinos caninos foram obtidas a partir de cães saudáveis apresentados a veterinários locais para eutanásia iniciada e aprovada pelos donos dos animais. Todos os animais estavam saudáveis e isentos de doenças. Foram dissecados o cólon, o cólon médio, o ceco e o íleo de

25 cada cão, de maneira a expor a mucosa.

Os sobrenadantes foram removidos após agitação do tecido mucoso (em vórtice durante 1 minuto) e homogeneização mecânica do tecido. Cada sobrenadante foi aplicado em placa

P10417808

de ágar de Clostridia reforçado (RCA) ou de MRS acrescido de 0,05% de cisteína mais mupirocina. Estas foram incubadas anaerobicamente, mediante o uso de um sistema Anerocult GasPak, durante 24 horas a 37 °C. As colônias isoladas a partir das placas foram reaplicadas por esfregaço em MRS ou RCA, e novamente cultivadas anaerobicamente sob as mesmas condições. As colônias isoladas foram reaplicadas por esfregaço mais 4 vezes, com a finalidade de purificar uma cepa única. Foram avaliadas a morfologia e a aparência microscópica da colônia. Os isolados adequados foram testados quanto a reação de Gram e atividade de catalase. A identificação de bastonetes Gram-positivos, catalase-negativos, foi realizada mediante teste de API (API 50CHL, BioMerieux). As células colhidas foram lavadas duas vezes com 0,05M de tampão de fosfato (pH 6,5) e cisteína HCl (500 mg/L), sendo a lavagem seguida de sonicação. Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação. Os sobrenadantes foram incubados com NaF (6 mg/mL) e Na iodoacetato (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida mediante incubação com hidroxilamina HCl (pH 6,5) durante 10 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento de cor foi monitorado em seguida à adição de HCl (4M), FeCl₃.6H₂O (5% (p/v) em 0,1M HCl) e frutose-6-fosfato (sal de Na). A formação de acetil fosfato a partir de frutose-6-fosfato foi evidenciada pela cor avermelhada formada pelo quelato férrico de seu hidroximato.

Cinquenta e oito (58) cepas de bactérias formadoras de ácido láctico foram isoladas a partir de trato

gastrointestinal canino ressecado e lavado, das quais seis foram identificadas como pertencendo ao gênero *Bifidobacteria*, e uma como pertencendo à cepa *B. pseudolongum*.

5 Exemplo 2: triagem quanto à atividade microbicide

As cepas bacterianas de *Bifidobacteria pseudolongum* isoladas foram incubada anaerobicamente em caldo TPY. 2 μ L de cada cultura foram aplicados em pontos sobre placas de ágar TPY, as quais foram incubadas
10 anaerobicamente de um dia para outro. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Eschericia coli* 0157H45 foram pré-cultivadas de um dia para outro, e 100 μ L foram inoculados em agar fundido (1% v/v). Essa cultura indicadora foi vertida sobre a superfície das
15 placas de MRS ou TPY inoculadas. Após incubação de um dia para outro, as zonas de inibição em redor da colônia probiótica foram medidas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em três ocasiões separadas. Além
disso, a incorporação do tampão de 2% de betaglicerofosfato
20 ao ágar possibilitou determinar a contribuição da produção de ácido à inibição *in vitro* de patógenos que foi observada.

Os dados apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4 claramente demonstram que as cepas da bactéria *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção, obteníveis
25 mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, apresentam atividade microbicide *in vitro*, indicadora de uma potencial atividade probiótica.

Exemplo 3: medições *in vitro* de sobrevivência e colonizaçãoTolerância a pH

As células bacterianas foram colhidas de culturas incubadas de um dia para outro, lavadas duas vezes em tampão de fosfato (pH 6,5) e ressuspensas em caldo TPY ajustado com 1M HCl até pH 2,5. As células foram incubadas anaerobicamente a 37 °C, e sua sobrevivência foi medida a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos, mediante o uso do método de contagem em placas conhecido pelos versados na técnica.

