



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

(11) PI 0417825-4 B1



(22) Data do Depósito: 17/12/2004

(45) Data de Concessão: 03/11/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA USO DE LACTOBACILLI PROBIÓTICOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/00.

(30) Prioridade Unionista: 19/12/2003 US 60/531,210.

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

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

(86) Pedido PCT: PCT US2004043068 de 17/12/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/060707 de 07/07/2005

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

(57) Resumo: "MÉTODOS PARA USO DE LACTOBACILLI PROBIÓTICOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO". De acordo com a presente invenção, são apresentados métodos para o uso de bactérias probióticas do gênero Lactobacilli em animais de estimação.

MÉTODOS PARA USO DE LACTOBACILLI PROBIÓTICOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se ao campo de *Lactobacilli* probióticos, mais especificamente métodos de uso de *Lactobacilli* probióticos em animais de estimação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Os mecanismos de defesa para proteção do trato gastrointestinal (GI) de mamíferos contra a colonização por bactérias são altamente complexos. O trato GI da maioria dos mamíferos é colonizado por microflora nativa e por microorganismos patogênicos invasivos. Em um estado 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.

[0003] O número e a composição da microflora intestinal tendem a ser estáveis, embora idade e dieta possam modificá-los. A acidez gástrica, a bÍlis, o peristaltismo intestinal e a imunidade local são fatores considerados importantes na regulação da flora bacteriana presente no intestino delgado de seres humanos e diversos outros mamíferos. Frequentemente, os transtornos gastrointestinais em animais de estimação, inclusive aqueles encontrados em cães e gatos, estão ligados a 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.

[0004] Recentemente, pesquisas começaram a revelar algumas valiosas cepas de bactérias obteníveis mediante o isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos, como seres humanos e cães, 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 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 que se pretende tratar, ou de espécies com parentesco próximo a esta. Embora algumas cepas de bactérias probióticas tenham sido elucidadas, os métodos de uso dessas cepas, bem como sua eficácia terapêutica, têm se limitado a modulação de transtornos gastrointestinais em seres humanos. Até o momento, não tem havido muita investigação quanto ao potencial desses organismos para afetar de modo benéfico outros sistemas fisiológicos que não o trato gastrointestinal em animais de estimação, como cães e gatos.

SUMARIO DA INVENÇÃO

[0005] De acordo com a presente invenção, são apresentados métodos para o uso, em animais de estimação, de *Lactobacilli* probióticos obteníveis mediante o isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos. Os ditos métodos incluem o tratamento, seja este profilático ou terapêutico, do sistema imune, do controle do peso e da composição corporal, da saúde urinária, de doenças da pele e da pelagem, e do envelhecimento.

[0006] Estes e outros aspectos, bem como características e vantagens da presente invenção, ficarão aparentes aos elementos versados na técnica a partir da leitura da presente descrição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 Sequências

[0007] SEQ. ID N° 1 - sequência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s - 23s de *Lactobacillus murinus* AHC 1222 (NCIMB 41194).

[0008] SEQ. ID N° 2 - sequência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s - 23s de *Lactobacillus murinus* AHC 3133 (NCIMB 41195).

30 [0009] SEQ. ID N° 3 - sequência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s -

23s de *Lactobacillus murinus* AHC 5323 (NC1MB 41196).

[0010] SEQ. ID N° 4 - sequência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s - 23s de *Lactobacillus murinus* AHC 6331 (NCIMB 41197).

[0011] SEQ. ID N° 5 - sequência iniciadora 16s - 23s de PCR do lado esquerdo
5 para análise de sequência.

[0012] SEQ. ID N° 6 - sequência iniciadora 16s - 23s de PCR do lado direito, para análise da sequência.

Números de depósito das bactérias

[0013] A tabela abaixo descreve a espécie, o número da cepa e o número de
10 depósito para os *Lactobacilli* probióticos obteníveis mediante o isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos, e úteis à presente invenção. As cepas bacterianas foram depositadas junto ao "National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria" (NCIMB), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de depósito	Sequência 16s – 23s
Lactobacillus murinus AHC 1222	NCIMB 41194	SEQ. ID N° 1
Lactobacillus murinus AHC 3133	NCIMB 41195	SEQ. ID N° 2
Lactobacillus murinus AHC 5323	NCIMB 41196	SEQ. ID N° 3
Lactobacillus murinus AHC 6331	NCIMB 41197	SEQ. ID N° 4
Lactobacillus salivarius UCC118	NCIMB 40829	-
Lactobacillus salivarius UCC1	NCIMB 40830	-
Lactobacillus salivarius AH102	NCIMB 41044	-
Lactobacillus salivarius AH103	NCIMB 41045	-
Lactobacillus salivarius AH105	NCIMB 41047	-
Lactobacillus salivarius AH109	NCIMB 41093	-

