(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 431 572**

(51) Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2008** **E 08774627 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013** **EP 2203551**

(54) Título: **Especies bifidobacterianas**

(30) Prioridad:

20.10.2007 EP 07118938

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (50.0%)
Liège Science Park Avenue Pré-Aily 4
4031 Angleur, BE y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)

(72) Inventor/es:

DAUBE, GEORGES;
FRANSSEN, CHRISTINE;
DELCENSERIE, VÉRONIQUE;
GAVINI, FRANÇOISE y
POT, BRUNO

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 431 572 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Especies bifidobacterianas

La invención se refiere a una bacteria que pertenece al género *Bifidobacterium,* a composiciones probióticas que comprenden dicha bacteria, particularmente productos alimenticios, y al uso de dicha bacteria en el tratamiento de enfermedades, tales como enfermedades gastrointestinales.

Las bifidobacterias (o bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*) constituyen una de las poblaciones más importantes de la flora fecal humana y animal. Generalmente se considera una indicación de buena salud cuando estas bacterias están presentes en una elevada tasa en la flora fecal. Por este motivo, se conocen como bacterias probióticas (microorganismos beneficiosos que mejoran el equilibrio natural de la flora intestinal cuando se ingieren vivos). Ejemplos de bifidobacterias conocidas incluyen *B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. catenulatum* y *B. longum*, que han demostrado tener efectos tecnológicos, organolépticos y probióticos beneficiosos.

Las bifidobacterias se hallan muy habitualmente como aditivo en leches fermentadas (yogures con "Bifidus activo") y por tanto constituyen un producto económicamente importante. Las cepas elegidas por la industria láctea deben cumplir numerosos requisitos estrictos, tales como resistencia al proceso de fabricación y supervivencia dentro del producto alimenticio. Las especies más habitualmente usadas en Francia son *B. animalis* subsp. *lactis* y *B. animalis* subsp. *animalis*, que es una subespecie de origen animal, nunca aislada de seres humanos. En vista de la importancia de las bifidobacterias, existe la gran necesidad de identificar nuevas especies dentro de este género que tengan propiedades que cumplan de forma óptima los requisitos de la industria alimentaria. Por ejemplo, en 2004, un grupo identificó y aisló *Bifidobacterium psychraerophilum* de un ciego porcino (Simpson, PJ. et al. (2004) Int J Syst Evol Microbiol 54: 401-6). La *Bifidobacterium* previamente conocida solamente era capaz de crecer a temperaturas entre 20 ºC y 46-49,5 ºC (Biavati, B. et al., (2000), Annals of Microbiology 50: 117-131; Dong et al., (2000) Int J Syst Evol Microbiol 50 Pt 1:119-25), sin embargo, *Bifidobacterium psychraerophilum* mostró una ventaja sobre todas las especies previas creciendo a entre 4 y 10 ºC. Esto es beneficioso para composiciones probióticas ya que las bacterias tienen mayor probabilidad de sobrevivir a las bajas temperaturas de almacenamiento de dichos productos y por lo tanto prolongarían la vida útil del producto. Por tanto existe la gran necesidad de identificar especies bifidobacterianas adicionales, que no solamente tengan ventajas únicas sino que también retengan los beneficios de las especies bifidobacterianas previamente identificadas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona *Bifidobacterium GC61* depositada en la CNCM el 9 de enero de 2007 con el número de acceso CNCMI-3712 y *Bifidobacterium GC61* depositada en la CNCM el 9 de enero de 2007 con el número de acceso CNCMI-3713 o un homólogo de la misma.

GC61 representa una nueva especie de Bifidobacterium. Las expresiones GC61, grupo GC61, *Bifidobacterium GC61* y *Bifidobacterium vercorsense* se usan de forma intercambiable para hacer referencia a esta nueva especie de Bifidobacterium.

Ejemplos de cepas de GC61 analizadas en este documento incluyen FR41/2, FR49/f/2, FR101/h/8, MarV3/22, FR39/1, MarV4/2, MarV1/5, FR66/e/1, MarC1/13, MarF/3, PicD/1, FR70/g/2 y FR47/2. Los genes de ARNr 16S de las cepas FR41/2, FR49/f/2 y FR101/h/8 se han secuenciado y se nombran como ID de secuencia Nº 1 para el gen de ARNr 16S de FR101/h/8; ID de secuencia Nº 2 para el gen de ARNr 16S de FR41/2; e ID de secuencia Nº 3 para el gen de ARNr 16S de FR49/f/2.

Se hizo un depósito de *Bifidobacterium GC61* cepa FR41/2 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en el Institut Pasteur en París el 9 de enero de 2007, a este depósito se le concedió el número de acceso CNCMI-3712.

Se hizo un depósito de *Bifidobacterium GC61* cepa FR49/f/2 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en el Institut Pasteur en París el 9 de enero de 2007, a este depósito se le concedió el número de acceso CNCMI-3713.

En la presente invención, un homólogo de GC61 puede definirse por referencia al grado de homología de secuencia en el gen 16 de ADN. Una bacteria en la que la secuencia del ADNr 16S se más del 98 % homóloga al gen del ADNr 16S de GC61 puede describirse como un homólogo de GC61. La secuencia del ADNr 16S de GC61 puede ser la secuencia consenso de ADNr 16S mencionada en la Figura 1A (ID de secuencia Nº 4) o puede tener la secuencia del ADNr 16S de cualquier cepa GC61 de la presente invención. Asimismo, o como alternativa, una bacteria que tiene un gen hsp60 con más del 90 % de homología de secuencia con la secuencia del gen hsp60, o con la secuencia consenso del gen hsp60, en GC61 puede describir como un homólogo de GC61. Preferiblemente, la secuencia consenso del gen hsp60 es la secuencia identificada en la Figura 3. Preferiblemente se usa la secuencia del ADNr 16S o la secuencia de hsp60 de la cepa FR41/2 o FR49/f/2 de GC61 cuando se determina el grado de homología de secuencia.

Los homólogos de GC61 pueden ser de origen natural o pueden producirse de forma artificial, por ejemplo por manipulación genética.

GC61 se aisló de leche sin procesar durante el proceso de fabricación del queso "L'etoile du Vercors" que se hace mediante un proceso tradicional y manual. GC61 está presente durante todo el proceso de producción del queso (es decir desde la leche sin procesar hasta el final de la maduración), con un aumento estadísticamente significativo durante el proceso. Estas bacterias pertenecen a una población microbiana natural que participa en el desarrollo de las propiedades organolépticas del producto.

GC61 tiene la ventaja de aislarse de un proceso de producción de alimentos mientras que muchas especies bifidobacterianas previamente aisladas se han extraído de los tractos digestivos de seres humanos o animales, por tanto GC61 es más fácil de integrar en el proceso de fabricación y también es más fácil de estabilizar en productos alimenticios y fermentados que muchas otras especies bifidobacterianas.

También se ha descubierto que GC61 es psicotrópica y es capaz de crecer a temperaturas tan bajas como aproximadamente 12 ºC. La ventaja clave de crecer a bajas temperaturas es que las bacterias GC61 tienen mayor probabilidad de sobrevivir a bajas temperaturas de almacenamiento que la mayoría de las demás composiciones bacterianas probióticas, lo que por lo tanto prolongaría su vida útil. Ventajas adicionales de las bacterias GC61 son que proporcionan una buena resistencia a la acidez del estómago, las sales biliares y a las enzimas intestinales (pepsina).

Una ventaja adicional más de las bacterias GC61 es que son resistentes al aire/oxígeno, es decir, son aerotolerantes.

Una ventaja adicional más de las bacterias GC61, y la cepa FR49/f/2 en particular, es que tienen un sorprendente efecto inmunomodulador, y pueden causar un elevado nivel de producción de la citoquina IL10, pero un bajo nivel de IL12. Esta proporción de IL10 a IL12 es indicativa de las propiedades anti-inflamatorias. Las propiedades anti-inflamatorias también se demostraron in vivo en un modelo experimental de colitis en ratones.

La *Bifidobacterium GC61* puede estar en forma de células viables.

Además, o como alternativa a las células viables, pueden ser útiles cultivos muertos de *Bifidobacterium GC61* que contienen factores beneficiosos expresados por las células de *Bifidobacterium GC61*.

La *Bifidobacterium GC61* puede estar en forma de un cultivo biológicamente puro.

Los mutantes de *Bifidobacterium GC61* incluyen cepas con cambios conservativos o degenerativos en el código genético. Los mutantes pueden ser de origen natural o diseñarse por ingeniería genética.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende *Bifidobacterium GC61* como se ha definido anteriormente en este documento y uno o más excipientes aceptables. Preferiblemente, la composición es una composición probiótica.

Se apreciará que un excipiente aceptable será bien conocido para los especialistas en la técnica de la preparación de composiciones probióticas.

Ejemplos de excipientes aceptables incluyen: azúcares tales como sacarosa, azúcar isomerizado, glucosa, fructosa, palatinosa, trehalosa, lactosa y xilosa; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinol, jarabe glutinoso reducido de almidón y jarabe glutinoso reducido de maltosa; emulsionantes tales como ésteres de sacarosa de ácidos grasos, ésteres de glicerina de ácidos grasos y lecitina; espesantes (estabilizantes) tales como carragenina, goma xantana, goma guar, pectina y goma garrofín; acidificantes tales como ácido cítrico, ácido láctico y ácido málico; zumos de fruta tales como zumo de limón, sumo de naranja y zumo de bayas; vitaminas tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D y vitamina E; y minerales tales como calcio, hierro, manganeso y zinc.

Las composiciones de la invención pueden prepararse por mezcla, adecuadamente a temperatura ambiente y presión atmosférica, habitualmente adaptadas para administración oral. Dichas composiciones puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, productos alimenticios convencionales, polvos, gránulos, grageas, polvos reconstituibles o suspensiones.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de dosis unitaria, y pueden contener uno o más excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes de formación de comprimidos, disgregantes, y agentes humectantes aceptables. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden estar en forma de un producto seco para su reconstitución con

agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), conservantes, y si se desea, aromatizantes o colorantes convencionales.

En una realización preferida, la composición de la invención se formula como un producto alimenticio convencional, más preferiblemente, un producto de base láctea (por ejemplo, leche fermentada, leche vegetal, leche de soja, mantequilla, queso o yogur) o sumo de frutas. La composición se formula preferiblemente como un alimento o bebida para adultos y/o infantes humanos y/o animales. En una realización alternativa, la composición se formula como un polvo liofilizado o secado por pulverización. Además de mostrar un efecto probiótico (es decir, mantener el equilibrio de la flora intestinal), también se cree generalmente que las bifidobacterias son de uso potencial en el tratamiento y/o profilaxis de diversos trastornos, tales como enfermedades gastrointestinales, enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cáncer (particularmente de los sistemas gastrointestinal e inmune), enfermedad diarreica, diarrea asociada con antibióticos, diarrea pediátrica, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, diabetes mellitus, rechazo de un órgano transplantado, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital, enfermedad de transmisión sexual, infección por VIH, replicación del VIH, diarrea asociada con el VIH, traumatismo asociado a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, función de barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, cardiopatía coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, trastornos epidérmicos, psoriasis; acné vulgar y/o exceso de colesterol.

GC61 puede estar presente en la composición a más de 10^6 ufc por gramo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona *Bifidobacterium GC61* para su uso como sustancia terapéutica o profiláctica, en particular en el tratamiento y/o profilaxis de uno cualquiera o más de los trastornos mencionados anteriormente.

La invención proporciona adicionalmente un uso de *Bifidobacterium GC61* en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de uno cualquiera o más de los trastornos mencionados anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona *Bifidobacterium GC61* para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de uno cualquiera o más de los trastornos mencionados anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional más, la invención proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis de uno cualquiera o más de los trastornos mencionados anteriormente, en un sujeto humano o animal, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de *Bifidobacterium GC61*.

Bifidobacterium GC61 puede usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, otros medicamentos que se sabe que son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades gastrointestinales (por ejemplo, diarrea), cáncer, exceso de colesterol, alergias, infección o uno cualquiera o más de los trastornos mencionados anteriormente.

Por tanto, como aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende una combinación de *Bifidobacterium GC61* junto con una agente o agentes terapéuticos adicionales.

Las combinaciones mencionadas anteriormente pueden presentarse convenientemente para su uso en forma de una composición probiótica y por tanto composiciones probióticas que comprenden una combinación definida anteriormente junto con uno o más excipientes proporciona un aspecto adicional de la invención. Los componentes individuales de dichas combinaciones pueden administrarse secuencial o simultáneamente en composiciones probióticas diferentes o combinadas.

En una realización preferida, se combina *Bifidobacterium GC61* y/o se usa con otras bifidobacterias u otras bacterias probióticas tales como: bacterias que pertenecen al género Lactobacillus tales como *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus casei, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus kefir, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus zeae* y *Lactobacillus salivalius;* bacterias que pertenecen al género *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus;* bacterias que pertenecen al género *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis;* bacterias que pertenecen al género *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis;* bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* tales como *Bifidobacterium crudilactis;* y/o levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces, Torulaspora* y/o *Candida* tales como *Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* y *Candida kefyr.*

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma, para su uso como probiótico inmunomodulador y/o anti-inflamatorio. Preferiblemente, el uso es para inducir la producción de IL-10 en un sujeto mamífero. Preferiblemente se produce IL-10 por PBMC.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de inflamación en un sujeto mamífero. Preferiblemente, la inflamación es del tracto gastrointestinal. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de la colitis.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la invención, se proporciona *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma, para su uso en el tratamiento de la inflamación en un sujeto mamífero. Preferiblemente, la inflamación es del tracto gastrointestinal. Preferiblemente, la *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma es para su uso en el tratamiento de la colitis.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la inflamación en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de *Bifidobacterium GC61* al sujeto mamífero. Preferiblemente la inflamación es del tracto gastrointestinal. Preferiblemente, el método es para el tratamiento de la colitis.

Preferiblemente, la *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma, estimula la producción de IL-10 en un sujeto mamífero. Preferiblemente la *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma reduce la producción de IL-12 en un sujeto mamífero. Preferiblemente, la *Bifidobacterium GC61* o un homólogo, descendiente o mutante de la misma no estimula la producción de IL-12 en un sujeto mamífero.

Preferiblemente es sujeto mamífero es un ser humano.

La *Bifidobacterium GC61* usada en cualquier aspecto de la invención puede ser de cualquier cepa mencionada previamente. Por ejemplo, la cepa puede ser la cepa FR41/2 o la cepa FR49/f/2. Si la *Bifidobacterium GC61* es para su uso como agente/probiótico inmunomodulador y/o anti-inflamatorio, y/o para su uso en el tratamiento de la inflamación, la cepa puede ser FR49/f/2.

Se entiende que todas las características opcionales y/o preferidas de un aspecto o realización de la invención pueden aplicarse a todos los demás aspectos o realizaciones de la invención descrita en este documento.