A Figura 5 claramente demonstra que nove cepas não eram resistentes a pH 2,5 após 1 hora, e que 49 cepas eram resistentes a pH 2,5 após 1 hora. A Tabela 2 sumariza esses dados por cepa.

Designação da cepa	Concentração inicial	Concentração após 1 hora	Viabilidade (%)
AHC A	1,50E+08	1,20E+08	80
AHC B	4,00E+07	5,50E+07	137
AHC C	1,10E+08	1,50E+08	136
AHC F	6,00E+08	6,00E+08	100
AHC 7	2,50E+07	4,50E+07	180

Tabela 2

Resistência à bÍlis

As cepas bacterianas foram aplicadas por esfregaço sobre ágar TPY suplementado com bÍlis de porco (Sigma) a 0,5%, 1% e 5% (p/v). As placas foram incubadas a 37 °C sob condições anaeróbicas, e a proliferação foi registrada após 24 horas. A proliferação foi comparada com placas de controle por um observador experiente, e a proliferação das colônias foi descrita como:

Negativa (0) - nenhuma proliferação;

+ (1) - proliferação translúcida nebulosa (<33% em placas de controle com 0% de bÍlis);

++ (2) - proliferação definida, porém não tão boa
5 como nas placas de controle (>33%, mas <66%);

+++ (3) - proliferação equivalente à das placas de controle (>66%).

Uma vez que a proliferação das colônias na presença de sais biliares é comparada às placas de controle, os
10 descritores de proliferação recebem valores numéricos de 0, 1, 2 ou 3 (-, +, ++ ou +++, respectivamente) e são, então, expressos como uma porcentagem, em que 3 representa 100%.

A Figura 6 demonstra que as *Bifidobacteria* da presente invenção claramente apresentam uma
15 resistência a sais biliares, sendo capazes de proliferar e formar colônias em níveis de ao menos 33%, quando expostas a 0,5% de sais biliares.

Adesão a células epiteliais intestinais

A linhagem de células epiteliais humanas HT-29 foi
20 usada para avaliar as propriedades de adesão das cepas selecionadas. As células epiteliais foram cultivadas de modo rotineiro, sob a forma de camada única em frascos de 75 cm² para cultura de tecidos, a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em meio mínimo essencial de
25 Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal de bezerro (FCS), penicilina/estreptomicina, glutamina e fungizona. Para propósitos do experimento, as células epiteliais foram semeadas a uma concentração de 5 x 10⁵ células/mL (3 mL de

P10417008

ah

volume total) por cavidade, em placas de cultura com 6 cavidades (Sarstedt). Após incubação durante 7 dias, para permitir diferenciação, as camadas únicas epiteliais foram lavadas com meio isento de antibióticos, contendo 10% de FCS. As suspensões bacterianas mais/em DMEM isento de antibióticos foram adicionadas a cada cavidade, e as células foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C. Após a incubação, as camadas únicas foram lavadas três vezes com PBS. As células epiteliais foram lisadas em H2O desionizada, e o número de bactérias aderentes foi obtido mediante o uso do método de contagem em placas conhecido pelos versados na técnica. A adesão foi expressa como uma porcentagem do número de bactérias inicialmente aplicadas à placa.

Como pode ser visto na Figura 7, a cepa de *Bifidobacteria pseudolongum* depositada junto ao NCIMB sob o número de depósito NCIMB 41199 aderiu às células epiteliais de intestino HT-29 em níveis de ao menos 4%.

Exemplo 4: seqüenciamento de polinucleotídeo intergênico

16s-23s

As colônias de *Bifidobacteria pseudolongum* foram removidas de uma placa de ágar e ressuspensas em tampão IX PCR, aquecidas a 96 °C durante 5 minutos, congeladas a -70 °C durante um período de 5 a 10 minutos e, então, descongeladas, e uma alíquota foi adicionada a um tubo eppendorf para PCR. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores de espaçador intergênico (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' () e IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. As condições de ciclo foram de 96 °C durante 1 minuto (1

