



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **330198**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20023434	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.12.28 PCT/EP2000/13374
(22)	Inng.dag	2002.07.17	(85)	Videreføringsdag	2002.07.17
(24)	Løpedag	2000.12.28	(30)	Prioritet	2000.01.18, EP, 00200179
(41)	Alm.tilgj	2002.08.20			
(45)	Meddelt	2011.03.07			

(73)	Innehaver	Société des Produits Nestlé SA, P.O. Box 353, CH-1800 VEVEY, Sveits Irène Corthesy-Theulaz, Chemin du Polny 34 C, CH-1066 Epalinges, Sveits Olivier Ballevre, Route de Cojonnex 16B, CH-1000 LAUSANNE, Sveits Marc Yves Adolphe Enslin, Chemin de la Gottettaz 3, CH-1000 Lausanne, Sveits
(72)	Oppfinner	
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anvendelse av melkesyrebakteriestamme og næringssammensetning for kjæledyr.
(56)	Anførte publikasjoner	EP 862863 A2, EP 577903 A1
(57)	Sammendrag	

Anvendelse av minst én stamme av melkesyrebakterier og/eller dens metabolitter eller et medium fermentert av minst én melkesyrebakterie som er isolert og selektert for sin evne til å vise en sterk antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro for preparering av en sammensetning som er ment for profylakse eller behandling av forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjon i kjæledyr og dyrematsammensetninger som inneholder det samme.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører anvendelse av en isolert stamme av melkesyrebakterier for fremstilling av en sammensetning som er ment for profylakse eller behandling av forstyrrelser relatert til infeksjon av *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-infeksjon i kjæledyr. Oppfinnelsen vedrører også en næringssammensetning for
 5 kjæledyr.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Det er kjent at i mennesker kan infeksjoner med den patogene *Helicobacter pylori*
 10 forårsake gastritt, og føre til sår sykdom og magetumorer. Fremgangsmåtene for behandling er flere. Det er vist tidligere i EP 577903 (Nestlé) at melkesyrebakterier er i stand til å hemme *Helicobacter pylori* både in vitro og in vivo.

EP 862863 beskriver fremstillingen av cerealieprodukter inneholdende probiotiske
 15 bestanddeler. Selv om det i denne publikasjonen erkjennes at *Helicobacter pylori* kan finnes i tarmene av en vert, er det også angitt at andre patogene bakterier kan være tilstede, så som for eksempel *Clostridium perfringens*.

Husdyr-kjøttetere, slik som hunder og katter, blir praktisk talt alle infisert med andre
 20 sorter av gastriske helikobaktere. De fleste av dem kan ikke dyrkes in vitro, men morfologisk ligner de *H. heilmannii*. *H. felis* ble også isolert fra mageslimhinner hos katt og nylig ble to nye helikobaktersorter, kalt *H. bizzozeronii* og *H. salomonis*, isolert fra hunder. Imidlertid tillater ikke den eneste morfologiske analysen å diskriminere mellom disse helikobakterspeciene og de blir gruppert under benevnelsen av "gastriske
 25 helikobakterlignende organismer" (GHLOs).

GHLOer lager kolonier i hulrom og/eller kroppen hos kjæledyr, mens *H. pylori* lager kolonier hovedsakelig i kroppen. GHLO organismer som danner kolonier er lokalisert dypt i fundusdelen av mage-lymfekjertler og blir av og til funnet i peritalcelle
 30 canaliculus i magesekken så vel som i pitsene og mageslimhinnen, sammenlignet med *H. pylori* som er kjent som en ikke invasiv bakterie. (Dunn et al, 1997: "Hp er lokalisert i slimet som sitter på overflateepiteliet finnes ofte dypt innen cryptene"..)

Kontamineringen av katte- og hundemage av helikobakterspecies blir sett på som en
 35 viktig risikofaktor for å utvikle milde til moderate gastritter. Inflammasjonen som observeres er vanligvis mindre alvorlig enn den som finner sted i mennesker som er

infisert med *H. pylori*. Mer alvorlige lesjoner, slik som magesår, lymfomer og cancere kan observeres, men patogenisiteten til GHLOer er langt fra å være klarlagt.

Ikke desto mindre blir det å kontrollere infeksjonen av GHLOer i katt og hund til et lavt nivå sett på av veterinærer som gunstig. Siden det ikke er en fullt anerkjent sykdom som krever medikamentterapi, er et næringsprodukt som inneholder en aktiv ingrediens som er i stand til å minimalisere GHLO infeksjonen i katter og hunder meget ønskelig.

Oppsummering av oppfinnelsen

10

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører således anvendelse av minst en stamme av melkesyrebakterie og/eller dens metabolitter eller et medium fermentert av minst én melkesyrebakterie som er blitt isolert og selektert for sin evne til å vise antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro, for fremstilling av en sammensetning som er ment for profylakse eller behandling av forstyrrelser relatert til *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-infeksjon i kjæledyr.

I en foretrukket utførelsesform anvendes melkesyrebakterien i form av et fermentert medium av nevnte melkesyrebakterie, eller en subfraksjon av kulturmediet fermentert av melkesyrebakterien.

Melkesyrebakteriestammen kan selekteres fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

I en foretrukket utførelsesform blir melkesyrebakteriestammen selektert fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

35

Oppfinnelsen kan finne anvendelse i forbindelse med en fremgangsmåte for behandling og for profylakse av forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjon i kjæledyr, ved å tilføre til

et kjæledyr en sammensetning som inneholder minst én stamme av melkesyrebakterier og/eller dets metabolitter eller et medium fermentert av minst én melkesyrebakterie som er isolert og selektert for sin evne til å vise en sterk antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro.

5

En ytterligere gjenstand for oppfinnelsen er næringssammensetning for kjæledyr for profylakse eller behandling av ikke-*Helicobacter pylori* gastriske *Helicobacter*-lignende lidelser kjæledyr, som inneholder minst én isolert stamme av melkesyrebakterie og/eller dens metabolitter eller dens fermenterte vekstmedium, hvor
 10 nevnte melkesyrebakterie er isolert og selektert ut fra sin evne til å vise antihelikobakter baktericidisk aktivitet in vitro, assosiert med en spiselig bærer eller en farmasøytisk matriks, hvor melkesyrebakteriestammen er selektert fra gruppen som består av *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*,
 15 *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*

Denne næringssammensetningen er i stand til å redusere GHLO-infeksjon i katter og hunder slik at GHLO-mengden og ureaseaktiviteten blir redusert minst 0,5 grader i fundus og minst 0,5 grader i antrum.

20

Effekten av sammensetningen på kronisk gastritt ble også evaluert ved cytologisk undersøkelse av biopsi på tynne seksjoner. Den kan indusere en regresjon av kronisk fundusgastritt, med en gjennomsnittlig regresjon av graden av mageinflammasjon (gradert fra 0 til 3) på minst 0,5.

25

Denne næringssammensetningen kan videre indusere en signifikant reduksjon av pustlukter som er korrelert med nivåene av infeksjon av GHLOer.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

30

Innen følgende beskrivelse definerer uttrykket "GHLOer" "Gastric Helicobacter-like-organisms". Arter av *Helicobacter* slik som *Helicobacter felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeroni* og *H. salomonis*, for eksempel, som er vist å danne kolonier i mageslim hos kjæledyr, er gruppert under denne benevnningen.