Las realizaciones de la invención se describirán ahora simplemente a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Figura 1A - muestra una alineación de las secuencias del gen del ARNr 16Sobtenidas de las cepas GC61 FR101/h/8 (ID de secuencia Nº 1), FR41/2 (ID de secuencia Nº 2) y FR49/f/2 (ID de secuencia Nº 3) (llamadas respectivamente 1, 2 y 3). La alineación se realizó usando los softwares ClustalW y Edtaln. La secuencia consenso (ID de secuencia Nº 4) (llamada C en la alineación) muestra un 100 % de homología entre las 3 cepas desde la base número 2 hasta la base número 1452. El consenso se muestra por una secuencia de caracteres que, de acuerdo con la situación encontrada en una posición dada, incluirán:

"." Si el carácter tiene una representación mayoritaria > = 20 %
":" Si el carácter tiene una representación mayoritaria > = 40 %
"+" Si el carácter tiene una representación mayoritaria > = 60 %
"*" Si el carácter tiene una representación mayoritaria> = 80 %
El propio carácter, si es igual para todas las secuencias;

Figura 1B - muestra la secuencia consenso de ADN de 1452 pb que codifica el ARNr 16S en *Bifidobacterium vercorsense* basándose en las 3 secuencias parciales de las cepas FR101/h/8, FR41/2 y FR49/f/2;

Figura 2A - muestra una alineación que compara la secuencia consenso de GC61 para el gen del ARNr 16S (indicado como secuencia nº 1 en esta figura) con las de las otras especies conocidas de *Bifidobacterium*, indicando el % de homología/identidad entre ellas. Se muestra un consenso entre las diferentes especies comparadas por una secuencia de caracteres que, de acuerdo con la situación encontrada en una posición dada, incluirán:

"." Si el carácter tiene una representación mayoritaria> = 20 %
":" Si el carácter tiene una representación mayoritaria> = 40 %
"+" Si el carácter tiene una representación mayoritaria> = 60 %
"*" Si el carácter tiene una representación mayoritaria> = 80 %
El propio carácter, si es igual para todas las secuencias. Esta secuencia consenso se denomina "C" en esta figura;

Figura 2B - muestra un árbol consenso de GC61 y las especies filogenéticamente más relacionadas de *Bifidobacterium*. Los números en las ramas indican la cantidad de veces que sucede la separación de las especies en los dos conjuntos que se separan por esa rama entre los árboles, de 1,00 árboles (los árboles tenían pesos fraccionados);

Figura 3 - muestra una secuencia consenso del gen hsp60 (ID de secuencia Nº 5) secuenciado a partir de GC61 cepas Fr41/2, Fr49/f/2 y Fr101/h/8. Las bases subrayadas correspondes a los cebadores de PCR (ID de secuencia Nº 6 y 7), y las bases resaltadas correspondes a la secuencia de una sonda (ID de secuencia Nº 8) específica para la especie GC61;

Figura 4 - muestra una alineación de una secuencia génica parcial de *hsp60* a partir de la bacteria *Bifidobacterium vercorsense* del grupo GC61, con secuencias muy relacionadas en otras especies de *Bifidobacterium* halladas en Genbank (PubMed-BLAST). La secuencia parcial del gen hsp60 de *Bifidobacterium vercorsense* es idéntica a la secuencia consenso del gen hsp60 mencionado en la Figura 3;

Figura 5 - muestra el procedimiento experimental usado para estudiar el efecto sobre IFNγ, IL-10 e IL-12 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cuando se estimulaban con diversos aislados bacterianos;

Figuras 6**A-D -** muestran el efecto sobre los niveles de IFNγ, IL-10 e IL-12 en células mononucleares de sangre periférica cuando se estimulaban con diversos aislados bacterianos incluyendo FR49/f/2 (cepa C), FR101/H/8 (cepa F), FR39/1 (cepa 1), FR41/2 (cepa M) y FR66/E/1 (cepa N);

Figura 6A - muestra la inducción de IFNγ; **Figura 6B -** muestra la inducción de IL-12; **Figura 6C -** muestra la inducción de IL-10; **Figura 6D -** muestra los valores de IL-10/IL-12; Souche=cepa, Temoin=control;

Figura 7 - ilustra el diseño de un estudio convencional de intervención bacteriana para la inducción por TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico) de colitis aguda; y

Figuras 8**A-C -** muestran los resultados del estudio de inducción por TNBS de colitis aguda; **Figura 8A -** muestra los valores de Wallace para las diferentes cepas; **Figura 8B -** muestra la dosificación de MPO para diferentes cepas; **Figura 8C -** muestra la protección relativa por las cepas. TEMOIN=control, Bifide temoin=*Bifidobacterium* de control.

Características fenotípicas de *Bifidobacterium GC61*

Bifidobacterium GC61 se ha caracterizado fenotípicamente y se ha identificado por análisis numérico (clasificación basada en métodos de vinculación promedio no ponderada y agrupación de Hartigan). No se han identificado cepas de otro tipo o referencia que pertenezcan a otra especie del género *Bifidobacterium* que compartan las características del grupo GC61.

Las características bioquímicas que diferencian el grupo GC61 de otras especies, tales como *B. crudilactis* (Delcenserie V., et al. Systematic and Applied Microbiology (2007) 30, 381-389) y *B. psychraerophilum* que se considera que son las especies filogenéticamente más relacionadas, se presentan en la Tabla 1. La Tabla 1 muestra características fenotípicas diferenciales entre GC61 (13 cepas), *B. crudilactis* (10 cepas), *B. crudilactis* LMG 23609T, y *B. psychraerophilum* LMG 21775T.

Tabla 1

Características	**GC61 (13 cepas, % de respuestas positivas)**	***B. crudilactis* (10 cepas, % de respuestas positivas)**	***B. crudilactis* LMG 23609^T**	***B. psychraerophilum* LMG 21775^T (Simpson *et al.*, 2004)**
Acidificación de:				
L-arabinosa	100	0	-	+
D-xilosa	0	10	-	+
a-metil-D-manósido	0	0	-	+
N-acetilglucosamina	0	0	-	+
Salicina	85	20	-	+
Lactosa	100	100	+	-
Melezitosa	0	10	-	+
glucógeno	92	10	-	-

Ensayos enzimáticos:				
α-arabinosidasa	100	0	-	+
glicina arilamidasa	38	100	+	+
Intervalo de temperatura de crecimiento	10 ºC[a]-41 ºC[b]	5 ºC-45 ºC	4 ºC-45 ºC	4 ºC-42 ºC
pH de crecimiento mínimo[c]	NT			4,5
Contenido de G+C en el ADN (% mol)	61,1 (6 cepas) (DT=0,67)	55,2 (9 cepas) (DT=0,83)	56,4 (4 experimentos) (DT=0,60)	59,2 (HPLC, Simpson *et al.,* 2004) 55,7 (Tm[d])
Leyenda de la Tabla 1: [a], crecimiento en 14 días; [b], en 8 días; [c], en 48h; [d], media de 2 experimentos realizados en el laboratorios; NT, no ensayado en todas las cepas				

Hibridación ADN-ADN

Los niveles de reasociación ADN-ADN a través del genoma bacteriano completo de las cepas GC61 y otras especies de *Bifidobacterium* y de *Aeriscardovia aeriphila* son entre el 3 y el 28 % (como se ilustra en la Tabla 2). Dentro del grupo GC61 (se compararon las cepas GC61 FR49/f/2, MarV3/22, FR39/1, MarV4/2, FR101/h/8, MarV1/5, FR66/e/1, MarC1/13, MarF/3, PicD/1, FR70/g/2 y FR47/2 con la cepa GC61 FR41/2) se observan niveles de reasociación ADN-ADN del 80 % al 100 %.

Los niveles de reasociación ADN-ADN se determinaron usando el método espectrofotométrico para determinar las tasas de renaturalización descrito por De Ley et al. (J Biochem (1970) 12 133-142), ligeramente modificado en la temperatura de hibridación (Gavini et al. Ecology in Health and Disease (2001) 12 40-45). Las determinaciones se realizaron a 63,7 ºC (T_m-25 ºC de acuerdo con el contenido en G+C de la cepa FR41/2), usando un espectrofotómetro Cary 100 (Varian) con un controlador de temperatura (Peltier System, Varian).

Tabla 2

Asociación ADN-ADN (%) entre los ADN de FR41/2 y cepas tipo *Bifidobacterium* y *Aeriscardovia aeriphila*.	
Especie/Colección y nº de referencia	**% de asociación ADN-ADN con FR41/2**
FR49/f/2; MarV3/22	100
FR39/1	95
MarV4/2	94
FR101/h/8; MarV1/5	93
FR66/e/1	92
MarCl/13	89
MarF/3	88
PicD/1	86
FR70/g/2	84
FR47/2	80
B. adolescentis CCUG[a] 18363	24
B. angulatum DSM 20098	18
B. animalis subsp. *animales N*CFB 2242	21
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 27674	NT
B. asteroides DSM 20089	23
B. bifidum DSM 20082	NT
B. bifidum BS98[b]	11
B. boum DSM 20432	14
B. breve NCFB 2257	6
B. catenulatum CCUG 18366	15
B. choerinum DSM 20434	21
B. coryneforme DSM 20216	25

B. cuniculi DSM 20435	12
B. crudilactis LMG 23609	10
B. crudilactis FR59/b/2	NT
B. crudilactis FR47/3	NT
B. dentium CCUG 18367	12
B. gallicum DSM 20093	19
B. gallinarum ATCC 33777	19
B. gallinarum ATCC 33778	NT
B. indicum DSM 20214	17
B. indicum ATCC 25913	NT
B. longum tipo infantis DSM 20088	NT
B. longum tipo longum NCTC 11818	14
B. longum tipo suis SU 859	18
B. longum tipo suis ATCC 27532	NT
B. magnum DSM 20222	10
B. magnum ATCC 27681	NT
B. merycicum RU 915 B	21
B. minimum DSM 20102	8
B. pseudocatenulatum DSM 20438	18
B. pseudolongum subsp. *globosum* RU 224	23
B. pseudolongum subsp. *globosum* ATCC 25864	NT
B. pseudolongum subsp. *pseudolongum* MB7	25
B. pseudolongum subsp. *pseudolongum* DSM 20094	NT
B. psychraerophilum LMG 21775	27
B. pullorum DSM 20433	NT
B. ruminantium RU 687	20
B. saeculare DSM 6531	13
B. scardovii DSM 13734	3
B. subtile DSM 20096	15
B. subtile ATCC 27683	NT
B. thermacidophilum subsp. *thermacidophilum* LMG 21395	17
B. thermacidophilum subsp. *porcinum* LMG 21689	22
B. thermophilum MB1	4
B. thermophilum DSM 20212	NT
Aeriscardovia aeriphila LMG 21773	28
Leyenda de la Tabla 2: [a], El tipo de cepa de colección internacional proviene de: ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Mariland, EEUU; CCUG, Culture Collection of University of Goteborg, Suecia; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Göttingen, Alemania; LMG Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Bélgica, NCFB, National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, Berks, Inglaterra; NCTC, National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, Londres, Inglaterra; RU, SU y MB, B. *Biavati,* Bolonia, Italia; [b], cepa aislada de heces humanas que comparte una similitud de ADN del 100 % con *B. bifidum* DSM 20082; NT, no ensayado.	

Secuenciación del gen de ARNr 16S

Se amplificó y secuenció el gen de ARNr 16S de las cepas del grupo GC61 FR41/2, FR49/f/2 y de FR101/h/8 (Figura 1A). Usando análisis BLAST, se determinó el porcentaje de identidad de secuencia entre la secuencia consenso para el gen de ARNr 16S de las cepas GC61 FR41/2, FR49/f/2 y de FR101/h/8 (véase la Figura 1B) y la secuencia del gen de ARNr 16S de otras especies de *Bifidobacterium* (Figura 2A). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Cepas y nº de referencia	Secuencias que producen alineaciones significativas	Identidades	Longitud de alineación
FR41/2, FR49/f/2, FR101/h/8, secuencia consenso (Figura 1B)	AY174108 *Bifidobacterium psychroaerophilum LMG21775*	95,45 %	1428 pb
	AY952448 *Bifidobacterium crudilactis* FR/59/b/2	95,23 %	1384 pb
	AY174103 *Bifidobacterium minimum*	94,77 %	1416 pb
	D89378 *Bifidobacterium subtile DSM20096*	94,56 %	1453 pb
	D86196 *Bifidobacterium pullorum JCM1214*	94,48 %	1413 pb
	D86188 *Bifidobacterium indicum JCM1302*	94,43 %	1453 pb
	D86191.1 *Bifidobacterium gallinarum JCM6291*	94,3 %	1453 pb

Secuenciación de hsp60

Se amplificó y secuenció el gen de hsp60 a partir de las cepas FR41/2, FR49/f/2 y FR101/h/8 del grupo GC61. Las secuencias se compararon y se identificó la secuencia consenso mostrada en la Figura 3. Esta secuencia consenso refleja una secuencia parcial del gen hsp60. Usando la secuencia consenso se seleccionaron los cebadores de PCR específicos y una sonda específica para las cepas GC61 (Figura 3). Los cebadores y/o la sonda permiten usar PCR a tiempo real para detectar cepas GC61.

Se usó análisis BLAST para identificar otras especies de *Bifidobacterium* que producían alineación significativa con la secuencia consenso del gen hsp60 de la Figura 3.

La Tabla 4 y la Figura 4 muestra la homología/porcentaje de identidad entre una secuencia génica parcial (212 pb) del gen *hsp60* del grupo GC61 de la bacteria *Bifidobacterium vercorsense* (véase la Figura 3) y el gen correspondiente de diferentes especies de *Bifidobacterium* (véase la Figura 4).

Tabla 4

Especie	Referencia	Identidades	Longitud de alineación
Bifidobacterium adolescents	AF210319	87 %	212 b
Bifidobacterium pullorum	AY004278	86 %	212 b
Bifidobacterium gallinarum	AY004279	86 %	212 b
Bifidobacterium dentium	AF240572	86 %	212 b
Bifidobacterium choerinum	AY013247	86 %	212 b
Bifidobacterium ruminantium	AF240571	86 %	212 b
Bifidobacterium cuniculi	AY004283	86 %	212 b
Bifidobacterium minimum	AY004284	86 %	210 b
Bifidobacterium thermacidophilum	AY166558	86 %	210 b
Bifidobacterium infantis	AY166569	86 %	207 b
Bifidobacterium longum	AY835622	86 %	207 b
Bifidobacterium boum	AF240566	85 %	212 b
Bifidobacterium merycicum	AY004277	85 %	212 b
Bifidobacterium bifidum	AY004280	85 %	212 b
Bifidobacterium pseudocatenulatum	AY004274	85 %	212 b
Bifidobacterium gallicum	AF240575	85 %	212 b
Bifidobacterium suis	AY013248	85 %	207 b
Bifidobacterium breve	AF240566	85 %	207 b
Bifidobacterium psychraerophilum	AY339132	85 %	204 b
Bifidobacterium crudilactis	Fr54/e/1 (aislado de lab.)	85 %	193 b
Bifidobacterium thermophilum	AF240567	84 %	212 b

Bifidobacterium magnum	AF240569	84 %	212 b
Bifidobacterium pseudolongum globosum	AF286736	84 %	212 b
Bifidobacterium angulatum	AF240568	84 %	212 b
Bifidobacterium animalis	AY488183	84 %	212 b
Bifidobacterium catenulatum	AY166565	83 %	212 b
Bifidobacterium tsurumiense	AB244755	82 %	212 b
Bifidobacterium indicum	AF240574	82 %	207 b
Bifidobacterium asteroides	AF240570	81 %	212 b
Bifidobacterium coryneforme	AY004275	80 %	207 b

Detección específica de GC61 por PCR

Se desarrolló un ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real para detectar específicamente el grupo GC61.

El ADN se preparó usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® de Promega™. Se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano durante 2 minutos a 13000xg. El sobrenadante se desechó y se resuspendió el sedimento en 480 µl de EDTA, 60 µl de lisozima, y 120 µl de solución de lisis celular y se incubó durante 45 minutos a 37 ºC. Después de centrifugación, se añadieron 600 µl de solución de lisis nuclear al sedimento seguido de incubación durante 5 min. a 80 ºC. Cuando se enfrió, se añadieron 200 µl de solución de lisis proteica seguido de agitación con vórtice. La suspensión resultante entonces se incubó durante 5 min. en hielo y se centrifugó durante 5 min. a 13000xg. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio que contenía 600 µl de isopropanol y después se centrifugó el tubo. El sobrenadante se decantó y se añadieron 600 µl de etanol al 70 % y se centrifugó el tubo. Se aspiró el etanol y se secó al aire el sedimento durante 10 min. Finalmente, se rehidrató el sedimento de ADN en 100 µl de solución de rehidratación durante una noche a 4 ºC.