Lactobacillus salivarius AH110	NCIMB 41094	-
Lactobacillus casei AH101	NCIMB 41043	-
Lactobacillus casei AH104	NCIMB 41046	-
Lactobacillus casei AH111	NCIMB 41095	-
Lactobacillus casei AH112	NCIMB 41096	-
Lactobacillus casei AH113	NCIMB 41097	-

[0014] Todos os pesos, medidas e concentrações na presente invenção são medidos a 25°C na composição em sua totalidade, exceto onde indicado em contrário.

[0015] Exceto onde indicado em contrário, todas as porcentagens das composições aqui mencionadas são porcentagens em peso, e todas as razões são razões em peso.

[0016] Exceto onde indicado em contrário, todos os pesos moleculares são pesos moleculares médios ponderais.

[0017] Exceto onde indicado em contrário, o conteúdo de todas as fontes de literatura mencionadas neste texto estão aqui incorporadas em sua totalidade, por referência.

[0018] Exceto onde são apresentados exemplos específicos de valores reais medidos, os valores numéricos aqui mencionados devem ser considerados como sendo qualificados pela expressão "cerca de".

[0019] No âmbito da descrição apresentada a seguir, a abreviação UFC ("unidade formadora de colônia") designa o número de células bacterianas revelado por contagens microbiológicas em placas de ágar, como e de entendimento comum na técnica.

[0020] Para uso na presente invenção, o termo "mutantes dessas cepas" inclui cepas bacterianas derivadas, tendo ao menos 88% de homologia, de preferência ao menos 90% de homologia e, com mais preferência, 95% 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.

[0021] 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
5 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 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
10 sequência-pai. Para uso na presente invenção, a "homologia" da sequência pode ser determinada mediante o uso de técnicas-padrão conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada usando-se o programa online para algoritmo de homologia "BLAST", disponível publicamente em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

15 [0022] 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 e de conhecimento do versado na técnica, sendo que a dita sequência de DNA tem um comprimento de
20 ao menos duas bases de ácido desoxirribonucléico.

[0023] Para uso na presente invenção, o termo "animal de estimação" significa um animal doméstico. De preferência, "animal de estimação" significa animais domésticos como cães, gatos, coelhos, furoes, cavalos, vacas ou similares. Com mais preferência, "animal de estimação" significa um cão ou gato doméstico.

25 [0024] A cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli murinus*, obtível 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
30 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, diarreia associada ao uso de antibióticos, apendicite, transtornos autoimunes, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, amiloidose, artrite reumatóide, artrite, mobilidade das articulações, diabetes mellitus, infecções bacterianas, infecções 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 barreira intestinal, alergia, asma, transtornos respiratórios, transtornos circulatórios, doença cardíaca coronariana, anemia, transtornos do sistema de coagulação sanguínea, doença renal, transtornos do sistema nervoso central, doença hepática, isquemia, transtornos nutricionais, 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 auto-imune e inflamação; 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.

[0025] 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 auto-imune 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 itens. Esses métodos são brevemente descritos na presente invenção, mas bem conhecidos pelos versados na técnica.

30 [0026] 1. Blastogênese de linfócitos: Este ensaio mede a resposta proliferativa *in*

vitro de linfócitos isolados a partir de sangue integral fresco obtido de animais 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 isoladas a partir de sangue integral por meio de 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 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), 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 μCi ^3H -timidina e coletadas, e as contagens de cintilação são lidas em um TopCount NXT a 72 horas.

[0027] 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 tireóide canina foram usadas como células-alvo na avaliação da atividade citotóxica de células NK. Foi anteriormente demonstrado que essa linhagem de células é suscetível a 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 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 tetrazólico (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:

$$[0028] \quad \text{Citotoxicidade específica (\%)} = 100 \times \{1 - [(DO \text{ de células - alvo e células efetoras} - DO \text{ de células efetoras}) / (DO \text{ de células-alvo})]\}$$

[0029] 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 usados 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.