35

Videre omfatter uttrykkene "GHLO forstyrrelser", alle forstyrrelser som direkte kan affisere gastrointestinalkanalen hos kjæledyr, men også sekundære forstyrrelser, slik som for eksempel symptomer med dårlig ånde.

- 5 Endelig betegner "NCC" Nestlé Culture Collection (Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Sveits).

Med hensyn til den første gjenstanden for den foreliggende oppfinnelse, blir anvendelsen av minst én melkesyrebakteriestamme og/eller dens metabolitter eller et
10 medium fermentert av minst én stamme av melkesyrebakterier som er i stand til å vise en sterk antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro, for fremstilling av en sammensetning som er ment for profylakse eller behandling av forstyrrelser relatert til ikke-*Helicobacter pylori* GHLO-infeksjon i kjæledyr, berørt.

- 15 Disse stammene er selektert blant melkesyrebakteriestammer med hensyn til deres teknologiske og fysiologiske parametere, og spesielt for deres gode vekstkarakteristikker, minst 5×10^8 bakterier pr. ml, helst $10^6 - 10^{10}$ bakterier pr. ml, aller helst $10^9 - 10^{10}$ bakterier pr. ml og deres evne til å vise en sterk antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro.

20

- I en ønsket utførelsesform blir melkesyrebakteriestammen selekteres fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*
25 *rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

- Melkesyrebakteriestammen blir helst valgt fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225), *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum*
30 MCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

- 35 Blant de forskjellige stammene selektert i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen, ble de følgende stammene deponert i henhold til Budapestavtalen ved Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur

Roux, 75724 Paris Cedex 15, Frankrike, *Lactobacillus johnsonii* (NCC 533) den 30.06.92 under referansen CNCM I-1225, *Lactobacillus paracasei* (NCC 2461) den 12.01.99 under referansen CNCM-I 2116 *Lactobacillus fermentum* NCC 2581, NCC 2592, NCC 2613, *Lactobacillus animalis* NCC 2603, *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 den 19.04.00 under referansene henholdsvis (CNCM I-2448), (CNCM I-2450), (CNCM I-2452) (CNCM I-2451), (CNCM I-2449), (CNCM I-2453), *Bifidobacterium sp.* NCC 2627, *Bifidobacterium sp.* NCC 2657, *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536). Stammen av *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536) er tilveiebrakt av Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Danmark).

BIOKJEMISK KARAKTERISERING AV DE UTVALGTE STAMMENE

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

- Gram positiv mikroorganisme, ikke-bevegelig, danner ikke sporer
- Ganske korte og tykke staver
- Mikroaerofil mikroorganisme med homofermentativ metabolisme, produksjon av L(+) og D(-) melkesyre.
- 20 - Katalase (-), produksjon av CO₂ (-), hydrolyse av arginin (-)
- Fermentering av sukker: Amygdalin (+), arabinose (-), cellobiose (+), esculine (+), fruktose (+), galaktose (-), glukose (+), laktose (+), maltose (+/-), mannitol (-), mannose (+), melibiose (-), raffinose (+), ribose (-), salicin (+), sukrose (+), tréhalose (+).

25

***Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116**

- Gram positiv
- Katalase negativ
- 30 - NH₃ form arginin negativ,
- CO₂ produksjon negativ
- Produksjon av L(+) melkesyre,
- Vekst i nærvær av gallesalter i en konsentrasjon på opp til ca. 0,4%.

35 Den isolerte stammen av melkesyrebakterier og/eller dens fermenterte medium av kultur kan anvendes for fremstilling av sammensetninger ment for å forbedre kjæledyrhelsen,

og spesielt for forebyggelse eller behandling av sykdommer relatert til GHLO-infeksjon i kjæledyr.

De kan også anvendes i forbindelse med andre forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjon, slik som dårlig ånde. Faktisk kan nærværet av GHLOer i katte- og hundemage ha en klar innflytelse på åndelukten ved at det produseres store mengder av ammoniakk fra urea. Denne ammoniakken kan vise seg i pust etter raping. Dårlig ånde kan også relatere seg til nærværet av GHLOer i magen ved produksjon av flyktige sulfidforbindelser. Fortrinnsvis er metabolittene produsert av nevnte isolerte stammer ment for å redusere dårlig åndelukt og å gjøre kjæledyrånde frisk.

En subfraksjon av det dyrkede mediet som fermenteres av den isolerte stammen av melkesyrebakterien kan også anvendes.

Melkesyrebakteriestammen i henhold til oppfinnelsen kan anvendes i sin viable eller inaktiverte form.

I en foretrukket utførelsesform blir melkesyrebakteriestammen anvendt i nærvær av dens fermenterte vekstmedium. Det nevnte mediet kan enten steriliseres alene eller med en mat, støpt eller spraytørket, avkjølt eller holdbart.

Melkesyrebakterien eller det ekvivalente fermenteringsmediet kan anvendes slik at mengden som er tilgjengelig for kjæledyret kan korrespondere til ca. $10^3 - 10^{14}$ cfu pr. dag. Denne mengden avhenger av dyrevekten, og er helst ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag for hunder og $10^7 - 10^{11}$ cfu/dag for katter.

Som nevnt kan oppfinnelsen anvendes i forbindelse med en fremgangsmåte for behandling eller for profylakse av forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjoner i kjæledyr, som omfatter å tilføre til et kjæledyr en sammensetning som inneholder minst én stamme av melkesyrebakterier og/eller et medium fermentert av minst én melkesyrebakterie som har de ovennevnte trekkene. Mengden som er tilgjengelig for kjæledyret, kan korrespondere til ca. $10^3 - 10^{14}$ cfu/dag, og den er helst ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag for hunder og $10^7 - 10^{11}$ cfu/dag for katter.

Den andre gjenstanden for den foreliggende oppfinnelsen dreier seg, som nevnt fullstendig ovenfor, om en næringssammensetning som inneholder minst én isolert stamme av melkesyrebakterier og/eller dens metabolitter eller fermenterte

vekstmedium. Nevnte melkesyrebakterier har de ovennevnte trekkene, assosiert med en spiselig bærer eller en farmasøytisk matriks.

Minst én bakteriell stamme som har de ovennevnte trekkene og/eller dets fermenterte medium, kan gis til kjæledyret som et supplement til dets normale diett eller som en komponent av en ernæringsmessig fullstendig dyremat.

Den ernæringsmessige komplette næringssammensetningen ifølge oppfinnelsen kan være i pulver eller tørket form eller et vått, avkjølt eller holdbart kjælenæringsprodukt.

Den kan også være diett supplement for kjæledyr eller farmasøytiske sammensetninger.

Den ernæringsmessig fullstendige sammensetningen kan være i enhver passende form; for eksempel i tørket form, halvvåt form og våt form. Denne dyrenæringen kan produseres på en konvensjonell måte. Bortsett fra bakteriestammene og/eller deres fermenterte medium, kan disse sammensetningene inkludere enhver, eller flere, en stivelseskilde, en proteinkilde og lipidkilde.

Passende stivelseskilder er for eksempel korn eller belgfrukter, slik som mais, ris, hvete, bygg, havre, soya og blandinger av disse.

