

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 710**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/569** (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 14/205 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04819936 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1698698**

54 Título: **Genes de toxinas de distensión citoletales como dianas para la detección de bacterias
Campylobacter**

30 Prioridad:

05.12.2003 JP 2003408103

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

23.04.2014

73 Titular/es:

**FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
(100.0%)
7-10, DOSHOMACHI 1-CHOME, CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**YAMASAKI, SHINJI y
ASAKURA, MASAHIRO**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 456 710 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

Genes de toxinas de distensión citoletales como dianas para la detección de bacterias *Campylobacter*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli* y a polinucleótidos que codifican para las mismas. La presente invención también se refiere a métodos para determinar la presencia de bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba (tales como muestras clínicas y alimentos) seleccionando como diana toxinas de distensión citoletales de bacterias *Campylobacter*, incluyendo *Campylobacter coli*.

Técnica anterior

10 Las bacterias *Campylobacter* son microorganismos que son patógenos para seres humanos así como para animales salvajes y domésticos y que provocan aborto y enteritis en animales y enteritis en seres humanos. Se sabe que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son bacterias causantes de infección por *Campylobacter* en seres humanos. A estas bacterias con frecuencia se les denomina bacterias de intoxicación de alimentos (véanse los documentos no de patente 1 y 2).

15 A fecha de 2000, se ha clasificado *Campylobacter* en 15 especies y 9 subespecies. *C. jejuni* constituye del 95 al 99% de las bacterias que se aíslan en casos de diarrea en seres humanos, mientras que otras especies bacterianas, tales como *C. coli*, sólo constituyen un pequeño porcentaje (véase el documento no de patente 3). Sin embargo, la tasa de portadores de *C. coli* es extremadamente alta en cerdos. En los últimos años, la infección por *Campylobacter* ha presentado una tendencia creciente al aumentar las importaciones de carne principalmente desde el Sudeste Asiático. En particular, la infección por alimentos relacionados con pollos, cuyo consumo ha estado creciendo como resultado de problemas con la ternera tales como BSE y O-157, ha aumentado rápidamente.

20 Además, aunque se ha conocido *Campylobacter fetus* como bacterias causantes de aborto en ovejas y animales bovinos, sólo recientemente se ha notificado que también está implicada en el aborto y el parto prematuro en seres humanos. La infección por *C. fetus*, que resulta de comer hígado crudo o ternera contaminada con *C. fetus*, está asociada con síntomas tales como septicemia y meningitis. La fuente principal de infección por *Campylobacter* en seres humanos es el pollo, que porta las bacterias a altas densidades en el tracto intestinal (documento no de patente 4).

30 Generalmente las bacterias *Campylobacter* se distribuyen a una alta densidad en el tracto digestivo de animales, tales como animales bovinos, ovejas, cerdos y pollos, y por tanto se reconocen como bacterias causantes de zoonosis. Se piensa que la mayoría de las campilobacteriosis está provocada por pollos. La infección puede surgir mediante contacto directo con los animales anteriores o con sus excrementos, o mediante la ingesta, o durante el procesamiento, de alimentos, agua potable, leche y similares contaminados con los excrementos. Además, también se han notificado casos de infección en instalaciones tales como salas de recién nacidos (véase el documento no de patente 5).

35 La campilobacteriosis tiene un periodo de incubación largo, que oscila entre 3 y 7 días. Se caracteriza por síntomas de gastroenteritis, tales como diarrea (algunas veces, diarrea mucosa con sangre), dolor abdominal, fiebre, náuseas, vómitos, cefalea, escalofríos y debilidad. Aunque la letalidad es baja, los bebés recién nacidos pueden desarrollar infección sistémica, tal como septicemia y meningitis. En la mayoría de los casos, la recuperación tarda de varios días a aproximadamente una semana. El pronóstico general tiene un transcurso favorable excepto en algunos pacientes inmunodeficientes. Sin embargo, en los últimos años se ha notificado que los pacientes pueden desarrollar síndrome de Guillain-Barre o síndrome de Fischer, que son enfermedades autoinmunitarias, tras campilobacteriosis. Los casos desarrollados tras campilobacteriosis tienden generalmente a volverse graves, y la tasa de remisión tras un año desde la aparición es de tan sólo aproximadamente el 60%.

45 Se realiza quimioterapia usando antibióticos para estados graves o casos complicados por septicemia. El fármaco de primera elección es macrólido, tal como eritromicina. Debido a la resistencia natural, no se espera que antibióticos de cefem tengan efectos terapéuticos. Mientras tanto, el aumento en el número de bacterias resistentes a nuevos antibióticos de quinolona se ha convertido en un problema en los últimos años. La rápida identificación de microorganismos causantes tras la infección es importante para realizar un tratamiento apropiado para la campilobacteriosis y para prevenir la expansión de la infección revelando la vía de infección. Sin embargo, resulta difícil diagnosticar la campilobacteriosis basándose en síntomas clínicos solos, por no hablar de identificar el *Campylobacter* y su especie.

55 Las bacterias *Campylobacter* son microaerófilas. Un cultivo de las bacterias requiere un medio especial tal como medio de Skirrow, y un aparato especial (frasco anaerobio o similar) para mantener la concentración de oxígeno a del 3 al 10% para la condición microaerófila absoluta. Además, el cultivo requiere mucho tiempo (de 2 a 3 días) en comparación con otras bacterias. Por tanto, es difícil alcanzar y mantener un cultivo en aislamiento de bacterias *Campylobacter*. Además, dado que las bacterias *Campylobacter* mueren fácilmente en el aire, deben someterse a prueba en el plazo de 2 a 3 horas tras la recogida de la muestra. Además, dado que el periodo de incubación de la

campilobacteriosis es largo (de 3 a 7 días), con frecuencia no pueden aislarse las bacterias cuando se lleva a cabo la identificación de bacterias en cualquier alimento afectado tras la aparición de los síntomas. Además, las bacterias *Campylobacter* tienen una infectividad muy fuerte, y se ha notificado que establecen infección con tan sólo algunos cientos de células. Por tanto, es extremadamente difícil identificar la fuente de la infección.

5 Un método de diagnóstico de distinción entre *C. jejuni* y *C. coli* implica someter a prueba la hidrólisis de hipurato. Específicamente, el método se basa en el hecho de que *C. jejuni* tiene la capacidad de hidrolizar hipurato mientras que *C. coli* no. Sin embargo, este método no es exacto porque en la técnica se conocen algunas especies de *C. jejuni* negativas para hipurato (véase el documento no de patente 6). Por tanto, la presencia de bacterias *Campylobacter* sólo puede confirmarse estimando la presencia de las bacterias a partir del historial de ingesta de
10 alimentos y de los síntomas, y examinando características morfológicas y biológicas de las bacterias a partir de colonias obtenidas mediante cultivo de heces, lo que requiere varios días.

Por tanto, se han realizado intentos de identificar bacterias *Campylobacter* y detectar sus genes de toxina usando, como métodos de diagnóstico rápido que no requieren cultivo, métodos de diagnóstico genético que usan un método de sonda de ADN o un método de PCR usando oligonucleótidos. Por ejemplo, generalmente se ha usado el ARNr que codifica para genes como sonda para bacterias *Campylobacter* (véase el documento de patente 1). Ya se han publicado las secuencias de genes de ARNr de *Campylobacter* (véase el documento no de patente 7). Además, también se conocen fragmentos de ácido nucleico para detectar bacterias *Campylobacter* (véanse los documentos de patente 2, 3, 4, 5 y 6). Sin embargo, aunque pueden usarse estas secuencias para detectar *C. jejuni* y/o *C. coli*, no son adecuadas para detectar otras bacterias *Campylobacter*. Además, el nivel actual de especificidad no es
15 suficiente.

Se han notificado la detección y el análisis de genes de *cdt* a partir de aislados de *C. jejuni* y *C. coli* mediante PCR (Eyigor *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37: 1646-1650 (1999)). También se ha notificado un método para identificar *C. jejuni* mediante PCR, usando oligonucleótidos seleccionados del gen de *flaA* de *C. coli* VC167 (véase el documento no de patente 8). Además, se ha notificado en la bibliografía el uso de cebadores de oligonucleótidos para amplificar una
20 secuencia diana de superóxido dismutasas de *C. jejuni* y *C. coli* (véase el documento de patente 7). Sin embargo, estos métodos no pueden distinguir entre *C. jejuni* y *C. coli*.

Mientras tanto, están estudiándose activamente los factores patógenos de *Campylobacter*. Se han notificado diversos factores, tales como invasividad celular, flagelina y enterotoxina similar a toxina del cólera, como factores patógenos de bacterias *Campylobacter* (véanse los documentos no de patente 9 y 10). Recientemente, se descubrió la toxina de distensión citoletal (CDT) como factor tóxico de *C. jejuni* (documento no de patente 11), y su relevancia para la patogenicidad ha atraído atención. Por ejemplo, se ha notificado la diarreagenicidad de la toxina en un modelo animal usando *E. coli* recombinante que produce CDT de bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae*) (documento no de patente 12).
30

CDT es una holotoxina compuesta por tres subunidades, denominadas *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, que se codifican por genes dispuestos en tándem. El centro activo de la toxina está en la subunidad *cdtB* que tiene actividad similar a desoxirribonucleasa tipo I, mientras que se piensa que las subunidades *cdtA* y *cdtC* están implicadas en la adhesión a células diana. Cuando la holotoxina actúa sobre células, las células se dilatan, es decir se hinchan, y finalmente se mueren. Por tanto, la toxina se denomina "toxina de distensión citoletal".
35

Se cree que el mecanismo molecular es el siguiente. La subunidad *cdtB* que constituye el centro activo de la toxina se transloca en el núcleo de una célula, e introduce mellas en el ADN cromosómico mediante su actividad desoxirribonucleasa tipo I, induciendo así una respuesta a daño del ADN. Entonces la célula detiene el ciclo celular en la fase G2/M para activar el sistema de reparación de genes, y después se dilata y muere (documento no de patente 13). Además, se ha encontrado que la CDT actúa sobre una amplia gama de células, incluyendo células epiteliales y células inmunitarias. En particular, se cree que la CDT actúa sobre linfocitos humanos e induce apoptosis en los mismos, lo que permite escapar fácilmente a la inmunidad (documento no de patente 14).
40
45

Tal como se describió anteriormente, la CDT tiene un mecanismo molecular único que no se encuentra en las otras toxinas anteriormente conocidas. Hasta ahora, sólo se ha determinado la secuencia de nucleótidos completa de CDT entre las bacterias *Campylobacter* para *C. jejuni* (documento no de patente 11).

Documento de patente 1: publicación Kokai de solicitud de patente japonesa n.º (JP-A) S62-228096 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada)
50

Documento de patente 2: JP-A H2-84200

Documento de patente 3: JP-A H2-154700

Documento de patente 4: JP-A H3-112498

Documento de patente 5: JP-A H6-90795

Documento de patente 6: JP-A H6-90796

Documento de patente 7: JP-A 2000-316590

Documento no de patente 1: Blaser, *et al.*, Ann. Intern. Med., 91:179 (1979)

Documento no de patente 2: Tauxe, R., American Society for Microbiology, Washington DC. pág. 9 (1992)

5 Documento no de patente 3: Takahashi, M. *et al*, Infectious Diseases Weekly Report Japan, 3 (6):10 (2001)

Documento no de patente 4: Simon, M. S. *et al.*, 2003. *Campylobacter* infection. Diseases of Poultry, Iowa State Press, 615-630

Documento no de patente 5: Japanese Journal of Pediatric Medicine, 29:1219-1222 (1997)

Documento no de patente 6: Totten, *et al*, J. Clin. Microbiol., 25: 1747 (1987)

10 Documento no de patente 7: Romaniuk, P. J. *et al*, J. Bacteriol., 169: 2173 (1987)

Documento no de patente 8: Oyofu, *et al*, J. Clin. Microbiol., 30: 2613 (1992)

Documento no de patente 9: Mizuno, K. *et al*, Microbios., 78: 215 (1994)

Documento no de patente 10: Suzuki, S. *et al*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 8: 207 (1994)

Documento no de patente 11: Pickett, C. *et al*. Infect. Immun., 64: 2070 (1996)

15 Documento no de patente 12: Infect. Immun., 65: 428-433 (1997)

Documento no de patente 13: Science, 290: 354-357 (2000)

Documento no de patente 14: J. Biol. Chem., 276: 5296-5302 (2001)

Descripción de la invención

Problemas que resuelve la invención

20 Tal como se describió en detalle anteriormente, existe la necesidad en la técnica del diagnóstico rápido de infección por *Campylobacter*, a pesar del hecho de que no se han esclarecido completamente los factores patógenos de bacterias *Campylobacter*. Convencionalmente, se han usado cebadores de PCR para identificar especies bacterianas basándose en el serotipo de las mismas, cebadores comunes para someter a prueba la producción de CDT, y similares (J. Applied Microbiol., 94: 1003-1014 (2003)). Sin embargo, tales métodos requieren la etapa de un cultivo de enriquecimiento, haciendo que la detección rápida de bacterias *Campylobacter* sea imposible.

25 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar CDT de *C. coli*, una especie de *Campylobacter* cuya secuencia de nucleótidos de CDT aún tiene que esclarecerse, y proporcionar el polinucleótido que codifica para la CDT, con el fin de permitir la detección rápida de bacterias *Campylobacter* mediante diagnóstico genético. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar CDT de *C. fetus*, cuya secuencia de nucleótidos de CDT aún tiene que esclarecerse, y proporcionar el polinucleótido que codifica para la CDT.

30 Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos que permiten la detección rápida de bacterias *Campylobacter*, que seleccionen como diana CDT de bacterias *Campylobacter*, incluyendo *C. coli* y *C. fetus*, basándose en los hallazgos obtenidos a partir de las secuencias de nucleótidos de *C. coli* y *C. fetus*.

Medios para solucionar los problemas

35 Cuando se lleva a cabo la clonación de genes de CDT usando la enzima de restricción *HindIII*, no puede aislarse su longitud completa porque su región codificante contiene sitios *HindIII*. Mientras tanto, enzimas de restricción comunes, tales como *EcoRI*, *PstI*, *KpnI*, *XbaI*, *BamHI*, *SalI* y *XhoI*, no proporcionan fragmentos con una longitud adecuada (de 3 a 5 kb) para la clonación de los genes de cdt. Como resultado de diversos estudios, los presentes inventores lograron finalmente clonar los genes de cdt completos sin ninguna escisión en sus secuencias internas seleccionando unas condiciones de digestión parcial en las que el gen de cdt no se digiere completamente con *HindIII*.

40 Los presentes inventores también compararon la CDT de *C. coli* con las CDT de *C. jejuni* y *C. fetus* y desarrollaron cebadores comunes para las tres bacterias *Campylobacter* y cebadores específicos para cada una de las bacterias. Los inventores demostraron entonces que estos cebadores podían aplicarse a una PCR múltiple que permite simultáneamente la determinación rápida y conveniente de la presencia de CDT de *Campylobacter* y la identificación de la especie, y que también pueden usarse en el tipado basado en PCR-RFLP.

45

La presente invención proporciona un método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *C. fetus* y/o *C. jejuni* en una muestra de prueba, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención también proporciona un kit usado en los métodos reivindicados, tal como se define en las reivindicaciones.

5 En el presente documento, la frase “toxinas de distensión citoletales” (CDT o CLDT) se refiere a factores tóxicos que pertenecen al grupo de holotoxinas de tipo A-B proteicas. La toxina de distensión citoletal tiene una estructura de subunidades que consiste en tres subunidades A, B y C. Se cree que la subunidad B es la unidad de sitio activo de la toxina y las subunidades A y B están implicadas en la adhesión celular. Cuando la toxina actúa sobre células, provoca la deformación celular tal como hinchamiento celular, y finalmente conduce a muerte celular. También se observa deformación celular tal como hinchamiento celular cuando se deja experimentalmente que la enterotoxina lábil al calor (LT), que se produce mediante *E. coli* toxicógena o similar, actúe sobre células. Sin embargo, cuando se elimina la toxina las células se recuperan y sobreviven. En cambio, las células no se recuperan sino que mueren, aunque se retire la CDT.

15 El término “polinucleótido” tal como se usa en el presente documento se refiere a un ribonucleótido o desoxirribonucleótido, o a un polímero constituido por varias bases o pares de bases. Los polinucleótidos incluyen ADN monocatenarios así como ADN bicatenarios. Los polinucleótidos en el presente documento pueden incluir tanto polinucleótidos que se producen de manera natural, no modificados, como polinucleótidos modificados. Las bases tritiladas y las bases especiales, tales como inosina, son ejemplos de bases modificadas.