[0030] 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 µL de fosfato de histamina a 0,0275 g/L, Greer, Lenoir, NC), ou PBS (100 µL 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.

[0031] Métodos adicionais para a determinação do efeito das bactérias *Lactobacilli* da presente invenção são descritos em US6.133.323 e US6.310.090.

[0032] 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.

[0033] Os *Lactobacilli* da presente invenção também podem ser usados 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 manutenção. Esses hormônios são reconhecidos biomarcadores de estresse, e podem ser prontamente medidos mediante o uso de técnicas conhecidas pelos versados na técnica.

[0034] Além disso, a manutenção ou a melhoria da saúde da pele e/ou da pelagem de animais de estimação, inclusive 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:

[0035] a) Índice de queda de pelos: Um índice de queda de pelos é atribuído a cada indivíduo de teste mediante a coleta de pelos produzidos durante uma

sessão de escovação padronizada. Os pelos são retidos e pesados, e os indivíduos de controle e de teste são comparados.

[0036] b) Avaliações subjetivas de pele/pelagem: Examinadores treinados avaliam subjetivamente as condições de pele e pelagem, mediante a determinação de queda de pelos, caspa, brilho, uniformidade, maciez e densidade.

[0037] 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.

[0038] 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

[0039] Estas fezes são duras e não aderem a superfícies. Estas fezes rolam quando empurradas. Não são produzidas endentações quando estas fezes são apanhadas. Estas fezes são frequentemente defecadas em grupos de unidades individuais, em vez de uma unidade completa. Estas fezes mantêm seu formato original após a coleta.

Pontuação: 4 Firme (fezes ideias)

[0040] 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 frequentemente defecadas como uma só
5 unidade. Estas fezes mantem seu formato original após a coleta.

Pontuação: 3 Mole, com formato

[0041] Estas fezes são moles, no entanto têm formatos definidos. Estas fezes se rompem facilmente e, definitivamente, deixam resíduos sobre superfícies e luvas. Estas fezes frequentemente perdem seu formato original após a coleta. Estas fezes
10 frequentemente se apresentam em conjunto com outra pontuação, mas podem compreender a totalidade da amostra.

Pontuação: 2 Mole, sem formato

[0042] Estas fezes são moles e não apresentam formato cilíndrico. O formato frequentemente associado a um "tipo 2" é aquele conhecido como "excremento de
15 vaca". Estas fezes perdem o formato original quando coletadas, e definitivamente deixam resíduos sobre superfícies e luvas. Estas fezes frequentemente 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

20 [0043] As fezes com esta pontuação sempre parecerão líquidas, e pode ou não haver a presença de matéria particulada. Estas fezes são frequentemente defecadas em grupos de montes, em vez de uma unidade completa. Muco está frequentemente 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
25 se espalhar por uma área de vários centímetros.

[0044] Além disso, são registradas outras observações, inclusive: presença de sangue, de objetos estranhos ou de muco nas fezes.

[0045] Além disso, o tratamento de infecção gastrointestinal em animais de estimação pode compreender a otimização da ecologia microbiana dos mesmos. A
30 otimização da ecologia microbiana em animais de estimação compreende, de

preferência, a 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
5 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.

[0046] O método de uso das bactérias da presente invenção pode incluir,
10 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 a teoria, acredita-se que
15 as bactérias *Lactobacilli* da presente invenção são uteis 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,
20 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 a Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

25 [0047] Os *Lactobacilli* da presente invenção podem ser usados 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
30 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.

10 [0048] De preferência, os métodos da presente invenção compreendem a administração de *Lactobacilli* selecionados das espécies compreendendo *Lactobacilli salivarius*, *Lactobacilli casei*, ou *Lactobacilli murinus*.

[0049] Alguns exemplos não-limitadores de *Lactobacilli* probióticos obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos e úteis à presente invenção são descritos com mais detalhes em WO 15 98/35014, WO 03/010298 e WO 03/010299.

[0050] Em WO 98/35014 são descritos *Lactobacilli salivarius* probióticos, isolados a partir de trato gastrointestinal humano ressecado e lavado. Essas bactérias estão depositadas no NCIMB sob os números de depósito 40829 e 40830.