Egnede proteinkilder kan være selektert fra enhver passende animalsk eller vegetabilsk proteinkilde; for eksempel kjøtt og mel, fjærfemel, fiskemel, soyaproteinkonsentrater, melkeproteiner, gluten og lignende. For eldre dyr er det ønskelig at proteinkilden inneholder et høykvalitetsprotein.

Passende lipidkilder inkluderer kjøtt, dyrefett og vegetabiliske fett.

Valg av stivelse, protein og lipidkilder vil stort sett bestemmes av dyrets ernæringskrav, betraktninger med hensyn til smak og type produkt som skal produseres. For eldre kjæledyr inneholder dyrematen helst forholdsvis mindre fett enn dyremat for yngre kjæledyr. Videre kan stivelseskildene inkludere en eller flere av ris, bygg, hvete og mais.

Videre kan flere andre ingredienser, for eksempel sukker, salt, krydder, smaksstoffer, vitaminer, mineraler, smaksagens, fett og lignende, også inkorporeres i næringssammensetningen hvis det er ønskelig.

For tørket næringssammensetning er trykkoking en passende fremgangsmåte, selv om baking og andre egnede fremgangsmåter kan anvendes. Når den blir trykkokt, blir den tørkede dyrematen vanligvis tilveiebrakt i form av en "godbit". Hvis et prebiotikum
 5 anvendes, kan prebiotikum blandes med de andre ingrediensene til den tørre dyrematen før tillagingen. En passende fremgangsmåte er beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 0850569. Hvis en probiotisk mikroorganisme blir anvendt, blir organismen best belagt på, eller fylt inn i, den tørre dyrematen. En passende fremgangsmåte er beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 0862863.

10

For våt sammensetning kan fremgangsmåtene beskrevet i US patenter 4.781.939 og 5.132.137 anvendes for å produsere simulerte kjøttprodukter. Andre fremgangsmåter for å produsere produkter av typen biter, kan også anvendes; for eksempel å koke i en dampovn. Alternativt kan produkter av type brød produseres ved å emulgere et
 15 passende kjøttmateriale for å produsere kjøttemulsjon, tilsette en passende gelagens, og varme kjøttemulsjonen før den fylles i hermetikkbokser eller andre beholdere.

20

Mengden av prebiotikum i dyremat er helst ca. 20 vekt-%; spesielt ca. 10 vekt-%. For eksempel kan prebiotikum utgjøre 0,1 til 5 vekt-% av dyrematen. For dyremat som
 20 bruker sikori som prebiotikum, kan chikorien inkluderes til å omfatte 0,5 til 10 vekt-% av matblandingen; aller helst 1 til 5 vekt-%.

25

Hvis en probiotisk mikroorganisme anvendes, inneholder dyrefôret helst 10^4 til 10^6 celler av den prebiotiske mikroorganisme pr. gram av dyrematen; helst 10^6 til 10^8 celler
 25 av den prebiotiske mikroorganisme pr. gram. Dyrematen kan inneholde 0,5 til 20 vekt-% av blandingen av den prebiotiske mikroorganisme; helst 1 til 6 vekt-% for eksempel 3 til 6 vekt-%.

30

Næringssammensetningen ifølge oppfinnelsen kan tilsettes andre aktive agenser, slik
 30 som langkjedede fettsyrer. Passende langkjedede fettsyrer inkluderer alfa-linolinsyre, gamma-linolinsyre, linolinsyre, eikosapentanensyre og dokosaheksaensyre. Fiskeoljer er en passende kilde for eikosapentanensyrer og dokosaheksaensyre. Agurkurtolje, solbærfrøolje og kveldsprimulaolje er passende kilder for gamma-linolinsyre. Safrantisteloljer, solsikkeolje, maisolje og soyabønneolje er passende kilder for
 35 linolinsyre.

Hvis det er nødvendig, kan næringssammensetningen supplert med mineraler og vitaminer slik at den er ernæringsmessig fullstendige.

Hvis det er ønskelig, kan bakteriestammen videre være innkapslet: for eksempel i en
5 sukkermatriks, fettmatriks eller polysakkaridmatriks.

Mengde av næringssammensetning som skal konsumeres av kjæledyret for å oppnå en gunstig effekt, vil avhenge av størrelsen av kjæledyret, type kjæledyr, og alder på kjæledyret. Imidlertid vil en mengde næringssammensetning for å tilveiebringe en
10 daglig mengde på ca. $10^3 - 10^{14}$ cfu av minst én melkesyrebakteriestamme og/eller det ekvivalente fermenteringsmediet, vanligvis være adekvat. Helst blir ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag for hunder og $10^7 - 10^{11}$ cfu/dag for katter gitt.

Sammensetningen ifølge oppfinnelsen er spesielt ment for profylakse eller behandling
15 av infeksjoner relatert til GHLO i kjæledyr, og spesielt i gastrointestinalkanalen eller for eksempel i nedre tarmavsnitt hos kjæledyr. Den er også ment for å opprettholde frisk fordøyelsesfunksjon hos kjæledyr og forebygge reinfeksjon av patogene stammer slik som for eksempel GHLOer. Således kan denne sammensetningen også anvendes som adjuvant for en antibioterapi mot angrep av GHLOer.

20 Effekten av sammensetningen ifølge oppfinnelsen på GHLOer ble evaluert med en histologisk undersøkelse av biopsiseksjoner (se eksempel 2). Hvis antall GHLOer pr. seksjon er ingen bakterier (grad "0"); mindre enn 5 bakterier (grad "1"); mellom 5 og 20 bakterier (grad "2") og mer enn 20 bakterier (grad "3"). Denne
25 næringssammensetningen er i stand til å nedsette GHLO-infeksjonen i katter og hunder slik at mengde GHLOer og ureaseaktiviteten i fundus blir redusert med minst 0,5 grad og minst 0,5 grad i antrum.

Effekten av sammensetningen på kronisk gastritt ble også evaluert med cytologisk
30 undersøkelse av tynne biopsiseksjoner. Den histologiske klassifiseringen av kronisk gastritt er:

- grad 0: overflatisk fibrose, 0 neutrofiler, 0 – 10 lymfocytter og plasmaceller, ingen aggregater, normalt epitel;
- 35 - mild kronisk gastritt – grad 1: kronisk overflategastritt, 10 – 15 lymfocytter eller plasmaceller som involverer det overflatiske interstitielle vevet, aggregater <2, normalt epitel,

- moderat kronisk gastritt – grad 2: kronisk interstitiell gastritt, 10 – 50 eller flere lymfocytter eller plasmaceller som involverer den fulle tykkelse av mukosaen, aggregater >3, normalt epitel
- alvorlig kronisk gastritt – grad 3: atrofisk gastritt, 10 – 50 eller flere lymfocytter eller plasmaceller, aggregater >3, glandulære epitelforandringer.

Denne sammensetning kan indusere en reduksjon av kronisk fundusgastritt, med en gjennomsnittlig regresjon av graden av gastrisk inflammasjon på minst ca. 0,5.

- 10 Denne sammensetningen er også vist å indusere en signifikant reduksjon av åndelukter. Derfor kan den anvendes for behandling eller forebyggelse av sekundære forstyrrelser eller forebyggelse av sekundære forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjon, slik som dårlig åndelukt hos kjæledyr.
- 15 Videre kan sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse også forbedre levetiden til hunder.

