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

(11) PI 0611493-8 B1

(22) Data do Depósito: 02/02/2006

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: LACTOBACILOS PROBIÓTICOS FELINOS

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; A61K 45/00; A61K 35/74; A23K 50/42; A23K 10/16; (...).

(52) CPC: A23K 50/42; A23K 10/16; A23K 10/18; A23K 50/48; A61K 35/747; (...).

(30) Prioridade Unionista: 21/06/2005 US 60/692,440; 31/05/2005 US 60/686,055.

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

(72) Inventor(es): THOMAS WILLIAM-MAXWELL BOILEAU; BARRY PIUS KIELY; LIAM DIARMUID O'MAHONY; JOHN MACSHARRY; GREGORY DEAN SUNVOLD.

(86) Pedido PCT: PCT US2006004001 de 02/02/2006

(87) Publicação PCT: WO 2006/130187 de 07/12/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/11/2007

(57) Resumo: LACTOBACILOS PROBIÓTICOS FELINOS De acordo com a presente invenção, é apresentada uma cepa de bactérias formadoras de ácido láctico, do gênero Lactobacilli, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais. São apresentados, também, métodos de uso e composições compreendendo os Lactobacilli da presente invenção.

"LACTOBACILOS PROBIÓTICOS FELINOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

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

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

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.

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

Ao longo dos últimos anos, pesquisas começaram a revelar algumas valiosas cepas de bactérias, e seu uso potencial como agentes probióticos. Os probióticos são considerados preparações de bactérias, sejam estas viáveis ou mortas, tendo constituintes como proteínas ou carboidratos, ou frações purificadas de fermentos bacterianos, que promovem a saúde dos mamíferos ao preservar 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. Portanto, existe uma necessidade por cepas probióticas derivadas de animais de estimação, para serem utilizadas para animais de estimação, que sejam diferentes daquelas derivadas de seres humanos.

O documento WO 01/90311 apresenta microorganismos probióticos isolados a partir de amostras fecais obtidas a partir de gatos, as quais têm atividade probiótica. No entanto, essas bactérias foram obtidas a partir de amostras fecais, e podem não ser parte da microflora intestinal natural presente na porção superior do trato gastrointestinal.

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

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, são apresentadas cepas de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli*, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais. As cepas de bactérias formadoras de ácido láctico são selecionadas, de preferência, dentre as espécies *Lactobacillus salivarius, Lactobacillus animalis, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonni Lactobacillus brevis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus cellobiosus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus delbruekii, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis ou Lactobacillus plantarum.*

Em uma modalidade preferencial, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacilli* com uma seqüência de polinucleotídeo de 16s a 23s que tem mais de 94% de homologia com a SEQ. ID Nº 1, mais de 93% de homologia com a SEQ. ID Nº 2 ou mais de 98% de homologia com a SEQ. ID nº 3.

Em uma outra modalidade preferencial, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacillus salivarius ss salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C), *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119), ou uma mutação das mesmas.

Além disso, a presente invenção refere-se ao uso das bactérias formadoras de ácido láctico, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, para a manutenção e melhoria da saúde do animal de estimação, bem como composições compreendendo as ditas bactérias formadoras de ácido láctico.

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

SEQÜÊNCIAS

SEQ. ID Nº 1 - seqüência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s-23s de *Lactobacillus salivarius subsp. Salicinius*, NCIMB 41287

SEQ. ID Nº 2 - seqüência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s-23s de *Lactobacillus animalis*, NCIMB 41288

SEQ. ID Nº 3 - seqüência de nucleotídeo do espaçador intergênico 16s-23s de *Lactobacillus reuteri*, NCIMB 41289

SEQ. ID Nº 4 - seqüência iniciadora 16s-23s de PCR do lado esquerdo para análise de seqüência.

SEQ. ID Nº 5 - seqüência iniciadora 16s-23s de PCR do lado direito para análise de seqüência.

NÚMEROS DE DEPÓSITO DAS BACTÉRIAS

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

Cepa	Número de depósito	Seqüência 16s-23s
Lactobacillus salivarius subsp. salicinius	NCIMB 41287	SEQ. ID N° 1
Lactobacillus animalis	NCIMB 41288	SEQ. ID N° 2
Lactobacillus reuteri	NCIMB 41289	SEQ. ID N° 3

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

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

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

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

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

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

Para uso na presente invenção, o termo "mutantes dos mesmos" inclui cepas bacterianas derivadas compreendendo mutações de DNA em outras seqüências de DNA do genoma bacteriano, excluindo-se a seqüência intergênica 16s-23s.

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 conhecidas pelos versados na técnica, inclusive modificação genética introduzida em um nucleotídeo ou seqüência de aminoácidos original (pai), mantendo-se ao menos 50% de homologia com a seqüência-pai. De preferência, a seqüência 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 seqüência-pai. Para uso na presente invenção, a seqüência de "homologia" pode ser determinada mediante o uso de técnicas-padrão conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada mediante o uso do algoritmo de homologia "BLAST" disponível publicamente online em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

Para uso na presente invenção, o termo "modificação genética" inclui a introdução de seqüências de DNA exógenas e/ou endógenas no genoma de um organismo, seja por meio de inserção no genoma do dito organismo, seja por meio de vetores, inclusive

DNA de plasmídios ou bacteriófagos, conforme é de conhecimento do versado na técnica, sendo que a dita seqüência de DNA tem um comprimento de ao menos duas bases de ácido desoxirribonucléico.