ciclo), 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, e 72 °C durante 30 segundos (28 ciclos). A reação de PCR continha 5 µL de DNA, tampão para PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mM de dNTPs (Roche, Reino Unido), 0,4 µM de iniciador IGS L e R (150 ng/50 µL) (MWG Biotech, Alemanha) e polimerase Bioline Taq (0,6 unidades). As reações de PCR foram realizadas em um termociclo Hybaid. Os produtos da PCR (8 µL) foram passados juntamente com um marcador para peso molecular (φX.174 Hae III, Promega) por um gel a 2% de agarose manchada com EtBr em TAE, para determinar seu perfil de IGS. Utilizando os mesmos iniciadores mencionados acima, o DNA do espaçador intergênico (IGS) foi seqüenciado para as 2 cepas de *Bifidobacteria pseudolongum* caninas, utilizando métodos conhecidos pelos versados na técnica.

Em seguida ao seqüenciamento, as seqüências obtida para as quatro cepas depositadas foram comparadas à base de dados de seqüências "BLAST", disponível online em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para verificação de homologia com outras seqüências bacterianas 16s-23s depositadas. A *Bifidobacterium pseudolongum* ATCC25865 apresentou a igualdade mais próxima para AHC 7, com um grau de homologia de 92%. No entanto, existem várias diferenças entre estas cepas.

Exemplo 5: exemplos de composição

Os Exemplos de 1 a 4 são exemplos de composições de ração seca compreendendo o probiótico *Bifidobacteria pseudolongum* da presente invenção.

PI0417808

93/2

Ingrediente	Porcentagem, com base no peso			
	Ex. 1	Ex. 2	Ex. 3	Ex. 4
Grãos de cereal	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100
Farinha de subproduto de ave	43,5	40	45	35
Gordura de aves	1,28	1,02	1,16	1,35
Produto de ovos	2,4	2,1	2,5	2,2
Farinha de fígado de frango	1,0	1,0	1,0	1,0
Levedura seca de cerveja	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monossódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato de cálcio	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloreto de potássio	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
cloreto de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerais	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloreto de Sódio	0,03	0,03	0,03	0,03
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41199 em óleo de girassol)	0,1	0,5	1	0,4

Os Exemplos de 5 a 7 são exemplos de composições de alimento úmido para animais de estimação compreendendo as *Bifidobacteria pseudolongum* probióticas da presente invenção.

Ingrediente	Porcentagem, com base no peso		
	Ex. 5	Ex. 6	Ex. 7
Água	Até 38	Até 47	Até 50
Fígado de aves	Até 25	Até 20	Até 15
Produtos de aves	25	20	20
Quirela de arroz	5	7	10
Produto de ovos	3	2,5	1,5
Gordura de aves	2,9	3,0	3,2
Caldo de frango	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1
Minerais	0,05	0,1	0,1
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41199)	4	5	6

41 110417005

94

Os Exemplos de 8 a 10 são exemplos de composições de suplemento à base de iogurte compreendendo as *Bifidobacteria pseudolongum* probióticas da presente invenção.

Ingrediente	Porcentagem, com base no peso		
	Ex. 8	Ex. 9	Ex. 10
Leite	82,75	81,9	82,7
Açúcar	12	12	10
Amido modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41199)	4	5	6