De følgende eksemplene er gitt for å illustrere foreliggende oppfinnelse. Alle prosentene er gitt i vekt, med mindre noe annet er angitt.

20

Eksempler

Eksempel 1: Seleksjon av bakteriestamme

- 25 For å selektare bakteriestamme ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan kultiverbare GHLOer (10^7 bakterier) inkuberes ved 37°C under 5% CO₂ i 1 – 2 timer i nærvær av seriefortynninger av nevnte bakteriestamme vekstsupernatant (BS) i DMEM. Etter inkubering blir GHLO-BS blandingen sentrifugert ved 12000 g i 3 minutter, pelleten blir så vasket i 1 ml 0,9% NaCl og resuspendert i 500 µl av hurtig ureasetest (Jatrox ®-
- 30 H.p.-test, Procter&Gamble Pharmaceuticals GmbH, Weiterstadt, Tyskland). De kolometriske forandringene, proporsjonalt til ureaseaktivitet, blir bestemt ved fotometrisk analyse ved en optisk tetthet på 550 nm.

- Bakteriell viabilitet blir estimert før og etter inkubering med LS ved å plate ut
- 35 seriefortynninger av GHLO på serumplater (GC agar, Gibco BRL, Paisley, Skottland) supplert med 10% hesteserum, Inotec, og med 1% Isovitale X (Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, MD) og ved å telle kolonidannende enheter (CFU).

Eksempel 2

Effektene av et supplement med fermenteringsmedium fra *Lactobacillus* på

5 *Helicobacter spp.* infeksjon i hunder blir studert.

MATERIALER OG FREMGANGSMÅTER

Dyr

10

Den etiske komiteen ved Veterinary School of Lyon – Frankrike, godkjente studien. Ni hann-beagler (harehund), som naturlig hadde fått en mageinfeksjon med GHLOer, ble inkludert i studien. Hundene var i vektområdet fra 10 til 14 kg og alder fra 3 til 4 år. Hundene ble holdt i individuelle kenneler med identiske betingelser for hygiene og mat: 15 (Veterinary School of Lyon – Frankrike). Kennelene ble renset og desinfisert daglig.

Hundene ble regelmessig føret kl. 8 om morgenen og de hadde konstant tilgang til vann gjennom hele studien. I løpet av hele studien ble de føret med en spesiell diett: VITALITY ® - Friskies, Frankrike.

20

Ekspérimentell design

Før behandlingen ble mageinfeksjonen med GHLOene stadfestet i de 9 harehundene ved å evaluere identifikasjonen av GHLOene (histobakteriologi), den gastriske ureaseaktiviteten (Jatrox ® test) og tilstedeværelsen av kronisk gastritt (histopatologi) i 25 fundus og/eller antrale biopsier av magen. Alle hundene med GHLO-infeksjoner ble utsatt for en behandling i 13 dager. Deteksjonen av gastrisk infeksjon med GHLO ved disse testene pluss ¹³C-urea pustetesten ble repetert tre ganger: før behandlingen [D₀], ved slutten av behandlingen [D13] og 30 dager etter slutten av behandlingen [D₄₃].

30

Behandling

Behandlingen var komponert av et daglig inntak av et syret melkepreparat fermentert av *L. johnsonii* NCC 533 i 13 dager. Det syrnede melkepreparatet måtte være 35 fullstendig oppspist før den spesifikke dietten (240 g "VITALITY ®/hund).

Evalueringstester

- 5 - Klinisk eksaminering: Under hele studien ble hundene holdt øye med av to veterinærkirurger ved den veterinære skole i Lyon, Frankrike. De kliniske observasjonene måtte nedtegnes i saksrapportform.
- 10 - Gastrisk biopsi: den gastriske endoskopien ble utført under anestesi (ketamin, IMALGENE ®, 5 mg/kg – IM). Hundene fastet i 24 timer. Endoskopien ble utført med et videogastroskop Olympus ® GIFK/XV10. Ved hver

15 evalueringdag ble 12 biopsier tatt fra fundus og antrum. To fundus og antrale biopsier måtte øyeblikkelig anvendes for å måle ureaseaktiviteten av GHLO. Fire fundus og antrale biopsier måtte oppbevares i en "bouin" løsning før de ble brukt til histobakteriologi og histopatologi.
- 20 - Identifisering av GHLOer (histobakteriologi): identifiseringen av GHLOene ble gjort ved en histologisk undersøkelse av biopsiseksjoner. Vevseksjonene ble farget med en Giemsa-type farging og evaluert med lysmikroskopi (x 1000). En semi-kvantitativ evaluering av GHLOene ble gjort ved å ta hensyn til

25 lokaliseringen i magen og dypheten av den ekstracellulære kontamineringen. Hvis antallet av GHLOer pr. seksjon er ingen bakterier (grad "0"); mindre enn 5 bakterier (grad "1"); mellom 5 og 20 bakterier (grad "2") og mer enn 20 bakterier (grad "3"). For hver fundus og antral biopsi, ble to seksjoner gjort, så evaluert og resultatene var gjennomsnittet av to evalueringer (Ref. Willard M.D. Characterization of naturally developing small intestinal bacterial overgrowth in 16 German Shepherd Dogs. *J. Am Vet Med Assoc*, 1994, 204, 1201 – 1206).
- 30 - Gastrisk ureaseaktivitet (Jatrox ® - H.P. test, Procter & Gamble, Germany): Prinsippet for testen er at ureaen i testmediet splittes av ureasen som er tilstede i GHLOene. Stigningen i pH-verdien assosiert med splittingen av ureaen

35 forårsaker en fargeforandring i indikatorendiet (fenolrødt) fra gult til rosa/rødt. Biopsiene ble testet umiddelbart etter deres prøveuttak. Etter introduksjonen av biopsien i indikatorendiet, ble Jatrox ®-testen lest ved 180 minutter i et fotometer med en ultrafiolett detektor som ble innstilt på 550 nm for å lese med en referanse på 650 nm. Ureaseaktiviteten i fundus og antrale biopsier var gjennomsnittet av to optiske målinger.