20 El término “polipéptido” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polímero constituido por varios aminoácidos. Por tanto, también se incluyen oligopéptidos y proteínas dentro del concepto de polipéptidos. Los polipéptidos incluyen tanto polipéptidos que se producen de manera natural, no modificados, como polipéptidos modificados. Los ejemplos de modificaciones de polipéptidos incluyen acetilación; acilación; ADP-ribosilación; amidación; unión covalente con flavina; unión covalente con restos hemo; unión covalente con nucleótidos o derivados de nucleótido; unión covalente con lípidos o derivados de lípidos; unión covalente con fosfatidilinositoles; reticulación; ciclización; formación de enlaces disulfuro; desmetilación; formación de reticulación covalente; formación de cistina, formación de piroglutamato; formilación; g-carboxilación; glicosilación; formación de anclaje a GPI; hidroxilación; yodinación; metilación; miristoilación; oxidación; tratamiento proteolítico; fosforilación; prenilación; racemización; selenoilación; sulfatación; adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a una proteína tal como arginilación; ubiquitinación; y similares.

30 El término “aislado” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido) retirada de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural para una sustancia que se produce de manera natural) y cambiada “artificialmente” a partir de su estado natural. Los compuestos “aislados” se refieren a compuestos que incluyen los presentes en muestras que son sustancialmente abundantes con un compuesto objeto, y/o los presentes en muestras en las que el compuesto objeto está parcial o sustancialmente purificado. En el presente documento, el término “sustancialmente purificado” se refiere a compuestos (por ejemplo, polinucleótidos o polipéptidos) que están aislados del entorno natural y en los que al menos el 60%, preferiblemente el 75% y lo más preferiblemente el 90% de los otros componentes asociados con el compuesto en la naturaleza están ausentes.

40 El término “mutación” tal como se usa en el presente documento se refiere a cambios a los aminoácidos de una secuencia de aminoácidos, o cambios a las bases en una secuencia de nucleótidos (es decir, sustitución, delección, adición o inserción de uno o más aminoácidos o nucleótidos). Por tanto, el término “mutante” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos en las que se cambian uno o más aminoácidos, o secuencias de nucleótidos en las que se cambian uno o más nucleótidos. Los cambios en la secuencia de nucleótidos en el mutante pueden cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por el polinucleótido convencional, o no. El mutante puede ser uno que existe en la naturaleza, tal como un mutante alélico, o uno aún no identificado en la naturaleza. El mutante puede estar alterado de manera conservativa, en el que los aminoácidos sustituidos conservan características estructurales o químicas similares a las del aminoácido original. Con poca frecuencia, los mutantes pueden estar sustituidos de manera no conservativa. Pueden usarse programas informáticos conocidos en la técnica, tales como el software DNA STAR, para decidir qué o cuántos residuos de aminoácido sustituir, insertar o deleccionar sin inhibir las actividades biológicas o inmunológicas.

50 La “delección” es un cambio o bien en una secuencia de aminoácidos o bien en una secuencia de nucleótidos, en el que faltan uno o más residuos de aminoácido o residuos de nucleótido en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de toxina de distensión citoletal que se produce de manera natural, o una secuencia de nucleótidos que codifica para el mismo.

55 La “inserción” o “adición” es un cambio o bien en una secuencia de aminoácidos o bien en una secuencia de nucleótidos, en el que se añaden uno o más residuos de aminoácido o residuos de nucleótido en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de toxina de distensión citoletal que se produce de manera natural, o una secuencia de nucleótidos que codifica para el mismo.

La “sustitución” es un cambio o bien en una secuencia de aminoácidos o bien en una secuencia de nucleótidos, en

el que se cambian uno o más residuos de aminoácido o residuos de nucleótido por residuos de aminoácido o residuos de nucleótido diferentes, en comparación con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de toxina de distensión citoletal que se produce de manera natural, o una secuencia de nucleótidos que codifica para el mismo.

- 5 El término “hibridar” tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el que una cadena de ácido nucleico se une a su cadena complementaria mediante la formación de pares de bases.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 es una fotografía que muestra un resultado de PCR con cebadores GNW y LPF-D usando extracto celular de *C. coli* Co1-192 como molde. La flecha 1 indica las bandas resultantes de la amplificación de la región de *cdt* (aproximadamente 1,5 Kb); las bandas (800 pb) de la flecha 2 son bandas secundarias derivadas de *cdtB*, que se amplificaron ya que los cebadores GNW eran cebadores mixtos.

La figura 2 es una fotografía que muestra un resultado de hibridación tras la digestión de genomas de células *C. coli* Co1-192 con la enzima de restricción *HindIII*.

La figura 3 es una fotografía que muestra un resultado de PCR usando un par de cebadores comunes 1. Se observan bandas derivadas de CDT a aproximadamente 1,9 kpb en los carriles 2 a 6.

- 15 La figura 4 es una fotografía que muestra un resultado de PCR para diversas cepas de *C. jejuni* usando un par de cebadores comunes 2. Se observan bandas derivadas de CDT a aproximadamente 720 pb.

La figura 5 es una fotografía que muestra un resultado de PCR para diversas cepas de *C. jejuni* y *C. coli* usando un par de cebadores comunes 2.

- 20 La figura 6 es una fotografía que muestra un resultado de PCR para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando un par de cebadores comunes 2.

La figura 7 es una fotografía que muestra un resultado de PCR múltiple para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando cebadores específicos. Se detectaron fragmentos amplificados específicos de CDT únicos para cada especie (*C. jejuni*, 750 pb; *C. coli*, 400 pb; *C. fetus*, 530 pb).

- 25 La figura 8 es una fotografía que muestra un resultado de PCR-RFLP para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando un par de cebadores comunes 1.

La figura 9 es un conjunto de fotografías que muestran un resultado de PCR múltiple para diversas cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando cebadores específicos. Se detectaron fragmentos amplificados específicos de CDT únicos para cada especie (*C. jejuni*, 750 pb; *C. coli*, 400 pb; *C. fetus*, 530 pb).

- 30 La figura 10 es una fotografía que muestra un resultado de hibridación tras la digestión de genomas de células *C. fetus* Co1-187 con la enzima de restricción *HindIII*.

La figura 11 es una fotografía que muestra un resultado de PCR usando cebadores comunes para *cdtA* y *cdtC*. Se observan bandas derivadas de *cdtA* a aproximadamente 550 pb en los carriles 2 a 8; y se observan bandas derivadas de *cdtC* a aproximadamente 320 pb en los carriles 10 a 16.

- 35 La figura 12 es un conjunto de fotografías que muestran un resultado de PCR para diversas cepas de especies de *Campylobacter* usando cebadores comunes para *cdtA*. Se observan bandas derivadas de *cdtA* a aproximadamente 550 pb.

La figura 13 es un conjunto de fotografías que muestran un resultado de PCR para diversas cepas de especies de *Campylobacter* usando cebadores comunes para *cdtC*. Se observan bandas derivadas de *cdtC* a aproximadamente 320 pb.

- 40 La figura 14 es una fotografía que muestra un resultado de PCR múltiple para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando cebadores específicos para *cdtA* y *cdtC*. Se detectan fragmentos amplificados específicos para *cdtA* (*C. jejuni*, 630 pb; *C. coli*, 330 pb; *C. fetus*, 490 pb) y para *cdtC* (*C. jejuni*, 500 pb; *C. coli*, 400 pb; *C. fetus*, 300 pb) únicos para cada especie.

- 45 La figura 15 es un conjunto de fotografías que muestran un resultado de PCR múltiple para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando cebadores específicos de *cdtA*. Se detectaron fragmentos amplificados específicos de *CdtA* únicos para cada especie.

La figura 16 es un conjunto de fotografías que muestran un resultado de PCR múltiple para cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* usando cebadores específicos de *cdtC*. Se detectaron fragmentos amplificados específicos de *CdtC* únicos para cada especie.

La figura 17 muestra el ORF de CDT de *C. jejuni* y las regiones de hibridación con cebador.

La figura 18 muestra el ORF de CDT de *C. coli* y las regiones de hibridación con cebador.

La figura 19 muestra el ORF de CDT de *C. fetus* y las regiones de hibridación con cebador.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

5 <Polinucleótido>

En el presente documento se da a conocer un polinucleótido que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli*. La secuencia de polinucleótido que codifica para la toxina de distensión citoletal de *C. coli*, que se identificó por los presentes inventores, se expone en SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos codificados por el polinucleótido se exponen en SEQ ID NO: 2 a 4. SEQ ID NO: 2, 3 y 4 corresponden a las secuencias de aminoácidos de cdtA, cdtB y cdtC, respectivamente.

En el presente documento también se da a conocer un polinucleótido que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*. La secuencia de polinucleótido que codifica para la toxina de distensión citoletal de *C. fetus*, que se identificó por los presentes inventores, se expone en SEQ ID NO: 51. Las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos codificados por el polinucleótido se exponen en SEQ ID NO: 52 a 54; SEQ ID NO: 52, 53 y 54 corresponden a las secuencias de aminoácidos de cdtA, cdtB y cdtC, respectivamente.

Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos que codifican para los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4; polinucleótidos que incluyen la región codificante en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, es decir una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la posición de 1 a 777, de 802 a 1605 y de 1615 a 2187 en SEQ ID NO: 1; y polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos diferente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 pero que aún codifican para los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 debido a la degeneración del código genético.

Los polinucleótidos también incluyen polinucleótidos que codifican para los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 a 54; polinucleótidos que incluyen la región codificante en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 51, es decir una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la posición de 1 a 702, de 778 a 1629 y de 1615 a 2187 en SEQ ID NO: 51; y polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos diferente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 51 pero que aún codifican para los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 a 54 debido a la degeneración del código genético.

Los polinucleótidos incluyen además polinucleótidos que codifican para polipéptidos funcionalmente equivalentes a polipéptidos codificados por los polinucleótidos anteriores y que tienen una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos el 40% o superior, preferiblemente del 60% o superior, más preferiblemente del 80% o superior, incluso más preferiblemente del 90% o superior, todavía más preferiblemente del 95% o superior, aún más preferiblemente del 97% o superior (por ejemplo, del 98 al 99%) con respecto a la secuencia completa del polinucleótido. La identidad de secuencia de nucleótidos puede determinarse, por ejemplo, usando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Se ha desarrollado un programa denominado BLASTN basándose en este algoritmo (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Cuando se analizan secuencias de nucleótidos mediante BLASTN, los parámetros se fijan, por ejemplo, de la siguiente manera: puntuación = 100; longitud de palabra = 12. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto para cada programa. Se conocen las técnicas específicas para estos métodos analíticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias de polinucleótido anteriores.

Los polinucleótidos pueden obtenerse mediante métodos de clonación y selección convencionales a partir de fuentes naturales, tales como ADN genómico en células bacterianas. Alternativamente, los polinucleótidos pueden obtenerse a partir de bibliotecas de ADNc derivadas de ARNm en células bacterianas. Los polinucleótidos también pueden sintetizarse usando técnicas conocidas que están disponibles comercialmente.

Pueden prepararse polinucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos con homología significativa con las secuencias de polinucleótido identificadas por los presentes inventores (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 51), por ejemplo, usando técnicas de hibridación (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 6.3-6.4) y técnicas de amplificación génica (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 6.1-6.4). Específicamente, basándose en las secuencias de polinucleótido identificadas por los presentes inventores (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 51) o porciones de las mismas, puede aislarse ADN altamente homólogo a las secuencias usando técnicas de hibridación conocidas. Alternativamente, pueden aislarse polinucleótidos altamente homólogos a las secuencias de polinucleótido mediante técnicas de amplificación génica, usando cebadores diseñados basándose en porciones de las secuencias de polinucleótido identificadas por los presentes inventores (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 51). Por tanto, en el presente documento se dan a conocer polinucleótidos que se hibridan con el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en una condición rigurosa. Una condición de hibridación rigurosa es

normalmente la condición de 1x SSC, el 0,1% de SDS y 37°C. Una condición más rigurosa es la condición de 0,5x SSC, el 0,1% de SDS y 42°C. Una condición todavía más rigurosa es la condición de 0,2xSSC, el 0,1% de SDS y 65°C. A medida que la condición de hibridación es más rigurosa tal como se describió anteriormente, se espera que se aisle ADN que tiene mayor homología con la secuencia de la sonda. Sin embargo, las combinaciones anteriores de condición de SSC, SDS y temperatura sólo son a modo de ejemplo. Los expertos en la técnica pueden alcanzar la misma rigurosidad que la descrita anteriormente combinando apropiadamente los factores anteriores u otros (por ejemplo, concentración y longitud de sonda y tiempo de reacción para la hibridación) lo que determina el grado de rigurosidad de hibridación.

También pueden prepararse polinucleótidos que incluyen las secuencias de nucleótidos con homología significativa con las secuencias de polinucleótido identificadas por los presentes inventores mediante métodos para introducir mutaciones en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y 51 (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 8.1-8.5)). Tales polinucleótidos también pueden generarse mediante mutaciones que se producen de manera natural. En el presente documento se dan a conocer polinucleótidos que codifican para los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen, delecionan, insertan y/o añaden uno o más aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 o de 52 a 54 debido a tales mutaciones en la secuencia de nucleótidos.

Cuando se usan los polinucleótidos para producir los polipéptidos de la presente invención, los polinucleótidos incluyen secuencias codificantes para los polipéptidos maduros o fragmentos de los mismos solos, o secuencias codificantes para los polipéptidos maduros o fragmentos de los mismos que están ubicadas en el mismo marco de lectura que otras secuencias codificantes (por ejemplo, secuencia líder o secretora, secuencia de pre, pro o preproteína, o secuencias que codifican para otras porciones de péptidos de fusión). Por ejemplo, pueden codificarse secuencias de marcador que facilitan la purificación de polipéptidos de fusión. En este aspecto, los ejemplos preferidos de secuencias de marcador incluyen, por ejemplo, péptido de hexa-histidina o etiqueta Myc que se proporciona mediante el vector pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen) y se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824. El polinucleótido también puede incluir secuencias no codificantes en 5' y 3', por ejemplo, secuencias transcritas pero no traducidas, señales de corte y empalme y de poliadenilación, sitio de unión a ribosoma y secuencia de estabilización de ARNm.

<Polipéptido>

En el presente documento se da a conocer el polipéptido de la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli* identificado por los presentes inventores. En el presente documento también se dan a conocer polipéptidos funcionalmente equivalentes al polipéptido identificado por los presentes inventores. En el presente documento, "funcionalmente equivalente" significa que un polipéptido de interés tiene características de toxina de distensión citoletal equivalentes a las del polipéptido identificado por los presentes inventores.

En el presente documento también se da a conocer el polipéptido de la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus* identificado por los presentes inventores. En el presente documento se dan a conocer además polipéptidos funcionalmente equivalentes al polipéptido identificado por los presentes inventores. En el presente documento, "funcionalmente equivalente" significa que un polipéptido de interés tiene características de toxina de distensión citoletal equivalentes a las del polipéptido identificado por los presentes inventores.

Introducir mutaciones en la secuencia de aminoácidos de proteínas es un medio para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a los polipéptidos identificados por los inventores. Tales métodos incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 8.1-8.5). También puede producirse mutación de aminoácidos en polipéptidos en la naturaleza. En el presente documento se dan a conocer proteínas mutantes, independientemente de si se producen artificialmente o de manera natural, que incluyen la secuencia de aminoácidos identificada por los inventores (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 a 4 y de 52 a 54), en las que se alteran uno o más residuos de aminoácido mediante sustitución, deleción, inserción y/o adición, pero que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos identificados por los presentes inventores.

Desde el punto de vista de conservar las funciones de la proteína, un residuo de aminoácido usado para la sustitución tiene preferiblemente propiedades similares al residuo de aminoácido sustituido (sustitución conservativa). Por ejemplo, todos de Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe y Trp se clasifican como aminoácidos no polares, y se considera que tienen propiedades similares. Además, ejemplos de aminoácidos no cargados son Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn y Gln. Además, ejemplos de aminoácidos ácidos son Asp y Glu, y de aminoácidos básicos son Lys, Arg y His.

No hay limitaciones en cuanto al número y al sitio de las mutaciones de aminoácidos de estos polipéptidos, siempre que los polipéptidos mutados conserven una función del polipéptido original. El número de mutaciones puede ser normalmente inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5% y más preferiblemente inferior al 1% de los residuos de aminoácido totales.

Otros medios para preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a los polipéptidos identificados por los inventores incluyen métodos que usan técnicas de hibridación o técnicas de amplificación génica. Más específicamente, los expertos en la técnica pueden obtener polipéptidos funcionalmente equivalentes a los polipéptidos determinados por los presentes inventores aislando ADN altamente homólogos a partir de muestras de ADN derivadas de organismos de la misma especie o de una diferente usando técnicas de hibridación (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 6.3-6.4) basándose en la secuencia de ADN que codifica para los polipéptidos identificados por los inventores (SEQ ID NO: 1 y 51). Por tanto, tales polipéptidos, codificados por ADN que se hibridan con los ADN que codifican para los polipéptidos identificados por los inventores, que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos identificados por los inventores, también se incluyen en los polipéptidos dados a conocer en el presente documento.