20 [0051] Em WO 03/010298 são descritos outros exemplos de *Lactobacilli salivarius* probióticos, isolados a partir de trato gastrointestinal humano ressecado e lavado. Essas bactérias estão depositadas no NCIMB sob os números de depósito 41044, 41045, 41047, 41093 e 41094.

[0052] Em WO 03/010299 são descritos outros exemplos de *Lactobacilli casei* 25 probióticos, isolados a partir de trato gastrointestinal humano ressecado e lavado. Essas bactérias estão depositadas no NCIMB sob os números de depósito 41043, 41046, 41095, 41096 e 41097.

[0053] Exemplos adicionais incluem cepas de *Lactobacilli* obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, tendo atividade 30 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 liberados no meio de fermentação, ou podem ser armazenados no interior do microorganismo. Para usa 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.

[0054] Descobriu-se que as bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli*, obteníveis mediante isolamento direto a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos, são aderentes ao trato GI em seguida a 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 a teoria, acredita-se que os *Lactobacilli* 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, pelos *Lactobacilli* probióticos 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 as bactérias probióticas, isto é, a prevenção da aderência de patógenos aos intestinos, mediante oclusão e competição por nutrientes, faz dos *Lactobacilli* da presente invenção organismos probióticos altamente eficazes.

5 [0055] Os *Lactobacilli* da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, apresentam atividade microbicida *in vitro* contra diversas cepas/espécies bacterianas patogênicas. Sem se ater a 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
10 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.

15 [0056] Sem se ater a teoria, acredita-se que a atividade microbicida das bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção pode ser o resultado de várias ações diferentes realizadas pelas ditas bactérias. 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
20 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 os *Lactobacilli* da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, embora exerçam algum efeito probiótico
25 mediante oclusão se fornecidos sob uma forma viável, possam oferecer um efeito probiótico substancial em suas formas tanto viáveis como não-viáveis devido a 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
30 desejável, já que as 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.

[0057] De preferência, as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção são capazes de manter sua viabilidade após trânsito pelo trato GI. Isso e
5 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 colonização dos intestinos pelas bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção é desejável para proporcionar ao hospedeiro benefícios
10 probióticos de longo prazo. A dosagem oral de células não-viáveis ou isolados purificados das mesmas induz benefícios temporários, mas, 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
15 células viáveis capazes de sobreviver ao trânsito gástrico em sua forma viável e, subsequentemente, colonizar os intestinos mediante adesão a mucosa intestinal e proliferação sobre a mesma, são capazes de proporcionar de maneira contínua os efeitos probióticos *in situ*.

[0058] Portanto, é preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico da
20 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
25 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.

30 [0059] Além disso, e preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico

da presente invenção apresentem uma proliferação de ao menos 66% quando na presença de ao menos 0,5 % de sais biliares de porco. A proliferação, para uso na presente invenção, e 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. Com mais preferência ainda, as bactérias da presente invenção apresentam uma proliferação de 100% na presença de 0,5% 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 viabilidade na presença de ao menos 0,5% de sais biliares de porco, sejam capazes de sobreviver as 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.

[0060] Além disso, é preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico 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 0,2% do número total de bactérias formadoras de ácido láctico coincubadas com as células epiteliais *in vitro* aderem as ditas células. Com mais preferência, ao menos 0,3% das células bacterianas coincubadas aderem às células *in vitro*. Sem se ater a 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*.

[0061] De preferência, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção pertence a uma espécie selecionada do grupo consistindo em *Lactobacillus murinus/ruminus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, ou combinações dessas cepas, com mais preferência *Lactobacillus murinus/ruminus*.

[0062] A sequência de polinucleotÍdeo intergênico 16s - 23s é conhecida pelos versados na técnica como a sequência de DNA, no genoma bacteriano, que pode ser usada para identificar diferentes espécies e cepas de bactérias. Essa sequência de

polinucleotídeo intergênico pode ser determinada pelo método detalhado abaixo.

[0063] As colônias de *Lactobacilli* 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

5

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' (SEQ. ID N° 5) e IGS R: 5' - CTGGTGCCAAGGCATCCA - 3' (SEQ. ID N° 6). 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

10

reação de PCR continha 5 µL de DNA, tampão para PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mM de dNTPs (Roche, Reino Unido), 0,4 µ de iniciador M IG5 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 sequenciado para as 4 cepas de *Lactobacilli* caninos, utilizando métodos conhecidos pelos versados na técnica.