- ¹³C-urea pustetest: UBT-testen ble realisert 2 timer etter anestesi for endoskopi, slik at denne ikke influerte resultatene av UBT. UBTen ble gjort i fastende hunder, uten anestesi. Ved første gang spiste hundene testmåltid som var halvparten av deres daglige inntak; nemlig 120 g VITALITY ® /hund. Ved en annen gang hadde hundene en oral administrering av 7,5 mg ¹³C-urea/hund (MASS TRACE, Woburn – USA). ¹³CO₂ –pustet-ut-prøver ble skaffet før testmåltidet [TB], så 40 minutter etter administrering av ¹³C-urea [T40]. Etterpå fikk hundene deres andre halvdel av det daglige matinntak. ¹³CO₂-urea-pustet-ut-prøver ble analysert med et gassisotop ratio massespektrometer (FINNIGAN MAT, Bremen – Tyskland). For å standardisere interlaboratorieresultater, ble en analog av internasjonal standard for ¹³C-referanse (Vienna Pee Dee Belemnite eller VPDB) benyttet. Atomprosentoverskuddet for ¹³CO₂ ble definert som forskjellen (deltaverdi, δ) i atomprosent ¹³CO₂ mellom grunnlinjeprøven (prøve før testmåltidet og ¹³C administrering [TB] og prøver skaffet etter 40 minutter [T40] x 1000 (44,45). Resultatene er uttrykt som en overskudd δ¹³CO₂ (δ ‰).
 - Histopatologi (cytologi): histopatologien ble gjort ved cytoloBT-test ved cytologisk eksaminering av biopsi-tynnseksjoner. De merkede seksjonene ble farget med Hematoxylin-Phloxin-Saffron (HPS) og observert ved mikroskopi. Kriteriene for histologiske diagnoser av gastrisk biopsi avhenger av antall av hver celletype som er gjennomsnittet av tre felt som ses på ved x400 forstørrelse og mengde av lymfocytiske aggregater som er antallet i en prøve ved 200 gangers forstørrelse. Den histologiske klassifisering av kronisk gastritt er:
 - **Grad 0:** overflatisk fibrose, 0 neutrofiler, 0 – 10 lymfocytter og plasmaceller, ingen aggregater, normalt epitel;
 - mild kronisk gastritt – **grad 1:** kronisk overflatisk gastritt, 10 – 15 lymfocytter eller plasmaceller som involverer det overflatiske interstitielle vev, aggregater <2, normalt epitel,
 - moderat kronisk gastritt – **grad 2:** kronisk interstitiell gastritt, 10 – 50 eller flere lymfocytter eller plasmaceller som involverer den fulle tykkelsen av mikosaen, aggregater >3, normalt epitel
 - alvorlig kronisk gastritt – **grad 3:** atrofisk gastritt, 10 – 50 eller flere lymfocytter eller plasmaceller, aggregater >3, glandulære epitelforandringer (atrofi).
- (Ref.: P. Lecoindre, M. Chevallier, R. Gillard og F. Daurin – Small intestinal bacterial overgrowth and inflammatory bowel diseases in dogs. Evaluation of the therapeutic

efficacy of Spiramycine-Metronidazole association. Revue Méd. Vét, 1998; 149: 843-852).

Statistiske analyser

5

Hvert resultat av diagnostiske tester var gjennomsnittet av to målinger fra distinkte biopsier. Normaliteten eller ikke-normaliteten av resultatdistribueringen var blitt undersøkt ved Wilk-Shapiro prosedyren.

- 10 Effektene av behandlingen og etter-behandlingen ble evaluert ved å anvende en Wilcoxon Signed Rank test (WSRT) og/eller paret t-test. Alle statistiske beregninger ble utført med et software program (Statistix ®, Excel Microsoft ®). En P-verdi $<0,05$ ble betraktet som signifikant.

15 **RESULTATER**

Kinetikk av mengde gastrisk GHLO belastning: Resultatene er presentert i Tabellene 1 og 2.

20

Tabell 1: Histobakteriologi i fundus

	Fundus/kropper (grad)					
	D₀	D₁₄	D₄₃	D₁₄-D₀	D₄₃-D₁₄	D₄₃-D₀
B01	3	1	2	-2	1	-1
B02	3	2	3	-1	1	0
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	3	2	1	-1	-1	-2
B06	3	0	3	-3	3	0
B07	3	1	2	-2	1	-1
B08	3	3	2	0	-1	-1
B09	3	1	1	-2	0	-2
B10	3	1	3	-2	2	0
Median	3	1	2	-2	1	-1
Nbr.<0	-	-	-	8	3	6
Nbr. = 0	-	-	-	1	1	3
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	0
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	2,9	1,3	1,9	-1,6	0,6	-1
+SEM	0,11	0,29	0,35	0,29	0,47	0,29

	D₁₄ vs D₀	D₄₃ vs D₁₄	D₄₃ vs D₀
WSRT	3	1	2

Tabell 2: Histobakteriologi i antrum

	Antrum (grad)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	1	1	2	0	1	1
B02	1	1	2	0	1	1
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	2	1	2	-1	1	0
B06	2	1	1	-1	0	-1
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	2	0	2	-2	2	0
B10	2	1	1	-1	0	-1
Median	2	1	1	-1	1	0
Nbr.<0	-	-	-	6	1	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	3	4
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	0
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	1,6	0,8	1,3	-0,8	0,6	-0,2
+SEM	0,18	0,15	0,24	0,22	0,29	0,32

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

- 5 Ved slutten av behandlingen ([D₀] til [D₁₄]) var den gjennomsnittlige bakterielle mengde med GHLOer signifikant redusert til grad fra "3" til "1" i fundus (P = 0,0143) og fra "2" til "1" i antrum (P=0,0360).

- 10 Mellom starten av behandlingen og slutten av studien ([D₀] til [D₄₃]) var den gjennomsnittlige bakterielle mengde med GHLOer signifikant redusert fra grad fra "3" til "2" i fundus biopsier (P<0,0360). I antrale biopsier er der ingen signifikant forskjell.

Gastrisk ureaseaktivitet (Jatrox ® test): Resultatene er presentert i Tabellene 3 og 4.

Tabell 3: Gastrisk ureaseaktivitet (Jatrox ® test) i fundus

	Fundus/kropper (optisk tetthet)					
	D₀	D₁₄	D₄₃	D₁₄-D₀	D₄₃-D₁₄	D₄₃-D₀
B01	0,43	0,34	0,43	-0,09	0,09	0,01
B02	0,42	0,39	0,44	-0,04	0,05	0,01
B04	0,54	0,00	0,44	-0,53	0,44	-0,10
B05	0,47	0,31	0,49	-0,16	0,18	0,02
B06	0,44	0,42	0,43	-0,02	0,01	-0,01
B07	0,52	0,40	0,41	-0,11	0,01	-0,11
B08	0,68	0,31	0,40	-0,37	0,09	-0,28
B09	0,45	0,35	0,38	-0,10	0,02	-0,08
B10	0,44	0,3,2	0,43	-0,13	0,01	-0,01
Median	0,46	0,34	0,43	-0,12	0,09	-0,01
Nbr.<0	-	-	-	9	0	6
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	0	9	3
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	0,49	0,32	0,43	-0,17	0,11	-0,06
+SEM	0,03	0,04	0,01	0,06	0,04	0,03

	D₁₄ vs D₀	D₄₃ vs D₁₄	D₄₃ vs D₀
Paret t-test	0,0155	0,0381	0,0921

Tabell 4: Gastrisk ureaseaktivitet (Jatrox ® test) i antrum

	Antrum (optisk tetthet)					
	D ₀	D ₁₄	D ₄₃	D ₁₄ -D ₀	D ₄₃ -D ₁₄	D ₄₃ -D ₀
B01	0,31	0,00	0,00	-0,31	0,00	-0,31
B02	0,33	0,05	0,00	-0,28	-0,05	-0,33
B04	0,41	0,00	0,00	-0,41	0,00	-0,41
B05	0,46	0,00	0,00	-0,46	0,00	-0,46
B06	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
B07	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00
B08	0,00	0,07	0,00	0,07	-0,07	0,00
B09	0,05	0,00	0,00	-0,05	0,00	-0,05
B10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,28	0,00	0,00	-0,28	0,00	-0,28
Nbr.<0	-	-	-	6	2	6
Nbr. = 0	-	-	-	2	7	3
Nbr. > 0	-	-	-	1	0	0
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	0,20	0,01	0,00	-0,19	-0,01	-0,20
+SEM	0,06	0,01	0,00	0,07	0,01	0,06

	D ₁₄ vs D ₀	D ₄₃ vs D ₁₄	D ₄₃ vs D ₀
Paret t-test	0,0197	0,1756	0,0123

- 5 Ved slutten av forandringen ([D₀] til [D₁₄]) ble gjennomsnittene av ureaseaktiviteten minket signifikant med 35% i fundus (P = 0,0155) og 93% i antrum (P = 0,0197).