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

CEPAS DE LACTOBACILLI FORMADORAS DE ÁCIDO LÁCTICO

O primeiro aspecto da presente invenção compreende uma cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli*, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, e apresentando uma atividade probiótica em animais. Os probióticos consistem em microorganismos viáveis ou mortos, composições processadas de microorganismos, seus constituintes como proteínas ou carboidratos, ou frações purificadas de fermentos bacterianos, que afetam de modo benéfico um hospedeiro. O uso geral de bactérias probióticas se dá sob a forma de células viáveis. No entanto, isso pode ser estendido a células não-viáveis, como culturas mortas ou composições contendo fatores benéficos expressos pelas bactérias probióticas. Isso pode incluir microorganismos mortos por meios térmicos, por exposição a um pH alterado, ou submetidos a pressão. Para o propósito da presente invenção, o termo "probióticos" destina-se a incluir, ainda, os metabólitos gerados pelos microorganismos da presente invenção durante a fermentação, caso estes não sejam

separadamente indicados. Esses metabólitos podem ser liberado no meio de fermentação, ou podem ser armazenados no interior do microorganismo. Para uso na presente invenção, o termo "probiótico" inclui, também, bactérias, homogenatos bacterianos, proteínas bacterianas, extratos bacterianos, sobrenadantes de fermento bacteriano e misturas desses itens, os quais exercem funções benéficas ao animal hospedeiro, quando administrados em uma dose terapêutica.

Descobriu-se que as 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 à alimentação com células bacterianas viáveis, e apresentam, também, uma ação imunomodulatória significativa quando fornecidas aos animais sob suas formas viáveis, não-viáveis ou fracionadas. Sem se ater à teoria, acredita-se que 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 às 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.

Os *Lactobacilli* da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, apresentam atividade microbicida *in vitro* contra diversas cepas/espécies bacterianas patogênicas. Sem se ater à teoria, acredita-se que essa atividade microbicida *in vitro* indique o potencial de atividade probiótica *in vivo* em animais, de preferência animais de estimação, como gatos. As bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção apresentam, de preferência, atividade microbicida *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* ou *Eschericia coli*, com mais preferência uma combinação dessas cepas e, com mais preferência ainda, todas essas cepas.

Sem se ater à teoria, acredita-se que a atividade microbicida das bactérias 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 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 the os *Lactobacilli* da presente invenção, obteníveis mediante

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

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

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

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

Além disso, é preferencial que as bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção apresentem uma proliferação de ao menos 33% quando na presença de ao menos 0,5% de sais biliares de gato. A proliferação, para uso na presente invenção, é descrita com mais detalhes no Exemplo 3. Com mais preferência, as bactérias da presente invenção apresentam uma proliferação de ao menos 33% quando na presença de ao menos 1% de sais biliares de felino. Com mais preferência ainda, as bactérias da presente invenção apresentam uma proliferação de 100% na presença de 0,5% de sais biliares de gato. 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 gato, sejam capazes de sobreviver às condições presentes nos intestinos. Acredita-se que isso seja um resultado da adição de bílis de gato ao meio de cultura, reproduzindo as condições do intestino.

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 1% do número total de bactérias formadoras de ácido láctico co-incubadas com as células epiteliais *in vitro* aderem às ditas células. Com mais preferência, ao menos 5% das células bacterianas co-incubadas aderem às células *in vitro*. Sem se ater à teoria, acredita-se que a aderência a células epiteliais de intestino *in vitro* seja uma indicação da capacidade das bactérias formadoras de ácido láctico para colonizar o trato GI de um animal *in vivo*.

De preferência, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção é de uma espécie selecionada do grupo consistindo em *Lactobacillus salivarius, Lactobacillus animalis, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonni Lactobacillus brevis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus cellobiosus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus delbruekii, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis ou Lactobacillus plantarum. De preferência, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é*

selecionada do grupo consistindo em Lactobacillus salivarius, Lactobacillus animalis, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus acidophilus ou Lactobacillus johnsonni.

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

Em uma modalidade preferencial da presente invenção, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacilli* com uma seqüência de polinucleotídeo de 16s a 23s que tem mais de 94% de homologia com a SEQ. ID N° 1, mais de 93% de homologia com a SEQ. ID N° 2 ou mais de 98% de homologia com a SEQ. ID n° 3. Com mais preferência, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacilli* com uma seqüência de polinucleotídeo 16s-23s tendo mais de 98% de homologia com SEQ. ID N° 1, SEQ. ID N° 2 ou SEQ. ID N° 3. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacilli* com uma seqüência de polinucleotídeo 16s-23s selecionada de SEQ. ID N° 1, SEQ. ID N° 2 ou SEQ. ID N° 3. Com mais preferência ainda, a cepa de bactérias formadoras de ácido láctico de acordo com a presente invenção é selecionada do grupo consistindo em *Lactobacillus salivarius ss salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C),

Lactobacillus reuteri NCIMB 41289 (AHF 5119), ou uma mutação das mesmas.