15

[0064] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli* tem uma sequência de polinucleotídeo intergênico 16s - 23s apresenta ao menos 88%, de preferência ao menos 90% e, com mais preferência, ao menos 95% 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 e a cepa *Lactobacilli murinus/ruminus* NCMB 41194 (AHC1222), ou uma mutação da mesma.

25

[0065] Em outra modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de

30

bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli* tem uma sequência de polinucleotídeo intergênico 16s - 23s que apresenta ao menos 88%, de preferência ao menos 90% e, com mais preferência, ao menos 95% de homologia com a sequência de polinucleotídeo de acordo com a SEQ. ID N° 2. Com mais preferência, a cepa de

5 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° 2. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção e a cepa *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41196 (AHC5323), ou uma mutação da mesma.

10 [0066] Em outra modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli* tem uma sequência de polinucleotídeo intergênico 16s - 23s que apresenta ao menos 88%, de preferência ao menos 90% e, com mais preferência, ao menos 95% de homologia com a sequência de polinucleotídeo de acordo com a SEQ. ID N° 3. Com mais preferência, a cepa de

15 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° 3. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção e a cepa *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB .41197 (AHC6331), ou uma mutação da mesma.

20 [0067] Em outra modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli* tem uma sequência de polinucleotídeo intergênico 16s-23s que apresenta ao menos 88%, de preferência ao menos 90% e, com mais preferência, ao menos 95% de homologia com a sequência de polinucleotídeo de acordo com a SEQ. ID N° 4. Com mais preferência, a cepa de

25 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° 4. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção e a cepa *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41195 (AHC3133), ou uma mutação da mesma.

30 [0068] Em seguida ao sequenciamento, as sequências obtidas para as quatro

cepas depositadas foram comparadas a base de dados de sequências "BLAST", disponível online em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para verificação de homologia com outras sequencias bacterianas 16s - 23s depositadas. As igualdades mais próximas para AHC 1222, 3133, 5323 e 6331 (NCIMB 41194, 41195, 41196 e 5 41197, respectivamente) foram encontradas na cepa *Lactobacillus ruminis* AF080103. No entanto, existem várias diferenças importantes entre as cepas AHC e a cepa de *Lactobacillus ruminis* na região do espaçador, resultando em um grau de homologia de 87%, e uma pontuação BLAST de ao menos 170.

[0069] O método de uso das bactérias *Lactobacilli* da presente invenção tipicamente 10 envolve o consumo oral pelo animal. O consumo oral pode ocorrer como parte da ingestão dietária normal, ou sob a forma de um suplemento a 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. Os *Lactobacilli* podem ser administrados ao animal de estimação em uma quantidade 15 terapêuticamente eficaz para manter ou melhorar a saúde do animal, de preferência um animal de estimação. Para uso na presente invenção, o termo "quantidade terapêuticamente eficaz", no que se refere as 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, porem baixa o 20 suficiente para evitar efeitos adversos como toxicidade, irritação ou resposta alérgica, proporcionalmente a uma relação risco/benefício razoável quando usada do modo indicado na presente invenção. A "quantidade terapêuticamente eficaz" específica irá variar conforme fatores como a condição específica sendo tratada, as condições físicas do usuário, a duração do tratamento, a natureza da terapia simultânea (caso 25 haja) , a forma de dosagem específica a ser utilizada, o veículo empregado, a solubilidade da forma de dosagem, e o regime de dosagem específico.

[0070] De preferência, as bactérias formadoras de ácido 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 30 pode conter, de preferência, ao menos 0,001% de *Lactobacilli* na faixa de 1,0E+04 a

1,0E+12 ufc/g, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos. As bactérias do tipo *Lactobacilli* podem ser administradas ao animal em sua forma viável, sob a forma de células mortas, ou como destilados, isolados ou outras frações dos produtos de fermentação das
5 bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção, ou qualquer mistura desses materiais.

[0071] De preferência, as bactérias *Lactobacilli*, 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 acima, a composição pode ser
10 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 a base de grãos processados, um alimento úmido para animais, iogurtes, molhos, itens mascaveis, petiscos e similares.

[0072] Essas composições podem compreender outros componentes. Outros componentes são benéficos para inclusão nas composições usadas na presente invenção, mas são 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
20 matéria seca, de cerca de 20% a cerca de 50% e, de 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 proteínas vegetais como feijão soja, caroço de algodão e amendoim, e
25 proteínas animais como caseína, albumina e tecido cárneo. Alguns exemplos, não-limitadores de tecido cárneo útil a 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 extraídas de fontes microbianas,
30 como levedura.