- 29 dager etter slutten av behandlingen ([D₁₄] til [D₄₃]) økte den gjennomsnittlige ureaseaktiviteten signifikant med 35% i fundusbiopsier (P = 0,0381), men forble fremdeles lavere enn ved starten av behandlingen. Den antrale ureaseaktiviteten var ikke modifisert og forble null.
- 10

Global ureaseaktivitet (¹³C-urea pusttest):

- 15 Resultatene er gitt i Tabell 5.

Tabell 5: Global ureaseaktivitet (¹³C-urea pusttest)

	D₀	D₁₄	D₄₃	D₁₄-D₀	D₄₃-D₁₄	D₄₃-D₀
B01	34	6	55	-28	49	21
B02	18	26	21	8	-5	3
B04	165	24	50	-141	26	-116
B05	15	7	6	-8	-1	-9
B06	18	20	19	2	-1	1
B07	12	13	22	1	9	10
B08	47	17	15	-30	-2	-32
B09	20	10	9	-10	-1	-11
B10	32	9	13	-23	4	-19
Median	20	13	20	-10	-1	-9
Nbr.<0	-	-	-	6	5	5
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	3	4	4
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	40	14	23	-26	9	-17
+SEM	16	3	6	15	6	13

	D₁₄ vs D₀	D₄₃ vs D₁₄	D₄₃ vs D₀
WSRT	0,0494	0,4772	0,3433

- 5 Mellom start og slutt av behandlingen ([D₀] til [D₁₄]) minket gjennomsnittlig ¹³C-anriking av 35% ¹³CO₂-pustet ut signifikant (P = 0,049).

Ved enden av 29 dager etter slutten av behandlingen ([D₁₄] til [D₄₃]) ble ikke den ¹³C-anrikningen av ¹³CO₂-pustet ut signifikant modifisert.

10

Kronisk gastritt (¹³C-urea pustetest):

Resultatene er gitt i Tabellene 6 og 7.

Tabell 6: Histopatologi i fundus

	Fundus/kropper (grad)					
	Innesluttet	D₁₄	D₄₃	D₁₄- Innesl.	D₄₃-D₁₄	D₄₃- Innesl.
B01	2	1	0	-1	-1	-2
B02	1	0	0	-1	0	-1
B04	2	0	0	-2	0	-2
B05	1	1	1	0	0	0
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	0	-1	1	0
B08	1	0	0	-1	0	-1
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	2	0	0	-2	0	-2
Median	1	0	0	-1	0	-1
Nbr.<0	-	-	-	8	1	7
Nbr. = 0	-	-	-	1	7	2
Nbr. > 0	-	-	-	0	1	0
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	1,3	0,2	0,2	-1,1	0,0	-1,1
+SEM	0,17	0,15	0,15	0,20	0,17	0,26

	D₁₄ – Innesl.	D₄₃ - D₁₄	D₄₃ – Innesl.
WSRT	0,0143	0,7500	0,0225

Tabell 7: Histopatologi i antrum

	Antrum (grad)					
	Innesluttet	D₁₄	D₄₃	D₁₄- Innesl.	D₄₃-D₁₄	D₄₃- Innesl.
B01	1	2	0	1	-2	-1
B02	1	0	2	-1	2	1
B04	0	0	0	0	0	0
B05	0	1	1	1	0	1
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	1	1	0	0	-1	-1
Median	1	0	1	0	0	0
Nbr.<0	-	-	-	4	2	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	4	4
Nbr. > 0	-	-	-	2	3	2
N	9	9	9	9	9	9
Gjennomsnitt	0,8	0,6	0,7	-0,2	0,1	-0,1
+SEM	0,15	0,24	0,24	0,28	0,39	0,26

	D₁₄ – innesl.	D₄₃ - D₁₄	D₄₃ – innesl.
WSRD	0,5294	0,8336	0,7874

- 5 På slutten av behandlingen ([innesl.] til [14]) var gjennomsnittlig kronisk gastritt signifikant redusert i grad fra "1" til "0" i fundus (P=0,0143). Denne nedgangen ble opprettholdt til slutten av studien. Det ble ikke vist noen signifikant modifisering av gjennomsnittlig grad i antralbiopsier.

KONKLUSJON

	BEHANDLING ([D₁₄] vs [D₀]) <i>Spesifikk diett</i> <i>+ L. johnsonii NCC 533</i> <i>fermentert melkepreparat</i>		ETTERBEHANDLING ([D₄₃] vs [D₁₄]) <i>Spesifikk diett</i>	
	FUNDUS	ANTRUM	FUNDUS	ANTRUM
GHLOer ^{(2)-a}	(-) *	(-) *	ns	ns
Ureaseaktivitet ^{(1)-b}	(-) *	(-) *	(+)*	Ns
Ureaseaktivitet ^{(2)-c}	(-) *		ns	

	([D ₁₄] vs Inneslutning)		([D ₄₃] vs [D ₁₄])	
Kronisk gastritt ^{(2)-d}	(-) *	ns	ns	ns

5

⁽¹⁾ Paret t-test; ⁽²⁾ Wilcoxon Signed Rank test – (-) (+) negativ eller positiv variasjon -

P < 0,05 – ^a Histobakteriologi – ^b Jatrox ® test ^{c13}C-urea pustetest – ^d histopatologi

10 I hunder som har en gastrisk GHLO-infeksjon med kronisk gastritt, var fortæringen av et syrnet melkepreparat fermentert av *L. johnsonii* NCC 533 i stand til å oppnå:

- i fundus og i antrum, en signifikant nedgang i GHLO mengde og ureaseaktivitet og regresjonen av kronisk gastritt under behandlingen,
- 15 - i fundus, en signifikant regresjon av kronisk gastritt som ble opprettholdt etter slutten av behandlingen,
- ingen bivirkning.

20 **Eksempel 3: Antihelikobakteregenskaper tilstede i kultursupernatantene av forskjellige Lactobacillistammer.**

In-Vitro anti-GHLO-egenskapene til vekstkultursupernatantene av Lactobacilli av de isolerte stammene: NCC 533, NCC 2583 og NCC 2628 ble undersøkt med hemming av ureaseaktivitet.

25

H. bizzozeronii og *H. Salomonis* ble dyrket i Columbia agar – 5% saueblod. *H. felis* ble dyrket på hjerne-hjerte-infusjon (BHI) agar som inneholdt 3 g/l gjærekstrakt og 10% saueblod. Alle *Helicobacterspeciene* ble holdt i en mikroaerofil atmosfære (85% N₂/10% CO₂/5% O₂) ved 37°C i 48 timer. Bakteriene ble høstet i BHI buljong supplert med 2,5 g/l gjærekstrakt. Antall bakterier ble estimert ved å måle den optiske tettheten ved 600 nm (1 OD₆₀₀ = 10⁸ bakterier/ml).