A cepa de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli*, obtenível mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal canino ressecado e lavado, pode ser usado para proporcionar benefícios probióticos em seguida ao consumo via oral em animais, de preferência animais de estimação ou seres humanos. Esses benefícios probióticos geralmente mantêm ou melhoram a saúde geral do animal. Os elementos não-limitadores de saúde e fisiologia animal que são beneficiados, seja terapeuticamente pelo alívio de sintomas, ou profilaticamente pela prevenção de doenças, incluem transtornos inflamatórios, imunodeficiência, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, câncer (particularmente aqueles dos sistemas gastrointestinal e imune), doença diarréica, diarréia associada ao uso de antibióticos, apendicite, transtornos autoimunes, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, amiloidose, artrite reumatóide, artrite, mobilidade das articulações, diabetes mellitus, resistência à insulina, infecções bacterianas, infecções 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 sangüínea, 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 diarréia, a regulação do sistema imune, de preferência tratamento ou prevenção de doença autoimune e inflamação, a manutenção ou melhoria da saúde da pele e/ou da pelagem, de preferência tratamento ou prevenção de doença atópica da pele, a melhoria ou redução dos efeitos do envelhecimento, inclusive consciência mental e níveis de atividade, a prevenção de transtornos associados ao eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, e a melhoria da saúde das articulações, de modo a otimizar a mobilidade.

O tratamento dos transtornos apresentados acima pode ser medido mediante o uso de técnicas conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, transtornos inflamatórios, inclusive doença autoimune e inflamação, podem ser detectados e monitorados utilizando-se testes de função imune *in vivo*, como blastogênese de linfócitos, atividade de células "Natural Killer", resposta de anticorpos a vacinas, hipersensibilidade de tipo retardado e combinações desses itens. Esses métodos são brevemente descritos na presente invenção, mas bem conhecidos pelos versados na técnica.

1. Blastogênese de linfócitos: Este ensaio mede a resposta proliferativa *in vitro* de linfócitos isolados a partir de sangue integral fresco obtido de animais de teste e de controle para diversos mitogênios, e é uma medida da função geral das células T e B. Em resumo, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, ou "peripheral

blood mononucleocytes") são isolados a partir de sangue integral por meio de 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 $2x10^5$ células são expostas a uma gama de concentrações (de 0,1 μg/mL a 100 μg/mL) de diversos mitogênios, 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 ^{3}H-timidina e coletadas, e as contagens de cintilação são lidas em um TopCount NXT a 72 horas.

2. Atividade de células "Natural Killer": Conforme descrito em US 6.310.090, este ensaio mede a atividade efetora *in vitro* de células "natural killer" (NK) isoladas a partir de sangue integral fresco de animais de teste e de controle. As células "natural killer" (NK) são um componente da função imune inata de um mamífero. As células de adenocarcinoma de tiróide felino são usadas como células-alvo na avaliação da atividade citotóxica de células NK. Foi anteriormente demonstrado que essa linhagem de células é suscetível à morte por células NK felinas. As células-alvo foram cultivadas em um frasco T75 com 20 mL de meio mínimo essencial (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA.),

suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS), 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina. Quando confluentes, as células-alvo foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes e ressuspensas a $5x10^5$ células/mL em meio completo (RPMI-1640 + 10% FCS+100 U/mL de penicilina + 100 μg/mL de estreptomicina). Triplicatas de alíquotas de 100 μL das células-alvo foram pipetadas em placas com 96 cavidades de fundo em U (Costar, Cambridge, Massachussets, EUA) e incubadas durante 8 horas para permitir a aderência das células. Os linfócitos (células efetoras, 100 μL) isolados por meio de separação Ficoll-Hypaque (conforme descrito acima) foram, então, adicionados às células-alvo para se obter uma razão entre células efetoras e células alvo (E:A) de 10:1. Após 10 horas de incubação a 37 °C, foram adicionados 20 μL de um substrato contendo 5 μg de brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT). A mistura foi incubada durante 4 horas a 37 °C, após os quais o MTT não-metabolizado foi removido por aspiração. Os cristais de formazan foram dissolvidos mediante a adição de 200 μL de etanol a 95%. A densidade óptica (DO) foi medida em 570 nm, utilizando-se um leitor de microplacas. A porcentagem de morte celular específica para célula NK foi calculada conforme exposto a seguir:

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

3. Resposta de anticorpos a vacinas: Os indivíduos de teste receberam um conjunto (até 5) de vacinas após ao menos 12 semanas de alimentação probiótica ou de controle. As vacinas podem ser uma mistura de vacinas novas e redundantes. Alguns exemplos não-limitadores de conjuntos de vacina que podem ser usado incluem misturas de vacinas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Alguns exemplos não-limitadores de vacinas adequadas ao uso na presente invenção incluem cinomose felina, adenovírus, coronavírus, parainfluenza, e parvovírus. A história de vacinação do indivíduo determinará as vacinas a serem utilizadas. As quantidades, no sangue, de anticorpos específicos para as vacinas administradas são medidas durante 3 semanas, sendo comparadas a duração e a intensidade da resposta nos grupos com alimentação de controle e probiótica.