Las rigurosidades de hibridación requeridas para aislar un ADN que codifica para un polipéptido funcionalmente equivalente a los polipéptidos identificados por los inventores son normalmente de "1x SSC, el 0,1% de SDS, 37°C" o similares, siendo condiciones más rigurosas "0,5x SSC, el 0,1% de SDS, 42°C" o similares, y siendo condiciones incluso más rigurosas "0,2x SSC, el 0,1% de SDS, 65°C" o similares. Se espera que se aislen ADN con una homología superior con la secuencia de la sonda a rigurosidades superiores. Sin embargo, las combinaciones anteriormente mencionadas de condiciones de SSC, SDS y temperatura sólo son ejemplos, y los expertos en la técnica pueden alcanzar las mismas rigurosidades que las descritas anteriormente combinando apropiadamente los factores anteriormente mencionados u otros parámetros que determinan la rigurosidad de hibridación (por ejemplo, concentración de sonda, longitud de sonda, tiempo de reacción de hibridación, etc.).

Los polipéptidos codificados por ADN aislados usando tales técnicas de hibridación tienen normalmente secuencias de aminoácidos altamente homólogas a los polipéptidos identificados por los presentes inventores. En el presente documento, una alta homología indica identidad de secuencia de al menos el 40% o más, preferiblemente del 60% o más, más preferiblemente del 80% o más, todavía más preferiblemente del 90% o más, además todavía más preferiblemente de al menos el 95% o más, y aún más preferiblemente de al menos el 97% o más (por ejemplo, del 98% al 99%). La homología de secuencias de aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, usando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). Basándose en este algoritmo, se ha desarrollado un programa denominado BLASTX (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). Cuando se analizan secuencias de aminoácidos usando BLASTX, los parámetros se fijan, por ejemplo, a puntuación = 50 y longitud de palabra = 3, mientras que cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de cada programa. En el campo se conocen bien técnicas específicas para estos métodos analíticos.

Pueden usarse técnicas de amplificación génica (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 6.1-6.4) para obtener polipéptidos funcionalmente equivalentes a los polipéptidos aislados por los presentes inventores, basándose en fragmentos de ADN aislados como ADN altamente homólogos a las secuencias de ADN que codifican para los polipéptidos aislados por los presentes inventores. Esto puede lograrse diseñando cebadores basándose en una parte de la secuencia de ADN que codifica para los polipéptidos identificados por los inventores (SEQ ID NO: 1 y 51).

<Fragmentos de polipéptido>

En el presente documento también se dan a conocer fragmentos de los polipéptidos de esta invención. Estos fragmentos son polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son parcial, pero no totalmente, idénticas a los polipéptidos anteriores. Los fragmentos de polipéptido incluyen habitualmente ocho residuos de aminoácido o más, y preferiblemente doce residuos de aminoácido o más (por ejemplo, 15 residuos de aminoácido o más). Los ejemplos de fragmentos preferidos incluyen polipéptidos de truncamiento, tales como secuencias de aminoácidos que carecen de una serie de residuos de aminoácido incluyendo o bien el extremo amino-terminal o bien el extremo carboxilo-terminal, o dos series de residuos de aminoácido, una que incluye el extremo amino-terminal y la otra que incluye el extremo carboxilo-terminal. Además, también son preferibles fragmentos que presentan características estructurales o funcionales, e incluyen aquellos que tienen hélice α y regiones de formación de hélice α , lamina β y regiones de formación de lámina β , giros y regiones de formación de giros, enrollamiento y regiones de formación de enrollamiento, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones α -anfipáticas, regiones β -anfipáticas, regiones variables, regiones de formación de superficie, regiones de unión a sustrato y regiones de alto índice de antigenicidad. También se prefieren fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos median en las actividades de los polipéptidos, e incluyen los que tienen una actividad similar o mejorada, o una actividad indeseable reducida. Por ejemplo, se incluyen fragmentos que son antigénicos o inmunogénicos en animales, especialmente en seres humanos. Estos fragmentos de polipéptido conservan preferiblemente una actividad biológica, tal como antigenicidad, de los polipéptidos. Los mutantes de secuencias específicas o fragmentos también constituyen un aspecto dado a conocer en el presente documento. Los mutantes preferidos son aquellos que se diferencian el polipéptido objeto debido a la sustitución por aminoácidos conservativos, concretamente, aquellos en los que se sustituye un residuo por otro residuo con propiedades similares. Las sustituciones típicas son aquellas entre Ala, Val, Leu e Ile; Ser y Thr; residuos ácidos Asp y Glu, Asn y Gln; residuos básicos Lys y Arg; o residuos aromáticos Phe y Tyr.

<Producción de polipéptidos>

Pueden producirse polipéptidos mediante cualquier método apropiado. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos que se producen de manera natural aislados, y polipéptidos que se producen mediante recombinación génica, síntesis o mediante una combinación de las mismas. En la técnica se conocen bien procedimientos para producir estos polipéptidos. Pueden prepararse polipéptidos recombinantes, por ejemplo, transfiriendo un vector, con inserción de un polinucleótido de la presente invención, en una célula huésped apropiada, y purificando el polipéptido expresado dentro del transformante resultante. Por otro lado, pueden prepararse polipéptidos que se producen de manera natural, por ejemplo, usando columnas de afinidad en las que se inmovilizan anticuerpos contra un polipéptido de esta invención (descritos a continuación) (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 16.1-16.19). Los anticuerpos para la purificación por afinidad pueden ser anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales. Los polipéptidos también pueden prepararse mediante métodos de traducción *in vitro* (por ejemplo, véase "On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system", Dasso, M. C. y Jackson, R. J. (1989) NAR 17: 3129-3144) y similares. Los fragmentos de polipéptido pueden producirse, por ejemplo, escindiendo los polipéptidos de la presente invención con peptidasas apropiadas.

<Sondas, cebadores>

En el presente documento se dan a conocer nucleótidos con una longitud de cadena de al menos 15 nucleótidos, que son complementarios para un polinucleótido identificado por los presentes inventores (por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una cadena complementaria de la misma, y un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 51 o una cadena complementaria de la misma). En el presente documento, el término "cadena complementaria" se define como la otra cadena de un ácido nucleico bicatenario compuesto por pares de bases de A:T (A:U en el caso de ARN) y G:C. Además, el término "complementario" abarca no sólo apareamiento completo dentro de una región continua de al menos 15 nucleótidos secuenciales, sino también homología de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 80%, más preferiblemente del 90% y lo más preferiblemente del 95% o superior dentro de esa región. La homología puede determinarse usando un algoritmo descrito en el presente documento. Las sondas y los cebadores para la detección o amplificación de los polinucleótidos se incluyen en esos polinucleótidos. Los polinucleótidos típicos usados como cebadores tienen de 15 a 100 nucleótidos de longitud, y preferiblemente de 15 a 35 nucleótidos de longitud. Alternativamente, los polinucleótidos usados como sondas son nucleótidos de al menos 15 nucleótidos de longitud, y preferiblemente de al menos 30 nucleótidos. Incluyen al menos una porción o una secuencia entera de un ADN de la presente invención. Cuando se usan los nucleótidos como cebadores, la reacción de amplificación de ácido nucleico no está particularmente limitada, siempre que pueda obtenerse un producto de amplificación deseado. Por ejemplo, la reacción puede seleccionarse de reacciones de amplificación de ADN tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ICAN, LAMP, SDA y LCR, y reacciones de amplificación de ARN tales como NASBA. Un método preferido es PCR.

En una realización, tales nucleótidos son los específicos para un ADN que codifica para un polipéptido. El término "específico" se refiere a hibridarse en condiciones de hibridación normales, preferiblemente condiciones rigurosas, con ADN que codifica para un determinado polipéptido, pero no con ADN que codifican para otros polipéptidos. Realizaciones preferidas son polinucleótidos que se hibridan con el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli* (SEQ ID NO: 1) pero no con ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*. Tales polinucleótidos incluyen, por ejemplo, pares de cebadores seleccionados de SEQ ID NO: 13, 14, 28 a 36, 70, 71, 76 y 77. Alternativamente, realizaciones preferidas son polinucleótidos que se hibridan con el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus* (SEQ ID NO: 51) pero no con ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Tales polinucleótidos incluyen, por ejemplo, pares de cebadores seleccionados de SEQ ID NO: 15, 16, 37 a 46, 72, 73, 78 y 79.

Además, con la identificación del ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli* (SEQ ID NO: 1) en los ejemplos, los presentes inventores encontraron secuencias de nucleótidos específicas para ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*. Por tanto, en el presente documento también se dan a conocer pares de cebadores específicos para el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni* y los específicos para el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*. Los cebadores específicos para el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni* incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los cebadores de SEQ ID NO: 11, 12 y 17 a 27. Los cebadores específicos para el ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus* incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los cebadores de SEQ ID NO: 15, 16 y 37 a 46.

Además, con la identificación de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli* (SEQ ID NO: 1) y *Campylobacter fetus* (SEQ ID NO: 51) en los ejemplos, los presentes inventores encontraron cebadores comunes para los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus* (cebadores que pueden amplificar todos los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de estas bacterias). En el presente

documento también se dan a conocer tales cebadores comunes. Los cebadores comunes preferidos incluyen, por ejemplo, cebadores de SEQ ID NO: 64 y 65 (para amplificar ADN de cdtA), cebadores de SEQ ID NO: 7 a 10 y de 47 a 50 (para amplificar ADN de cdtB) y cebadores de SEQ ID NO: 66 y 67 (para amplificar ADN de cdtC).

5 Los expertos en la técnica pueden preparar apropiadamente cebadores que incluyen uno o más nucleótidos diferentes de los cebadores anteriores pero pueden amplificar las mismas regiones de ADN genómico que las amplificadas con los cebadores anteriores. Las regiones de ADN genómico con las que se hibridan los cebadores anteriores se muestran en las figuras 17 a 19. En el presente documento también se dan a conocer tales cebadores mutantes. Tal como se describió anteriormente, las reacciones de amplificación de ácido nucleico en las que pueden aplicarse los cebadores no están particularmente limitadas, siempre que proporcionen productos de amplificación deseado. Por ejemplo, la reacción puede seleccionarse de reacciones de amplificación de ADN tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ICAN, LAMP, SDA y LCR, y reacciones de amplificación de ARN tales como NASBA. Un método preferido es PCR. Basándose en los cebadores anteriores, los expertos en la técnica pueden diseñar cebadores mutantes adecuados para métodos de amplificación de ácido nucleico que van a realizarse. Tales cebadores mutantes pueden prepararse sintéticamente. Puede evaluarse fácilmente si los cebadores mutantes pueden amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con los cebadores originales, realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico usando los cebadores mutantes y analizando los productos de amplificación.

Estos cebadores pueden usarse preferiblemente para detectar bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba.

<Producción de vectores, células huésped y polipéptidos>

20 En el presente documento también se dan a conocer métodos para producir vectores que llevan polinucleótidos dados a conocer en el presente documento, células huésped que conservan los polinucleótidos o dichos vectores, y polipéptidos que usan dichas células huésped.

Los vectores no están limitados, siempre que los ADN insertados en los vectores se conserven de manera estable. Por ejemplo, el vector pBluescript (Stratagene) es un vector de clonación preferible cuando se usa *E. coli* como huésped. Cuando se usan vectores para producir los polipéptidos de la presente invención, los vectores de expresión son particularmente útiles. Estos vectores de expresión no están específicamente limitados, siempre que expresen polipéptidos *in vitro*, en *E. coli*, en células en cultivo o *in vivo*. Sin embargo, los ejemplos preferidos incluyen el vector pBEST (ProMega) para la expresión *in vitro*, el vector pET (Invitrogen) para la expresión en *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (n.º de registro de GenBank AB009864) para la expresión en células en cultivo y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. 8:466-472(1988)) para la expresión *in vitro*, y similares. Puede insertarse un ADN en un vector mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante una reacción de ligasa usando sitios de enzimas de restricción (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel, *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 11.4-11.11).

35 Las células huésped en las que se introducen los vectores no están específicamente limitadas, y pueden usarse diversas células huésped según los objetivos de la presente invención. Por ejemplo, células bacterianas (por ejemplo *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo levadura, *Aspergillus*), células de insectos (por ejemplo *Drosophila* S2, *Spodoptera* SF9), células de animales (por ejemplo CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, célula de melanoma de Bowes) y células vegetales son ejemplos de células para expresar polipéptidos. La transfección de un vector en una célula huésped puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales, tales como métodos de precipitación con fosfato de calcio, métodos de electroporación (Current protocols en Molecular Biology, edit., Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, sección 9.1-9.9), métodos de Lipofectamine (GIBCO-BRL), métodos de microinyección, y similares.

45 En células huésped, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en un polipéptido de interés con el fin de facilitar la secreción de un polipéptido expresado en la luz del retículo endoplasmático, en la cavidad alrededor de una célula, o en el entorno extracelular. Estas señales pueden ser señales endógenas o señales de una especie diferente del polipéptido diana.

Cuando un polipéptido se secreta en medios de cultivo, se recogen estos medios de cultivo para recoger el polipéptido. Cuando un polipéptido se produce intracelularmente, en primer lugar se lisan las células y después se recoge el polipéptido.

50 Con el fin de recoger y purificar un polipéptido a partir de un cultivo de células recombinantes, pueden usarse métodos conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina.

<Anticuerpos>

55 En el presente documento se dan a conocer anticuerpos que se unen a un polipéptido dado a conocer en el presente documento. En el presente documento, el término "anticuerpos" se refiere a anticuerpos policlonales,

anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos humanizados y fragmentos Fab incluyendo Fab u otros productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina.

5 Puede usarse un polipéptido o su fragmento, o análogos de los mismos, o una célula que expresa los mismos, como inmunógeno para producir anticuerpos que se unen a un polipéptido. Los anticuerpos son preferiblemente inmunoespecíficos para un polipéptido. El término "inmunoespecífico" significa que un anticuerpo tiene afinidad sustancialmente superior hacia polipéptidos de la presente invención en comparación con otros polipéptidos.

10 Los anticuerpos que se unen a un polipéptido pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo policlonal tal como sigue: Se administra un polipéptido, o una proteína de fusión con GST del mismo, a animales pequeños, tales como conejos, para obtener suero. Se preparan anticuerpos policlonales purificando el suero mediante precipitación con sulfato de amonio; una columna de proteína A o de proteína G; cromatografía de intercambio iónico de DEAE; una columna de afinidad en la que se acopla el polipéptido de la presente invención; y similares. Por otro lado, pueden prepararse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, tal como sigue: Se administra un polipéptido a animales pequeños tales como ratones, y posteriormente se extirpan sus bazo y se trituran para separar las células. Entonces se fusionan las células con células de mieloma de ratón usando reactivos tales como polietilenglicol, y se seleccionan clones que producen anticuerpos que se unen al polipéptido a partir de esas células fusionadas (hibridomas). Entonces se trasplantan los hibridomas obtenidos a cavidades peritoneales de ratones, y se recogen ascitis a partir de los ratones. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse purificando las ascitis usando, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio; una columna de proteína A o de proteína G; cromatografía de intercambio iónico de DEAE; una columna de afinidad en la que se acoplan los polipéptidos de la presente invención; y similares.

15
20

Los anticuerpos también pueden usarse para detectar y purificar los polipéptidos en muestras de prueba.

<Detección de bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba>

25 La presente invención proporciona métodos para detectar bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba. Detectar bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba es útil para diversos fines, por ejemplo, en el diagnóstico de campilobacteriosis, examen rápido de alimentos contaminados con bacterias *Campylobacter*, validación de procedimientos de procesamiento de alimentos, e identificación de bacterias causantes en el momento de brote de intoxicación por alimentos.

30 En una realización, el método de detección de la presente invención es un método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter fetus* en muestras de prueba, que incluye las etapas de:

- (a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con la muestras de prueba usando una mezcla de pares de cebadores específicos para cada uno de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de estas bacterias; y
- 35 (b) determinar la presencia de estas bacterias basándose en la presencia o el peso molecular de fragmentos amplificados a partir de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias.

En una realización alternativa, el método de detección de la presente invención es un método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter fetus* en muestras de prueba, que incluye las etapas de:

- 40 (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con muestras de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de estas bacterias;
- (b) realizar una reacción en cadena de la polimerasa usando los ADN genómicos amplificados en la etapa (a) como molde y una mezcla de pares de cebadores específicos para cada uno de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias; y
- 45 (c) determinar la presencia de estas bacterias basándose en la presencia o el peso molecular de fragmentos amplificados a partir de ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias.