Kultursupernatanter, rene eller forhåndsfortynnete i det passende mediet, ble tilslutt fortynnet 1:2 i DMEM medium. Etter å ha justert pH til 4,2, ble prøvene sterilisert ved filtrering gjennom 0,2 µm. Ekvivalenten med 1 x 10⁷ *H. pylori* ble tilsatt til rørene som inneholdt 500 µl av forskjellige prøver og rørene ble videre holdt i 1 time ved 37°C i en celleinkubator (5% CO₂). Bakterier ble høstet ved sentrifugering. Bakteriepelletene ble vasket en gang i 0,9% NaCl og resuspendert i 250 µl av ureasetestreagens (Jatrox ®-H.p.-test; Procter & Gamble Pharmaceutical). Etter en tilleggsinkubering på 1 time ved 37°C, ble de kolorimetriske forandringene, proporsjonal med ureaseaktivitet, bestemt ved spektrofotometri ved en optisk tetthet (OD) på 550 nm.

Fermentert supernatantpreparasjon

Lactobacilli fra Nestlé kultursamlingen kalt NCC 2583 og NCC 2628 ble dyrket i MRS-Pasteur medium. *E. faecium* SF68 og *S. boulardii* SB20 ble dyrket i henholdsvis HJL og YPF medium. Etter 48 timer ved 37°C, ble bakteriene pelletert og fermenterte supernatanter ble høstet og holdt frosne ved -20°C til videre bruk.

Resultater

Forråd av *Lactobacillus* stammer, NCC 2583 og NCC 2628, av *E. faecium* SF68 (Bioferment) og av *S. boulardii* SB20 (Levucell) ble dyrket i parallell i deres passende medier. De forskjellige fermenterte supernatantene ble testet for deres hemmende kapasitet mot *H. bizzozeronii*, *H. salominis* og *H. felis* ved å bruke ureasetesten. En NCC 533 vekstkultursupernatant ble brukt som en positiv kontroll og kulturmediet alene ble brukt som negative kontroller i analysene.

Tabell 8 viser resultatene av de to separate eksperimentene. Den fermenterte supernatanten av *L. acidophilus* NCC 2628 hemmet totalt ureaseaktiviteten til *H. bizzozeronii*, *H. salominis* og *H. felis*. Den fermenterte supernatanten av *L. rhamnosus*

NCC 2583 hemmet delvis ureaseaktiviteten av *H. bizzozeronii* og *H. salomonis*, men ikke til *H. felis*.

Inkubasjonen av enhver av helikobacterspeciene med *L. johnsonii* NCC 533

- 5 kultursupernatanten førte til en fullstendig hemming av deres ureaseaktivitet. Ingen hemming av ureaseaktiviteten ble observert når de tre helikobakterartene ble inkubert med vekstkultur supernatantene av *E. faecium* SF68, og *S. boulardii* SB20.

Tabell 8: Effekt av forskjellige fermenterte supernatanter på GHLO-ureaseaktivitet

10

Prøve	Sort	Initiell pH	Urease	Aktivitet	(OD _{550 nm})
			<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>
MRS-Pasteur	-	6,6	0,5	0,5	0,5
YPD	-	6,4	0,5	0,6	0,5
CNCM I-1225	<i>L. johnsonii</i>	3,9	0,0	0,0	0,0
			0,0	0,0	0,0
CNCM I-2583	<i>L. rhamnosus</i>	4,1	0,3	0,2	0,5
CNCM I-2628	<i>L. acidophilus</i>	4,1	0,0	0,0	0,0
SF68	<i>E. faecium</i>	5,1	0,5	0,5	0,5
SB20	<i>S. boulardii</i>	4,2	0,5	0,5	0,6

3 Lactobacilli, *E. faecium*, *S. boulardii* ble dyrket i 48 timer i deres passende medier.

Fortynning $\frac{1}{2}$ av de fermenterte kultursupernatantene ble inkubert med 2×10^7

- 15 bakterier/ml. Etter inkubering i 1 time, ble ureaseaktivitetene til *H. bizzozeronii*, *H. felis* og *H. salomonis* testet med spektrofotometri. Total hemming OD_{550 nm} = 0; ingen hemming OD_{550 nm} $\geq 0,5$.

Eksempel 4: Tørr hundemat

20

En matblanding er satt sammen av ca. 58 vekt-% mais, ca. 5,5 vekt-% maisgluten, ca. 22 vekt-% kyllingmel, 2,5% tørket sikori, fermentert melk med stammer av

Lactobacillus johnsonii NCC 533 (CNCM-I 1225) og *Lactobacillus paracasei*

(CNCM-I 2116) slik at den korresponderende mengden for hunden er ca. $10^9 - 10^{12}$

- 25 cfu/dag, og salter, idet vitaminer og mineraler utgjør det gjenværende.

Matblandingen blir matet inn i en forkondisjoneringsinnretning og fuktet. Den fuktede maten ble så matet inn i en trykkoker og gelatinisert. Den gelatiniserte matriksen som forlater trykkokeren, blir tvunget gjennom et stempel og trykt ut. Den uttrykte substansen ble så kuttet i stykker som er passende for å mate hunder, tørket ved ca. 110°C i ca. 20 minutter, og nedkjølt for å danne pelleter.

Denne tørre hundematen er i stand til å forbedre kjæledyrhelsen, og spesielt forebygge forstyrrelser som er relatert til GHLO-infeksjoner i kjæledyr.

10

Eksempel 5

Et forsøk ble utført på et panel med 20 hann-harehunder, som naturlig hadde pådratt seg en mageinfeksjon med GHLOer. Alle hundene ble først gitt gjentatt behandling med antibiotika for å utrydde GHLOene, som omfatter å gi to forskjellige antibiotika (Spiramycine og Metronidazole) og ett antisekretorisk middel som Omeprazole i løpet av 1 uke.

Etter 7 dagers behandling var halvparten av hundene GHLO-negative, dvs. ingen helikobakterorganismer ble oppdaget ved histobakteriologi, ingen gastrisk ureaseaktivitet og en ^{13}C -urea pustetest lavere enn 5% økning over grunnlinjen ved 40 minutter.

Etter behandlingen ble halvparten av hundene matet med Friskies Menu Energy produkt, som er tørket hundemat tilgjengelig på markedet som en kontrollmat. De 10 gjenværende hundene ble matet med en testmat som korresponderer med Friskies Menu Energy produktet, bortsett fra at det inneholder pelleter av tørket melk som var fermentert av stammer av *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) og *Lactobacillus paracasei* (CNCM-I 2116), slik at mengden for en hund er ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag.

^{13}C -urea pustetesten og helikobakterdeteksjonen ved histobakteriologi ble målt igjen 6 uker etter fôring med disse to forskjellige diettene. Resultater viser at 20% av hundene som var fôret med den normale Friskies Menu Energy-produktet, ble positive i 6 uker. Alle hundene som ble fôret med testmaten var negative etter 6 uker.

35

Denne sammensetningen er effektiv som et hjelpemiddel i antibioterapier for å hindre reinfisering av GHLOer.