5 Embora modalidades particulares da presente invenção tenham sido ilustradas e descritas, deve ficar evidente aos versados na técnica que várias outras alterações e modificações podem ser feitas sem que se desvie do caráter e âmbito da invenção. Portanto, pretende-se cobrir nas
 10 reivindicações anexas todas essas alterações e modificações que se enquadram no escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição **caracterizada** pelo fato de compreender uma cepa de *Bifidobacterium pseudolongum* NCIMB 41199e um veículo selecionado de um grupo consistindo de alimento de animal seco, alimento em grão processado, comida animal molhada, iogurte, molhos, gomas, guloseimas, biscoitos, pós, suspensões em óleo, suspensões à base de leite e queijos.
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a cepa é selecionada com base em sua capacidade para sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal de um animal de estimação.
3. Composição, de acordo com as reivindicações 1, **caracterizada** pelo fato de que a cepa apresenta menos de 33% de proliferação quando cultivada na presença de sais biliares a 0,5%.
4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que a cepa é capaz de manter sua viabilidade após 1h sob pH 2,5.
5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo fato de que o animal de estimação é um cão ou gato.
6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de ser um alimento para animais de estimação, de preferência um alimento para gatos ou um alimento para cães.
7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de ser um alimento molhado para animais ou um alimento seco para animais.
8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de estar sob a forma de uma ração, um item mascável, um biscoito, um suplemento alimentar para animais de estimação, um molho, um produto lácteo, uma cápsula, um tablete ou uma pílula.
9. Composição, de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de compreender ao menos 0,001% de bactérias formadoras de ácido láctico na faixa de cerca de 1,0E+04 ufc/g a cerca de 1,0E+12 ufc/g.

10. Composição, de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de as bactérias *Bifidobacterium pseudolongum* estarem sob a forma de células viáveis, células não-viáveis, ou frações constituintes ativas das mesmas.

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de compreender ainda pelo menos um metabólito, um homogenato, uma proteína, um extrato e um sobrenadante de fermento bacteriano.

102

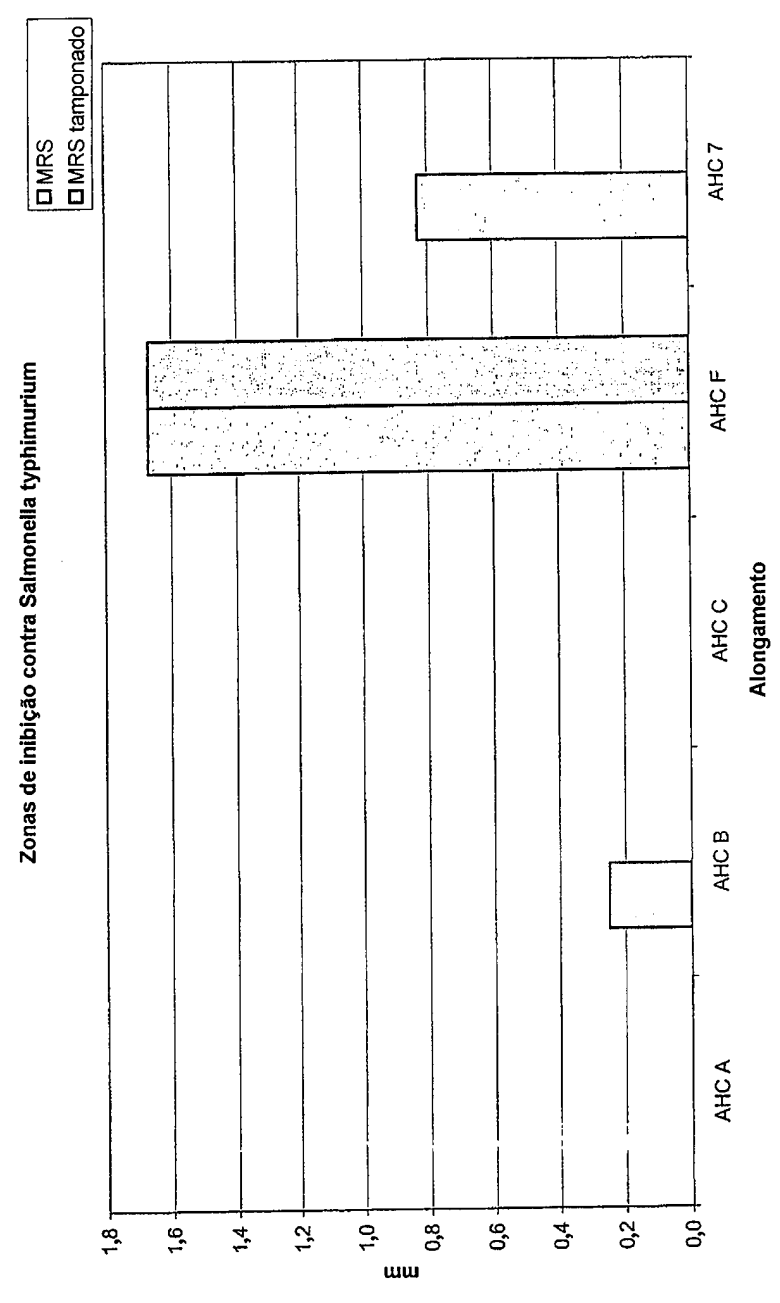


Figura 1.