50 La PCR usando múltiples cebadores de PCR en un único sistema de reacción, tal como se usa en los ejemplos, se denomina "PCR múltiple". Pueden identificarse simultáneamente múltiples especies bacterianas sometiendo a electroforesis los productos de PCR y examinando los tamaños de sus bandas. La presente invención proporciona métodos para detectar bacterias *Campylobacter* mediante métodos de amplificación de ácido nucleico, que incluyen PCR múltiple como ejemplo típico, usando cebadores o combinaciones de los mismos que se usan de manera adecuada para amplificar múltiples regiones de ácido nucleico. No hay ninguna limitación en cuanto al tipo de método de amplificación de ácido nucleico en la presente invención, siempre que puedan obtenerse los productos de amplificación deseados. Un método preferido es PCR.

Las mezclas de pares de cebadores específicos usadas en tales métodos incluyen, por ejemplo, mezclas de los siguientes pares de cebadores:

- 5 (a) un par de cebadores seleccionado de SEQ ID NO: 13, 14 y 28 a 36 para amplificar ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli*, o un par de cebadores que puede amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con el par de cebadores;
- (b) un par de cebadores seleccionado de SEQ ID NO: 11, 12 y 17 a 27 para amplificar ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*, o un par de cebadores que puede amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con el par de cebadores; y
- 10 (c) un par de cebadores seleccionado de SEQ ID NO: 15, 16 y 37 a 46 para amplificar ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*, o un par de cebadores que puede amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con el par de cebadores. Además, puede usarse un par de cebadores seleccionado de, por ejemplo, SEQ ID NO: 7 a 10 y de 47 a 50, o un par de cebadores que puede amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con el par de cebadores, como par de cebadores comunes.

15 En una realización adicional de la presente invención, el método de detección es un método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus* en muestras de prueba, que incluye las etapas de:

- (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con muestras de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de estas bacterias;
- 20 (b) digerir los ADN genómicos amplificados en la etapa (a) con una enzima de restricción; y
- (c) determinar la presencia de estas bacterias basándose en el peso molecular de fragmentos de ADN que resultan de la digestión. Las enzimas de restricción que pueden usarse en este método no están particularmente limitadas siempre que permitan la identificación de ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *C. coli*, *C. jejuni* y *C. fetus*, e incluyen, por ejemplo, *Sau3AI*, *Dsal*, *Mbol*, *Rsal*, *EcoRI*, *Hinfl*, *NdeI*, *PstI*, *XbaI* y *XhoI*.
- 25 Mientras tanto, los ejemplos de pares de cebadores comunes incluyen pares de cebadores seleccionados de SEQ ID NO: 7 a 10 y de 47 a 50, y pares de cebadores que pueden amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con los pares de cebadores.

30 Un método para detectar polimorfismos basándose en longitudes de fragmentos generados mediante digestión de ADN amplificado por PCR con diversas enzimas de restricción, tal como se describe en el ejemplo a continuación, se denomina PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción mediante PCR). La presente invención también proporciona cebadores que se usan de manera adecuada en métodos para detectar polimorfismos, que incluyen PCR-RFLP como ejemplo típico, basándose en longitudes de fragmentos generados mediante tratamiento de ADN amplificado mediante métodos de amplificación de ácido nucleico con diversas enzimas de restricción.

35 En otra realización de la presente invención, el método de detección es un método para detectar la presencia de bacterias *Campylobacter* en muestras de prueba, que incluye las etapas de:

- (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con muestras de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de bacterias *Campylobacter*; y
- 40 (b) determinar la presencia de *Campylobacter* basándose en la presencia o el peso molecular de fragmentos amplificados a partir de ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de bacterias *Campylobacter*. Los pares de cebadores usados en este método son aquellos que pueden amplificar ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de bacterias *Campylobacter* independientemente de la especie de *Campylobacter*. Tales pares de cebadores comunes incluyen, por ejemplo, pares de cebadores seleccionados de SEQ ID NO: 7 a 10, de 47 a 50 y de 64 a 67. Tal como se describió anteriormente, los pares de cebadores anteriores son pares de cebadores comunes que amplifican todos los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las tres especies, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*. Se espera que los pares de cebadores descritos anteriormente amplifiquen ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales no sólo de las tres especies descritas anteriormente sino también de otras bacterias *Campylobacter*. Del mismo modo, pares de cebadores que pueden amplificar la misma región de ADN genómico que la amplificada con los pares de cebadores descritos anteriormente pueden amplificar regiones genómicas de las tres especies bacterianas descritas anteriormente y otras bacterias *Campylobacter*.
- 45
- 50

55 La presente invención también proporciona kits usados en los métodos de detección anteriores de la presente invención. Estos kits incluyen un manual de instrucciones además de los pares de cebadores descritos anteriormente. Los kits también pueden incluir otros componentes.

La detección de bacterias *Campylobacter* puede alcanzarse a nivel de proteína así como a nivel de ADN tal como se describió anteriormente. Puede evaluarse la presencia de estas bacterias en muestras de prueba, por ejemplo, detectando las toxinas de distensión citoletales de las bacterias mediante inmunotransferencia de tipo Western, inmunotransferencia puntual, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia, o similares, usando anticuerpos específicos para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Cepas de *Campylobacter*

Se usaron *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* recogidos a partir de diversos materiales clínicos durante del 2001 al 2003. Se cultivó cada cepa en placas de sangre-agar (base de sangre-agar n.º 2: OXOID) que contenían el 5% de sangre de caballo desfibrinada (Japan Biological Material Center) y suplemento selectivo para *Campylobacter* SR69 (OXOID). Se cultivaron *C. jejuni* y *C. coli* bajo los gases el 5% de O₂, el 10% de CO₂ y el 85% de N₂ a 42°C, mientras que se cultivó *C. fetus* a 25°C en una incubadora de gas de O₂/CO₂ a baja temperatura (modelo 9200: Wakenyaku Co., Ltd).

[Ejemplo 2] Preparación de molde de PCR

Se separaron mediante raspado cinco clones de cada especie bacteriana y se suspendieron en 500 µl de PBS estéril. Se lavaron las bacterias recogidas mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min. (MRX-150: TOMY SEIKO Co., Ltd.) y después se resuspendieron en 300 µl de PBS estéril. Después se sometieron las suspensiones a ebullición en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos y se enfriaron sobre hielo. Se centrifugaron las suspensiones a 15.000 rpm durante 10 min. y se recogieron los sobrenadantes resultantes. Se cuantificó la cantidad de ADN en los sobrenadantes recogidos usando un espectrofotómetro (Ultrospec 3100pro: Amersham Biosciences). Se diluyó cada extracto celular cuantificado hasta 20 ng/µl y se sometió a PCR.

[Ejemplo 3] Preparación de sonda de *cdtB* de *C. coli* e hibridación de tipo Southern

Se preparó una sonda de *cdtB* de *C. coli* mediante marcaje por PCR usando los cebadores GNW y LPF-D, mezcla de marcaje DIG (Roche) y extracto celular de *C. coli* Co1-192 como molde.

Específicamente, para someter a prueba la existencia del gen de CDT de *C. coli*, se analizaron tres cepas de *C. jejuni* y dos cepas de *C. coli* mediante PCR usando los cebadores degenerados GNW [SEQ ID NO: 5: 5'-GG(ACGT)AA(CT)TGGAT(ACT)TGGGG(ACGT)TA-3'] y LPF-D [SEQ ID NO: 6: 5'-(AGT)AA(CT)TG(ACGT)AC(AGT)TA(ACGT)CC(AGT)AA(ACGT)GG-3'] descritos en una referencia (Pickett, C. *et al.* Infect. Immun., 64: 2070 (1996)) en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos] y 72°C durante 5 minutos. Las tres cepas de *C. jejuni* y las dos cepas de *C. coli* dieron bandas de la región de *cdt* amplificada a aproximadamente 1,5 Kb (flecha 1 en la figura 1).

Se ligaron las bandas amplificadas en el vector pT7 (Novagen) y se transformaron células de *E. coli* (*E. coli* JM109) con los ligados. La secuenciación de los clones resultantes usando un secuenciador (secuenciador de ADN ABI PRISM 377; Applied Biosystems) mostró secuencias similares a *cdtB*. Se usaron kits de secuenciación por ciclos BigDye terminator (Applied Biosystems) en la reacción de secuencia. Además, se encontró que bandas de 800 pb (flecha 2 en la figura 1) eran bandas secundarias derivadas de *cdtB*, que se amplificaron porque el cebador GNW era un cebador mixto.

Se digirieron 20 µg de ADN genómico de *C. coli* Co1-192 con 60 U de enzima de restricción *HindIII* a 37°C durante 12 horas. Después, se realizaron transferencia de tipo Southern e hibridación de ADN-ADN usando la sonda preparada según un método convencional (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, (2001)).

Se llevó a cabo la hibridación en una condición rigurosa a 42°C. Tras la transferencia, se lavó dos veces la transferencia con una disolución de 2x SSC/el 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante cinco minutos y después dos veces con una disolución de 0,2x SSC/el 0,1% de SDS a 60°C durante 15 minutos.

Como resultado, se encontraron bandas positivas para sonda a aproximadamente 3 y 4 kpb (figura 2). Se ligó la banda de 3 kpb en el vector pUC18. Se transformó *E. coli* JM109 con el ligado, proporcionando un clon que contenía la región de *cdtB* (3k44).

[Ejemplo 4] Secuenciación del gen de *cdtB* de *C. coli*

Se secuenció el clon 3k44 que contenía la región de *cdtB* de *C. coli* obtenido en el ejemplo 3 mediante un método convencional. Se determinó la secuencia de la región de CDT completa de *C. coli* tal como se muestra en SEQ ID NO: 1.

[Ejemplo 5] Diseño de par de cebadores comunes 1 y PCR

5 Se comparó la secuencia de CDT de *C. coli* de la presente invención con el gen de CDT de *C. jejuni* a partir de bases de datos conocidas para diseñar cebadores comunes U y R descritos a continuación. Se mezclaron los cebadores y se añadieron a 1 µl de extracto celular 20 ng/µl para dar una concentración de cada cebador de 0,5 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto] y 72°C durante 3 minutos. El resultado se muestra en la figura 3. Se encontraron fragmentos amplificados de aproximadamente 1900 pb y por tanto se detectaron bandas derivadas de CDT a partir tanto de *C. jejuni* (carriles 2 a 4) como de *C. coli* (carriles 5 y 6).

10 Cebador común U [SEQ ID NO: 7: GATAA(CT)GATCCTTTAAAACCT]

Cebador común R [SEQ ID NO: 8: (AT)(AT)CCAAAGCG(AT)TTTT(CG)TATGG]

[Ejemplo 6] Diseño de par de cebadores comunes 2 y PCR

15 Del mismo modo, se diseñaron los cebadores comunes Up y Do indicados a continuación, y se llevó a cabo la PCR en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos] y 72°C durante 3 minutos. Los resultados se muestran en las figuras 4 a 6. Se encontraron fragmentos amplificados de aproximadamente 720 pb.

Cebador común Up [SEQ ID NO: 9: ACTTGGAATTTGCAAGGC]

Cebador común Do [SEQ ID NO: 10: TCTAAAATTTAC(ACT)GGAAAATG]

[Ejemplo 7] Diseño de cebadores específicos y detección del gen de *cdtB* mediante PCR múltiple

20 Se comparó la secuencia de CDT de *C. coli* de la presente invención con el gen de CDT de *C. jejuni* a partir de bases de datos conocidas para diseñar cebadores específicos de *C. jejuni* CjSPBU3 y CjSPBR3 descritos a continuación. Del mismo modo, se diseñaron cebadores específicos de *C. coli* CcSPBU5 y CcSPBR5 y cebadores específicos de *C. fetus* CfSPBU1 y CfSPBR1.

25 Se combinaron los cebadores y se añadieron a 1 µl de extracto celular 20 ng/µl para dar una concentración de cada cebador de 0,5 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR múltiple en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 56 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos] y 72°C durante 3 minutos (sistema de PCR GeneAmp 9700; Applied Biosystems). El resultado se muestra en la figura 7. Se encontraron fragmentos de CDT amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 750 pb), *C. coli* (aproximadamente 400 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 530 pb), permitiendo la distinción de *C. jejuni* (carriles 2 a 4), *C. coli* (carriles 5 y 6) y *C. fetus* (carriles 7 y 8).

30 Cebador específico CjSPBU3 [SEQ ID NO: 11: TACTCCGCCTTTTACCGCA]

Cebador específico CjSPBR3 [SEQ ID NO: 12: GAGTATAGGTTTGTGTC]

Cebador específico CcSPBU5 [SEQ ID NO: 13: TTTAATGTATTATTTGCCGC]

35 Cebador específico CcSPBR5 [SEQ ID NO: 14: TCATTGCCTATGCGTATG]

Cebador específico CfSPBU1 [SEQ ID NO: 15: CGCAAGTTGGAAGACTAT]

Cebador específico CfSPBR1 [SEQ ID NO: 16: TTTATTATCGCCGAGCA]

[Ejemplo 8] Identificación de especies bacterianas mediante PCR-RFLP usando el par de cebadores comunes 1

40 Tras la PCR usando el par de cebadores comunes 1 obtenido en el ejemplo 6, se añadieron 5 U de la enzima de restricción *Sau3AI* (NEB) a 8,5 µl de la disolución de reacción. Se hizo reaccionar la mezcla resultante a 37°C durante 3 horas y después se sometió a electroforesis. El resultado se muestra en la figura 8.

[Ejemplo 9] Detección del gen de *cdtB* mediante PCR múltiple usando cebadores específicos

45 Se realizó una PCR múltiple con otras diversas cepas clínicas de bacterias *Campylobacter* usando cebadores específicos obtenidos en el ejemplo 7 y la condición experimental en el ejemplo 7. El resultado se muestra en la figura 9. Como en el caso del ejemplo 7, se encontraron fragmentos de CDT amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 750 pb), *C. coli* (aproximadamente 400 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 530 pb), permitiendo la distinción de cada especie.

[Ejemplo 10] Preparación de sonda de *cdtB* de *C. fetus* e hibridación de tipo Southern

Se preparó una sonda de *cdtB* de *C. fetus* mediante marcaje por PCR usando el par de cebadores comunes 2 (cebadores comunes Up y Do), mezcla de marcaje DIG (Roche) y extracto celular de *C. fetus* Co1-187 como molde.

5 Se digirieron 20 µg de ADN genómico de *C. fetus* Co1-187 con 60 U de la enzima de restricción *HindIII* a 37°C durante 12 horas. Después, se llevaron a cabo transferencia de tipo Southern e hibridación ADN-ADN según un método convencional (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, (2001)) usando la sonda obtenida. Se llevó a cabo la hibridación en una condición rigurosa a 42°C. Tras la transferencia, se lavó la transferencia dos veces con una disolución de 2x SSC/el 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante cinco minutos, y después dos veces con una disolución de 0,2x SSC/el 0,1% de SDS a 60°C
10 durante 15 minutos.

Como resultado, se encontraron bandas positivas para sonda a aproximadamente 2 y 5 kpb (figura 10). Se ligaron las bandas de 2 kpb en vector pUC18. Se transformó *E. coli* JM109 con el ligado, proporcionando un clon que contenía la región de *cdtB* (Cf78).

[Ejemplo 11] Secuenciación del gen de CDT de *C. fetus*

15 Se secuenció el clon Cf78 que contenía la región de *cdtB* de *C. fetus* obtenido en el ejemplo 10 mediante un método convencional para determinar las secuencias de las regiones de *cdtA* y *cdtB* de *C. fetus*. Dado que el clon Cf78 no contenía la región de *cdtC*, se determinó la secuencia de la región de *cdtC* realizando un desplazamiento sobre el gen en la condición descrita a continuación usando cebadores aleatorios diseñados basándose en la secuencia del gen de *cdtB* determinada. Por tanto, se determinó la secuencia de la región de CDT de *C. fetus* completa tal como se muestra en SEQ ID NO: 51.
20

[Desplazamiento sobre el gen usando cebador aleatorio]

25 Se diseñaron conjuntos de cebadores, que consistían en un cebador aleatorio, un cebador de amplificación de diana y un cebador de secuenciación descritos a continuación, basándose en la secuencia génica determinada en el ejemplo 11. Se amplificaron las dianas usando el gen de *C. fetus* Co1-187 como molde. Para la amplificación de diana, se añadieron 10 pmol del cebador aleatorio a 20 ng del gen de molde, y se ajustó el volumen final a 100 µl usando kit de PCR KOD Dash (TOYOBO). Se sometió la mezcla de reacción a PCR en la condición de: 94°C durante 2 minutos y 35 ciclos de [94°C durante 20 segundos, 65°C durante 5 segundos y 74°C durante 30 segundos].