Las mezclas de reacción de amplificación contenían de 10 a 50 ng de ADN, 12,5 µl de TaqMan universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, EEUU), 900 nM de cada cebador, 200 nM de sonda fluorogénica en un volumen total de 25 µl. Los cebadores usados fueron: 5'TCCGACGCCATCGTCAA 3' (ID de secuencia Nº 6) y 5'-CGATCTGCTCCTTGGTTTCC-3' (ID de secuencia Nº 7). La secuencia de la sonda era 5'-TCGTCGCCTCGGC-3' (ID de secuencia Nº 8). Como control, se preparó una mezcla de reacción que carecía de muestra de ADN. Las secuencias de los cebadores y la sonda se presentan en la Figura 3.

Para la amplificación se programó un temociclador del siguiente modo: 50 ºC durante 2 min., 95 ºC durante 10 min., y después 40 ciclos de PCR de dos temperaturas (95 ºC durante 15 s y 60 ºC durante 60 s) y se realizó la detección en un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster city, EEUU). Los resultados de PCR para las muestras se expresaron como deltaRn (sensibilidad relativa) de la señal de fluorescencia.

Una muestra se consideró positiva cuando el valor Ct era inferior a 35 para un valor de fluorescencia relativa (nivel Rn) de al menos 1,0.

En los experimentos de PCR realizados, todos los aislados del grupo GC61 fueron positivos y todas las demás especies de *Bifidobacterium* (*animalis, thermophilum, choerinum, globosum, pseudolongum, merycicum, ruminatum, minimum, cuniculi, adolescentis, bifidum, breve, dentium, longum, pseudocatenulatum* y *crudilactis*) ensayadas fueron negativas en este ensayo.

Resistencia gastrointestinal de cepas GC61

En esta parte del estudio se ensayaron las cepas FR/49/f/2 y FR/41/2 del grupo *Bifidobacterium GC61*.

Los materiales usados incluyen:

MRS: medio Man Rogosa Sharpe (Oxoid GmbH, Wesel, Alemania),
Jugo gástrico: solución de pepsina (0,3 % p/v) (P7000 Sigma) en NaCl-agua (0,5 % p/v) ajustada a pH 2 y 3 con HCl.
Jugo pancreático: solución de pancreatina USP (1 g/1) (P1500 Sigma) en NaCl-agua (0,5 % p/v) ajustada a pH 8 con NaOH.
Sal biliar: medio MRS con bilis al 0,3 %, 0,5 % y 1 % (p/v) (LP0055, Oxo id).
Solución tampón: K_2HPO_4 50 mM

Estudio a pH 2 y 3 - se inocularon dos cepas de GC61, FR/49/f/2 y FR/41/2, en caldo MRS y se incubaron de forma anaeróbica a 37 ºC durante 36 horas. Después de centrifugación, las bacterias se resuspendieron en solución al 0,5

% de NaCl ajustada a pH 2 o pH 3. La suspensión se incubó de forma anaeróbica a 37 ºC y se tomaron muestras cada hora durante 5 horas. Las muestras se sembraron en placa usando un sembrador espiral en medio agar MRS (Don Whitley Scientific LTD., Shipley, West Yorkshire, RU). Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 ºC antes de contar la cantidad de colonias. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina anaeróbica. Las manipulaciones se hicieron por triplicado.

Estudio en jugo gástrico a pH 2 y 3 - las dos cepas (FR/49/f/2 y FR/41/2) se inocularon en caldo MRS y se incubaron de forma anaeróbica at 37 ºC durante 36 horas. Después de centrifugación, las bacterias se resuspendieron en solución de jugo gástrico ajustada a pH 2 o pH 3. La suspensión se incubó de forma anaeróbica a 37 ºC y se tomaron muestras cada hora durante 5 horas. Las muestras se sembraron en placa usando un sembrador espiral en medio agar MRS (Don Whitley Scientific LTD., Shipley, West Yorkshire, RU). Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 ºC antes de contar la cantidad de colonias. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina anaeróbica. Las manipulaciones se hicieron por triplicado.

Estudio en jugo pancreático a pH 8 - las dos cepas (FR/49/f/2 y FR/41/2) se inocularon en caldo MRS y se incubaron de forma anaeróbica a 37 ºC durante 36 horas. Después de centrifugación, las bacterias se resuspendieron en solución de jugo pancreático ajustada a pH 8. La suspensión se incubó de forma anaeróbica a 37 ºC y se tomaron muestras cada hora durante 5 horas. Las muestras se sembraron en placa usando un sembrador espiral en medio agar MRS (Don Whitley Scientific LTD., Shipley, West Yorkshire, RU). Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 ºC antes de contar la cantidad de colonias. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina anaeróbica. Las manipulaciones se hicieron por triplicado.

Estudio en medio MRS con sales biliares - las dos cepas (FR/49/f/2 y FR/41/2) se inocularon en caldo MRS y se incubaron de forma anaeróbica a 37 ºC durante 36 horas. Después de centrifugación, las bacterias se resuspendieron en medio MRS con sales biliares al 0,3 %, 0,5 % y 1 %. La suspensión se incubó de forma anaeróbica a 37 ºC y se tomaron muestras al inicio del experimento y después de 48 horas. Las muestras se sembraron en placa usando un sembrador espiral en medio agar MRS (Don Whitley Scientific LTD., Shipley, West Yorkshire, RU). Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 ºC antes de contar la cantidad de colonias. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina anaeróbica. Las manipulaciones se hicieron por triplicado.

Resultados

Se evaluó *in vitro* la resistencia a las condiciones gastrointestinales de algunos aislados (Fr41/2 y Fr49/f/2). Los resultados (en log10 del cambio de ufc) mostrados en las Tablas 5 y 6 confirman el uso probiótico potencial de GC61.

La Tabla 5 muestra la resistencia de las cepas Fr49/f/2 y Fr41/2 de GC61 a soluciones de pepsina a pH 2 y pH 3 y enzimas pancreáticas a pH 8 después de 5 horas a 37 ºC en cabina anaeróbica. Los resultados se expresan en log10 de la reducción después del periodo de incubación. Se observó una buena resistencia a pH 3 y con enzimas pancreáticas (menos de 1 log10 de ufc de reducción).

Tabla 5

	Agua fisiológica		**Pepsina**		**Enzimas pancreáticas**
Cepas	**pH 2**	**pH 3**	**pH 2**	**pH 3**	**pH 8**
Fr49/f/2	**> -3**	**0**	**>- 4,8**	**-0,2**	**-0,2**
Fr41/2	**> -3**	**0**	**-3,1**	**-0,4**	**-0,5**

La Tabla 6 muestra la resistencia de las cepas Fr49/f/2 y Fr41/2 a sales biliares en medio MRS después de 48 horas a 37 ºC en cabina anaeróbica. Los resultados se expresan en log10 de la reducción o crecimiento después del periodo de incubación. Se observó una baja cantidad de reducción a pH 3 y con sales biliares al 0,3 % (menos de 2 log10 de ufc de reducción).

Tabla 6

	Sales biliares			
Cepas	**1 %**	**0,5 %**	**0,3 %**	**0 %**
Fr49/f/2	**-3,1**	**-2,6**	**-1**	**+1,1**
Fr41/2	**-3,5**	**-3,1**	**-1,8**	**+2**

Modulación de la inmunidad gastrointestinal

También se determinó que algunos aislados del grupo GC61 tienen interesantes efectos inmunomoduladores modulando los niveles de citoquinas.

IL-10 es una citoquina producida por células T, células B, monocitos y macrófagos. IL-10 aumenta la proliferación y diferenciación de células B en células secretoras de anticuerpos. IL-10 muestra principalmente actividades anti-inflamatorias y puede ser un importante regulador negativo de la destrucción de tejido conectivo observada en enfermedades inflamatorias crónicas.

IL-12 es una citoquina producida principalmente por células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos, temprana en la cascada inflamatoria. Es un potente inductor de la producción de IFNγ y es un activador de células citolíticas naturales. La inhibición de IL-12 *in vivo* puede tener algún valor terapéutico en el tratamiento de trastornos inflamatorios, tales como esclerosis múltiple.

IFNγ es principalmente un producto de linfocitos T activados y sinergiza con otras citoquinas provocando una estimulación más potente de monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales.

Para ensayar el efecto de GC61 sobre la producción de IL-10, IL-12 e IFNγ, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos (n=5) por centrifugación en gradiente de densidad. Las células mononucleares de sangre periférica aisladas después se estimularon con aislados bacterianos, incluyendo los aislados bacterianos probióticos GC61 FR49/f/2, FR101/h/8, FR39/1, FR41/2, y FR66/e/1, durante un periodo de 72 horas a 37 ºC. Los sobrenadantes después se recogieron, centrifugaron y ensayaron para los niveles de IL-10, IL-12 e IFNγ por ELISA.

Método

Se cultivaron las cepas de *Bifidobacterium*, incluyendo FR49/f/2, FR101/h/8, FR39/1, FR41/2, y FR66/e/1, en medio MRS (Difco) suplementado con cisteína (Sigma a 0,5 g/) en frascos anaeróbicos con bolsas gaspack (GEN bag Biomerieux). Todas las cepas resultaron ser puras.

Se usaron subcultivos de estas cepas puras en todas las experimentaciones posteriores y se conservaron en forma de cultivos en glicerol a -80 ºC a modo de reserva y control de calidad.

Preparación de PBMC

Como se ilustra en la Figura 5, se diluyó sangre humana fresca, obtenida de sujetos sanos, a una proporción 1:2 con PBS-Ca (GIBCO) (tubo de ensayo A en la Figura 6) y se purificó en un gradiente de Ficoll (GIBCO). Después de centrifugación a 400x g durante 30 min. a 20 ºC las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) formaron una capa anular interfásica en el suero (tubo de ensayo B en la Figura 5). Las PBMC se aspiraron con cuidado, se suspendieron a un volumen final de 50 ml usando PBS-Ca y se lavaron tres veces en el mismo tampón con etapas de centrifugación a 350x g durante 10 min. a 20 ºC.

Las PBMC posteriormente se resuspendieron usando medio RPMI completo (GIBCO), suplementado con suero de ternera fetal al 10 % p/v (inactivado a 56 ºC durante 30 min.), L-glutamina al 1 % p/v (GIBCO), y gentamicina (150 µg/ ml) (GIBCO). Las PBMC se contaron al microscopio y se ajustaron a una concentración de $2x10^6$ células/ml y se distribuyeron (en alícuotas de 1 ml) en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Coming, Inc.).

Preparación de bacterias

Se cultivaron cultivos de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* durante una noche y después se lavaron dos veces con tampón PBS, pH 7,2, antes de resuspenderse en PBS a una concentración de 2×10^9 ufc/ml. La Tabla 7 detalla las cepas bacterianas estudiadas, que incluyen los aislados GC61 FR49/f/2 (=cepa C), FR101/h/8 (=cepa F), FR39/1 (=cepa 1), FR41/2 (=cepa M), y FR66/E/1 (=cepa N). Además de las cepas GC61 (cepas A a P), también se estudiaron cepas de otras especies de *Bifidobacterium* (cepas Q a Z).

Tabla 7

nº IPL de cepa	nº original	Grupo taxonómico
cepa A	FR62/b/3	Grupo 1
cepa B	FR56/a/3	Grupo 1
cepa C	FR49/f/2	Grupo GC61
cepa D	FR55/d/2	Grupo 1
cepa E	FR54/e/1	Grupo 1
cepa F	FR101/h/8	Grupo GC61
cepa G	FR59/b/2	Grupo 1
cepa H	FR57/h/4	Grupo 1

cepa I	FR39/1	Grupo GC61
cepa J	FR35/5	Grupo 1
cepa K	FR50/f/4	Grupo 1
cepa L	FR60/h/1	Grupo 1
cepa M	FR41/2	Grupo GC61
cepa N	FR66/e/1	Grupo GC61
cepa O	FR51/h/1	Grupo 1
cepa P	FR66/a/1	Grupo 1
cepa Q	C 4A *B.adolescentis*	
cepa R	C 3-12 *B.adolescentis*	
cepa S	C 5-19 *B.adolescentis*	
cepa T	C 1-7 *B.longum*	
cepa U	C2-2 *B.pseudocatenulatum*	
cepa V	C 6-20 *B.breve*	
cepa W	C 9-4 *B.dentium*	
cepa X	C 9-5 *B.adolescentis*	
cepa Y	C 12-19 *B.dentium*	
cepa Z	C 11-15 *B.dentium*	

Incubación de PBMC

Después se transfirieron 10 µl de las suspensiones bacterianas en los poquillos que contenían las PBMC. Las placas se incubaron después a 37 ºC en una atmósfera de CO_2 al 5 %/aire al 95 %. Después de 24 h de incubación, se aspiró el sobrenadante, se centrifugó a 2000 rpm (modelo Eppendorf) y se retiró el sobrenadante y se almacenó a -20 ºC. Como control (Temoin), se realizó el procedimiento usando un tampón sin bacterias en lugar de la suspensión bacteriana.

Cuantificación de citoquinas

Se determinó el nivel de la citoquina pro-inflamatoria/Thl IFNγ, de IL-12 y de la citoquina reguladora anti-inflamatorio IL-10 en el sobrenadante retirado de las PBMC tratadas.

Los niveles de expresión de citoquinas se determinaron por ELISA. Se recubrieron placas ELISA con uno o más anticuerpos anti-citoquina específicos (en un procedimiento durante una noche) y se bloqueó el anticuerpo con PBS / BSA al 1 %.

Las citoquinas se detectaron y cuantificaron usando una reacción de estreptavidina. Se usaron los kits comerciales de Pharmingen que contienen TMB (tetrametilbenzidina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Los resultados del análisis de citoquinas se presentan en las Figuras 6A a 6D. Cada punto de datos es la media del análisis de 5 muestras sanguíneas, cada una de diferentes donantes.

Como puede observarse a partir de la Figura 6C, las cepas FR49/f/2 (cepa C), FR39/1 (cepa I), FR41/2 (cepa M) y FR66/E/1 (cepa N) indujeron todas significativamente la producción de IL-10 después de co-incubación con células mononucleares de sangre periférica. La cepa FR101/H/8 (cepa F) no alteró significativamente los niveles de IL-10 en comparación con los controles.

Como puede observarse a partir de la Figura 6B, la cepa FR49/f/2 (cepa C) ni indujo estimulación de producción de IL-12 y mostró un interesante efecto anti-inflamatorio indicado por el elevado nivel del coeficiente IL-10/IL-12 (Figura 6D). El nivel observado para FR49/f/2 es tan elevado como la mejor especie de *Bifidobacterium* previamente ensayada.

Todas las cepas ensayadas excepto la cepa FR49/f/2 indujeron producción de IFNγ.

En conclusión, la cepa FR49/f/2 tiene un buen perfil para su uso en aplicaciones probióticas anti-inflamatorias.

Evaluación de las cepas FR49/f/2 (cepa C) y FR66/a/1 (cepa P) para su potencial inmunomodulador en un modelo de colitis

La cepa C (FR49/f/2) del grupo GC61 y la cepa P (FR66/a/1) del grupo 1 no GC61 mostraron propiedades opuestas en ensayos de PBMC (Figura 6) y se estudiaron adicionalmente para evaluar su potencial inmunomodulador en un modelo animal de colitis.

Se usaron las cepas V (C 6-20) y X (C 9-5) como controles positivos, ya que tienen una elevada proporción IL-10/IL-12 en estudios *in vitro*.

Reactivos químicos

Los agentes químicos y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical, Francia salvo que se indique otra cosa.