4. Hipersensibilidade de tipo retardado: Um método *in vivo* não-invasivo para avaliação do estado do sistema imune. Este teste compreende uma injeção intradérmica do mitogênio policlonal fitoemaglutinina (PHA) em combinação com eritrócitos de ovelha, uma vacina multivalente, histamina (100 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.

Métodos adicionais para a determinação do efeito das bactérias *Lactobacilli* da presente invenção são descritos em US 6.133.323 e US 6.310.090.

Além disso, a melhoria quanto aos efeitos do envelhecimento pode ser determinada mediante o uso de absorptometria de dupla emissão de raios X ou tomografia computadorizada para medir a composição corporal, inclusive massa corporal gorda, massa corporal magra e conteúdo mineral ósseo. De modo similar, esse método pode ser usado para determinar alterações de anatomia como perda de peso ou densidade óssea em indivíduos, após infecção.

Os *Lactobacilli* da presente invenção também podem ser usados em um método para redução dos níveis de estresse em animais de estimação. As concentrações sangüíneas de hormônios de estresse, inclusive epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol e proteína C-reativa e outras proteínas de fase aguda 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. Adicionalmente, a medição direta do tamanho adrenal como um marcador in vivo da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal pode ser feita por meio de imagens de tomografia computadorizada.

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:

a) Índice de queda de pêlos: Um índice de queda de pêlos é atribuído a cada indivíduo de teste mediante a coleta de pêlos produzidos durante uma sessão de escovação padronizada. Os pêlos são retidos e pesados, e os indivíduos de controle e de teste são comparados.

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

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

horas, para avaliar as propriedades de proteção e cura da pele.

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

Pontuação: 5 Extremamente seca

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

Pontuação: 4 Firme (fezes ideais)

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

Pontuação: 3 Mole, com formato

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

Pontuação: 2 Mole, sem formato

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

Pontuação: 1 Líquida

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

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

Além disso, o tratamento de infecção gastrointestinal em animais de estimação pode compreender a otimização da ecologia microbiana dos mesmos. A otimização da ecologia microbiana em animais de estimação compreende, de preferência, a redução dos teores de bactérias patogênicas nas fezes dos mesmos. Os teores de bactérias patogênicas presentes nas fezes de animais de estimação podem ser enumerados mediante o uso do

método padrão de contagem em placa, conhecido pelos versados na técnica. Com mais preferência, as bactérias patogênicas são selecionadas a partir do grupo consistindo em *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, bacteroides e combinações das mesmas. Alguns exemplos não-limitadores de cepas de bactérias patogênicas adequadas incluem *C. perfringens*, *C. difficile*, *Eschericia coli*, *Salmonella typhimurium* e combinações destas.

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

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 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 feline 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.

As cepas probióticas felinas da presente invenção podem ser usadas para reduzir o odor das fezes e da urina e, concomitantemente, na caixa de areia, mediante a redução da produção de compostos, nas fezes e na urina, que causam odor. Alguns exemplos não-limitadores de compostos causadores de odor incluem amônia, indóis, fenóis, aminas, ácidos graxos de cadeia ramificada e compostos voláteis contendo enxofre. Sem se ater à teoria, acredita-se que a redução dos teores desses compostos nas fezes ou na urina de um animal de estimação reduz o odor associado às mesmas. Além disso, para animais de estimação que usem caixa

de areia, há uma diminuição concomitante no odor da caixa de areia.

O método de uso das bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção tipicamente envolve o consumo oral pelo animal. O consumo oral pode ocorrer como parte da ingestão dietária normal, ou sob a forma de um suplemento à mesma. O consumo oral tipicamente ocorre ao menos uma vez por mês, de preferência ao menos uma vez por semana e, com mais preferência, ao menos uma vez por dia. As bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção podem ser administradas ao animal de estimação em uma quantidade terapeuticamente eficaz para manter ou melhorar a saúde do animal, de preferência um animal de estimação. Para uso na presente invenção, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz", no que se refere às bactérias formadoras de ácido láctico, significa aquela quantidade de bactérias que é suficiente para proporcionar o efeito ou benefício desejado a um animal hospedeiro precisando de tratamento, porém baixa o suficiente para evitar efeitos adversos como toxicidade, irritação ou resposta alérgica, proporcionalmente a uma relação risco/benefício razoável quando usada do modo indicado na presente invenção. A "quantidade terapeuticamente eficaz" específica irá variar conforme fatores como a condição específica sendo tratada, as condições físicas do usuário, a duração do tratamento, a natureza da terapia simultânea (caso haja), a forma de dosagem específica a ser utilizada, o veículo empregado, a solubilidade da forma de dosagem, e o regime de dosagem específico.