30 Se secuenciaron los productos de PCR resultantes según un método convencional usando los cebadores de secuenciación.

Conjunto de cebadores 1

Cebador aleatorio [SEQ ID NO: 55: GCTTGTAGCAGTATTGATGCNNNNNNNNN]

Cebador de amplificación de diana [SEQ ID NO: 56: GCTTGTAGCAGTATTGATGC]

Cebador de secuenciación [SEQ ID NO: 57: CTAGTTTCGGACCATTTTCC]

35 Conjunto de cebadores 2

Cebador aleatorio [SEQ ID NO: 58: ATACGCAATGCAAACACCGNNNNNNNNN]

Cebador de amplificación de diana [SEQ ID NO: 59: ATACGCAATGAAACACCGG]

Cebador de secuenciación [SEQ ID NO: 60: TAAAAGCGATTTTCAGGGCAG]

Conjunto de cebadores 3

40 Cebador aleatorio [SEQ ID NO: 61: TGTCGACATAGAGCCTAAACNNNNNNNNN]

Cebador de amplificación de diana [SEQ ID NO: 62: TGTCGACATAGAGCCTAAAC]

Cebador de secuenciación [SEQ ID NO: 63: ATTTTACCGCCGCTTAGTG]

[Ejemplo 12] Diseño de los cebadores comunes de *cdtA* y PCR

45 Se compararon las secuencias de *cdtA* de *C. coli* y *C. fetus* de la presente invención con el gen de *cdtA* de *C. jejuni* a partir de bases de datos conocidas para diseñar cebadores comunes de *cdtA* U y R descritos a continuación. Se combinaron los cebadores y se añadieron 1 µl de extracto celular 20 ng/µl para dar una concentración de cada

5 cebador de 0,25 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos] y 72°C durante 3 minutos. El resultado se muestra en la figura 11 (izquierda). Se encontraron fragmentos amplificados de aproximadamente 550 pb. Por tanto, se detectaron bandas derivadas de *cdtA* para todos de *C. jejuni* (carriles 2 a 4), *C. coli* (carriles 5 y 6) y *C. fetus* (carriles 7 y 8).

Cebador común de CdtA U [SEQ ID NO: 64: (GA)A(ACT)GAT(AC)(AC)(TAG)GAT(AC)GATCC(AT)(TC)CAAA]

Cebador común de CdtA R [SEQ ID NO: 65: (GA)(AT)AA(TC)AGG(TC)G(CT)TTG(CT)A(AT)(GA)CA]

[Ejemplo 13] Detección del gen de *cdtA* mediante PCR usando cebadores comunes de *cdtA*

10 Se realizó una PCR con otras diversas cepas clínicas de bacterias *Campylobacter* usando los cebadores comunes obtenidos en el ejemplo 12 y la condición experimental en el ejemplo 12. El resultado se muestra en la figura 12. Como en el caso del ejemplo 12, se encontraron fragmentos amplificados específicos para *cdtA* (aproximadamente 550 pb).

[Ejemplo 14] Diseño de cebadores comunes de *cdtC* y PCR

15 Se compararon las secuencias de *cdtC* de *C. coli* y *C. fetus* de la presente invención con el gen de *cdtC* de *C. jejuni* de la base de datos conocida (BLAST) para diseñar cebadores comunes de *cdtC* U y R descritos a continuación.

20 Se combinaron 1 µl de extracto celular 20 ng/µl y los cebadores para dar una concentración de cada cebador de 0,25 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 minutos] y 72°C durante 3 minutos. El resultado se muestra en la figura 3. Se encontraron fragmentos amplificados de aproximadamente 320 pb. Por tanto, se detectaron derivadas de *cdtC* para todos de *C. jejuni* (carriles 10-12), *C. coli* (carriles 13 y 14) y *C. fetus* (carriles 15 y 16) (figura 11; derecha).

Cebador común de CdtC U [SEQ ID NO: 66:(AGC)A(TG)(TC)(TC)(AT)(AG)(AT)(AT)(GT)A(CT)CAAAA(CT)TGG]

25 Cebador común de CdtC R [SEQ ID NO: 67:(AGC)CTA(AGT)(AT)CC(AT)A(AC)(GT)C(GT)(AT)T(CT)TT(GC)]

[Ejemplo 15] Detección del gen de *cdtC* mediante PCR usando cebadores comunes de *cdtC*

30 Se realizó una PCR con otras diversas cepas clínicas de bacterias *Campylobacter* usando los cebadores comunes obtenidos en los ejemplos y la condición experimental en el ejemplo 14. El resultado se muestra en la figura 13. Como en el caso del ejemplo 14, se encontraron fragmentos amplificados específicos para *cdtC* (aproximadamente 320 pb).

[Ejemplo 16] Diseño de cebadores específicos de *cdtA* y detección del gen de *cdtA* mediante PCR múltiple

35 Se comparó la secuencia de CDT de *C. fetus* de la presente invención con los genes de CDT de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de la base de datos conocida (BLAST) para diseñar cebadores específicos de *C. jejuni* CjASPU2 y CjASPR2 descritos a continuación. Del mismo modo, se diseñaron los cebadores específicos de *C. coli* CcASPU1 y CcASPR1 y los cebadores específicos de *C. fetus* CfASPU1 y CfASPR1.

40 Se combinaron los cebadores y se añadieron a 1 µl de extracto celular 20 ng/µl para dar una concentración de cada cebador de 0,125 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR múltiple en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos] y 72°C durante 3 minutos (sistema de PCR GeneAmp 9700; Applied Biosystems). El resultado se muestra en la figura 14 (izquierda). Se encontraron fragmentos de CDT amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 630 pb), *C. coli* (aproximadamente 330 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 490 pb), permitiendo la distinción de *C. jejuni* (carriles 2 a 4), *C. coli* (carriles 5 y 6) y *C. fetus* (carriles 7 y 8).

Cebador específico CjASPU2 [SEQ ID NO: 68: AGGACTTGAACCTACTTTTC]

45 Cebador específico CjASPR2 [SEQ ID NO: 69: AGGTGGAGTAGTTAAAACC]

Cebador específico CcASPU1 [SEQ ID NO: 70: ATTGCCAAGGCTAAAATCTC]

Cebador específico CcASPR1 [SEQ ID NO: 71: GATAAAGTCTAAAAGTGC]

Cebador específico CfASPU1 [SEQ ID NO: 72: AACGACAAATGTAAGCACTC]

Cebador específico CfASPR1 [SEQ ID NO: 73: TATTTATGCAAGTCGTGCGA]

[Ejemplo 17] Detección del gen de *cdtA* mediante PCR múltiple usando cebadores específicos de *cdtA*

5 Se realizó una PCR múltiple con otras diversas cepas clínicas de bacterias *Campylobacter* usando los cebadores específicos obtenidos en los ejemplos y la condición experimental en el ejemplo 14. El resultado se muestra en la figura 15. Como en el caso del ejemplo 14, se encontraron fragmentos de *cdtA* amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 630 pb), *C. coli* (aproximadamente 330 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 490 pb), permitiendo la distinción de cada especie.

[Ejemplo 18] Diseño de cebadores específicos de *cdtC* y detección del gen de *cdtC* mediante PCR múltiple

10 Se comparó la secuencia de CDT de *C. fetus* de la presente invención con los genes de CDT de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de bases de datos conocidas para diseñar cebadores específicos de *C. jejuni* CjCSPU1 y CjCSPR2 descritos a continuación. Del mismo modo, se diseñaron cebadores específicos de *C. coli* CcCSPU1 y CcCSPR1 y cebadores específicos de *C. fetus* CfCSPU2 y CfCSPR1.

15 Se combinaron los cebadores y se añadieron a 1 µl de extracto celular 20 ng/µl para dar una concentración de cada cebador de 0,125 mM. Se ajustó el volumen final a 20 µl con tampón de PCR (TaKaRa de Taq kit: Takara Bio). Se sometió la mezcla de reacción a PCR múltiple en la condición de: 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de [94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos] y 72°C durante 3 minutos (sistema de PCR GeneAmp 9700; Applied Biosystems). El resultado se muestra en la figura 14 (derecha). Se encontraron fragmentos de CDT amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 500 pb), *C. coli* (aproximadamente 300 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 400 pb), permitiendo la distinción de *C. jejuni* (carriles 10 a 12), *C. coli* (carriles 13 y 14) y *C. fetus* (carriles 15 y 16).

Cebador específico CjCSPU1 [SEQ ID NO: 74: TTTAGCCTTTGCAACTCCTA]

Cebador específico CjCSPR2 [SEQ ID NO: 75: AAGGGGTAGCAGCTGTAA]

Cebador específico CcCSPU1 [SEQ ID NO: 76: TAGGGGATATGCACGCAAAAG]

Cebador específico CcCSPR1 [SEQ ID NO: 77: GCTTAATACAGTTACGATAG]

25 Cebador específico CfCSPU2 [SEQ ID NO: 78: AAGCATAAGTTTTGCAAACG]

Cebador específico CfCSPR1 [SEQ ID NO: 79: GTTTGGATTTTCAAATGTTCC]

[Ejemplo 19] Detección del gen de *cdtC* mediante PCR múltiple usando cebadores específicos

30 Se realizó una PCR múltiple con otras diversas cepas clínicas de bacterias *Campylobacter* usando los cebadores específicos obtenidos en los ejemplos y la condición experimental en el ejemplo 14. El resultado se muestra en la figura 16. Como en el caso del ejemplo 14, se encontraron fragmentos de *CdtC* amplificados específicos para *C. jejuni* (aproximadamente 500 pb), *C. coli* (aproximadamente 300 pb) y *C. fetus* (aproximadamente 400 pb), permitiendo la distinción de cada especie.

Aplicabilidad industrial

35 Los métodos y los kits de la presente invención pueden aplicarse no sólo a investigaciones y a estudios epidemiológicos con bacterias *Campylobacter* y al diagnóstico de la campilobacteriosis, sino también al examen rápido de alimentos contaminados con bacterias *Campylobacter*, a la validación de procedimientos de procesamiento de alimentos y a la rápida identificación de las bacterias causantes en el momento de brote de intoxicación por alimentos, y por tanto son útiles para prevenir la expansión de la infección.

Lista de secuencias

40 <110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Método para detectar CDT y bacterias del género *Campylobacter* usándolo como diana

<130> F2-A0301P

<150> JP 2003-408103

45 <151> 05-12-2003

<160> 79

<170> PatentIn versión 3.1

5 <210> 1

<211> 2211

<212> ADN

<213> *Campylobacter coli*

10 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (777)

<223>

15 <220>

<221> CDS

<222> (802) .. (1605)

<223>

20 <220>

<221> CDS

<222> (1615) .. (2187)

<223>

25 <400> 1

ES 2 456 710 T3

atg	caa	aaa	ata	aaa	tta	agc	cta	atg	ttt	ttg	att	gta	aca	atc	att	48
Met	Gln	Lys	Ile	Lys	Leu	Ser	Leu	Met	Phe	Leu	Ile	Val	Thr	Ile	Ile	
1				5					10					15		
ttt	tta	gct	tgt	tct	tca	aaa	gaa	caa	caa	atc	aat	cct	tta	gga	aga	96
Phe	Leu	Ala	Cys	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Ile	Asn	Pro	Leu	Gly	Arg	
			20						25					30		
tct	tac	ggt	aaa	ttt	aac	gat	aac	gat	cct	tta	aaa	ctt	ggt	tca	aaa	144
Ser	Tyr	Gly	Lys	Phe	Asn	Asp	Asn	Asp	Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	
		35						40					45			
cct	aca	ccc	cct	gtc	aaa	caa	aaa	aca	cca	agc	ttg	gta	gaa	ggt	aaa	192
Pro	Thr	Pro	Pro	Val	Lys	Gln	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	Val	Glu	Gly	Lys	
	50					55						60				
aaa	ttt	ccc	gcc	ata	cca	ctt	gtc	cca	cct	gta	atc	act	cct	aat	acc	240
Lys	Phe	Pro	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Pro	Pro	Val	Ile	Thr	Pro	Asn	Thr	
65					70					75					80	
ttt	aaa	gga	gat	aat	gcc	gtc	aaa	ggc	cca	ttg	cca	agg	cta	aaa	tct	288
Phe	Lys	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Leu	Lys	Ser	
				85					90					95		
cca	aac	gaa	ttt	gct	tca	aat	gct	tta	tac	gaa	aac	aca	ggt	atg	gta	336
Pro	Asn	Glu	Phe	Ala	Ser	Asn	Ala	Leu	Tyr	Glu	Asn	Thr	Gly	Met	Val	
			100					105						110		

ES 2 456 710 T3

agt gat ttt gtc act att atg aat cct aat gga gca tct tta aca atc	384
Ser Asp Phe Val Thr Ile Met Asn Pro Asn Gly Ala Ser Leu Thr Ile	
115 120 125	
tgg gct tta aat cct ggc aat tgg ata tgg gga tat agt tta ttt gct	432
Trp Ala Leu Asn Pro Gly Asn Trp Ile Trp Gly Tyr Ser Leu Phe Ala	
130 135 140	
agt aga cct ttt gga gat gca aga gct tgg cag ctt att gaa ttt cca	480
Ser Arg Pro Phe Gly Asp Ala Arg Ala Trp Gln Leu Ile Glu Phe Pro	
145 150 155 160	
aac aat aca gta atg att aaa aat gca aaa aca ttt act tgc tta aac	528
Asn Asn Thr Val Met Ile Lys Asn Ala Lys Thr Phe Thr Cys Leu Asn	
165 170 175	
gcc tat aga aat ggc atc gtt cat tat cct tgt gat caa aca aat ttt	576
Ala Tyr Arg Asn Gly Ile Val His Tyr Pro Cys Asp Gln Thr Asn Phe	
180 185 190	
gcg cag ttt tgg aga ctt tat ccg atg act aat gga gct tat caa att	624
Ala Gln Phe Trp Arg Leu Tyr Pro Met Thr Asn Gly Ala Tyr Gln Ile	
195 200 205	
caa aat ttt gcc acc caa caa tgt ata caa aca cct gtt tca aat gta	672
Gln Asn Phe Ala Thr Gln Gln Cys Ile Gln Thr Pro Val Ser Asn Val	
210 215 220	
atg gaa gaa ttt aat ttg agc ttt tat aat att tat tta acc gat tgt	720
Met Glu Glu Phe Asn Leu Ser Phe Tyr Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Cys	
225 230 235 240	
ttg aaa gaa aaa gaa aag aat ttg gat aga cag tgg tat ata ggc gct	768
Leu Lys Glu Lys Glu Lys Asn Leu Asp Arg Gln Trp Tyr Ile Gly Ala	
245 250 255	
cct att taa ttttttcgct atgaaaaggaa gata atg aaa aaa ata gta ttt	819
Pro Ile Met Lys Lys Ile Val Phe	
260	
ttg att tta agt ttt aat gta tta ttt gcc gct tta gaa aat tac aac	867
Leu Ile Leu Ser Phe Asn Val Leu Phe Ala Ala Leu Glu Asn Tyr Asn	
265 270 275 280	
acc gga act tgg aat ttg caa ggc tca tca gct gca act gaa agc aaa	915
Thr Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser Ala Ala Thr Glu Ser Lys	
285 290 295	
tgg aat gtt agt ata aga caa ctc ata acc ggt gca aat cct atg gat	963
Trp Asn Val Ser Ile Arg Gln Leu Ile Thr Gly Ala Asn Pro Met Asp	
300 305 310	
gtt tta gct gtt caa gaa gcg ggg gtt tta cct agt aca gct atg atg	1011
Val Leu Ala Val Gln Glu Ala Gly Val Leu Pro Ser Thr Ala Met Met	
315 320 325	
act cct aga cag gta caa ccc gtg ggc gtg ggt att cct ata cat gaa	1059
Thr Pro Arg Gln Val Gln Pro Val Gly Val Gly Ile Pro Ile His Glu	
330 335 340	
tac ata tgg aat tta ggc tct gta tca aga cct agc tct gtt tat ata	1107
Tyr Ile Trp Asn Leu Gly Ser Val Ser Arg Pro Ser Ser Val Tyr Ile	
345 350 355 360	
tat tat tct aga gtg gat gta gga gca aat cgt gtg aat tta gct atc	1155