Animales

Los experimentos en animales se realizaron en un establecimiento acreditado (número A59107; instalación animal del Institut Pasteur de Lille, Francia) de acuerdo con las directrices del gobierno francés (número 86/609/CEE).

Se adquirieron ratones adultos hembra BALB/C convencionales (7/8 semanas de edad), con flora homogénea, amamantados (Felasa, 1994 - (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Laboratory Animals. 28: 1-12) y mantenidos en condiciones sin patógenos específicos (SPF), de Iffa Credo (Saint-Germain sur l'Arbresle, Francia). Los ratones se alojaron en grupos (8-10/jaula) y se mantuvieron en campanas de filtro superior detrás de una barrera en condiciones SPF. Los ratones tuvieron acceso libre a agua corriente y pienso para roedores y experimentaron al menos una semana de aclimatación antes de cualquier intervención. Se usaron grupos de 10 ratones para cada grupo experimental.

Preparación de cultivos bacterianos y administración a ratones

Las cepas investigadas se cultivaron como se ha descrito anteriormente en el método de PBMC. Se usaron 10^8 bacterias por administración diaria.

Inducción con TNBS de colitis aguda y diseño del estudio

El diseño del estudio de intervención bacteriana convencional se representa en la Figura 7. En resumen, se administraron suspensiones bacterianas a los ratones desde el día -5 antes de la inducción de colitis hasta el +1 después de la inducción de colitis el día 0. Se evaluaron la tasa de mortalidad, los valores macroscópicos de inflamación, el peso corporal y la MPO (actividad mieloperoxidasa) 48 h después de la inducción de colitis. Se anestesió a los ratones con 3 mg de ketamina (Imalgene 1000; Merial Lyon, Francia), 46,7 µg de diazepam (Valium, Roche Diagnostics) y 15 µg de atropina (Aguettant Laboratory, Lyon, Francia) disueltos en NaCl al 0,9 %. Se disolvió TNBS (Fluka, Francia) a una dosis de 120 mg/kg de peso corporal en NaCl al 0,9 %/etanol (50/50 v/v) y se administraron 50 µl por vía intra-rectal a 4 cm proximal al ano, usando un catéter 3,5 F (EO 3416-1; Biotrol, Chelles, Francia). Los ratones de "control negativo" recibieron solamente etanol al 50 % ("ratones de etanol"). Los ratones de "control positivo" (también mencionados como ratones "de TNBS-control" o "tratados con TNBS") se alimentaron solamente con tampón $NaHCO_3$, en comparación con los ratones "tratados", a los que se administró adicionalmente una cantidad de bifidobacterias. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical 2 días después de la administración de TNBS. Los ratones se pesaron antes de la administración de TNBS y después del sacrificio.

Evaluación macroscópica de colitis

El colon se diseccionó dejándolo libre de la grasa y el mesenterio, antes de retirarlo y abrirlo con cuidado y limpiarlo con PBS. Se evaluó el daño al colon y la inflamación de acuerdo con los criterios de Wallace (Wallace et al. 1989, Gastroenterology. 96(1):29-36 - resumido en la Tabla 9). Estos criterios para valoración macroscópica (valores que varían entre 0 y 10) se han establecido bien en estudios tanto de ratas como de ratones, y reflejan (i) la intensidad de la inflamación, (ii) el engrosamiento de la mucosa del colon y (iii) el grado de la ulceración (Tabla 9).

Tabla 9

Valor de Wallace	Descripción de los síntomas
0	Aspecto normal del colon
1	Hiperemia focal, ligero engrosamiento, sin úlceras
2	Hiperemia, engrosamiento prominente, sin úlceras
3	Ulceración con inflamación en un sitio
4	Ulceración con inflamación en dos o más sitios

5	Los sitios principales de daño se extienden > 1cm
6-10	Cuando el área de daño se extiende > 2cm, el valor se aumenta en 1 por cada cm adicional de implicación.

Actividad mieloperoxidasa (MPO)

Se determinó la actividad de la enzima MPO, un marcador de gránulos primarios de neutrófilos polimorfonucleares, en el tejido del colon proximal de acuerdo con Bradley et al. (1982, J Invest Dermatol. 78(3):206-9). Inmediatamente después del sacrificio, se tomó una muestra de colon (1 cm de longitud) a 3 cm de la unión ceco-colónica. Las muestras se suspendieron en un tampón fosfato potásico (50 mmol/l, pH 6,0) y se homogeneizaron en hielo usando un politrón. Se emprendieron tres ciclos de congelación y descongelación. Las suspensiones se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min. a 4 ºC. Se desecharon los sobrenadantes y los sedimentos se resuspendieron en tampón bromuro de hexadecil trimetilamonio (HTAB al 0,5 %, p/v, en 50 mmol/l de tampón fosfato potásico, pH 6,0), un detergente que induce la liberación de MPO desde los gránulos primarios de neutrófilos polimorfonucleares. Estas suspensiones se sonicaron en hielo, y se centrifugaron de nuevo durante 15 min. a 4 ºC. Los sobrenadantes obtenidos se diluyeron en tampón fosfato potásico (pH 6,0) que contenía 0,167 mg/ml de diclorhidrato de O-dianisidina y un 0,0005 % de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se usó MPO de neutrófilos humanos (0,1 U/100 ml, Sigma) como patrón. Se registraron los cambios en la absorbancia a 450 nm, durante 5 y 10 min., con un espectrofotómetro de microplaca (ELX808, Bio-Tek Instrument, CA). Una unidad de actividad MPO se define como la cantidad de MPO que degrada 1 mmol de peróxido de hidrógeno/min/ml a 25 ºC. Los resultados se dan como la media +/- ETM.

Resultados

El grado de protección conferido por una cepa bacteriana se expresa en este documento como el "% de protección relativa" que se refiere al % de reducción de la inflamación macroscópica media de ratones tratados en relación con el valor medio de ratones no tratados (grupo de TNBS-control). El % de protección relativa se calcula como se detalla a continuación.

% **de protección relativa =** 100 x (valor promedio de Wallace del grupo de "control positivo" - valor promedio de Wallace del grupo de "tratamiento") / valor promedio de Wallace del grupo de "control positivo"

Este cálculo permite la comparación de grupos de ratones dentro y entre experimentos.

La aplicación de esta 'protección relativa' al nivel promedio de colitis de cada grupo de "control positivo", también permite la eliminación de las inevitables variaciones del valor de Wallace entre experimentos independientes.

La Figura 8A-C y la Tabla 10 muestran los resultados obtenidos cuando se analizaron 6 grupos diferentes de 10 ratones.

grupo 1: 10 ratones tratados con TNBS (sin bacterias)
grupo 2: 10 ratones tratados con TNBS (+ cepa Fr 49/f/2)
grupo 3: 10 ratones tratados con TNBS (+ cepa Fr 66/a/1)
grupo 4: 10 ratones tratados con TNBS (+ cepa C6-20)
grupo 5: 10 ratones tratados con TNBS (+ cepa C9-5)
grupo 6: 10 ratones tratados con TNBS (- cepa de control de Bifidobacterium)

Tabla 10

	Valor de Walace	etm	student	Protección	
Grupo 1 - TNBS	4,75	0,037		0,00	
Grupo 2 - C FR49/f/2	1,9	0,056	1,38 10exp-11	60,00	****
Grupo 3 - P FR66/a/1	2,8	0,161	0,000346	41,05	***
Grupo 4 - V B.breve C6-20	2	0,163	8,67 10exp-6	57,89	****
Grupo 5 - X B.adolescentis C9-5	1,8	0,147	1,01 10exp-6	62,11	****
Grupo 6 - Bifido ctrl	2,7	0,211	0,0018	43,16	**

Como se esperaba debido a la proporción IL-10/IL-12, la cepa C (FR49/f/2) protegió bien en el modelo de colitis.

La cepa P (FR66/a/1), otra *Bifidobacterium* no del grupo GC61, también mostró alguna protección.

Los datos presentados demuestran que algunos aislados del grupo GC61, y la cepa FR49/f/2 en particular, tienen

propiedades anti-inflamatorias, lo que apoya la afirmación de que pueden usarse como agentes inmunomoduladores.

Lista de secuencias

<110> UNIVERSITE DE LIEGE

<120> ESPECIES BIFIDOBACTERIANAS

<130> 2007-08

<140> EP07118938.5
<141> 20-10-2007

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 1470
<212> ADN
<213> Bifidobacterium sp.
<400> 1

```
atcctggctc aggatgaacg ctggcggcgt gcttaacaca tgcaagtcga acgggatccg      60
aggcgcttgc gtctcggtga gagtggcgaa cgggtgagta atacgtgact aacctgcctc     120
atacatcgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccga atgctccaac cttccgcatg     180
gatggttggg aaagcgttag cggtatgaga tggggtcgcg tcctatcagc ttgttggtgg     240
ggtgaaggcc caccaaggct tcgacgggta gccggcctga gagggtgacc ggccacattg     300
ggactgagat acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg     360
cgaaagcctg atgcagcgac gccgcgtgcg ggatgaaggc cttcgggttg taaaccgctt     420
ttgattggga gcaagcgaga gtgagtgtac ctttcgaata agcaccggct aactacgtgc     480
cagcagccgc ggtaatacgt agggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagagc     540
tcgtaggcgg tttgtcgcgt ctggtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atctgcgccg     600
ggtacgggca ggctagagtg cgacagggga gactggaatt cccggtgtaa cggtggaatg     660
tgtagatatc gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggtcgtc actgacgctg     720
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg     780
gtggatgctg gatgtggggc ccattccacg ggttccgtgt cggagctaac gcgttaagca     840
tcccgcctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag aaattgacgg gggcccgcac     900
aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag aaccttacct gggcttgaca     960
tgttcctgac ggccgcggag acgcggcttc ccttcggggc aggttcacag gtggtgcatg    1020
gtcgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg    1080
ccttgtgttg ccagcacgtt atggtgggaa ctcgcaaggg accgccgggg ttaactcgga    1140
ggaaggtggg gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggcttc acgcatgcta    1200
caatggccgg tacaacggga tgcgacgcgg tgacgcggag cggatccctt aaaaccggtc    1260
tcagttcgga ttggagtctg caactcgact ccatgaaggc ggagtcgcta gtaatcgcga    1320
atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcaagtcatg    1380
aaagtgggta gcacccgaag ccggtggcct aaccttttgg ggggagccgt ctaaggtgag    1440

actcgtgatt gggactaagt cgtaacaagg                                     1470
```

<210> 2
<211> 1453
<212> ADN
<213> Bifidobacterium sp.

<400> 2

```
ggctcaggat gaacgctggc ggcgtgctta acacatgcaa gtcgaacggg atccgaggcg      60
cttgcgtctc ggtgagagtg gcgaacgggt gagtaatacg tgactaacct gcctcataca     120
tcggaatagc tcctggaaac gggtggtaat gccgaatgct ccaaccttcc gcatggatgg     180
ttgggaaagc gttagcggta tgagatgggg tcgcgtccta tcagcttgtt ggtggggtga     240
aggcccacca aggcttcgac gggtagccgg cctgagaggg tgaccggcca cattgggact     300
gagatacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgaaa     360
gcctgatgca gcgacgccgc gtgcgggatg aaggccttcg ggttgtaaac cgcttttgat     420
tgggagcaag cgagagtgag tgtacctttc gaataagcac cggctaacta cgtgccagca     480
gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa agagctcgta     540
ggcggtttgt cgcgtctggt gtgaaagtcc atcgcttaac ggtggatctg cgccgggtac     600
gggcaggcta gagtgcgaca ggggagactg gaattcccgg tgtaacggtg gaatgtgtag     660
atatcgggaa gaacaccaat ggcgaaggca ggtctctggg tcgtcactga cgctgaggag     720
cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacggtgga     780
tgctggatgt ggggcccatt ccacgggttc cgtgtcggag ctaacgcgtt aagcatcccg     840
cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact caaagaaatt gacgggggcc cgcacaagcg     900
gcggagcatg cggattaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggct tgacatgttc     960
ctgacggccg cggagacgcg gcttcccttc ggggcaggtt cacaggtggt gcatggtcgt    1020
cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgccttg    1080
tgttgccagc acgttatggt gggaactcgc aagggaccgc cggggttaac tcggaggaag    1140
gtggggatga cgtcagatca tcatgcccct tacgtccagg gcttcacgca tgctacaatg    1200
gccggtacaa cgggatgcga cgcggtgacg cggagcggat cccttaaaac cggtctcagt    1260
tcggattgga gtctgcaact cgactccatg aaggcggagt cgctagtaat cgcgaatcag    1320
caacgtcgcg gtgaatgcgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaag tcatgaaagt    1380
gggtagcacc cgaagccggt ggcctaacct tttgggggga gccgtctaag gtgagactcg    1440
tgattgggac taa                                                       1453
```

<210> 3
<211> 1467
<212> ADN
<213> Bifidobacterium sp.

<400> 3

```
gctcaggatg aacgctggcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcgaacggga tccgaggcgc      60
ttgcgtctcg gtgagagtgg cgaacgggtg agtaatacgt gactaacctg cctcatacat     120
```

```
cggaatagct cctggaaacg ggtggtaatg ccgaatgctc caaccttccg catggatggt    180
tgggaaagcg ttagcggtat gagatggggt cgcgtcctat cagcttgttg gtggggtgaa    240
ggcccaccaa ggcttcgacg ggtagccggc ctgagagggt gaccggccac attgggactg    300
agatacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgaaag    360
cctgatgcag cgacgccgcg tgcgggatga aggccttcgg gttgtaaacc gcttttgatt    420
gggagcaagc gagagtgagt gtacctttcg aataagcacc ggctaactac gtgccagcag    480
ccgcggtaat acgtagggtg caagcgttat ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag    540
gcggtttgtc gcgtctggtg tgaaagtcca tcgcttaacg gtggatctgc gccgggtacg    600
ggcaggctag agtgcgacag gggagactgg aattcccggt gtaacggtgg aatgtgtaga    660
tatcgggaag aacaccaatg gcgaaggcag gtctctgggt cgtcactgac gctgaggagc    720
gaaagcgtgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacggtggat    780
gctggatgtg gggcccattc cacgggttcc gtgtcggagc taacgcgtta agcatcccgc    840
ctggggagta cggccgcaag gctaaaactc aaagaaattg acgggggccc gcacaagcgg    900
cggagcatgc ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctgggctt gacatgttcc    960
tgacggccgc ggagacgcgg cttcccttcg gggcaggttc acaggtggtg catggtcgtc   1020
gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc ctcgccttgt   1080
gttgccagca cgttatggtg ggaactcgca agggaccgcc ggggttaact cggaggaagg   1140
tggggatgac gtcagatcat catgcccctt acgtccaggg cttcacgcat gctacaatgg   1200
ccggtacaac gggatgcgac gcggtgacgc ggagcggatc ccttaaaacc ggtctcagtt   1260
cggattggag tctgcaactc gactccatga aggcggagtc gctagtaatc gcgaatcagc   1320
aacgtcgcgg tgaatgcgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcaagt catgaaagtg   1380
ggtagcaccc gaagccggtg gcctaacctt ttgggggag ccgtctaagg tgagactcgt   1440
gattgggact aaagtcgtaa acaaggt                                       1467
```

<210> 4
<211> 1452
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia consenso

<400> 4

```
gctcaggatg aacgctggcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcgaacggga tccgaggcgc      60
ttgcgtctcg gtgagagtgg cgaacgggtg agtaatacgt gactaacctg cctcatacat     120
cggaatagct cctggaaacg ggtggtaatg ccgaatgctc caaccttccg catggatggt     180
tgggaaagcg ttagcggtat gagatggggt cgcgtcctat cagcttgttg gtggggtgaa     240
ggcccaccaa ggcttcgacg ggtagccggc ctgagagggt gaccggccac attgggactg     300
agatacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgaaag     360

cctgatgcag cgacgccgcg tgcgggatga aggccttcgg gttgtaaacc gcttttgatt     420
gggagcaagc gagagtgagt gtacctttcg aataagcacc ggctaactac gtgccagcag     480
ccgcggtaat acgtagggtg caagcgttat ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag     540
gcggtttgtc gcgtctggtg tgaaagtcca tcgcttaacg gtggatctgc gccgggtacg     600
ggcaggctag agtgcgacag gggagactgg aattcccggt gtaacggtgg aatgtgtaga     660
tatcgggaag aacaccaatg gcgaaggcag gtctctgggt cgtcactgac gctgaggagc     720
gaaagcgtgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacggtggat     780
gctggatgtg gggcccattc cacgggttcc gtgtcggagc taacgcgtta agcatcccgc     840
ctggggagta cggccgcaag gctaaaactc aaagaaattg acgggggccc gcacaagcgg     900
cggagcatgc ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctgggctt gacatgttcc     960
tgacggccgc ggagacgcgg cttcccttcg gggcaggttc acaggtggtg catggtcgtc    1020
gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc ctcgccttgt    1080
gttgccagca cgttatggtg ggaactcgca agggaccgcc ggggttaact cggaggaagg    1140
tggggatgac gtcagatcat catgcccctt acgtccaggg cttcacgcat gctacaatgg    1200
ccggtacaac gggatgcgac gcggtgacgc ggagcggatc ccttaaaacc ggtctcagtt    1260
cggattggag tctgcaactc gactccatga aggcggagtc gctagtaatc gcgaatcagc    1320
aacgtcgcgg tgaatgcgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcaagt catgaaagtg    1380
ggtagcaccc gaagccggtg gcctaacctt ttgggggag ccgtctaagg tgagactcgt     1440
gattgggact aa                                                        1452
```

<210> 5
<211> 212
<212> ADN
<213> Bifidobacterium sp.