De preferência, as bactérias formadoras de ácido láctico são fornecidas ao animal de estimação em uma dose na faixa de 1,0E+04 a 1,0E+14 ufc por dia e, com mais preferência, na faixa de 1,0E+06 a 1,0E+12 ufc por dia. A composição pode conter, de preferência, ao menos 0,001% de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli*, na faixa de 1,0E+04 a 1,0E+12 ufc/g, obteníveis mediante isolamento a partir de trato GI felino ressecado e lavado. As bactérias formadoras de ácido láctico 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 bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção, ou qualquer mistura desses materiais.

De preferência, as bactérias formadoras de ácido láctico, 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 parte da ingestão dietária normal, ou pode ser um suplemento. Nos casos em que a composição faz parte da ingestão dietária normal, esta pode estar sob a forma de um alimento seco para animais, como biscoitos ou ração, um alimento à base de grãos processados, um alimento úmido para animais, iogurtes, molhos, itens mascáveis, petiscos e similares.

Essas composições podem compreender outros componentes. Outros componentes são benéficos para inclusão nas composições usadas na presente invenção, mas são opcionais para os propósitos da invenção. Por exemplo, as composições alimentícias são, de preferência, nutricionalmente

balanceadas. Em uma modalidade, as composições alimentícias podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 20% a cerca de 50% e, de 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 proteínas animais como caseína, albumina e tecido cárneo. Alguns exemplos não-limitadores de tecido cárneo útil à presente invenção incluem carne fresca e farinhas secas ou processadas, como farinha de peixe, farinha de aves, farinha de carne, farinha de ossos e similares. Outros tipos de fontes adequadas de proteína bruta incluem glúten de trigo ou de milho, e proteínas extraídas de fontes microbianas, como levedura.

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

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.

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 feito 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, xilooligossacarídeos, ou oligoderivados de amido. Os prebióticos podem ser fornecidos sob qualquer forma adequada. Por exemplo, o prebiótico pode ser fornecido sob a forma de material de origem vegetal contendo essas fibras. Os materiais de origem vegetal adequados incluem aspargo, alcachofras, cebolas, trigo ou chicória, bem como resíduos desses materiais de origem vegetal. Alternativamente, a fibra prebiótica pode ser fornecida sob a forma de um extrato de inulina, sendo adequados, por exemplo, os extratos de chicória. Os extratos de inulina adequados podem ser obtidos junto à Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, sob a marca registrada "Raftiline". Por exemplo, a inulina pode ser fornecida sob a forma de Raftiline (g) ST, que é um pó branco fino que contém de cerca de 90% a cerca de 94%,

em peso, de inulina, até cerca de 4%, em peso, de glicose e frutose, e de cerca de 4% a 9%, em peso, de sacarose. Alternativamente, a fibra pode estar sob a forma de um frutooligossacarídeo como aquele obtido junto à Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, sob a marca registrada "Raftilose". Por exemplo, a inulina pode ser fornecida sob a forma de Raftilose (g) P95. De outro modo, os frutooligosacarídeos podem ser obtidos pela hidrólise da inulina por meio de métodos enzimáticos, ou mediante o uso de microorganismos.

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

Para alimentos úmidos, os processos descritos nas patentes U.S. N° 4.781.939 e 5.132.137 podem ser usados para produzir produtos cárneos simulados. Outros procedimentos para a produção de produtos em pedaços também podem ser usados como, por exemplo, cozimento em um forno a vapor. Alternativamente, produtos em filão podem ser produzidos mediante a emulsificação de um material cárneo adequado para produzir uma emulsão de

carne, adicionando-se um agente gelificante adequado e aquecendo-se a dita emulsão de carne, antes de acondicionar a mesma em latas ou outros recipientes. As composições alimentícias úmidas típicas podem compreender de cerca de 5% a cerca de 15% de proteína, de cerca de 1% a cerca de 10% de gordura, e de cerca de 1% a cerca de 7% de fibras. Exemplos não-limitadores de ingredientes que podem ser usados em composições alimentícias úmidas incluem frango, peru, carne bovina, pescado branco, caldo de frango, caldo de peru, caldo de carne bovina, fígado de frango, quirela de arroz, grits de milho, farinha de peixe, ovos, polpa de beterraba, cloreto, farelo de linhaça, cordeiro, subprodutos de carne bovina, subprodutos de frango e misturas desses itens.

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

Os alimentos para animal de estimação podem conter outros agentes ativos, como ácidos graxos de cadeia longa e zinco. Os ácidos graxos de cadeia longa adequados incluem ácido alfa-linoléico, ácido gama-linolênico, ácido linoléico, ácido

eicosapentanóico e ácido docosaexanóico. Os óleos de peixe são uma fonte adequada de ácidos eicosapentanóicos e ácido docosaexanóico.

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

Nos casos em que a composição está sob a forma de um molho, esta compreende, de preferência, ao menos 10% de 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 fibras.

Alguns outros exemplos não-limitadores de suplementos adequados ao uso na presente invenção incluem pós, suspensões de óleo, suspensões à base de leite e queijos, e composições à base de manteiga de cacau 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 à base de iogurte podem compreender de cerca de 1% a cerca de 5% de proteína, de cerca de 10% a cerca de 20% de carboidrato, de cerca de 1% a cerca de 5% de fibra, de cerca de 1% a cerca de 5% de gordura e de cerca de 50% a cerca de 90% de um veículo líquido, como leite.