ES 2 456 710 T3

Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn Arg Val Asn Leu Ala Ile	
365 370 375	
gtt agc aga gtg caa gcg gat gaa gtt ttt gtt tta ccc cct cca aca	1203
Val Ser Arg Val Gln Ala Asp Glu Val Phe Val Leu Pro Pro Pro Thr	
380 385 390	
gtt gct tca aga cct att ata ggc ata cgc ata ggc aat gat gct ttt	1251
Val Ala Ser Arg Pro Ile Ile Gly Ile Arg Ile Gly Asn Asp Ala Phe	
395 400 405	
ttc aat ata cac gct cta gca agt ggg gga aat gac gca gga gcc att	1299
Phe Asn Ile His Ala Leu Ala Ser Gly Gly Asn Asp Ala Gly Ala Ile	
410 415 420	
gtc gct gct gtg gat atg ttt ttt aga aat aga cct gat att aat tgg	1347
Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe Arg Asn Arg Pro Asp Ile Asn Trp	
425 430 435 440	
atg att tta ggc gat ttt aat aga gaa tca ggc gcc tta gta acc ttg	1395
Met Ile Leu Gly Asp Phe Asn Arg Glu Ser Gly Ala Leu Val Thr Leu	
445 450 455	
cta gat cct gac tta aga gca cgc act cgc gta gtt gtt ccg cct tct	1443
Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Arg Thr Arg Val Val Val Pro Pro Ser	
460 465 470	
tct acg caa aca agt gga aga acg att gat tat gct atc act gga aat	1491
Ser Thr Gln Thr Ser Gly Arg Thr Ile Asp Tyr Ala Ile Thr Gly Asn	
475 480 485	
tcc aac act gca gct tta tac aac cca cca ccg ata gtt gcg att tta	1539
Ser Asn Thr Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Pro Pro Ile Val Ala Ile Leu	
490 495 500	
gct tta gaa gga tta aga acc ttt ttg gct tca gat cat ttt cct gta	1587
Ala Leu Glu Gly Leu Arg Thr Phe Leu Ala Ser Asp His Phe Pro Val	
505 510 515 520	
aat ttt aga aga cct tag gagcttaat atg aaa aaa ttt ttt att tta ttt	1638
Asn Phe Arg Arg Pro Met Lys Lys Phe Phe Ile Leu Phe	
525 530	
ttt gcc ctt ttg agc ttt ttg aaa gca gag cct agc ttg gat gaa tta	1686
Phe Ala Leu Leu Ser Phe Leu Lys Ala Glu Pro Ser Leu Asp Glu Leu	
535 540 545	
gca gac ttt act cct atg ttt gct ata aga tct tta gaa aca gga att	1734
Ala Asp Phe Thr Pro Met Phe Ala Ile Arg Ser Leu Glu Thr Gly Ile	
550 555 560 565	
tct tta agt cct ttt aga aaa act tca aaa agg tta gaa gat caa aat	1782
Ser Leu Ser Pro Phe Arg Lys Thr Ser Lys Arg Leu Glu Asp Gln Asn	
570 575 580	
tgg ttt tta aaa gag att gta gca aat gat gag cta aaa gct agg gat	1830
Trp Phe Leu Lys Glu Ile Val Ala Asn Asp Glu Leu Lys Ala Arg Asp	
585 590 595	
atg cac gca aaa gat ttg cct ttt ggc tat gtt cag ttt ata agc cct	1878
Met His Ala Lys Asp Leu Pro Phe Gly Tyr Val Gln Phe Ile Ser Pro	
600 605 610	
agg ggc gat gat ata tgc cta gct gtt tta agt gaa aaa agt ttt ggc	1926

ES 2 456 710 T3

615	620	625	
acc aaa tct tgc aaa caa gat ttg caa gat gga aca atg cag act att			1974
Thr Lys Ser Cys Lys Gln Asp Leu Gln Asp Gly Thr Met Gln Thr Ile			
630	635	640	645
ttt tct atc ata cca atg aca aat ggt tct ata caa att aga tct tta			2022
Phe Ser Ile Ile Pro Met Thr Asn Gly Ser Ile Gln Ile Arg Ser Leu			
	650	655	660
acc aat ggt ggc aat caa tgc atg agc act ttt cct gac tct agt atc			2070
Thr Asn Gly Gly Asn Gln Cys Met Ser Thr Phe Pro Asp Ser Ser Ile			
	665	670	675
gcc ata gaa aat cgc ttt ggt tta gga gaa tgc ctt ttg gat cgt tct			2118
Ala Ile Glu Asn Arg Phe Gly Leu Gly Glu Cys Leu Leu Asp Arg Ser			
	680	685	690
atc gta act gta tta agc aaa ctt ttc ttt ttc tcc cct gct ata atc			2166
Ile Val Thr Val Leu Ser Lys Leu Phe Phe Phe Ser Pro Ala Ile Ile			
	695	700	705
gaa gca agc gca att tac taa cacttttcta acaaaaccaa gctt			2211
Glu Ala Ser Ala Ile Tyr			
710	715		

<210> 2

<211> 258

<212> PRT

5 <213> *Campylobacter coli*

<400> 2

Met Gln Lys Ile Lys Leu Ser Leu Met Phe Leu Ile Val Thr Ile Ile
 1 5 10 15
 Phe Leu Ala Cys Ser Ser Lys Glu Gln Gln Ile Asn Pro Leu Gly Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Gly Lys Phe Asn Asp Asn Asp Pro Leu Lys Leu Gly Ser Lys
 35 40 45
 Pro Thr Pro Pro Val Lys Gln Lys Thr Pro Ser Leu Val Glu Gly Lys
 50 55 60
 Lys Phe Pro Ala Ile Pro Leu Val Pro Pro Val Ile Thr Pro Asn Thr
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Asp Asn Ala Val Lys Gly Pro Leu Pro Arg Leu Lys Ser
 85 90 95
 Pro Asn Glu Phe Ala Ser Asn Ala Leu Tyr Glu Asn Thr Gly Met Val
 100 105 110
 Ser Asp Phe Val Thr Ile Met Asn Pro Asn Gly Ala Ser Leu Thr Ile
 115 120 125
 Trp Ala Leu Asn Pro Gly Asn Trp Ile Trp Gly Tyr Ser Leu Phe Ala
 130 135 140
 Ser Arg Pro Phe Gly Asp Ala Arg Ala Trp Gln Leu Ile Glu Phe Pro
 145 150 155 160
 Asn Asn Thr Val Met Ile Lys Asn Ala Lys Thr Phe Thr Cys Leu Asn
 165 170 175
 Ala Tyr Arg Asn Gly Ile Val His Tyr Pro Cys Asp Gln Thr Asn Phe
 180 185 190
 Ala Gln Phe Trp Arg Leu Tyr Pro Met Thr Asn Gly Ala Tyr Gln Ile
 195 200 205
 Gln Asn Phe Ala Thr Gln Gln Cys Ile Gln Thr Pro Val Ser Asn Val
 210 215 220
 Met Glu Glu Phe Asn Leu Ser Phe Tyr Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Cys
 225 230 235 240
 Leu Lys Glu Lys Glu Lys Asn Leu Asp Arg Gln Trp Tyr Ile Gly Ala
 245 250 255
 Pro Ile

<210> 3

<211> 267

ES 2 456 710 T3

<212> PRT

<213> *Campylobacter coli*

<400> 3

```

Met Lys Lys Ile Val Phe Leu Ile Leu Ser Phe Asn Val Leu Phe Ala
1                               5                               10                               15

Ala Leu Glu Asn Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser
                20                               25                               30

Ala Ala Thr Glu Ser Lys Trp Asn Val Ser Ile Arg Gln Leu Ile Thr
                35                               40                               45

Gly Ala Asn Pro Met Asp Val Leu Ala Val Gln Glu Ala Gly Val Leu
    50                               55                               60

Pro Ser Thr Ala Met Met Thr Pro Arg Gln Val Gln Pro Val Gly Val
65                               70                               75                               80

Gly Ile Pro Ile His Glu Tyr Ile Trp Asn Leu Gly Ser Val Ser Arg
                85                               90                               95

Pro Ser Ser Val Tyr Ile Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn
                100                               105                               110

Arg Val Asn Leu Ala Ile Val Ser Arg Val Gln Ala Asp Glu Val Phe
                115                               120                               125

Val Leu Pro Pro Pro Thr Val Ala Ser Arg Pro Ile Ile Gly Ile Arg
    130                               135                               140

Ile Gly Asn Asp Ala Phe Phe Asn Ile His Ala Leu Ala Ser Gly Gly
145                               150                               155                               160

Asn Asp Ala Gly Ala Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe Arg Asn
                165                               170                               175

Arg Pro Asp Ile Asn Trp Met Ile Leu Gly Asp Phe Asn Arg Glu Ser
                180                               185                               190

Gly Ala Leu Val Thr Leu Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Arg Thr Arg
    195                               200                               205

```

5

ES 2 456 710 T3

Val Val Val Pro Pro Ser Ser Thr Gln Thr Ser Gly Arg Thr Ile Asp
210 215 220
Tyr Ala Ile Thr Gly Asn Ser Asn Thr Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Pro
225 230 235 240
Pro Ile Val Ala Ile Leu Ala Leu Glu Gly Leu Arg Thr Phe Leu Ala
245 250 255
Ser Asp His Phe Pro Val Asn Phe Arg Arg Pro
260 265

<210> 4

<211> 190

<212> PRT

5 <213> *Campylobacter coli*

<400> 4

Met Lys Lys Phe Phe Ile Leu Phe Phe Ala Leu Leu Ser Phe Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Glu Pro Ser Leu Asp Glu Leu Ala Asp Phe Thr Pro Met Phe Ala
 20 25 30
 Ile Arg Ser Leu Glu Thr Gly Ile Ser Leu Ser Pro Phe Arg Lys Thr
 35 40 45
 Ser Lys Arg Leu Glu Asp Gln Asn Trp Phe Leu Lys Glu Ile Val Ala
 50 55 60
 Asn Asp Glu Leu Lys Ala Arg Asp Met His Ala Lys Asp Leu Pro Phe
 65 70 75 80
 Gly Tyr Val Gln Phe Ile Ser Pro Arg Gly Asp Asp Ile Cys Leu Ala
 85 90 95
 Val Leu Ser Glu Lys Ser Phe Gly Thr Lys Ser Cys Lys Gln Asp Leu
 100 105 110
 Gln Asp Gly Thr Met Gln Thr Ile Phe Ser Ile Ile Pro Met Thr Asn
 115 120 125
 Gly Ser Ile Gln Ile Arg Ser Leu Thr Asn Gly Gly Asn Gln Cys Met
 130 135 140
 Ser Thr Phe Pro Asp Ser Ser Ile Ala Ile Glu Asn Arg Phe Gly Leu
 145 150 155 160
 Gly Glu Cys Leu Leu Asp Arg Ser Ile Val Thr Val Leu Ser Lys Leu
 165 170 175
 Phe Phe Phe Ser Pro Ala Ile Ile Glu Ala Ser Ala Ile Tyr
 180 185 190

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> "n" = a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

5 <223> "n" = c o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12) .. (12)

10 <223> "n" = a, c o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18) .. (18)

15 <223> "n" = a, c, g o t

<400> 5

ggnaantgga tntggggnta

20

20 <210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (1) .. (1)

<223> "n" = a, g o t

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (4) .. (4)

<223> "n" = c o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (7)

5 <223> "n" = a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) .. (10)

10 <223> "n" = a, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) .. (13)

15 <223> "n" = a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (16) .. (16)

20 <223> "n" = a, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (19) .. (19)

25 <223> "n" = a, c, g o t

<400> 6

naantgnacn tancnaang g

21

30 <210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (6)
5 <223> "n" = c o t

<400> 7
gataangatc cttttaaact **20**

10 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (1) .. (1)
<223> "n" = a o t

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (2) .. (2)
<223> "n" = a o t

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (11) .. (11)
<223> "n" = a o t

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (16) .. (16)
<223> "n" = c o g

	<400> 8	
	nnccaaagcg nttttntatg g	21
	<210> 9	
5	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 9	
	acttgggaatt tgcaaggc	18
15	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (13) .. (13)	
	<223> "n" = a, c o t	
	<400> 10	
	tctaaaattt acnggaaaat g	21
30	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35		

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 11

5 **tactccgcct ttaccgca** **19**

<210> 12

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15 <400> 12

gagtataggt ttgttgtc **18**

<210> 13

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

25

<400> 13

tttaatgtat tatttgccgc **20**

<210> 14

30 <211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 14

tcattgccta tgcgtatg

18

5 <210> 15

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 15

cgcaagttgg aagactat

18

15

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 16

25

tttattatcg ccggagca

18

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

35 <400> 17

	attatatggt tatttttatc	20
	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 18	
	ccacagaaag caaatgga	18
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
20	<400> 19	
	agccactcca acaggacgcc	20
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
30	<400> 20	
	tgatgaatat gagtggaatt tagg	24
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN	

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

5

<400> 21

ttcaagaatg caagctgaa

19

<210> 22

<211> 16

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15

<400> 22

cagctgtaga tgcaca

16

<210> 23

20

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 23

tgatccttct actataacaa gt

22

30

<210> 24

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 24	
	gacaacaac ctatactc	18
	<210> 25	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 25	
	gcaagtttaa gatctcatat	20
	<210> 26	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 26	
	ccccttagat atcttaatga tac	23
25	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 27	
35	tgcaacaagg tggaacacc	19

	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 28	
	caaccaccca ccgatagtt	19
	<210> 29	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
20	<400> 29	
	agccactcca acaggacgcc	20
	<210> 30	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 30	
	ctgtatcaag acctagctct g	21
35	<210> 31	

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 31

catacgcata ggcaatga

18

10

<210> 32

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 32

20 **cgcaggagcc attgtcgctg ct**

22

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

30 <400> 33

tgacttaaga gcacgcactc g

21

<210> 34

<211> 19

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

5

<400> 34

ggattaagaa cctttttgg

19

<210> 35

10

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 35

aagaccttag gagcttaata tg

22

<210> 36

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 36

cgtagtgtgtt ccgccttctt

20

30

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 37

5 **gcgtcagagt aacgttttta aca** **23**

<210> 38

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15 <400> 38

ttatatttat agcaacttta ggc **23**

<210> 39

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

25 <400> 39
aaatttacct caaacggctc ttc **23**

<210> 40

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

	<400> 40		
	aagcataaat caaggcgacg atc		23
5	<210> 41		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 41		
	gtatatctag accgttccaa		20
15	<210> 42		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 42		
25	aatcatcat cttgccgcct		20
	<210> 43		
	<211> 22		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
35	<400> 43		

ggaactcttg gattagaaac tc

22

<210> 44

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10

<400> 44

gcgtcagagt aacgttttta aca

23

<210> 45

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 45

agccggcgat cttgtccgaa c

21

25 <210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 46

gcaaacctgc ggactcacct a

21

35

	<210> 47	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 47	
10	ccacagaaag caaatgga	18
	<210> 48	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
20	<400> 48	
	ctaatacgtgt aaatttagct atagtt	26
	<210> 49	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
30	<400> 49	
	tttttcaata tccatgcttt agc	23
	<210> 50	
35	<211> 23	

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 50

tg gat gat ag caggggattt taa

23

10 <210> 51

<211> 2180

<212> ADN

<213> *Campylobacter fetus*

15 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (702)

<223>

20 <220>

<221> CDS

<222> (778) .. (1629)

<223>

25 <220>

<221> CDS

<222> (1632) .. (2177)

<223>

30 <400> 51

ES 2 456 710 T3

atg act aaa att att ttc aag cat att aaa aat agt ctt att tta cta Met Thr Lys Ile Ile Phe Lys His Ile Lys Asn Ser Leu Ile Leu Leu 1 5 10 15	48
ttt tgt atc gct ctt ttt agt gct tgc tca tca aaa acg aca aat gta Phe Cys Ile Ala Leu Phe Ser Ala Cys Ser Ser Lys Thr Thr Asn Val 20 25 30	96
agc act caa aaa ata aat cca tta gga agc att ttt ggc aaa acg gat Ser Thr Gln Lys Ile Asn Pro Leu Gly Ser Ile Phe Gly Lys Thr Asp 35 40 45	144
gat cca gat cca cta aat tta ggc gat ttt cca act ctt cta aca tca Asp Pro Asp Pro Leu Asn Leu Gly Asp Phe Pro Thr Leu Leu Thr Ser 50 55 60	192
aat ttt aca aat cct atg ccg act aga acg cca tcg cca ctt aaa aaa Asn Phe Thr Asn Pro Met Pro Thr Arg Thr Pro Ser Pro Leu Lys Lys 65 70 75 80	240
gtg gat ttg cct gta atg aac tca tta aca cat ggt ccg atg ttt tca Val Asp Leu Pro Val Met Asn Ser Leu Thr His Gly Pro Met Phe Ser 85 90 95	288
agt gct ttt agt aaa ccg gac ttg aat ttc aaa caa cct act atc agt Ser Ala Phe Ser Lys Pro Asp Leu Asn Phe Lys Gln Pro Thr Ile Ser 100 105 110	336
cta caa ggt atc ccg cct gat cta ttt gat aga aca agc gat ttt atg Leu Gln Gly Ile Pro Pro Asp Leu Phe Asp Arg Thr Ser Asp Phe Met 115 120 125	384
gtg ata atg ggt gca aac ggc gtt gtg atc act att tgg tac aca tct Val Ile Met Gly Ala Asn Gly Val Val Ile Thr Ile Trp Tyr Thr Ser 130 135 140	432
cct gga aac tgg tta tgg ggc tac tgc ctc tat gaa agc ggc aat tta Pro Gly Asn Trp Leu Trp Gly Tyr Ser Leu Tyr Glu Ser Gly Asn Leu 145 150 155 160	480
gga gga tat cgt gtt tgg cgt cta att tta cta cca aat aat gaa gtc Gly Gly Tyr Arg Val Trp Arg Leu Ile Leu Leu Pro Asn Asn Glu Val 165 170 175	528
atg ata gta aat ttc aac act cgc acg act tgc ata aat act tat aaa Met Ile Val Asn Phe Asn Thr Arg Thr Thr Cys Ile Asn Thr Tyr Lys 180 185 190	576
aac gga gta att cac tca cct tgc aat aaa gat aat cct ttt cag aaa Asn Gly Val Ile His Ser Pro Cys Asn Lys Asp Asn Pro Phe Gln Lys 195 200 205	624
ttt acg ttt cgt cca atg aca aac gga gcc gta caa att tat aac aaa Phe Thr Phe Arg Pro Met Thr Asn Gly Ala Val Gln Ile Tyr Asn Lys 210 215 220	672
gct act aat tgc gtg ctt gca aac gcc tgt taataatcta ttcggttttg Ala Thr Asn Cys Val Leu Ala Asn Ala Cys 225 230	722
acgtttttgg ggcgataaat cttacgacaa aatgcactga tactatcgat caaca atg Met 235	780
gta ttt gct ccc gcc gcc gca agt tgg aag act att tta tta gga gta	828