<400> 5

```
tgcatgaggg tctgaagaac gtcgtggccg gatccaaccc gatcgcactg cgtcgcggtg      60
tcgagaaggc gtccgacgcc atcgtcaagg agctcgtcgc ctcggccaag gacgtggaaa     120
ccaaggagca gatcgcggct acggccacga tttccgccgc tgatcccgag gtcggcgaca     180
agatcgccga agcactcgac aaggtcggcc ag                                   212
```

<210> 6
<211> 17

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
tccgacgcca tcgtcaa 17

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7
cgatctgctc cttggtttcc 20

<210> 8
<211> 13
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sonda

<400> 8
tcgtcgcctc ggc 13

REIVINDICACIONES

1. Bifidobacterium GC61 depositada en la CNCM el 9 de enero de 2007 con número de acceso CNCMI-3712.

2. Bifidobacterium GC61 depositada en la CNCM el 9 de enero de 2007 con número de acceso CNCMI-3713.

3. Una cepa de Bifidobacterium que tiene un gen de ARNr 16S con más de un 98 % de homología de secuencia de ADN con el gen de ARNr 16S (SEC ID Nº 4) de Bifidobacterium GC61 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

4. Una cepa de Bifidobacterium que tiene un gen hsp60 con más del 90 % de homología de secuencia de ADN con el gen hsp60 (SEC ID Nº 5) de Bifidobacterium GC61 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una composición probiótica que comprende Bifidobacterium GC61 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 y uno o más excipientes aceptables.

6. Una composición probiótica como se ha definido en la reivindicación 5 en donde dicha composición es un producto alimenticio.

7. Una composición probiótica como se ha definido en la reivindicación 6 en donde dicho producto alimenticio es un producto de base láctea seleccionado entre leche fermentada, leche vegetal, leche de soja, mantequilla, queso y yogur.

8. Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 para su uso como sustancia terapéutica o profiláctica, en particular en el tratamiento y/o la profilaxis de una o más de enfermedades gastrointestinales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cáncer (particularmente de los sistemas gastrointestinal e inmune), enfermedad diarreica, diarrea asociada con antibióticos, diarrea pediátrica, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, diabetes mellitus, rechazo de un órgano transplantado, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital, enfermedad de transmisión sexual, infección por VIH, replicación del VIH, diarrea asociada con el VIH, traumatismo asociado a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, función de barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, cardiopatía coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, trastornos epidérmicos, psoriasis; acné vulgar y/o exceso de colesterol.

9. Uso de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una o más de enfermedades gastrointestinales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cáncer (particularmente de los sistemas gastrointestinal e inmune), enfermedad diarreica, diarrea asociada con antibióticos, diarrea pediátrica, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, diabetes mellitus, rechazo de un órgano transplantado, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital, enfermedad de transmisión sexual, infección por VIH, replicación del VIH, diarrea asociada con el VIH, traumatismo asociado a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, función de barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, cardiopatía coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, trastornos epidérmicos, psoriasis; acné vulgar y/o exceso de colesterol.

10. Una composición que comprende Bifidobacterium GC61 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 junto con un agente o agentes terapéuticos adicionales.

11. Bifidobacterium GC61 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, para su uso como, o en la preparación de, un probiótico o un medicamento inmunomoduladores y/o anti-inflamatorios.

12. Uso de Bifidobacterium GC61 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una cepa de Bifidobacterium de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación en un sujeto mamífero.

```
  1 = FR101/h/8                    1473     1 a    1473
  2 = FR41/2                       1473     1 a    1473
  3 = FR49/f/2                     1473     1 a    1473
  C = consenso

                10        20        30        40        50        60
  1  ATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCG
60
  2  -----GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCG
55
  3  ------GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCG
54
  C  .....+GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCG

                70        80        90       100       110       120
  1  AGGCGCTTGCGTCTCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAACCTGCCTC
120
  2  AGGCGCTTGCGTCTCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAACCTGCCTC
115
  3  AGGCGCTTGCGTCTCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAACCTGCCTC
114
  C  AGGCGCTTGCGTCTCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAACCTGCCTC

               130       140       150       160       170       180
  1  ATACATCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCAACCTTCCGCATG
180
  2  ATACATCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCAACCTTCCGCATG
175
  3  ATACATCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCAACCTTCCGCATG
174
  C  ATACATCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCAACCTTCCGCATG

               190       200       210       220       230       240
  1  GATGGTTGGGAAAGCGTTAGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGG
240
  2  GATGGTTGGGAAAGCGTTAGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGG
235
  3  GATGGTTGGGAAAGCGTTAGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGG
234
  C  GATGGTTGGGAAAGCGTTAGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGG
```

Figura 1A ...

```
                250       260       270       280       290       300
  1  GGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTG
300
  2  GGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTG
295
  3  GGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTG
294
  C  GGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTG

                310       320       330       340       350       360
  1  GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
360
  2  GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
355
  3  GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
354
  C  GGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG

                370       380       390       400       410       420
  1  CGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTT
420
  2  CGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTT
415
  3  CGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTT
414
  C  CGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTT

                430       440       450       460       470       480
  1  TTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGC
480
  2  TTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGC
475
  3  TTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGC
474
  C  TTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGC
```

Figura 1A continuación...

```
                490       500       510       520       530       540
  1   CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC
540
  2   CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC
535
  3   CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC
534
  C   CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC

                550       560       570       580       590       600
  1   TCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCG
600
  2   TCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCG
595
  3   TCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCG
594
  C   TCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCG

                610       620       630       640       650       660
  1   GGTACGGGCAGGCTAGAGTGCGACAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATG
660
  2   GGTACGGGCAGGCTAGAGTGCGACAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATG
655
  3   GGTACGGGCAGGCTAGAGTGCGACAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATG
654
  C   GGTACGGGCAGGCTAGAGTGCGACAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATG

                670       680       690       700       710       720
  1   TGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGTCGTCACTGACGCTG
720
  2   TGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGTCGTCACTGACGCTG
715
  3   TGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGTCGTCACTGACGCTG
714
  C   TGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGTCGTCACTGACGCTG

                730       740       750       760       770       780
  1   AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
780
  2   AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
775
  3   AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
774
  C   AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
```

Figura 1A continuación...

```
                790       800       810       820       830       840
  1  GTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCA
840
  2  GTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCA
835
  3  GTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCA
834
  C  GTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCA


                850       860       870       880       890       900
  1  TCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAC
900
  2  TCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAC
895
  3  TCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAC
894
  C  TCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAC

                910       920       930       940       950       960
  1  AAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACA
960
  2  AAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACA
955
  3  AAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACA
954
  C  AAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACA

                970       980       990      1000      1010      1020
  1  TGTTCCTGACGGCCGCGGAGACGCGGCTTCCCTTCGGGGCAGGTTCACAGGTGGTGCATG
1020
  2  TGTTCCTGACGGCCGCGGAGACGCGGCTTCCCTTCGGGGCAGGTTCACAGGTGGTGCATG
1015
  3  TGTTCCTGACGGCCGCGGAGACGCGGCTTCCCTTCGGGGCAGGTTCACAGGTGGTGCATG
1014
  C  TGTTCCTGACGGCCGCGGAGACGCGGCTTCCCTTCGGGGCAGGTTCACAGGTGGTGCATG
```

Figura 1A continuación...

```
            1030      1040      1050      1060      1070      1080
  1  GTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
1080
  2  GTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
1075
  3  GTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
1074
  C  GTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG

            1090      1100      1110      1120      1130      1140
  1  CCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGA
1140
  2  CCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGA
1135
  3  CCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGA
1134
  C  CCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGA

            1150      1160      1170      1180      1190      1200
  1  GGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
1200
  2  GGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
1195
  3  GGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
1194
  C  GGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
```

Figura 1A continuación...

```
            1210      1220      1230      1240      1250      1260
  1  CAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTC
1260
  2  CAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTC
1255
  3  CAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTC
1254
  C  CAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTC

            1270      1280      1290      1300      1310      1320
  1  TCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGA
1320
  2  TCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGA
1315
  3  TCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGA
1314
  C  TCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGA
```

Figura 1A continuación...

```
            1330      1340      1350      1360      1370      1380
  1  ATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATG
1380
  2  ATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATG
1375
  3  ATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATG
1374
  C  ATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATG

            1390      1400      1410      1420      1430      1440
  1  AAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAG
1440
  2  AAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAG
1435
  3  AAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAG
1434
  C  AAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAG

             1450      1460      1470
   1  ACTCGTGATTGGGACTAA-GTCGTAA-CAAGG-
 1470
   2  ACTCGTGATTGGGACTAA---------------
 1453
   3  ACTCGTGATTGGGACTAAAGTCGTAAACAAGGT
 1467
   C  ACTCGTGATTGGGACTAA.+++++++.+++++.
```

Figura 1A continuación...

Gen de ARNr 16S de Bifidobacterium vercorsense

1-

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCGAGGCGCTTGCGTC
TCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAACCTGCCTCATACATCGGAATAGCTCCTG
GAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCAACCTTCCGCATGGATGGTTGGGAAAGCGTTAGCGGTATG
AGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAACCGCTTTTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGC
AGGCTAGAGTGCGACAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAG
AACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGTCGTCACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACG
GGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCA
AAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCTGGGCTTGACATGTTCCTGACGGCCGCGGAGACGCGGCTTCCCTTCGGGGCAGGTTCACAGG
TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
CGCCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTA
CAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCGAAGCCGGTGGCCTAAC
CTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAGACTCGTGATTGGGACTAA

-1452 pb

Figura 1B

Figura 2A...

```
1  GC61                    1519    1 a  1519
2  psychroaerophilum       1519    1 a  1519
3  subtile                 1519    1 a  1519
4  gallinarum              1519    1 a  1519
5  saeculare               1519    1 a  1519
6  pullorum                1519    1 a  1519
7  minimum                 1519    1 a  1519
8  crudilactis             1519    1 a  1519
9  indicum                 1519    1 a  1519

           10        20        30        40        50        60
1  ------------GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   48
2  -------------GTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   46
3  -GTTTCGATTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   59
4  -----CGATTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   55
5  ---TTCGATTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   57
6  GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   60
7  ---------------------------TGGCGGCGTGCTTA-CACATGCAAGTCGANCG   31
8  ------------------------------------------------------AG    2
9  ---TTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG   57
C     ::.:::..:+++++++++++++++*****************************G

           70        80        90       100       110       120
1  GGATCCGAGGCGCTTGCGTCTCGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAAC  108
2  GGATCCATCAAGCTTGCTTGATGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACTAAC  106
3  GGATCCCTGGCGCTTGCGCCGGGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC  119
4  GGATCCCTGGCGCTTGCGCCGGGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC  115
5  GGATCCCTGGCGCTTGCGCCGGGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC  117
6  GGATCCCTGGCGCTTGCGCCGGGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC  120
7  GGATCGGCCAAGCTTGCTTGGCCGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC   91
8  GGATCCATCAAGCTTGCTTGATGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACTAAC   62
9  GGATCCATCAAGCTTGCTTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCAAC  117
C  GGATC::+:::GCTTGC:::+::GTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGACCAAC
```

```
          130       140       150       160       170       180
1   CTGCCTCATACATCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGCTCCA-ACCT  167
2   CTGCCTCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-ACAT  165
3   CTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-GATG  178
4   CTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-GATG  174
5   CTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-GATG  176
6   CTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-GATG  179
7   CTGCCCCATTCTCCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA-CATG  150
8   CTGCCTCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAACATT  122
9   CTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCG-CACC  176
C   CTGCC*CAT*C**CGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCG*ATG*TCC*:+++:

          190       200       210       220       230       240
1   TCCGCATGGATGGTTGGGAAAGCGTT-AGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  226
2   TTCACATGTTTTGTTGGGAAAGCGTT-AGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  224
3   ACCGCATGGGATTCTGGGAAAGCTTT-TGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  237
4   ACCGCATGGGATTCTGGGAAAGCTTT-TGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  233
5   ACCGCATGGGATTCTGGGAAAGCTTT-TGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  235
6   ACCGCATGGGATTCTGGGAAAGCTTT-TGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  238
7   ACCTCATGGGATTGTGGGAAAGGGTT-ACTGGAATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  209
8   -TCACATGTTTTGTTGGGAAAGCGTT-AGCGGTATGAGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  180
9   GTCGCATGGTGGTGTGGGAAAGGGTTTACCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT  236
C   :+C*CATG+::++:TGGGAAAG+:TT :+*GG:ATG+GATGGGGTCGCGTCCTATCAGCT

          250       260       270       280       290       300
1   TGTTGGTGGGGTGAAGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCG  286
2   TGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  284
3   TGTTGGTGGGGTGATGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  297
4   TGTTGGTGGGGTGATGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  293
5   TGTTGGTGGGGTGATGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  295
6   TGTTGGTGGGGTGATGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  298
7   TGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  269
8   TGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  240
9   TGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG  296
C   TGTTGGTG:GGT:A:GGC:*ACCAAGGC:TCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGG:GACCG
```

Figura 2A continuación..

```
           310       320       330       340       350       360
1  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  346
2  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  344
3  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  357
4  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  353
5  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  355
6  GCCACATTGGGACTNAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  350
7  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  329
8  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  300
9  GCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  356
C  GCCACATTGGGACT*AGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG

           370       380       390       400       410       420
1  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  406
2  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  404
3  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  417
4  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGC-TTCGGGTTGT  412
5  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  415
6  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  418
7  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  389
8  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  360
9  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGT  416
C  CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATG**GGC*TTCGGGTTGT

           430       440       450       460       470       480
1  AAACCGCTTTTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTA  466
2  AAACCGCTTTTAATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTA  464
3  AAACCGCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTGTTGAATAAGCACCGGCTA  477
4  AAACCGCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTGTTGAATAAGCACCGGCTA  472
5  AAACCGCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTGTTGAATAAGCACCGGCTA  475
6  AAACCGCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTGTTGAATAAGCACCGGCTA  478
7  AAACCGCTTTTGATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTA  449
8  AAACCGCTTTTAATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTA  420
9  AAACCGCTTTTNATTGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTA  476
C  AAACCGCTTTT+++GGGAGCAAGCGAGAGTGAGTGTACC++TGAATAAGCACCGGCTA

           490       500       510       520       530       540
1  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  526
2  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  524
3  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  537
4  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  532
5  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  535
6  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  538
7  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  509
8  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  480
9  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  536
C  ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC
```