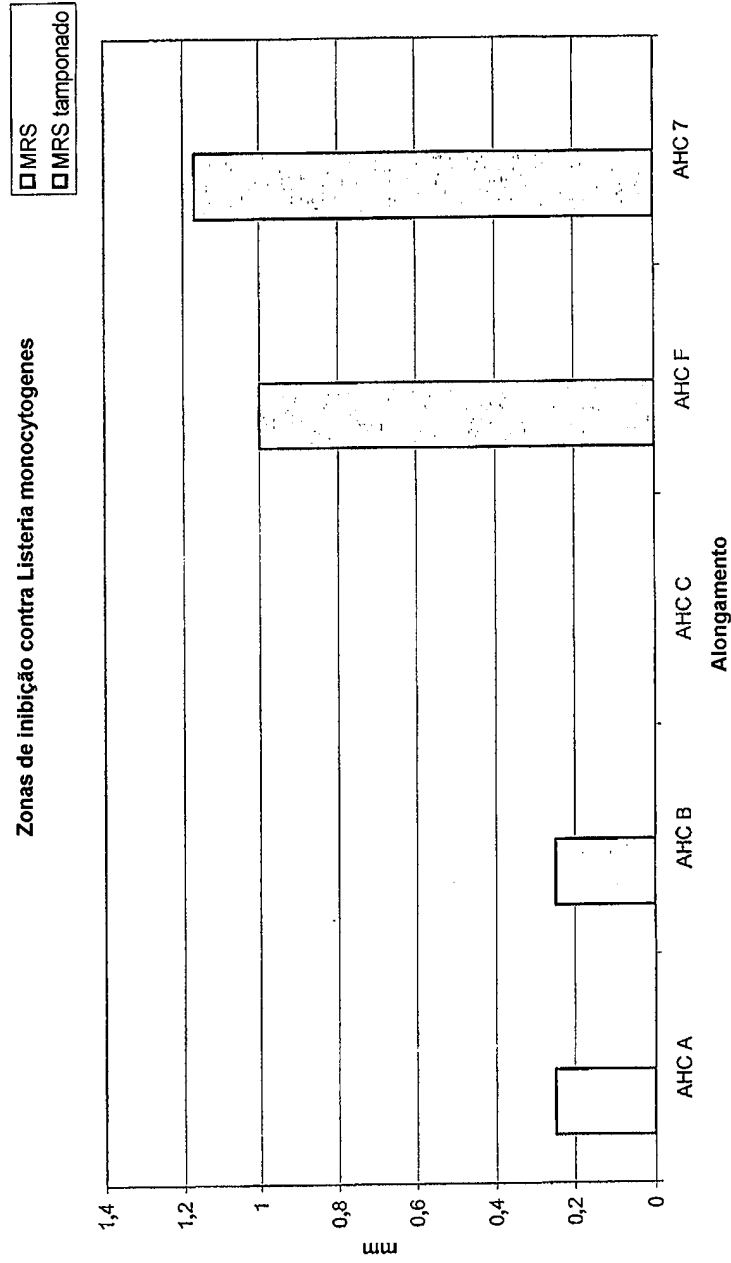


Figura 2.