ES 2 456 710 T3

Val	Phe	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Trp	Lys	Thr	Ile	Leu	Leu	Gly	Val		
				240					245					250			
aaa	atg	cga	aat	ggt	att	atg	att	ata	ttt	ata	gca	act	tta	ggc	ttt		876
Lys	Met	Arg	Asn	Val	Ile	Met	Ile	Ile	Phe	Ile	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe		
			255					260					265				
gca	aaa	cca	gaa	gat	tat	aaa	att	gct	act	tgg	aat	ttg	caa	ggc	agt		924
Ala	Lys	Pro	Glu	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ala	Thr	Trp	Asn	Leu	Gln	Gly	Ser		
		270					275					280					
tcg	gct	ata	acc	gaa	agc	aaa	tgg	aat	ata	agc	gta	cgt	caa	ata	att		972
Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Ser	Lys	Trp	Asn	Ile	Ser	Val	Arg	Gln	Ile	Ile		
	285					290				295							
agc	ggt	gaa	aat	cca	gca	gat	ata	tta	gcc	ggt	caa	gaa	gca	gga	aat		1020
Ser	Gly	Glu	Asn	Pro	Ala	Asp	Ile	Leu	Ala	Val	Gln	Glu	Ala	Gly	Asn		
300					305				310						315		
tta	cct	caa	acc	gct	ctt	cct	aca	ggt	aga	agc	ata	aat	caa	ggc	ggc		1068
Leu	Pro	Gln	Thr	Ala	Leu	Pro	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Asn	Gln	Gly	Gly		
				320					325					330			
acg	atc	gta	act	gag	cat	tta	tgg	cag	cta	ggc	agt	ata	tct	aga	ccg		1116
Thr	Ile	Val	Thr	Glu	His	Leu	Trp	Gln	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro		
			335					340					345				
ttc	caa	gtc	tat	ata	tat	tat	gct	caa	atc	gac	aca	ggg	gca	aat	aga		1164
Phe	Gln	Val	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Ile	Asp	Thr	Gly	Ala	Asn	Arg		
		350					355					360					
gta	aat	tta	gca	atc	ggt	tca	cgc	ata	aaa	gct	gat	gaa	atc	atc	atc		1212
Val	Asn	Leu	Ala	Ile	Val	Ser	Arg	Ile	Lys	Ala	Asp	Glu	Ile	Ile	Ile		
	365					370					375						
ttg	ccg	cct	cct	acg	gta	gct	tct	cgt	ccg	ctc	ata	ggt	ata	aga	ata		1260
Leu	Pro	Pro	Pro	Thr	Val	Ala	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Arg	Ile		
380					385				390						395		
gga	aac	gac	gta	ttt	ttc	aac	ata	cac	gct	cta	gca	aat	ggc	gga	gtc		1308
Gly	Asn	Asp	Val	Phe	Phe	Asn	Ile	His	Ala	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Val		
				400				405					410				
gat	gct	ccg	gcg	ata	ata	aat	tca	ata	ttt	gac	aga	ttt	aga	aat	atg		1356
Asp	Ala	Pro	Ala	Ile	Ile	Asn	Ser	Ile	Phe	Asp	Arg	Phe	Arg	Asn	Met		
			415					420					425				
cca	aat	atc	act	tgg	atg	att	tta	ggc	gat	ttt	aac	cgc	tca	cct	gag		1404
Pro	Asn	Ile	Thr	Trp	Met	Ile	Leu	Gly	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Pro	Glu		
		430					435					440					
agt	tta	aga	gga	act	ctt	gga	tta	gaa	act	cgc	gtc	aga	gta	acg	ttt		1452
Ser	Leu	Arg	Gly	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Phe		
	445					450					455						
tta	aca	cct	ccg	gcg	cct	act	caa	aga	agc	ggc	gga	acg	ctt	gac	tgg		1500
Leu	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Thr	Gln	Arg	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Asp	Trp		
460						465				470					475		
gct	ata	ggt	gga	aac	tca	gcc	ggc	gat	ctt	gtc	cga	act	acg	ctt	gta		1548
Ala	Ile	Val	Gly	Asn	Ser	Ala	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Thr	Thr	Leu	Val		
				480				485						490			
gca	gta	ttg	atg	cta	gca	aac	ctg	cgg	act	cac	cta	ggt	tcg	gac	cat		1596
Ala	Val	Leu	Met	Leu	Ala	Asn	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Val	Ser	Asp	His		

ES 2 456 710 T3

495					500					505						
ttt	ccg	gta	aat	ttt	aga	aaa	ttt	gga	gat	aac	ta	atg	aaa	gct	tta	1643
Phe	Pro	Val	Asn	Phe	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp	Asn		Met	Lys	Ala	Leu	
		510					515						520			
gca	ata	ata	ttt	tta	ttt	gta	agc	ata	agt	ttt	gca	aac	gaa	aac	ata	1691
Ala	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Val	Ser	Ile	Ser	Phe	Ala	Asn	Glu	Asn	Ile	
		525					530					535				
acc	gac	gct	ttt	caa	ata	cgc	aat	gca	aac	acc	gga	att	cct	ata	aat	1739
Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Ile	Arg	Asn	Ala	Asn	Thr	Gly	Ile	Pro	Ile	Asn	
	540					545					550					
ata	aag	cga	ttt	tca	ggg	cag	ttt	aat	tac	caa	aac	tgg	ttt	tta	aat	1787
Ile	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Gln	Phe	Asn	Tyr	Gln	Asn	Trp	Phe	Leu	Asn	
555					560					565					570	
gat	tta	gga	gta	gat	cct	aag	ata	aaa	aaa	gta	gat	aaa	ttt	tca	aat	1835
Asp	Leu	Gly	Val	Asp	Pro	Lys	Ile	Lys	Lys	Val	Asp	Lys	Phe	Ser	Asn	
				575						580					585	
tct	ttt	cct	ttt	gga	tac	gtg	caa	ttt	caa	gta	gca	gcc	gac	gta	aaa	1883
Ser	Phe	Pro	Phe	Gly	Tyr	Val	Gln	Phe	Gln	Val	Ala	Ala	Asp	Val	Lys	
			590							595			600			
atg	tgc	ctt	cag	atc	gct	cct	agc	gga	ttt	tta	gca	cta	aaa	aac	tgc	1931
Met	Cys	Leu	Gln	Ile	Ala	Pro	Ser	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Lys	Asn	Cys	
		605					610						615			
aag	caa	gac	tac	gat	agc	gga	gag	ttt	gag	act	att	ttt	cag	atc	atc	1979
Lys	Gln	Asp	Tyr	Asp	Ser	Gly	Glu	Phe	Glu	Thr	Ile	Phe	Gln	Ile	Ile	
	620					625					630					
cct	aca	agt	agt	gga	gct	atg	cag	cta	cga	tca	cta	gtt	cta	aaa	aca	2027
Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Ala	Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Thr	
635					640					645					650	
aac	gag	tgc	tta	gga	aca	ttt	gaa	aat	cca	aac	gtg	ccg	atc	gaa	gat	2075
Asn	Glu	Cys	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asn	Pro	Asn	Val	Pro	Ile	Glu	Asp	
				655					660					665		
aga	gta	gga	cta	gta	cgc	tgc	gtt	tta	gaa	ttt	ttt	gtc	gac	ata	gag	2123
Arg	Val	Gly	Leu	Val	Arg	Cys	Val	Leu	Glu	Phe	Phe	Val	Asp	Ile	Glu	
			670					675					680			
cct	aaa	caa	ctt	ttt	gta	ttt	tca	ccg	ccg	ctt	agt	gaa	gct	aag	gta	2171
Pro	Lys	Gln	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	Pro	Pro	Leu	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	
		685					690					695				
att	aga	taa														2180
Ile	Arg															
	700															

<210> 52

<211> 234

<212> PRT

<213> *Campylobacter fetus*

<400> 52

Met Thr Lys Ile Ile Phe Lys His Ile Lys Asn Ser Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 456 710 T3

Phe Cys Ile Ala Leu Phe Ser Ala Cys Ser Ser Lys Thr Thr Asn Val
 20 25 30
 Ser Thr Gln Lys Ile Asn Pro Leu Gly Ser Ile Phe Gly Lys Thr Asp
 35 40 45
 Asp Pro Asp Pro Leu Asn Leu Gly Asp Phe Pro Thr Leu Leu Thr Ser
 50 55 60
 Asn Phe Thr Asn Pro Met Pro Thr Arg Thr Pro Ser Pro Leu Lys Lys
 65 70 75 80
 Val Asp Leu Pro Val Met Asn Ser Leu Thr His Gly Pro Met Phe Ser
 85 90 95
 Ser Ala Phe Ser Lys Pro Asp Leu Asn Phe Lys Gln Pro Thr Ile Ser
 100 105 110
 Leu Gln Gly Ile Pro Pro Asp Leu Phe Asp Arg Thr Ser Asp Phe Met
 115 120 125
 Val Ile Met Gly Ala Asn Gly Val Val Ile Thr Ile Trp Tyr Thr Ser
 130 135 140
 Pro Gly Asn Trp Leu Trp Gly Tyr Ser Leu Tyr Glu Ser Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Tyr Arg Val Trp Arg Leu Ile Leu Leu Pro Asn Asn Glu Val
 165 170 175
 Met Ile Val Asn Phe Asn Thr Arg Thr Thr Cys Ile Asn Thr Tyr Lys
 180 185 190
 Asn Gly Val Ile His Ser Pro Cys Asn Lys Asp Asn Pro Phe Gln Lys
 195 200 205
 Phe Thr Phe Arg Pro Met Thr Asn Gly Ala Val Gln Ile Tyr Asn Lys
 210 215 220
 Ala Thr Asn Cys Val Leu Ala Asn Ala Cys
 225 230

ES 2 456 710 T3

<211> 284

<212> PRT

<213> *Campylobacter fetus*

5 <400> 53

Met Val Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ser Trp Lys Thr Ile Leu Leu Gly

His Phe Pro Val Asn Phe Arg Lys Phe Gly Asp Asn
275 280

<210> 54

<211> 182

<212> PRT

5 <213> *Campylobacter fetus*

<400> 54

ES 2 456 710 T3

Met Lys Ala Leu Ala Ile Ile Phe Leu Phe Val Ser Ile Ser Phe Ala
 1 5 10 15

Asn Glu Asn Ile Thr Asp Ala Phe Gln Ile Arg Asn Ala Asn Thr Gly
 20 25 30

Ile Pro Ile Asn Ile Lys Arg Phe Ser Gly Gln Phe Asn Tyr Gln Asn
 35 40 45

Trp Phe Leu Asn Asp Leu Gly Val Asp Pro Lys Ile Lys Lys Val Asp
 50 55 60

Lys Phe Ser Asn Ser Phe Pro Phe Gly Tyr Val Gln Phe Gln Val Ala
 65 70 75 80

Ala Asp Val Lys Met Cys Leu Gln Ile Ala Pro Ser Gly Phe Leu Ala
 85 90 95

Leu Lys Asn Cys Lys Gln Asp Tyr Asp Ser Gly Glu Phe Glu Thr Ile
 100 105 110

Phe Gln Ile Ile Pro Thr Ser Ser Gly Ala Met Gln Leu Arg Ser Leu
 115 120 125

Val Leu Lys Thr Asn Glu Cys Leu Gly Thr Phe Glu Asn Pro Asn Val
 130 135 140

Pro Ile Glu Asp Arg Val Gly Leu Val Arg Cys Val Leu Glu Phe Phe
 145 150 155 160

Val Asp Ile Glu Pro Lys Gln Leu Phe Val Phe Ser Pro Pro Leu Ser
 165 170 175

Glu Ala Lys Val Ile Arg
 180

<210> 55

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (21) .. (29)

<223> "n" indica a, t, g o ,c

10 <400> 55

gctttagca gtattgatgc nnnnnnnn

29

<210> 56

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

20

<400> 56

gctttagca gtattgatgc

20

<210> 57

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 57

ctagtttcgg accattttcc

20

35 <210> 58

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (21) .. (29)

<223> "n" indica a, t, g o ,c

<400> 58

atacgcaatg caaacaccgg nnnnnnnn

29

15

<210> 59

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 59

25

atacgcaatg aaacaccgg

19

<210> 60

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

35 <400> 60

taaaagcgat tttcagggca g

21

<210> 61

<211> 29

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (21) .. (29)

<223> "n" indica a, t, g o ,c

15

<400> 61

tgtcgacata gagcctaac nnnnnnnn

29

<210> 62

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 62

tgtcgacata gagcctaac

20

30 <210> 63

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 63

attttcaccg cogottagtg

20

5

<210> 64

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (1) .. (24)

<223> "r" = a o g, "h" = a o c o t, "m" = a o c, "d" = a o g o t, "w" = a o t, e "y" = c o t

<400> 64

rahgatmmdg atmgatccwy caaa

24

20

<210> 65

<211> 20

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> "r" = a o g, "w" = a o t, e "y" = c o t

35

<400> 65

rwaayaggyg yttgyawrca

20

<210> 66

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (21)

<223> "v" = a o c o g, "k" = g o t, "y" = c o t, "w" = a o t, y "r" = a o g

15 <400> 66

vakyywrwwk aycaaaaytg g

21

<210> 67

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> "v" = a o c o g, "d" = a o g o t, "w" = a o t, "m" = a o c, "k" = g o t, "y" = c o t, y "s" = g o c

30

<400> 67

vctadwccwa mkckwtytts

20

<210> 68

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 68

aggacttgaa cctacttttc

20

10 <210> 69

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 69

aggtggagta gttaaaaacc

20

20

<210> 70

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 70

30 **attgccaagg ctaaaatctc**

20

<210> 71

<211> 18

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

5 <400> 71

gataaagtct aaaactgc

18

<210> 72

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

15

<400> 72

aacgacaaat gtaagcactc

20

<210> 73

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 73

tatttatgca agtcgtgcga

20

30 <210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 74

tttagccttt gcaactccta

20

5

<210> 75

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 75

aaggggtagc agctgtaa

19

15

<210> 76

<211> 21

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

25

<400> 76

taggggatat gcacgcaaaa g

21

<210> 77

<211> 20

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

35

<400> 77

gcttaataca gttacgatag

20

<210> 78

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 78

aagcataagt tttgcaaacg

20

15 <210> 79

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 79

gtttggattt tcaaagtgc c

21

25

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y/o *Campylobacter jejuni* en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citotetales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni*; y
 - 10 (b) determinar la presencia de una *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y/o *Campylobacter jejuni* basándose en la presencia o el peso molecular de un fragmento amplificado a partir del ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citotetales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y/o *Campylobacter jejuni*,
 en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citotetales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51, y la figura 17, respectivamente, y en el que el par de cebadores comunes es uno cualquiera de un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 64 y 65, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 9 y 10, y un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 66 y 67.
2. Método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, y/o *Campylobacter fetus* en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:
 - 20 (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra de prueba usando una mezcla de pares de cebadores específicos para cada uno de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citotetales de estas bacterias; y
 - 25 (b) determinar la presencia de las bacterias basándose en la presencia o el peso molecular de fragmentos amplificados a partir de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citotetales de las bacterias,
 en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citotetales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, respectivamente, y en el que la mezcla de pares de cebadores específicos es la siguiente:
 - 30 (i) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 70 y 71 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter coli*;
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 68 y 69 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter jejuni*; y
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 72 y 73 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter fetus*;
 - 35 (ii) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 13 y 14 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter coli*;
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 11 y 12 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter jejuni*; y
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 15 y 16 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter fetus*; o
 - 40 (iii) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 76 y 77 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter coli*;
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 74 y 75 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter jejuni*; y
 un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 78 y 79 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citotetal de *Campylobacter fetus*.
3. Método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, y/o *Campylobacter fetus* en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:
 - 45 (a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión

citoletales de estas bacterias;

(b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra de prueba o con el ADN genómico amplificado en la etapa (a) como molde usando una mezcla de pares de cebadores específicos para cada uno de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias; y

(c) determinar la presencia de las bacterias basándose en la presencia o el peso molecular de fragmentos amplificados a partir de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de las bacterias, en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, respectivamente, y en el que el par de cebadores comunes es uno cualquiera de un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 64 y 65, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 9 y 10, y un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 66 y 67, y en el que la mezcla de pares de cebadores específicos es la siguiente:

(i) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 70 y 71 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli*;

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 68 y 69 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*; y

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 72 y 73 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*;

(ii) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 13 y 14 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli*;

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 11 y 12 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*; y

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 15 y 16 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*; o

(iii) un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 76 y 77 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter coli*;

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 74 y 75 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*; y

un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 78 y 79 para amplificar un ADN genómico que codifica para la toxina de distensión citoletal de *Campylobacter fetus*.