Figura 2A continuación ...

```
           550       560       570       580       590       600
1  GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  536
2  GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCACGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  584
3  GTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  597
4  GTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  592
5  GTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  595
6  GTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  598
7  GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  569
8  GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCACGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  540
9  GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA  596
C  GTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCCCGTCTGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGA

           610       620       630       640       650       660
1  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGAGTGCCACAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  646
2  TCTGCGCCGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGCACTAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  644
3  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  657
4  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  652
5  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  655
6  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  658
7  TCTGCGCCGGGTACGGGCAGGCTGGAGTGCAGTAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  629
8  TCTGCGCCGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGCACTAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  600
9  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGACTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC  656
C  TCTGCGCCGGGTACGGGCCGGCTGGAGTGCCGCAGGGGAGATTGGAATTCCCGGTGTAAC

           670       680       690       700       710       720
1  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTGA  706
2  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  704
3  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  717
4  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  712
5  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  715
6  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  718
7  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  639
8  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  660
9  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA  716
C  GGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTA
```

Figura 2A continuación...

```
           730       740       750       760       770       780
1  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  766
2  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG  764
3  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  777
4  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  772
5  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  775
6  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  778
7  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  749
8  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG  720
9  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  776
C  CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG

           790       800       810       820       830       840
1  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  826
2  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGCTCCGTGTCGGAGCTAACG  823
3  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  837
4  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  832
5  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  835
6  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  838
7  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  809
8  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGACCC-TTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  779
9  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG  836
C  CCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGCCCCATTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACG

           850       860       870       880       890       900
1  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  886
2  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  883
3  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  897
4  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  892
5  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  895
6  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  898
7  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  869
8  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  839
9  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG  896
C  CGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGG

           910       920       930       940       950       960
1  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  946
2  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA  943
3  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  957
4  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATNCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  952
5  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  955
6  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA  958
7  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  929
8  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA  899
9  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG  956
C  GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCAT*CGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
```

Figura 2A continuación...

```
           970       980       990      1000      1010      1020
1  GGCTTGACATGTTCCTGACGGCCGCCGGAGAGGGGGCTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1006
2  GGCTTGACATGTTCCGGACGGCCGCCGGAGATGGGGCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGG 1003
3  GGCTTGACATGTTCCCGACGACGGCCGGAGATGTGGTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1017
4  GGCTTGACATGTTCCCGACGACGGCCGGAGATGTGGTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1012
5  GGCTTGACATGTTCCCGACGACGGCCGGAGATGTGGTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1015
6  GGCTTGACATGTTCCCGACGATCCCGGAGATGGGGCTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1018
7  GGCTTGACATGTGCCGGACGCTCCCGGAGATGGGGCTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG  909
8  GGCTTGACATGTTCCGGACGCCCCCGGAGATGGGGCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGG  959
9  GGCTTGACATGTGCCGGACGCCCCCGGAGACGGGGCTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG 1016
C  GGCTTGACATGTCCCGACCCCCCCGGAGACGGGGCTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGG

          1030      1040      1050      1060      1070      1080
1  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1066
2  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1063
3  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1077
4  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1072
5  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1075
6  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1078
7  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1049
8  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG 1019
9  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTCAAGTCCCGCAACGAGCG 1076
C  TGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
1  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGTTGGGAACTCGCAAGGGACCGCCGGGGT 1126
2  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGTTGGGAACTCACAAGGGACCGCCGGGGT 1123
3  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCACGTCATGTTGGGAACTCACTAGGGACCGCCGGGGT 1137
4  CAACCCTCGCCCCGNGTTGCCAGCCCGTCATGTCGGGAACTCACTGGGGACCGCCGGGGT 1132
5  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCCCGTCATGTCGGGAACTCACCGGGGACCGCCGGGGT 1135
6  CAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCCCGTCATGTCGGGAACTCACCGGGGACCGCCGGGGT 1138
7  CAACCCTCGCCTCGTGTTGCCAGCCGGGTCATGCCGGGAACTCACGAGGGACCGCCGGGGT 1109
8  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGTTGGGAACTCATAAGGGACCGCCGGGGT 1079
9  CAACCCTCGCCTCGTGTTGCCAGCCGGGTCATGCCGGGAACTCACCGGGGACCGCCGGGGT 1136
C  CAACCCTCGCCTTGTGTTGCCAGCACGTTATGTTGGGAACTCACTAGGGACCGCCGGGGT

          1150      1160      1170      1180      1190      1200
1  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1186
2  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCTAGGGCTTCA 1183
3  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1197
4  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1192
5  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1195
6  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1198
7  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1169
8  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCTAGGGCTTCA 1139
9  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA 1196
C  TAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCA
```

Figura 2A continuación...

```
          1210      1220      1230      1240      1250      1260
1  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGTGACGCGAGCGGATCCCTTA 1246
2  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTTA 1243
3  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1257
4  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1252
5  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1255
6  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1250
7  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1229
8  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTTA 1199
9  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA 1256
C  CGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACATGGGACATGGAGCGGATCCCTGA

          1270      1280      1290      1300      1310      1320
1  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAG 1306
2  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAG 1303
3  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1317
4  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1312
5  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1315
6  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1316
7  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAG 1289
8  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1259
9  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG 1316
C  AAACCGGTCTCAGTTCGGATTCGAGTCTGCAACTCGACTCCTGAAGGCGGAGTCGCTAG

          1330      1340      1350      1360      1370      1380
1  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1366
2  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1363
3  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1377
4  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1372
5  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1375
6  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1378
7  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1349
8  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1319
9  TAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1376
C  TAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

          1390      1400      1410      1420      1430      1440
1  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTT---GGGGGGAGCC 1423
2  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTT---GGAGGGAGCC 1420
3  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTGT--GGGGGGAGCC 1435
4  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTGT--GGGGGGAGCC 1430
5  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTGT--GGGGGGAGCC 1433
6  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTCTTGGGGGGGAGCC 1438
7  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACTCGCAA-GAGGGGAGCC 1408
8  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTG-GAGGG--AGCC 1376
9  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCGCGA-GGGGGGAGCC 1435
C  CAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAAC+++:: :+G*G**AGCC
```

Figura 2A continuación...

```
        1450      1460      1470      1480      1490      1500
1  GTCTAAGGTGAGACTCGTGATTGGGACTAA------------------------------ 1453
2  GTCTAAGG------------------------------------------------------ 1428
3  GTCTAAGGTGAGGCTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG 1495
4  GTCTAAGGTGAGGCTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG 1490
5  GTCTAAGGTGAGGCTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG 1493
6  GNCTAAGGTGAGGNTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG 1498
7  GTCTAAGG------------------------------------------------------ 1416
8  GTCTAAGG------------------------------------------------------ 1384
9  GTCTAAGGTGAGGTCCGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG 1495
0  G*CTAAGG++++:::++:+++++++++++++::::::::::::::::::::::::::::::

        1510
1  -------------------                                          1453
2  -------------------                                          1428
3  CGGCTGGATCACCTCCTTA                                          1514
4  CGGCTGGATCACCTCCTTA                                          1509
5  CGGCTGGATCACCTCCTTA                                          1512
6  CGGTTGGATCACCTCCTTA                                          1517
7  -------------------                                          1416
8  -------------------                                          1384
9  CGGCTGGATCACCTCCTTA                                          1514
0  ::::::::::::::::::
```

Figura 2A continuación...

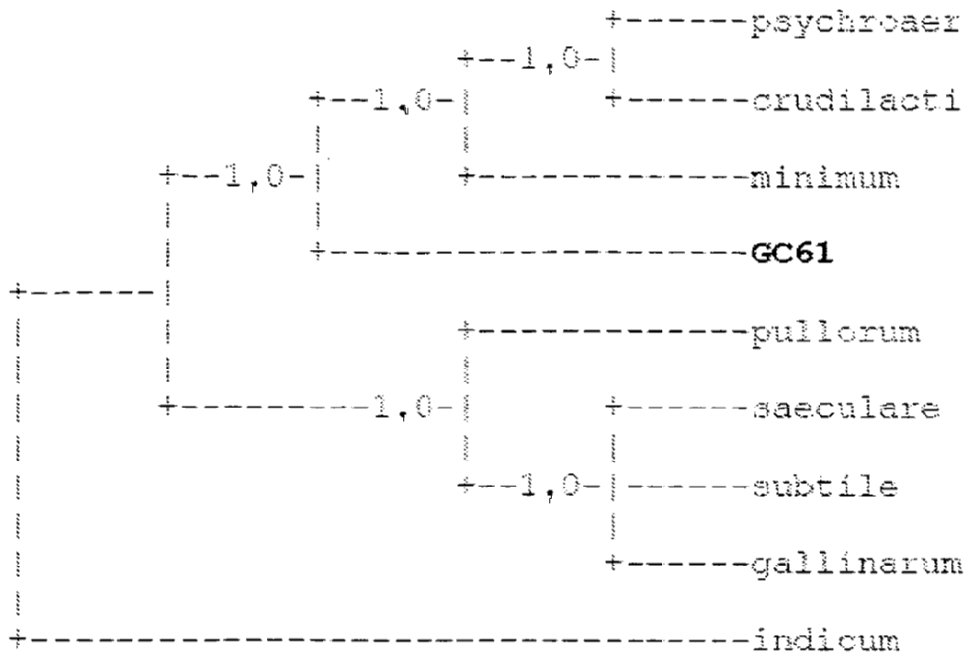

psychroaer
1,0
crudilacti
1,0
minimum
1,0
GC61
pullorum
1,0
saeculare
1,0
subtile
gallinarum
indicum

Figura 2B

Figura 3

TGCATGAGGGTCTGAAGAACGTCGTGGCCGGATCCAACCCGATCGCACTGC
GTCGCGGTGTCGAGAAGGCG**TCCGACGCCATCGTCAA**GGAGC**TCGTCGCC**
TCGGCCAAGGACGT**GGAAACCAAGGAGCAGATCG**CGGCTACGGCCACGA
TTTCCGCCGCTGATCCCGAGGTCGGCGACAAGATCGCCGAAGCACTCGACA
AGGTCGGCCAG