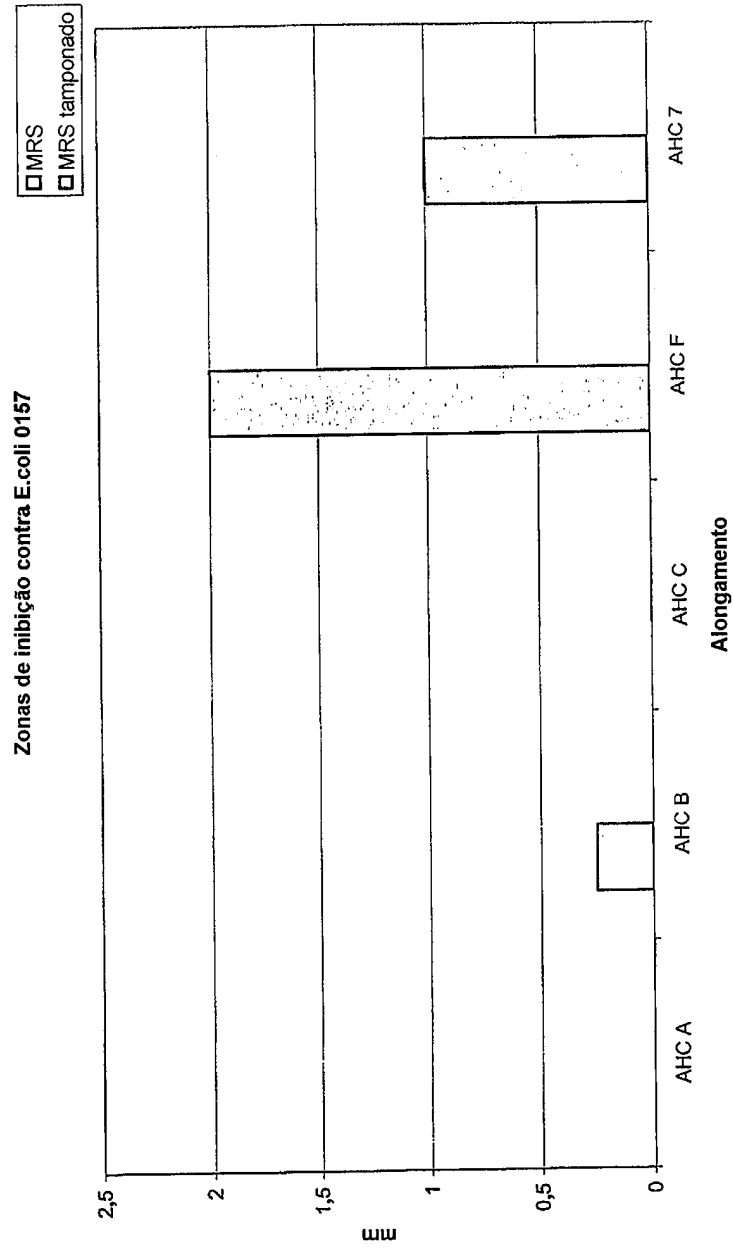


Figura 3.