Exemplos

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

Exemplo 1: isolamento de bactérias formadoras de ácido láctico a partir de trato gastrointestinal felino

Amostras de intestinos de felino foram obtidas a partir de gatos saudáveis apresentados a veterinários locais para eutanásia iniciada e aprovada pelos donos dos animais. Todos os animais estavam saudáveis e isentos de doenças. Foram

dissecados o cólon, o cólon médio, o ceco e o íleo de cada gato, de maneira a expor a mucosa.

Os sobrenadantes foram removidos após agitação do tecido mucoso (em vórtice durante 1 minuto) e homogeneização mecânica do tecido. Cada sobrenadante foi colocado em uma placa de ágar do tipo de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar. Estas foram incubadas anaerobicamente, mediante o uso de um sistema Anerocult GasPak, durante 48 horas a 37 °C. As colônias isoladas a partir das placas foram reaplicadas por esfregaço em MRS, e novamente cultivadas anaerobicamente sob as mesmas condições. As colônias isoladas foram reaplicadas por esfregaço mais 4 vezes, com a finalidade de purificar uma cepa única. Foram avaliadas a morfologia e a aparência microscópica da colônia. Os isolados adequados foram testados quanto a reação de Gram e atividade de catalase. A identificação de bastonetes Gram-positivos, catalase-negativos, foi realizada mediante teste de API (API 50CHL, BioMerieux). As células colhidas foram lavadas duas vezes com um tampão de fosfato (pH 6,5) a 0,05 M e cisteína HCl (500 mg/L), sendo a lavagem seguida de sonicação. Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação. Os sobrenadantes foram incubados com NaF (6 mg/mL) e Na iodoacetato (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida mediante incubação com hidroxilamina HCl (pH 6,5) durante 10 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento de cor foi monitorado em seguida à adição de HCl (4M), $FeCl_3.6H_2O$ (5% (p/v) em 0,1M HCl) e frutose-6-fosfato (sal de Na). A formação de acetil fosfato a partir de frutose-6-fosfato foi evidenciada

pela cor avermelhada formada pelo quelato férrico de seu hidroximato.

Exemplo 2: triagem quanto à atividade microbicida

Cada uma das cepas de bactérias formadoras de ácido láctico foi incubada anaerobicamente em caldo MRS. 2 μL de cada cultura foram aplicados em pontos sobre placas de ágar MRS, as quais foram incubadas anaerobicamente de um dia para outro. *Salmonella typhimurium* e *E. Coli* enteropatogênica (ExPEC) foram pré-cultivadas de um dia para outro, e 100 ml foram inoculados em agar fundido (1% v/v). Essa cultura indicadora foi vertida sobre a superfície das placas de MRS inoculadas. Após incubação de um dia para outro, as zonas de inibição em redor da colônia probiótica foram medidas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em três ocasiões separadas. Além disso, a incorporação do tampão de 2% de betaglicerofosfato ao ágar possibilitou determinar a contribuição da produção de ácido à inibição *in vitro* de patógenos que foi observada.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram claramente que as cepas de bactérias formadoras de ácido láctico da presente invenção, obteníveis mediante isolamento a partir de trato GI felino ressecado e lavado, têm significativa atividade microbicida *in vitro*, indicadora de uma potencial atividade probiótica.

Tabela 2

	AHF122A	AHF223C	AHF5119
S. typhimurium	9,34	7,5	9,665
ExPEC	11,84	7,67	11,17

Exemplo 3: medições *in vitro* de sobrevivência e colonização

Tolerância a pH

As células bacterianas foram colhidas de culturas incubadas de um dia para outro, lavadas duas vezes em tampão de fosfato (pH 6,5) e ressuspensas em caldo de MRS/TPY ajustado com 1M HCl até pH 2,5. As células foram incubadas anaerobicamente a 37 °C, e sua sobrevivência foi medida a intervalos de 0, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos, mediante o uso do método de contagem em placas conhecido pelos versados na técnica. A Tabela 3 sumariza esses dados por cepa.

Tabela 3

Sobrevivência de cepas em um ambiente de baixo pH (pH 2,5). Todos os dados são mostrados em log UFC.

	TEMPO (min)					
CEPA	0	30	60	120	180	360
NCIMB 41287	9,31	9,13	8,95	8,88	8,84	8,52
NCIMB 41288	8,85	8,79	8,89	8,65	8,71	8,59
NCIMB 41289	9,25	9,06	8,97	9,10	9,00	8,88

Resistência à bílis

As cepas bacterianas foram aplicadas por esfregaço sobre ágar MRS suplementado com bílis de porco (Sigma) a 0,5%, 1% e 5% (p/v). As placas foram incubadas a 37 °C sob condições anaeróbicas, e a proliferação foi registrada após 48 horas. A proliferação foi comparada com placas de controle por um observador experiente, e a proliferação das colônias foi descrita como:

Negativa (0) - nenhuma proliferação,

+ (1) - proliferação translúcida nebulosa (menos de 33% das placas de controle com 0% de bílis),

++ (2) - proliferação definida, porém não tão boa como nas placas de controle (mais de 33%, porém menos que 66%);

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

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

A Tabela 4 demonstra que a *Bifidobacterium* da presente invenção claramente apresenta uma resistência a sais biliares, sendo capaz de se proliferar e formar colônias em níveis de ao menos 66%, na maioria dos casos, quando exposta a 0,5% de sais biliares de porco.