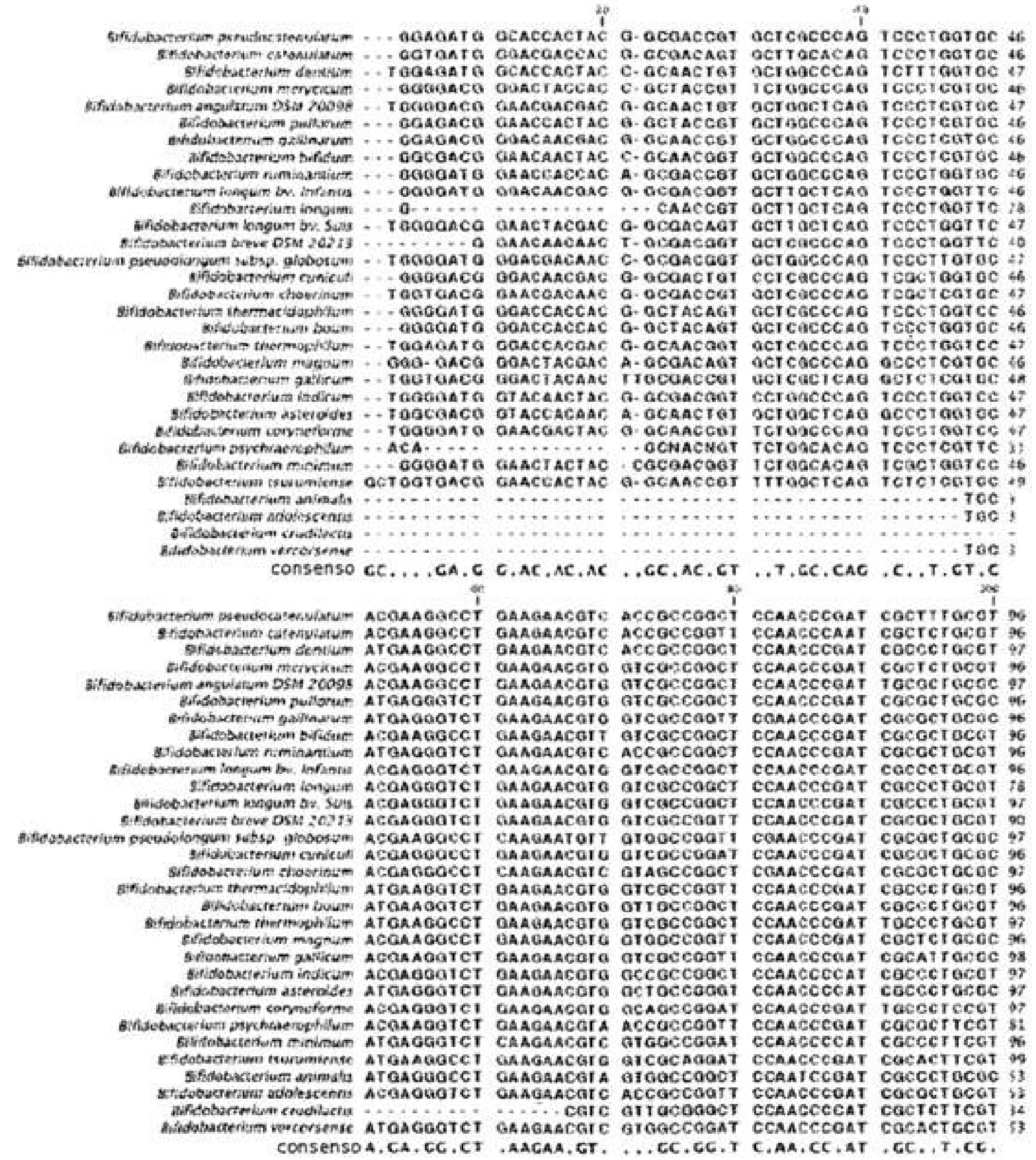


Figura 4

```
                                                  350                                   360
                                                   |                                     |
Bifidobacterium pseudocatenulatum   CGTGGTATCG AGAAGGCTTC CGAAGCCATC GTCAAGGAGC TTATCGCAGC 346
Bifidobacterium catenulatum         CGTGGTATCG AGAAGGCTTC CGAGGCTATC GTCAAGGAGC TCATCGCAGC 346
Bifidobacterium dentium             CGTGGTATCG AGAAGGCTTC CGAGGCCATC GTCAAGGAGC TCGTCGCAGC 347
Bifidobacterium merycicum           CGCGGTATCG AGAAGGCCAC CGAAGTCATC GTCAAGGAAC TCGTCGCCGC 346
Bifidobacterium angulatum DSM 20098 CGCGGCATTG AAAAGGCCGC CGACGCCATC GTCAAGGAAC TCGTCGCAGC 347
Bifidobacterium pullorum            CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGACGTCATC GTCAAGGAGC TCATCGCCGC 346
Bifidobacterium gallinarum          CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGACGTCATC GTCAAGGAGC TCATCGCCGC 346
Bifidobacterium bifidum             CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGACACCATC GTCAAGGAAC TGGTCGCCGC 346
Bifidobacterium ruminantium         CGCGGCATCG AAAAGGCTTC CGACGCCATT GTCAAGGAAC TTGTCGCGGC 346
Bifidobacterium longum bv. infantis CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGAGGTCATC GTCAAGGAAC TCGTCGCTGC 346
Bifidobacterium longum              CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGAGGTCATC GTCAAGGAAC TCGTCGCTGC 328
Bifidobacterium longum bv. Suis     CGCGGCATCG AGAAGGCCAC CGAGGTCATC GTCAAGGAAC TCGTTGCCGC 347
Bifidobacterium breve DSM 20213     CGCGGCATTG AGAAGGCCAC CGAGGTCATC GTCAAGGAGC TCGTCGTTGC 346
Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum CGTGGCATCG AGAAGGCCTC CGACGCGATC GTCAAGGAAC TCGTGGCCTC 347
Bifidobacterium cuniculi            CGCGGCATCG AGAAGGCGTC CGCCGCCATC GTCAAGGAAC TGGTCGCCTC 346
Bifidobacterium choerinum           CGCGGCATCG AGAAGGCCTC GGACGCCATC GTCAAGGAGC TCGTCGCGTC 347
Bifidobacterium thermacidophilum    CGCGGCATCG AAAAAGCCGC CGACGAAATC GTCAAGGAAC TGGTCGCTTC 346
Bifidobacterium boum                CGCGGCATCG AAAAAGCCCC CGATGAGATC GTCAAGGAAC TGGTTGCCTG 346
Bifidobacterium thermophilum        CGCGGCATCG AGAAGGCCGC CGACGAAATC GTCAAGGAAC TGGTCGCTTG 347
Bifidobacterium magnum              CGTGGTGTGG AGAAGGCTTC TGACGCCATC GTCAAGGAAC TCGTGGCATC 346
Bifidobacterium gallicum            CGTGGCATTG AGAAGGCTTC CGACGCCATC GTCAAGCAGC TCGTCAAGTG 348
Bifidobacterium indicum             CGCGGCATCG AGAAGGCCGC TGACGCCATC GTCAAGGAAC TGATCGCCCA 347
Bifidobacterium asteroides          CGCGGCATCG AGAAGGCCGC TGACGCCATC GTCAAGGAGC TCGTGGCCCA 347
Bifidobacterium corynebacterium     CGTGGCATCG AGAAGACCGC TGACGCCATC GTCAAGGAAC TGATCGCCCA 347
Bifidobacterium psychraerophilum    CGCGGCATCG AGAAGGCTTC GGATGCCATC GTCAAGGAGC TCATCGCAGC 331
Bifidobacterium minimum             CGTGGCATCG AGAAGGCTTC GGCGGCCATC GTCAAGGAGC TCATAGCCAG 346
Bifidobacterium tsurumiense         CGTGGTATCG AAAAGGCTGC AGACGTGATC GTCAAGGAAC TGATCGGCGC 349
Bifidobacterium animalis            CGCGGCATCG AGAAGGCTTC CGACGCTCTC GTCAAGCAGC TTGTCGCTTC 303
Bifidobacterium adolescentis        CGTGGCATCG AGAAGGCCGC CGACGCCATC GTCAAGGAAC TCGTCGCAGC 353
Bifidobacterium crudilactis         CGCGGCATCG AGAAGGCCTC AGACGCCATC GTCAAGGAGC TGATTTCCGC 86
Bifidobacterium verecundiae         CGCGGTGTCG AGAAGGCGTC CGACGCCATC GTCAAGGAGC TCGTCGCCTC 303
consenso                            CG.GG..T.C A.AA..C..C .G......T. GTCAAG.A.C T..T......

                                                  370                                   380
                                                   |                                     |
Bifidobacterium pseudocatenulatum   TGCCAAGGAC GTTGAGACCA AGGATCAGAT CGCCGCTACC GCAACGATTT 396
Bifidobacterium catenulatum         TGCCAAGGAC GTTGAGACCA AGGATCAGAT CGCTGCCACC GCAACGATTT 396
Bifidobacterium dentium             TGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGATCAGAT CGCTGCCACC GCAACGATCT 397
Bifidobacterium merycicum           CGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGATCAGAT CGCTGCCACT GCTACGATCT 396
Bifidobacterium angulatum DSM 20098 CGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGATCAGAT CGCTGCCACC GCAACGATTT 397
Bifidobacterium pullorum            CGCCAAGGAC GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCCGCCACC GCTACCATTT 396
Bifidobacterium gallinarum          CGCCAAGGAC GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCCGAGACC GCCACCATCT 396
Bifidobacterium bifidum             CGCCAAGGAC GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCCGCCACC GCCACGATCT 396
Bifidobacterium ruminantium         CGCCAAGGAT GTCGAGACCA AGGACCAGAT CGCTGCCACC GCAACGATCT 396
Bifidobacterium longum bv. infantis CGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGACCAGAT CGCTGCTACC GCCACCATCT 396
Bifidobacterium longum              CGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGACCAGAT CGCTGCTACC GCCACCATCT 378
Bifidobacterium longum bv. Suis     CGCCAAGGAT GTCGAGACCA AGGACCAGAT CGCTGCTACC GCCACCATCT 397
Bifidobacterium breve DSM 20213     CGCCAAGGAC GTTGAGACCA AGGACCAGAT TGCTGCTACC GCCACCATCT 390
Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum TGCCAAGCCG GTGGAGACCA AGGAGCAGAT CGCCGCGACC GCGACGATCT 397
Bifidobacterium cuniculi            CGCCAAGCCG GTCGAGACCA AGGAGCAGAT CGCGGCCACC GCGACCATCT 396
Bifidobacterium choerinum           GGCCAAGCCG GTCGAGACGA AGGACCAGAT CGCCGCCACC GCGACGATTT 397
Bifidobacterium thermacidophilum    CGCCAAGGAT GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCAGCCACC GCAACGATTT 396
Bifidobacterium boum                CGCCAAGGAT GTGGAAACCA AGGACCAGAT CGCCGCCACC GCAACGATTT 396
Bifidobacterium thermophilum        CGCCAAGGAT GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCAGCCACC GCAACGATTT 397
Bifidobacterium magnum              CGCTAAGCCG GTAGAAACCA AGGAGCAGAT TGCTGCAACC GCAACGATTT 396
Bifidobacterium gallicum            CGCCAAGCCT GTGGAAACCA AGGAGCAGAT CGCTGCCAGC GCAACGATTT 398
Bifidobacterium indicum             GTCCAAGGAG GTTGAGACCA AGGACCAAAT TGCTGCCAGA GCCACCATAT 397
Bifidobacterium asteroides          GTCCAAGGAA GTCGAGACCA AGGACCAGAT TGCTGCCACC GCAACCATCT 397
Bifidobacterium corynebacterium     GTCCAAGGAT GTCGAGACCA AGGACCAGAT TGCGGCCACC GCGAGCATTT 397
Bifidobacterium psychraerophilum    TGCCAAGGAC GTGGAGACCA AGGACCAGAT CGCCGCTACC GCAACGATCT 381
Bifidobacterium minimum             CGCCAAGGAC GTCGAGACCA AGGAGCAGAT CGCGGCGACG GCCACGATCT 396
Bifidobacterium tsurumiense         CGCCAAGGAT GTGGAGACCA AGGATCAGAT CGCAGCCACC GCAAGCATTT 399
Bifidobacterium animalis            CGCGAAGCCG GTGGAGACCA AGGAGCAGAT CGCTGCAACC GCAACGATTT 353
Bifidobacterium adolescentis        GGCCAAGGAC GTTGAGACCA AGGATCAGAT CGCTGCCACC GCAACGATCT 353
Bifidobacterium crudilactis         AGCCAAGGAC GTTGAGACCA AGGATCAGAT CGCCGCGACG GCAACGATCT 334
Bifidobacterium verecundiae         GGCCAAGGAC GTGGAAACCA AGGAGCAGAT CGCGGCTACG GCCACGATTT 353
consenso                            ..C.AAG... GT.GA.AC.A AGGA.CA.AT .GC.G..AC. GC.AC.AT.T
```

Figura 4 continuación...

```
                                                  220                                 230
                                                   |                                   |
Bifidobacterium pseudocatenulatum   CCGCCGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC TCTTGACAAG 246
Bifidobacterium catenulatum         CCGCAGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAGGC GCTGGACAAG 246
Bifidobacterium dentium             CCGCCGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC GCTGGACAAG 247
Bifidobacterium merycicum           CCGCCGCCGA TCCTGAGGTT GGTGAGAAGA TCGCCGAAGC CCTGGACAAG 246
Bifidobacterium angulatum DSM 20098 CCGCCGCCGA TCCCGAGGTT GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC GCTGGACAAG 247
Bifidobacterium pullorum            CGGCCGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC CCTGGACAAG 246
Bifidobacterium gallinarum          CCGCCGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC TCTCGACAAG 246
Bifidobacterium bifidum             CCGCAGCCGA CCCCGAGGTT GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC TCTGGACAAG 246
Bifidobacterium ruminantium         CCGCCGCTGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC TCTGGACAAG 246
Bifidobacterium longum bv. Infantis CCGCCGCTGA CCCTGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAGGC TCTGGACAAG 246
Bifidobacterium longum              CCGCCGCTGA CCCTGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAGGC TCTGGACAAG 228
Bifidobacterium longum bv. Suis     CCGCCGCTGA CCCTGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAGGC TCTGGACAAG 247
Bifidobacterium breve DSM 20213     CCGCTGCTGA CCCCGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAGGC TCTGGACAAG 240
Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum CCGCAGCCGA TCCCGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC GCTGGACAAG 247
Bifidobacterium cuniculi            CCGCCGCCGA CCCCGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC GCTCGACAAG 246
Bifidobacterium choerinum           CGGCCGCCGA TCCGGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC ACTCGACAAG 247
Bifidobacterium thermacidophilum    CTGCTGCTGA TCCTGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC GCTTGACAAG 246
Bifidobacterium boum                CCGCTGCCGA TCCTGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC ACTCGACAAG 246
Bifidobacterium thermophilum        CCGCTGCTGA CCCTGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCTGAAGC GCTCGACAAG 247
Bifidobacterium magnum              CAGCTGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC GCTCGACAAG 246
Bifidobacterium gallicum            CGGCTGCTGA CCCCGAGGTT GGCGAGAAGA TTGCCGAAGC GCTCGACAAG 248
Bifidobacterium indicum             CCGCCGGAGA TCCCGAGATC GGCGCCGAAA TCGCCGAGGC CCTGGACAAG 247
Bifidobacterium asteroides          CTGCAGGCGA CCCCGAGATC GGCAATGAGA TTGCCGAGGC TCTGGACAAG 247
Bifidobacterium coryneforme         CCGCCGGCGA CCCCGAGATT GGTGCTGAGA TTGCCGAGGC CCTCGACAAG 247
Bifidobacterium psychraerophilum    CAGCCGCTGA CCCAGAGGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC TCTCGACAAG 231
Bifidobacterium minimum             CCGCTGCGGA CCCCGAGGTC GGAGAGAAGA TCGCCGAGGC TCTGGACAAG 245
Bifidobacterium suiromiense         CCGCTGCGGA TCCTGAGGTT GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC CTTGGATAAG 249
Bifidobacterium animalis            CCGCAGGTGA CCCCGAGGTG GGCGAGAAGA TCGCCGAGGC TCTCGACAAG 203
Bifidobacterium adolescentis        CCGCCGCCGA TCCGGAAGTC GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC TCTGGACAAG 203
Bifidobacterium crudilactis         CCGCGGCCGA TCCCGAGGTT GGCGAGAAGA TCGCCGAAGC TCTGGACAAG 184
Bifidobacterium veroorsense         CCGCCGCTGA TCCCGAGGTC GGCGACAAGA TCGCCGAAGC ACTCGACAAG 203
consenso                            C.GC.G..GA .CC.GA..T. GG.....A.A T.GC.GA.GC ..T.GA.AAG

                                                  260                                 270
                                                   |                                   |
Bifidobacterium pseudocatenulatum   GTTGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTTGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium catenulatum         GTTGGCCAGG ATGGTGTTGT GACCGTTGAG GACAACAACC GTTTCGGTTT 296
Bifidobacterium dentium             GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 297
Bifidobacterium merycicum           GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACCGTCGAA GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium angulatum DSM 20098 GTTGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTTGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 297
Bifidobacterium pullorum            GTCGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium gallinarum          GTCGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTTGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium bifidum             GTCGGTCAGG ACGGCGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium ruminantium         GTCGGCCAGG ACGGTGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGACT 296
Bifidobacterium longum bv. Infantis GTCGGCCAGG ACGGCGTTGT GACCGTTGAA GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium longum              GTCGGCCAGG ACGGCGTTGT GACCGTTGAA GACAACAACC GCTTCGGCCT 278
Bifidobacterium longum bv. Suis     GTCGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTTGAA GACAACAACC GCTTCGGCCT 297
Bifidobacterium breve DSM 20213     GTCGGCCAGG ATGGCGTTGT GACCGTTGAA GATAACAACC GCTTCGGTCT 290
Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum GTCGGCCAGG ATGGTGTGGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGTCT 297
Bifidobacterium cuniculi            GTCGGCCAGG ACGGCGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium choerinum           GTCGGCCAGG ACGGTGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 297
Bifidobacterium thermacidophilum    GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 296
Bifidobacterium boum                GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACTGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGTCT 296
Bifidobacterium thermophilum        GTCGGCCAGG ATGGTGTCGT GACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGTCT 297
Bifidobacterium magnum              GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACCGTGGAA GACAACAATC GTTTCGGCTT 296
Bifidobacterium gallicum            GTCGGCCAGG ATGGCGTCGT GACCGTGGAA GACAACAATC GTTTCGGCCT 298
Bifidobacterium indicum             GTCGGCCAGG ATGGCGTGGT CACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGCCT 297
Bifidobacterium asteroides          GTCGGCCAGG ACGGCGTGGT CACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGACT 297
Bifidobacterium coryneforme         GTGGGCCAGG ATGGTGTGGT CACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGTCT 297
Bifidobacterium psychraerophilum    GTCGGTCAGG ACGGCGTTGT AACCGTCGAG GACAACAACC GCTTCGGTCT 281
Bifidobacterium minimum             GTCGGGCAGG ATGGCGTCGT CACGGTCGAG GACAACAACC GTTTCGGTCT 296
Bifidobacterium suiromiense         GTCGGACAGG ACGGTGTGGT CACCGTTGAA GACAACAACA AGTTCGGTTT 299
Bifidobacterium animalis            GTCGGACAG- ---------- ---------- ---------- ---------- 212
Bifidobacterium adolescentis        GTCGGCCAG- ---------- ---------- ---------- ---------- 212
Bifidobacterium crudilactis         GTCGGCCAGG ACGGT----- ---------- ---------- ---------- 399
Bifidobacterium veroorsense         GTCGGCCAG- ---------- ---------- ---------- ---------- 212
consenso                            GT.GG.CAGG A.GG.GT.GT .AC.GT.GA. GA.AACAA.. ..TTCGG..T
```