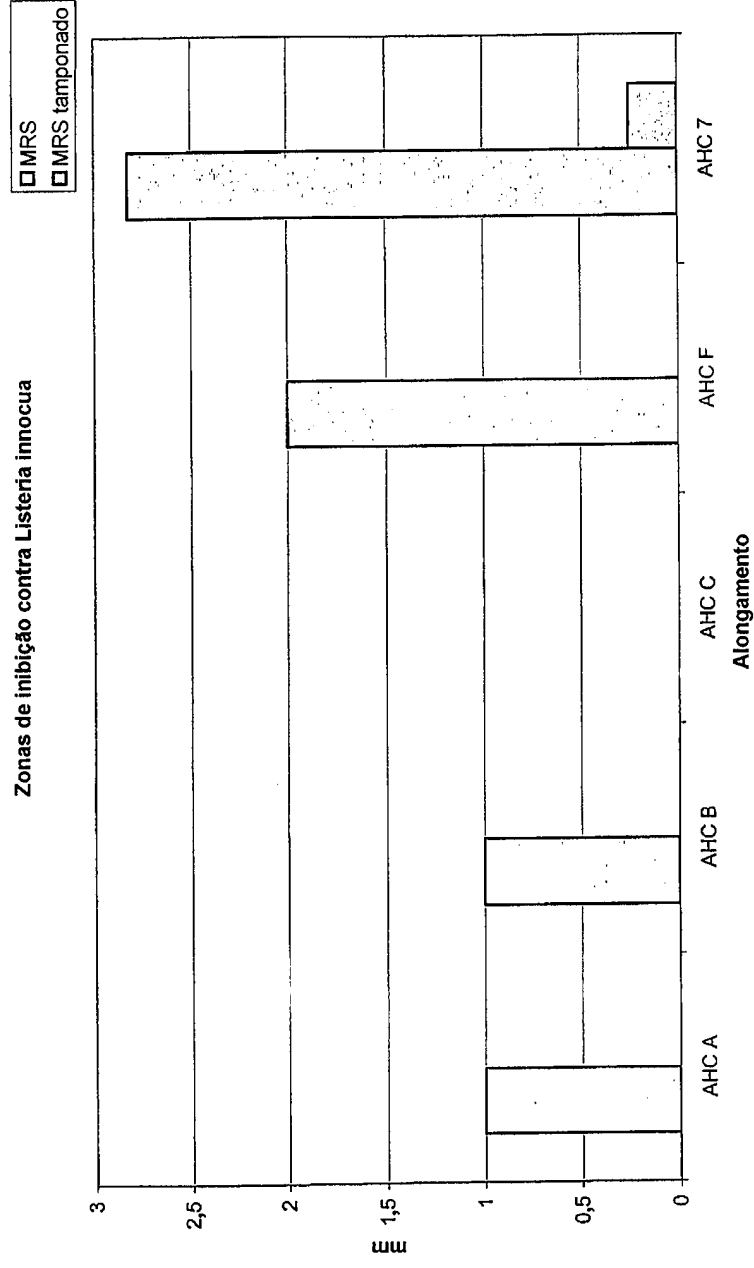


Figura 4.



Figura 5.