Eksempel 6: Hermetisert dyremat

5

En blanding ble laget av 73% av fjærfeskrott, griselunger og storfelever (malt), 16% av hvetemel, 2% farge og 9% melk fermentert ved stammer av *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225) og *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536), vitaminer og uorganiske salter. Denne blandingen ble emulgert ved 12°C og sprøytet ut i form av en
 10 pudding som så ble kokt ved en temperatur på 90°C. Den ble nedkjølt til 30°C og kuttet opp i biter. 45% av disse bitene ble blandet med 55% av en saus som var laget av 98% vann, 1% fargestoff og 1% guar gummi. Fortinnede hermetikkbokser blir fylt og sterilisert ved 125°C i 40 min.

15 Denne våte sammensetningen er ment for å forebygge eller behandle forstyrrelser relatert til GHLO-infeksjoner i kjæledyr.

Eksempel 7: Effekt på dårlig pustlukter

20 10 hunder med GHLOer i magen ble føret med den samme dietten som i Eksempel 2 i 2 uker. Pustlukten ble målt i hver av hundene ved begynnelsen og slutten av behandlingen ved hjelp av et halitometer.

Dette eksperimentet viser at å føre hundene med en sammensetning som inneholder en
 25 surnet melkepreparat fermentert av *L. johnsonii* NCC 533 induserer en signifikant reduksjon i åndelukter.

Videre er det en klar korrelasjon mellom nivået av infeksjonen av helikobakter og åndeluktene.

30

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av minst én stamme av melkesyrebakterie og/eller dens metabolitter eller et
 5 medium fermentert av minst én melkesyrebakterie som er blitt isolert og selektert for sin
 evne til å vise antihelikobakter baktericidal aktivitet in vitro, for fremstilling av en
 sammensetning som er ment for profylakse eller behandling av forstyrrelser relatert til
ikke-Helicobacter pylori GHLO-infeksjon i kjæledyr.

10 2.

Anvendelse ifølge krav 1, hvor melkesyrebakterien anvendes i form av et fermentert
 medium av nevnte melkesyrebakterie, eller en subfraksjon av kulturmediet fermentert
 av melkesyrebakterien.

15 3.

Anvendelse ifølge ethvert av de foregående kravene, hvor melkesyrebakteriestammen
 blir selektert fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*,
Lactobacillus paracasei, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus*
acidophilus, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium sp.*,
 20 *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

4.

Anvendelse ifølge ethvert av de foregående kravene, hvor melkesyrestammen er
 selektert fra gruppen som består av *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (CNCM-I 1225),
 25 *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus fermentum* NCC
 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum* NCC 2613 (CNCM I-2452),
Lactobacillus paracasei NCC 2461 (CNCM-I 2116), *Lactobacillus animalis* NCC 2603
 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus*
acidophilus NCC 2628 (CNCM I-2453), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

30

5.

Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 4, hvor den minst ene melkesyrebakterien,
 metabolitten eller fermenteringsmediet administreres til kjæledyret i en mengde på ca.
 $10^3 - 10^{14}$ cfu/dag.

35

6.

Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 5, hvor den minst ene melkesyrebakterien,

metabolitten eller fermenteringsmediet administreres i en mengde på ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag for hunder og $10^7 - 10^{11}$ cfu/dag for katter.

7.

- 5 Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor den minst ene isolerte stammen av melkesyrebakterie, en av dens metabolitter, eller et fermentert vekstmedium administreres til hunder eller katter for å redusere *ikke-Helicobacter pylori* GHLO forårsakede lidelser, slik at mengde GHLOer og ureaseaktiviteten i fundus blir redusert til minst 0,5 grad og minst 0,5 grad i antrum.

10

8.

- Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor den minst ene isolerte stammen av melkesyrebakterien, en av dens metabolitter, eller et fermentert vekstmedium administreres til et kjæledyr for å indusere en regresjon av kronisk
15 fungisk gastritt, med en midlere regresjon av graden av gastrisk inflammasjon på minst ca. 0,5.

9.

- Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor den minst ene isolerte
20 stammen av melkesyrebakterie, en av dens metabolitter, eller et fermentert vekstmedium administreres til et kjæledyr i en mengde som er tilstrekkelig til å redusere dårlige åndelukter i kjæledyret.

10.

- 25 Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor den minst ene isolerte stammen av melkesyrebakterie, en av dens metabolitter, eller et fermentert vekstmedium administreres til et kjæledyr i en mengde som er tilstrekkelig til å forebygge eller redusere *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-lidelser i kjæledyrets gastrointestinale kanal.

30

11.

- Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor den minst ene isolerte stammen av melkesyrebakterie, en av dens metabolitter, eller et fermentert vekstmedium administreres til kjæledyret i en mengde som er tilstrekkelig til å
35 forebygge eller redusere *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-lidelser i magen eller den nedre tarmen i kjæledyret.

12.

Næringssammensetning for kjæledyr for profylakse eller behandling av *ikke-Helicobacter pylori* gastriske *Helicobacter*-lignende lidelser kjæledyr, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at den minst én isolert stamme av
5 melkesyrebakterie og/eller dens metabolitter eller dens fermenterte vekstmedium, hvor
nevnte melkesyrebakterie er isolert og selektert ut fra sin evne til å vise antihelikobakter
baktericidisk aktivitet in vitro, assosiert med en spiselig bærer eller en farmasøytisk
matriks, hvor melkesyrebakteriestammen er selektert fra gruppen som består av
Lactobacillus reuterii, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus*
10 *ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*,
Bifidobacterium sp., *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*.

13.

Sammensetning ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at
15 melkesyrebakterien anvendes i form av et fermenteringsmedium av en
melkesyrebakterie som er viabel eller inaktivert, eller en subfraksjon av kulturmedium
fermentert av melkesyrebakterie.

14.

20 Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 - 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at melkesyrebakteriestammen er
selektert fra gruppen som består av *Lactobacillus fermentum* NCC 2581 (CNCM I-
2448), *Lactobacillus fermentum* NCC 2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus fermentum*
NCC 2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM-I 2116),
25 *Lactobacillus animalis* NCC 2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus rahmnosus* NCC 2583
(CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628 (CNCM I-2453),
Bifidobacterium lactis (ATCC 27536).

15.

30 Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 – 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mengden av
melkesyrebakteriestammen eller dens metabolitter eller dens fermenteringsmedium er
tilstede i en mengde som gir ca. $10^3 - 10^{14}$ cfu pr. dag.

35 16.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av krav 12 – 15, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at mengden av melkesyrebakteriestammen eller dens

metabolitter eller dens fermenterte vekstmedium er tilstede i en mengde på ca. $10^9 - 10^{12}$ cfu/dag for hunder eller $10^7 - 10^{11}$ cfu/dag for katter.

17.

5 Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 – 16,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den reduserer *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-infeksjon i katter og hunder slik at mengde GHLOer og ureaseaktiviteten i fundus blir redusert med minst 0,5 grad og minst 0,5 grad i antrum.

10 18.

Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 – 16,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den induserer en regresjon av kronisk fundisk gastritt, med en gjennomsnittlig regresjon av graden på gastrisk inflammasjon på minst ca. 0,5.

15

19.

Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 – 16,

k a r a k t e r i s e r t v e d at metabolittene reduserer dårlig ånde lukter hos kjæledyr.

20

20.

Sammensetning ifølge ethvert av kravene 12 – 16,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den forebygger eller reduserer forstyrrelser relatert til *ikke-Helicobacter pylori* GHLO-infeksjon i
25 gastrointestinalkanalen hos kjæledyr, spesielt i magen og nedre tarm.