[0073] 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 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 W099/51108.

[0074] 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 seco e outros subprodutos lácteos.

[0075] 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, 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 a Orafiti 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

contem 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 frutooligossacarídeo como aquele obtido junto a Orafiti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, sob a marca registrada "Raftilose". Por exemplo, a inulina pode ser 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.

[0076] Para alimentos secos para animal de estimação, um processo adequado á 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 Europeia N° 0850569. Se for usado um microorganismo probiótico, e melhor que este seja aplicado como um revestimento ou um recheio no alimento seco para animais de estimação. Um processo adequado e descrito na publicação de patente europeia número EP0862863.

[0077] 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.

[0078] Em outra modalidade, as composições de suplemento como biscoitos, itens mascaveis 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.

[0079] 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.

[0080] O óleo de borragem, o óleo de semente de groselha negra e o óleo de primula 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 pode ser fornecido de diversas formas adequadas, por exemplo como sulfato de zinco ou oxido 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, como uma fonte de prebiótico, com um óleo rico em ácido linoleico, como o óleo de soja, proporciona benefícios inesperados, que sugerem um efeito sinérgico.

[0081] Nos casos em que a composição está sob a forma de um molho, esta compreende, de preferência, ao menos 10% de 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 cerca de 1% a cerca de 5% de fibra.

[0082] Alguns outros exemplos não-limitadores de suplementos adequados ao uso na presente invenção incluem pós, suspensões de óleo, suspensões a base de leite e queijos, bem como pílulas ou cápsulas. Nos casos em que a 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 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 a base de iogurte podem compreender de cerca de 1% a cerca de 5% de proteína, de cerca de 10% a cerca de 20% de prebiótico *Lactobacilli murinus*, usado de acordo com a 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 NCIMB 41096 (1E10)	4	5	6

ufc/g)			
--------	--	--	--

[0083] Os Exemplos de 8 a 10 são exemplos de composições de suplemento à base de iogurte compreendendo probiótico *Lactobacilli murinus*, usado de acordo com a presente invenção.

Ingrediente	Porcentagem, com base no peso		
	Ex.5	Ex.6	Ex.7
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 NCIMB 41047 (1E10 ufc/g)	4	5	6

[0084] Embora modalidades particulares da presente invenção tenham sido
5 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 reivindicações anexas todas essas alterações e modificações que se enquadram no escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição compreendendo uma cepa probiótica de *Lactobacilli*, CARACTERIZADO pelo dito *Lactobacilli* probiótico ser da espécie *Lactobacillus murinus*; a cepa selecionada do grupo consistindo de *Lactobacillus murinus* NCIMB 41194 (AHC1222); *Lactobacillus murinus* NCIMB 41195 (AHC 3133), *Lactobacillus murinus* NCIMB 41196 (AHC 5323); *Lactobacillus murinus* NCIMB 41197 (AHC6331), obténivel mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal ressecado e lavado de mamíferos, para a fabricação de um medicamento para tratamento de um animal de estimação, sendo o dito tratamento selecionado dentre: regulação do sistema imune de um animal de estimação, a dita regulação compreendendo tratar ou prevenir doença autoimune em um animal de estimação, tratar ou impedir a inflamação em um animal de estimação ou misturas das mesmas, manutenção ou melhoria da saúde da pele e/ou da pelagem de um animal de estimação, compreendendo tratar ou prevenir doença atópica da pele em animais de estimação, prevenindo perda de peso durante e após infecção em um animal de estimação, prevenção ou tratamento de infecções do trato gastrointestinal de um animal de estimação ou misturas das mesmas, em que o dito animal de estimação é selecionado do grupo consistindo de caninos e felinos.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita cepa probiótica de *Lactobacilli* é isolada a partir de tecido gastrointestinal ressecado e lavado obtido de seres humanos, cães ou gatos.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de prevenir ou tratar infecções do trato gastrointestinal, sendo que a dita prevenção ou tratamento compreende a redução do número de bactérias patogênicas encontradas nas fezes do dito animal de estimação, ou combinações desses itens.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas bactérias patogênicas são selecionadas a partir do grupo consistindo em *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella* e combinações desses itens.