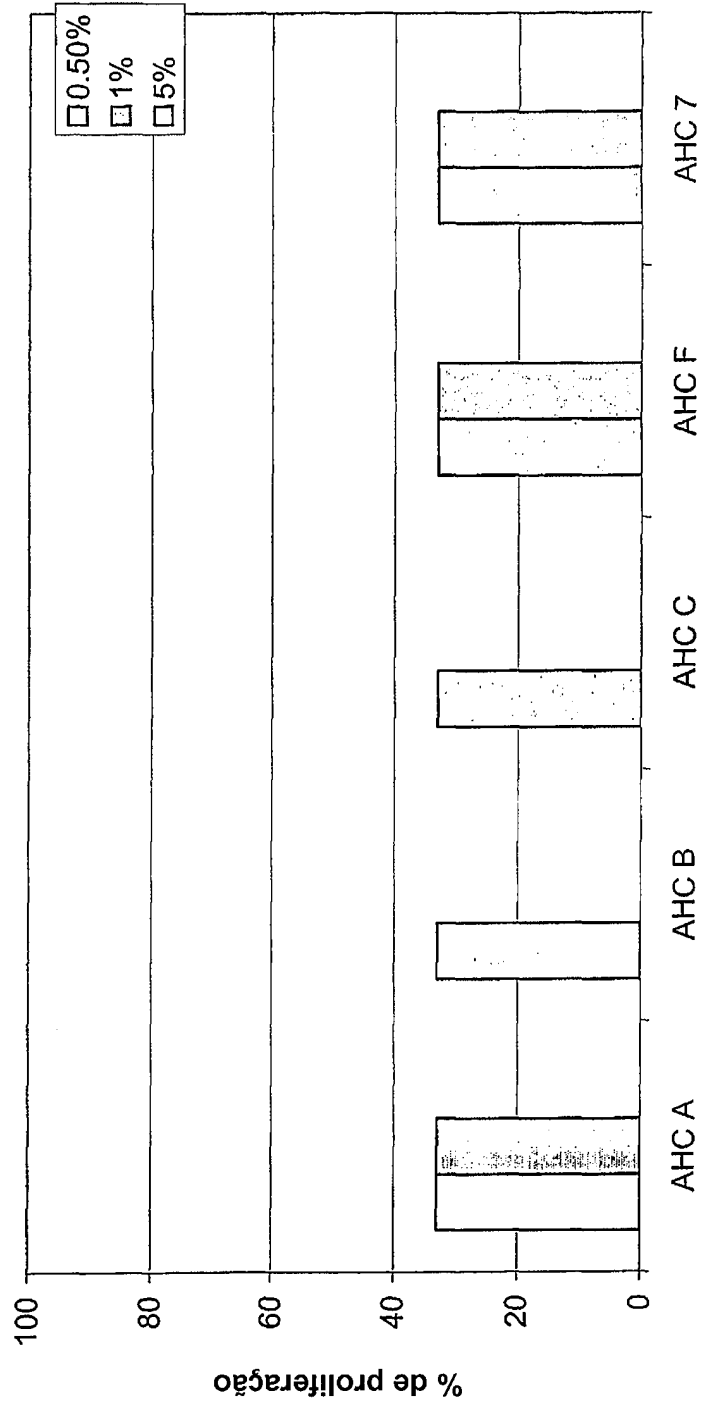


Figura 6.

**% de adesão de células bacterianas co-incubadas
com células epiteliais**

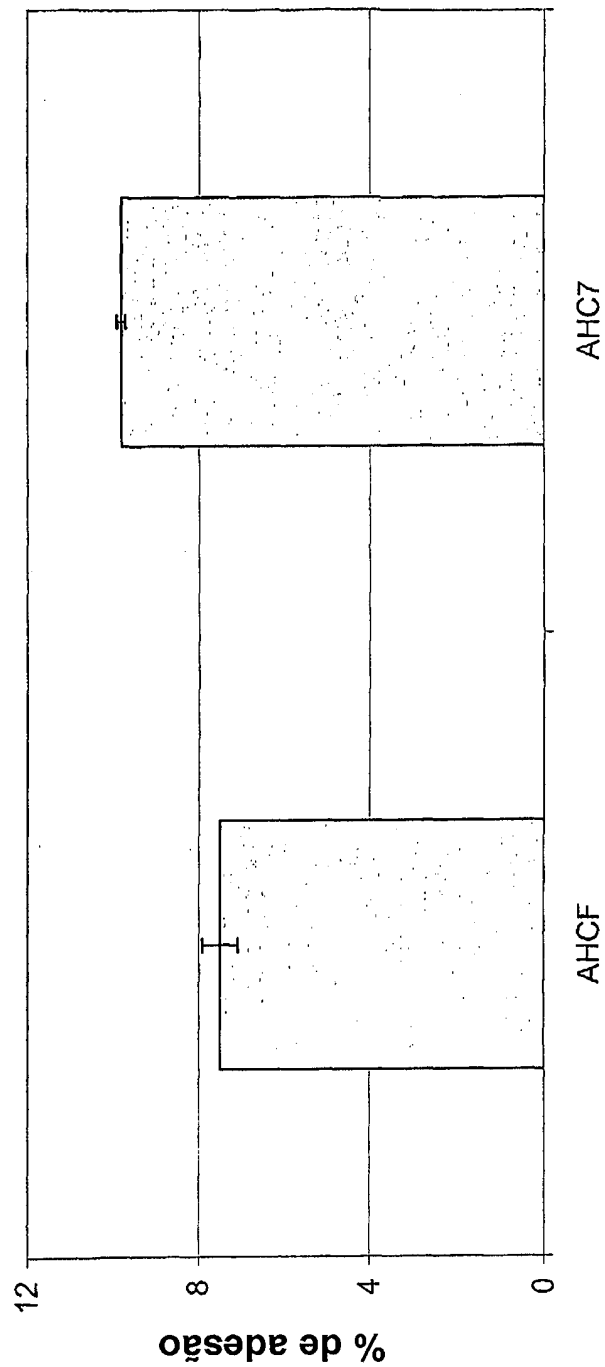


Figura 7.