Tabela 4

Sobrevivência de cepas em diversas concentrações de bílis de porco

	PORCENTAGEM DE BÍLIS (%)							
CEPA	0	0,3	0,5	1	2	5	7,5	10
NCIMB 41287	+++	+	+	-	-	-	-	-
NCIMB 41288	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
NCIMB 41289	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+

Além disso, para avaliar quaisquer diferenças na capacidade das cepas para colonizar o trato GI de gatos, as cepas bacterianas foram aplicadas por esfregaço sobre ágar MRS suplementado com bílis felina a 0,5%, 1% e 2% (peso/volume). A

bílis felina foi obtida a partir de gatos que foram submetidos a endoscopia em um ambiente clínico durante um procedimento não-terminal. As placas foram incubadas a 37 °C sob condições anaeróbicas, e a proliferação foi registrada após 48 horas. A proliferação foi comparada com placas de controle por um observador experiente, e a proliferação das colônias foi descrita como:

Negativa (0) - nenhuma proliferação,

+ (1) - proliferação translúcida nebulosa (menos de 33% de placas de controle com 0% de bílis),

++ (2) - proliferação definida, porém não tão boa como nas placas de controle (mais de 33%, porém menos que 66%);

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

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

A Tabela 5 demonstra que a *Bifidobacterium* da presente invenção claramente apresenta uma resistência a sais biliares de felinos, sendo capaz de se proliferar e formar colônias em níveis de ao menos 66%, na maioria dos casos, quando exposta a 0,5% de sais biliares de porco.

Tabela 5

Sobrevivência de cepas em diversas concentrações de bílis felina

	PORCENTAGEM DE BÍLIS (%)			
CEPA	0	0,5	1	2
NCIMB 41287	+++	+++	+++	+++

NCIMB 41288	+++	+++	++	++
NCIMB 41289	+++	+++	+++	+++

Adesão a células epiteliais intestinais

A linhagem de células epiteliais humanas HT-29 foi usada para avaliar as propriedades de adesão das cepas selecionadas. As células epiteliais foram cultivadas de modo rotineiro, sob a forma de camada única em frascos de 75 cm^2 para cultura de tecidos, a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 em meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal de bezerro (FCS), penicilina/estreptomicina, glutamina e fungizona. Para fins do experimento, as células epiteliais foram semeadas a uma concentração de 5 x 10^5 células/mL (3 mL de volume total) por cavidade, em placas de cultura com 6 cavidades (Sarstedt). Após incubação durante 7 dias, para permitir diferenciação, as camadas únicas epiteliais foram lavadas com meio isento de antibióticos, contendo 10% de FCS. As suspensões bacterianas mais/em DMEM isento de antibióticos foram adicionadas a cada cavidade, e as células foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C. Após a incubação, as camadas únicas foram lavadas três vezes com PBS. As células epiteliais foram lisadas em H_2O desionizada, e o número de bactérias aderentes foi obtido mediante o uso do método de contagem em placas conhecido pelos versados na técnica. A adesão foi expressa como uma porcentagem do número de bactérias inicialmente aplicadas à placa. O *Lactobacillus* AHF122A apresentou um nível de adesão de 39,5%, enquanto o *Lactobacillus* AHF223C apresentou um nível de adesão

de 13,9%. Já o *Lactobacillus* AHF5119 apresentou um nível de adesão de 36,7%.

Exemplo 4: seqüenciamento de polinucleotídeo intergênico 16s-23s

Os isolados de *Bifidobacterium* felina foram centrifugados em tubos de estoque, e os peletes resultantes foram lisados em 100 μL de solução para extração e 25 μL de solução para preparação de tecidos (Sigma, kit XNAT2), e incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram, então, incubadas durante 5 minutos a 95 °C e, então, foram adicionados 100 μL de solução para neutralização (kit XNAT2). A solução de DNA genômica foi, então, quantificada mediante o uso de um espectrofotômetro Nanodrop, e armazenada a 4 °C.

O PCR foi realizado mediante o uso de iniciadores de espaçador intergênico (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' e IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (Bridgidi et al., 2000, System Appl. Microbiol., 23, 391-399 (2000)). As condições de ciclo foram de 94 °C durante 3 minutos (1 ciclo), 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, e 72 °C durante 30 segundos (28 ciclos). A reação de PCR continha 4 μL (50 ng) de DNA, mistura de PCR (kit XNAT2), 0,4 μM de iniciador IGS L e R (MWG Biotech, Alemanha). As reações de PCR foram realizadas em um termociclo Eppendorf. Os produtos de PCR (10 μL) foram passados, juntamente com um marcador para peso molecular (100 bp Ladder, Roche) por um gel a 2% de agarose manchado com EtBr em TAE, para determinar seu perfil de IGS.