Figura 4 continuación

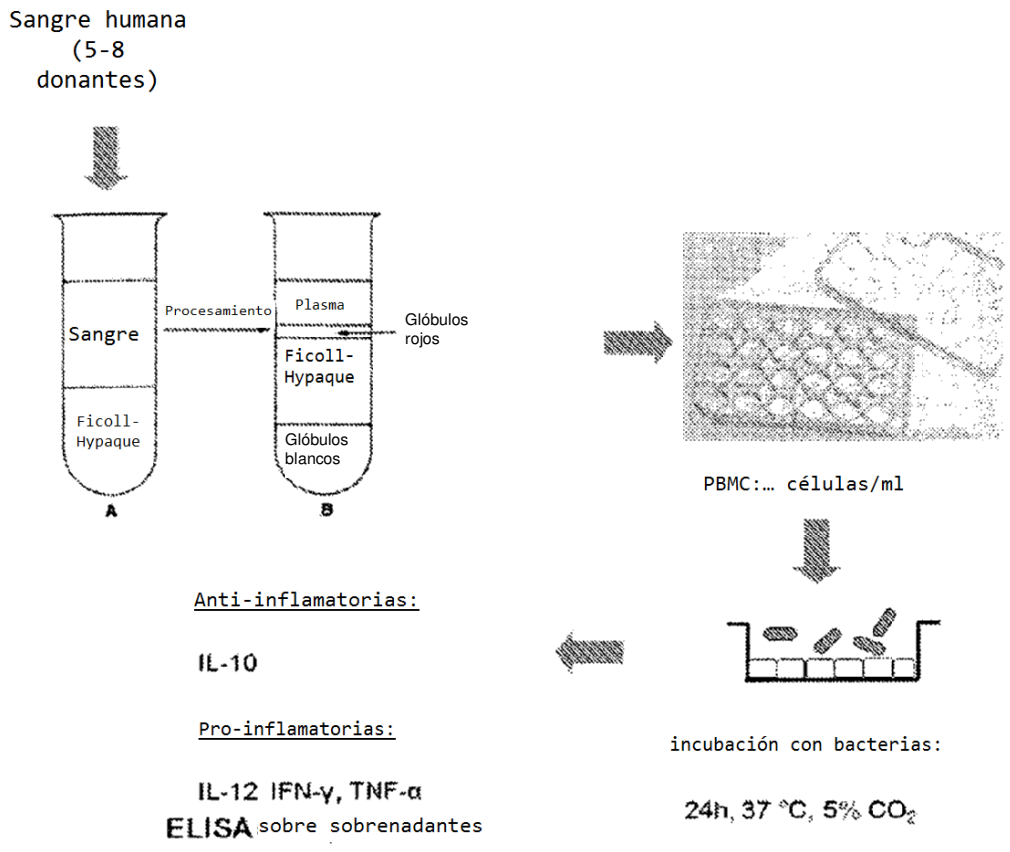
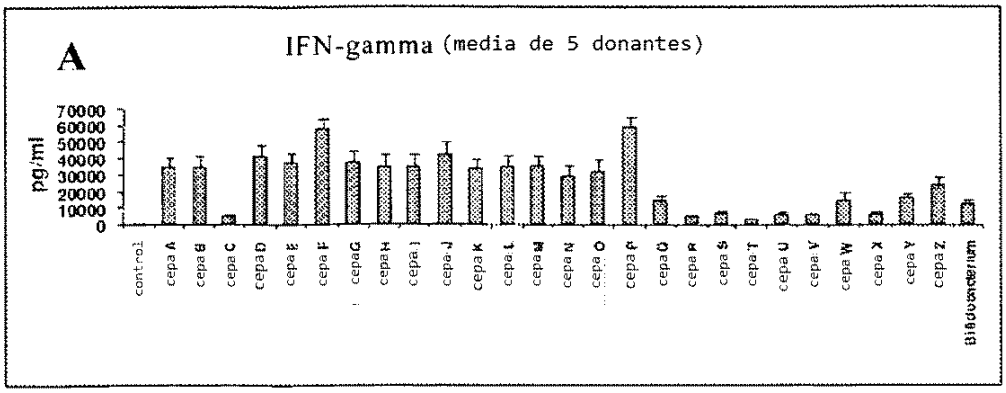

Sangre humana
(5-8
donantes)
Sangre
Ficoll-
Hypaque
A
Procesamiento
Plasma
Glóbulos
rojos
Ficoll-
Hypaque
Glóbulos
blancos
B
PBMC:… células/ml
Anti-inflamatorias:
IL-10
Pro-inflamatorias:
IL-12 IFN-γ, TNF-α
ELISA sobre sobrenadantes
incubación con bacterias:
24h, 37 °C, 5% CO2

Figura 5

Figura 6


A
IFN-gamma (media de 5 donantes)
pg/ml
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
control
cepa A
cepa B
cepa C
cepa D
cepa E
cepa F
cepa G
cepa H
cepa I
cepa J
cepa K
cepa L
cepa M
cepa N
cepa O
cepa P
cepa Q
cepa R
cepa S
cepa T
cepa U
cepa V
cepa W
cepa X
cepa Y
cepa Z
Bifidobacterium

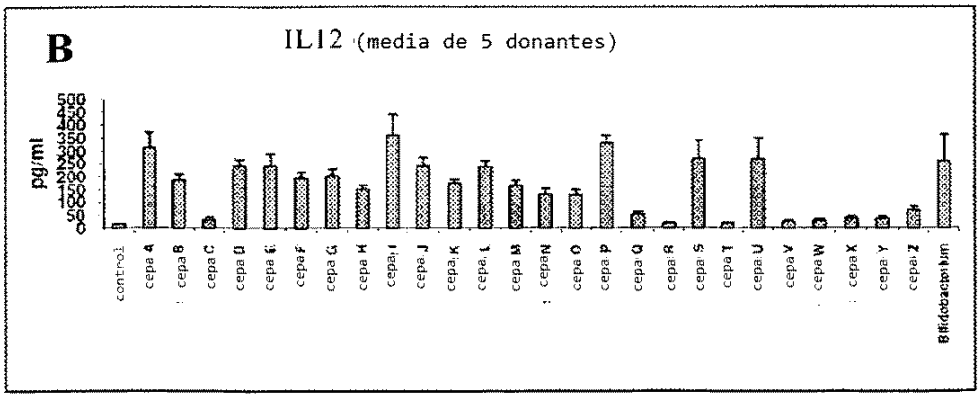
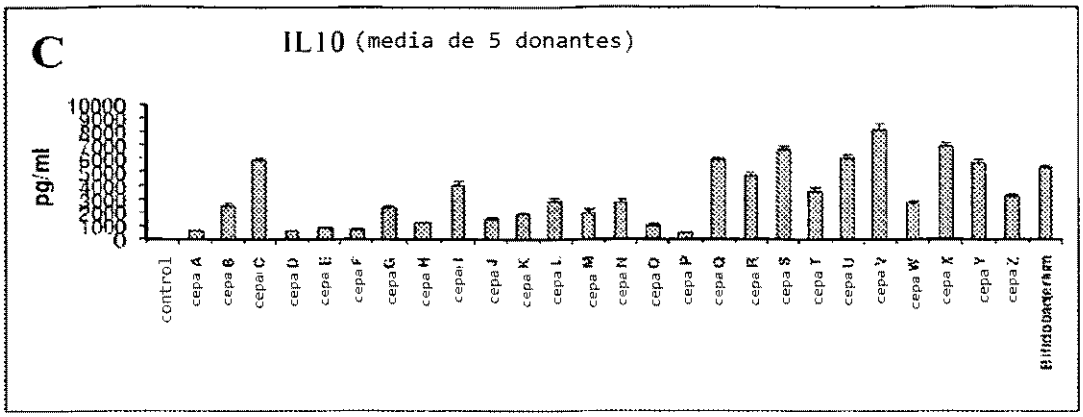

B
IL12 (media de 5 donantes)
pg/ml
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
control
cepa A
cepa B
cepa C
cepa D
cepa E
cepa F
cepa G
cepa H
cepa I
cepa J
cepa K
cepa L
cepa M
cepa N
cepa O
cepa P
cepa Q
cepa R
cepa S
cepa T
cepa U
cepa V
cepa W
cepa X
cepa Y
cepa Z
Bifidobacterium

Figura 6 continuación



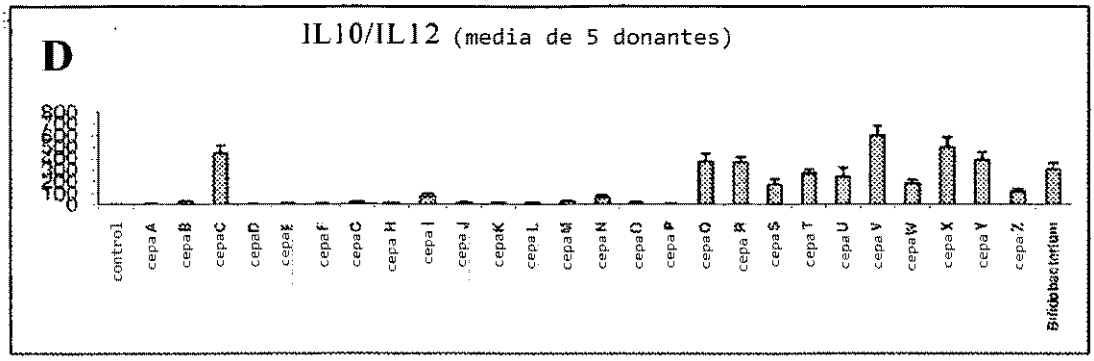


Figura 7

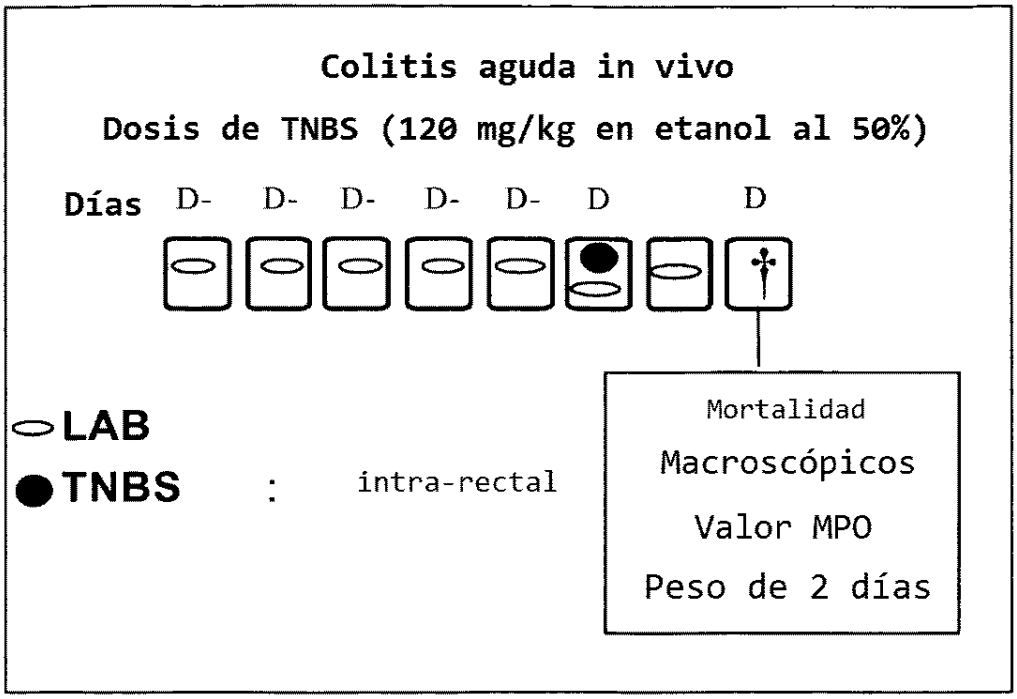
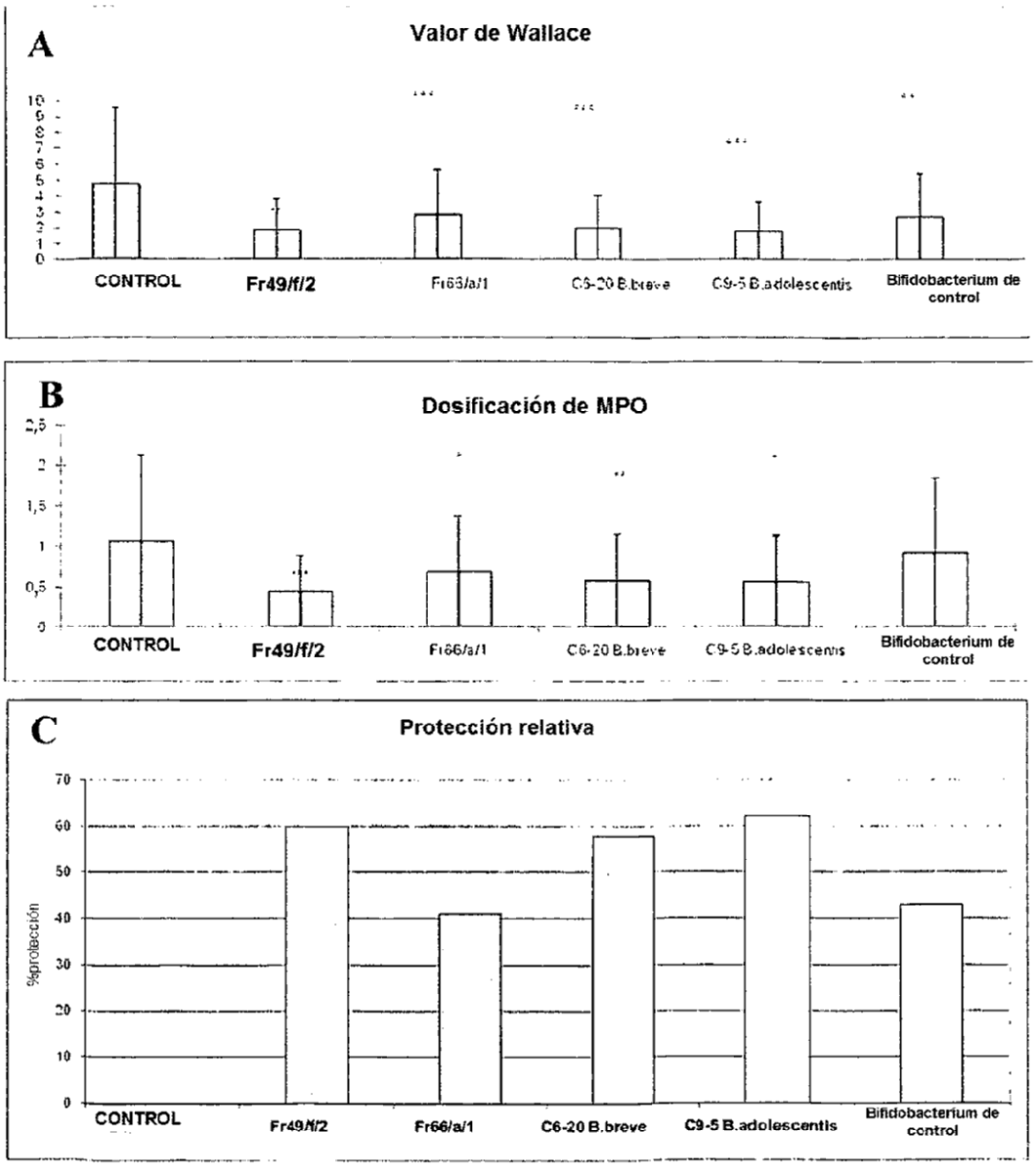

Colitis aguda in vivo
Dosis de TNBS (120 mg/kg en etanol al 50%)
Días
D-
D-
D-
D-
D-
D
D
LAB
TNBS
:
intra-rectal
Mortalidad
Macroscópicos
Valor MPO
Peso de 2 días

Figura 8


A
Valor de Wallace
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
CONTROL
Fr49/f/2
Fr66/a/1
C6-20 B.breve
C9-5 B.adolescentis
Bifidobacterium de control
B
Dosificación de MPO
2,5
2
1,5
1
0,5
0
CONTROL
Fr49/f/2
Fr66/a/1
C6-20 B.breve
C9-5 B.adolescentis
Bifidobacterium de control
C
Protección relativa
%protección
70
60
50
40
30
20
10
0
CONTROL
Fr49/f/2
Fr66/a/1
C6-20 B.breve
C9-5 B.adolescentis
Bifidobacterium de control