Os produtos de PCR da Bifidobacterium (banda única) foram purificados mediante o uso do kit de purificação Promega Wizard PCR.

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados mediante o uso de seqüências iniciadoras (acima) para a região de espaçador intergênico. Os dados de seqüência foram, então, pesquisados contra a base de dados de nucleotídeos do NCBI, para determinar a identidade da cepa por homologia de nucleotídeos.

Em seguida ao seqüenciamento, as seqüências obtida para as quatro cepas depositadas foram comparadas à base de dados de seqüências "BLAST", disponível online em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ para verificação de homologia com outras seqüências bacterianas de 16s a 23s depositadas. A similaridade mais próxima para AHF122A foi apresentada pela cepa *Lactobacillus salivarius subsp. Salicinius* (AB102859), com um grau de homologia de 94%. A similaridade mais próxima para AHF223C foi apresentada por *Lactobacillus animalis, cepa LA51* (AY526615), com um grau de homologia de 93%. A similaridade mais próxima para AHF5316 foi apresentada por *Lactobacillus reuteri DSM 20016* (AF080100), com um grau de homologia de 98%.

Exemplo 5: exemplos de composição

Os Exemplos 1 a 4 são exemplos de composições de ração seca compreendendo os *Lactobacilli* probióticos da presente invenção.

Ingrediente	**Porcentagem, com base no peso**			
	Ex. 1	**Ex. 2**	**Ex. 3**	**Ex. 4**
Grãos de cereal	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%

Farinha de subproduto de ave	43,5	40	45	35
Gordura de aves	1,28	1,02	1,16	1,35
Produto de ovos	2,4	2,1	2,5	2,2
Farinha de fígado de frango	1,0	1,0	1,0	1,0
Levedura seca de cerveja	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monossódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato de cálcio	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloreto de potássio	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
cloreto de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerais	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloreto de Sódio	0,03	0,03	0,03	0,03
Probiótico (1 x 10^{10} ufc/g NCIMB 41287 em óleo de girassol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1 x 10^{10} ufc/g NCIMB 41288 em óleo de girassol)	-	0,5	1	0,4

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

Ingrediente	**Porcentagem, com base no peso**		
	Ex. 5	**Ex. 6**	**Ex. 7**
Água	Até 38	Até 47	Até 50
Fígado de aves	Até 25	Até 20	Até 15
Produtos de aves	25	20	20
Quirela de arroz	5	7	10
Produto de ovos	3	2,5	1,5
Gordura de aves	2,9	3,0	3,2
Caldo de frango	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1

Minerais	0,05	0,1	0,1
Probiótico (1 x 10^{10} ufc/g NCIMB 41289)	4	5	6

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

Ingrediente	**Porcentagem, com base no peso**		
	Ex. 8	**Ex. 9**	**Ex. 10**
Leite	38	42	48
Açúcar	12	12	10
Amido modificado	1,0	0,8	0,8
Prebiótico	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1 x 10^{10} ufc/g NCIMB 41287)	4	5	6

Todos os documentos citados na Descrição Detalhada da Invenção são, em parte relevante, aqui incorporados por referência, e a citação de qualquer documento não deve ser interpretada como admissão de que este represente técnica anterior com respeito à presente invenção.

Embora modalidades específicas da presente invenção tenham sido ilustradas e descritas, deve ficar óbvio 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. Composição, **caracterizada** pelo fato de compreender uma mistura de cepas de bactérias formadoras de ácido láctico do gênero *Lactobacilli* obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, selecionadas do grupo que consiste em *Lactobacillus salivarius ss salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C) e *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119).

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato da dita composição ser um alimento para animais de estimação, em que a composição é um alimento úmido para animais ou um alimento seco para animais.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de ser um alimento para gatos.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de estar sob uma forma selecionada do grupo consistindo em rações, itens mascáveis e biscoitos.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de ser um suplemento alimentar para animais de estimação.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de estar sob a forma de um molho, um iogurte, um queijo ou outro produto lácteo.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de estar sob uma forma selecionada a partir do grupo consistindo em cápsulas, tabletes e pílulas.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de compreender ao menos 0,001% de bactérias formadoras de ácido láctico na faixa de cerca de 1,0E+04 ufc/g a cerca de 1,0E+12 ufc/g.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que as bactérias formadoras de ácido láctico estão sob a forma de células viáveis.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo

fato de que as bactérias formadoras de ácido láctico conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 estão sob a forma de células não-viáveis, ou de frações constituintes ativas das mesmas.

11. Uso de bactérias formadoras de ácido láctico, do gênero *Lactobacilli*, obteníveis mediante isolamento a partir de trato gastrointestinal felino ressecado e lavado, selecionadas do grupo que consiste em *Lactobacillus salivarius ss salicinius* NCIMB 41287 (AHF 122A), *Lactobacillus animalis* NCIMB 41288 (AHF 223C) e *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41289 (AHF 5119), **caracterizado** por ser para redução do odor associado a fezes ou urina de um animal de estimação.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo odor ser associado a uma caixa de areia de um animal de estimação.