4. Método para detectar la presencia de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter fetus* en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:

(a) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra de prueba usando un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómicos que codifican para subunidades cdtB de las toxinas de distensión citoletales de estas bacterias;

(b) digerir el ADN genómico amplificado en la etapa (a) con una enzima de restricción; y

(c) determinar la presencia de las bacterias basándose en el peso molecular de un fragmento de ADN resultante de la digestión, en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, respectivamente, y en el que el par de cebadores comunes es un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, o un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 9 y 10.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la enzima de restricción se selecciona del grupo que consiste en: *Sau3AI*, *Dsal*, *Mbol*, *RsaI*, *EcoRI*, *HinfI*, *NdeI*, *PstI*, *XbaI* y *XhoI*.

6. Kit, que comprende un manual de instrucciones y un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de bacterias *Campylobacter*, en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de bacterias *Campylobacter* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, y en el que el par de cebadores comunes se selecciona del grupo que consiste en: un par de cebadores que comprende las secuencias de

SEQ ID NO: 64 y 65, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 9 y 10 y un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 66 y 67.

- 5 7. Kit, que comprende un manual de instrucciones y una mezcla de pares de cebadores específicos para cada uno de los ADN genómicos que codifican para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*, en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, respectivamente, y en el que la mezcla de pares de cebadores específicos es tal como se definió en la reivindicación 2.
- 10 8. Kit según la reivindicación 7, que comprende además un par de cebadores comunes que puede amplificar ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*, en el que el ADN genómico que codifica para las toxinas de distensión citoletales de *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni* es un ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 51 y la figura 17, respectivamente, en el que el par de cebadores comunes se selecciona de un par de cebadores de las secuencias de SEQ ID NO: 65 y 64, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 7 y 8, un par de cebadores que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 9 y 10 y un par de cebadores de las secuencias de SEQ ID NO: 66 y 67.
- 15

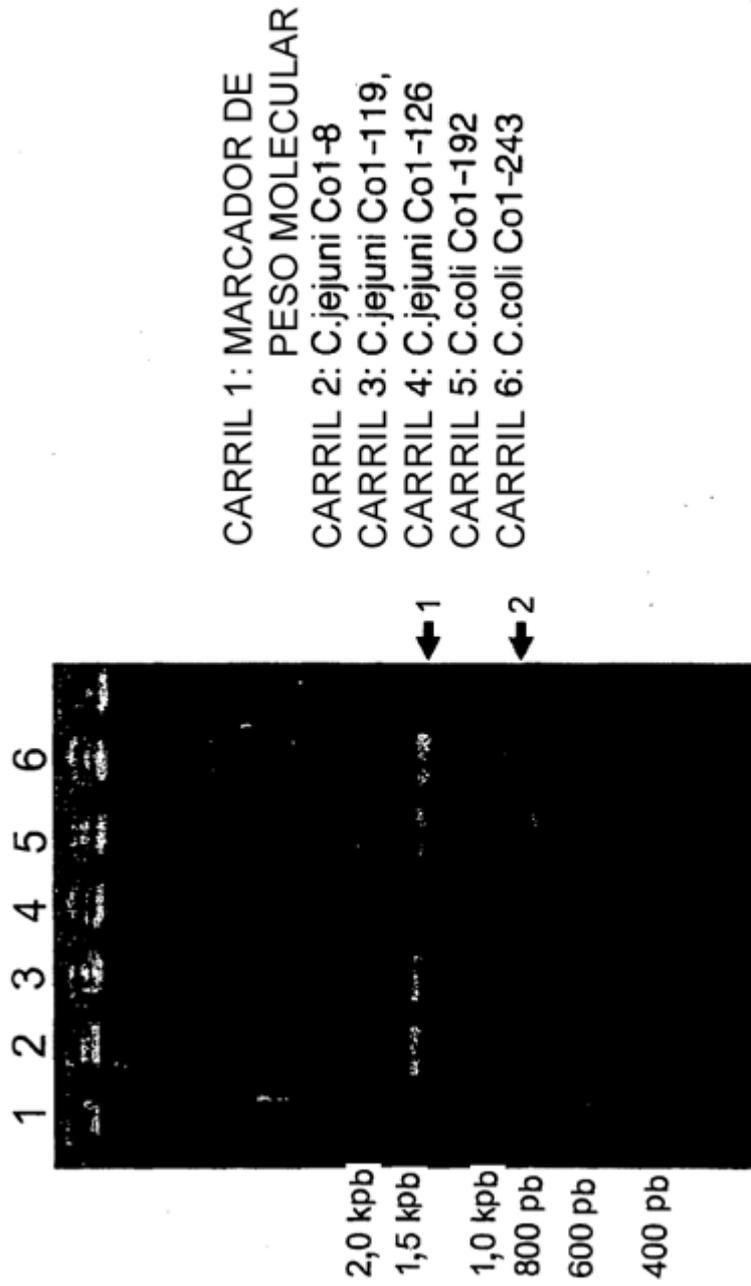


FIG. 1

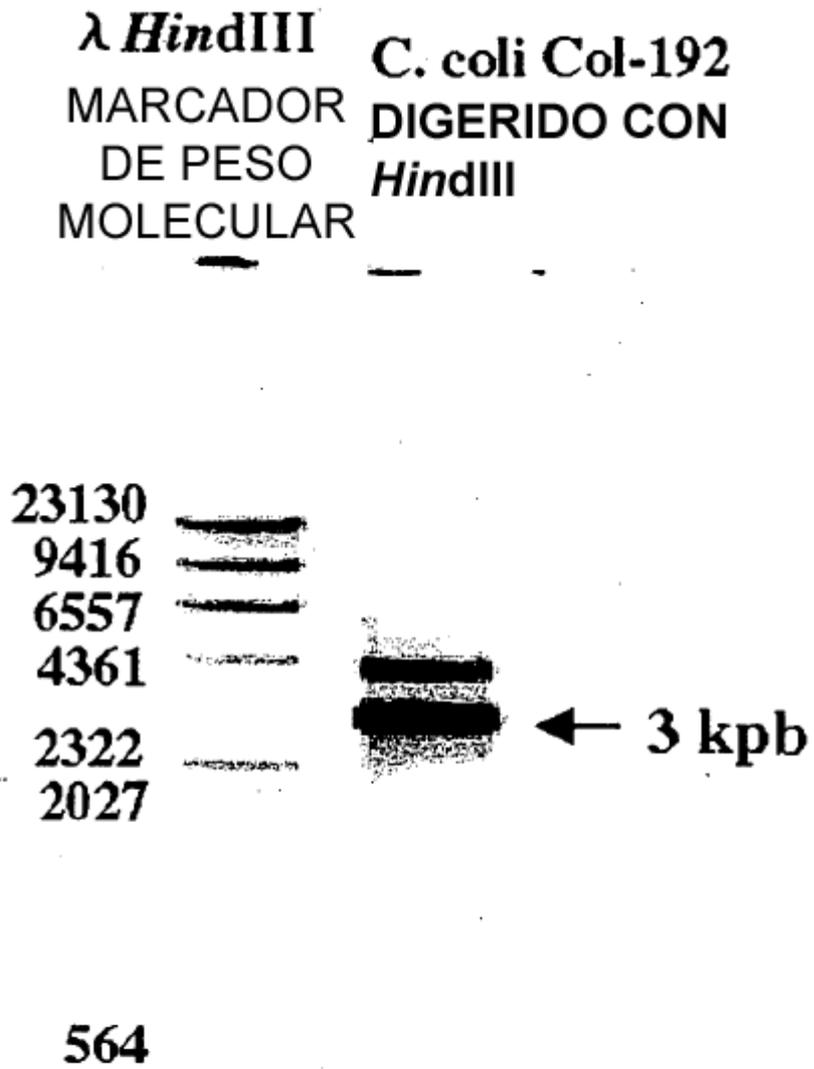
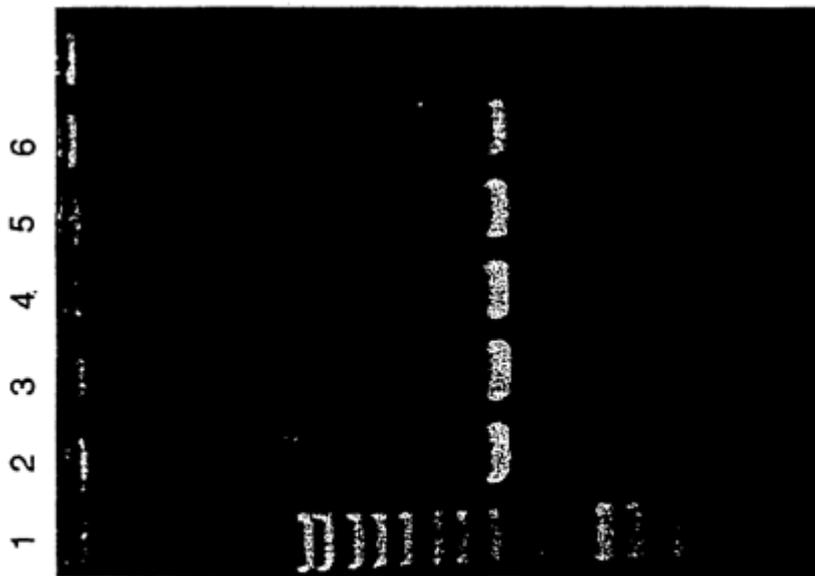


FIG. 2



CARRIL 1: MARCADOR DE
PESO MOLECULAR
CARRIL 2: *C.jejuni* Co1-8
CARRIL 3: *C.jejuni* Co1-119
CARRIL 4: *C.jejuni* Co1-126
CARRIL 5: *C.colli* Co1-192
CARRIL 6: *C.colli* Co1-243

FIG. 3

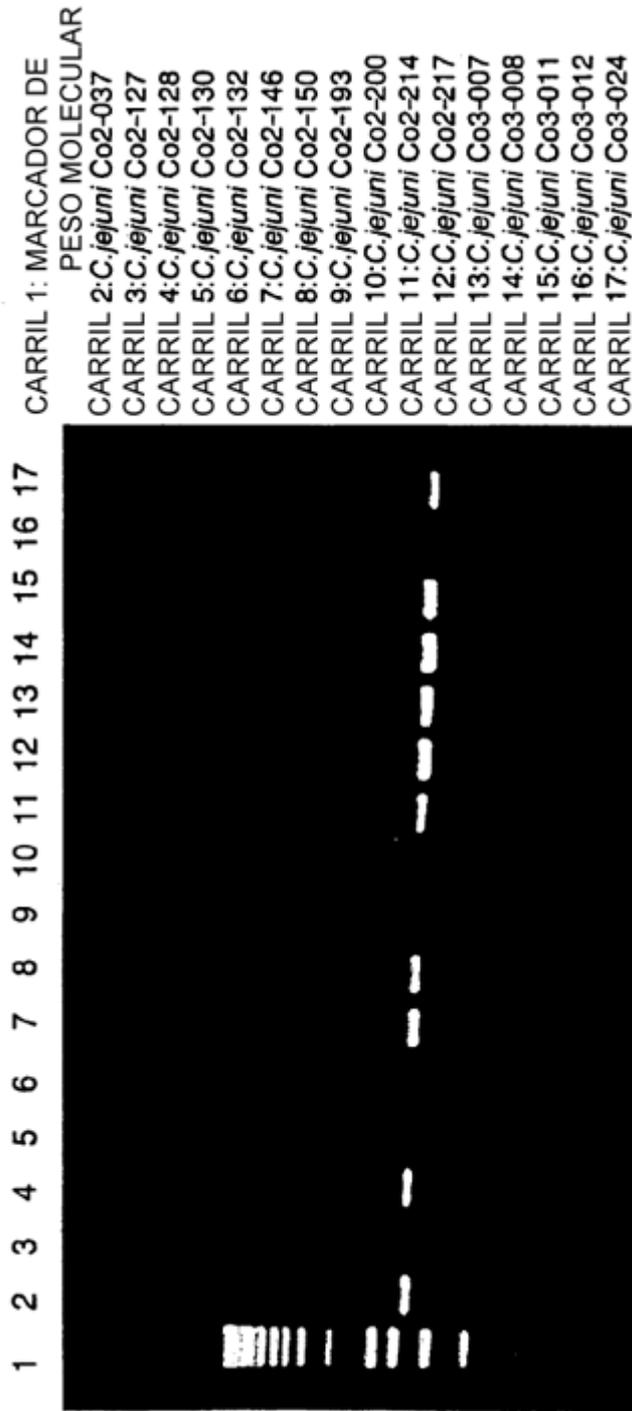


FIG. 4

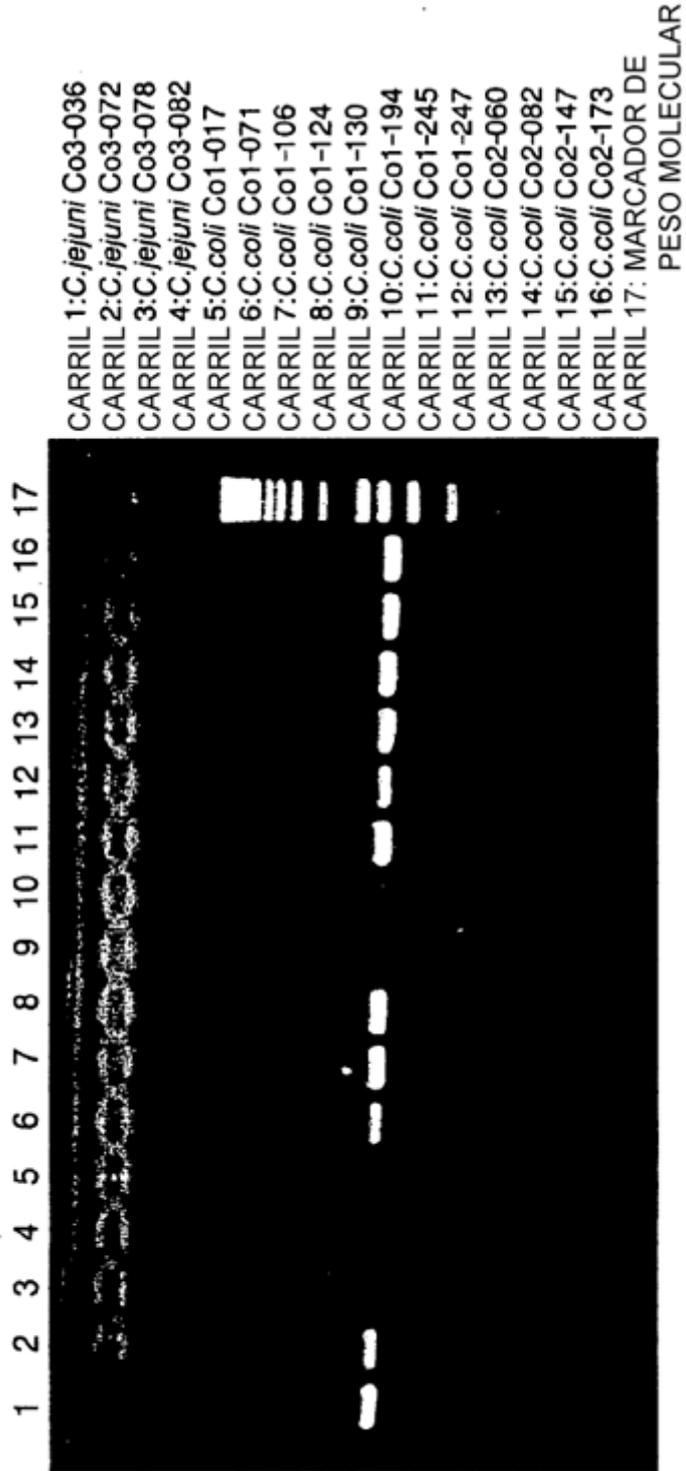


FIG. 5

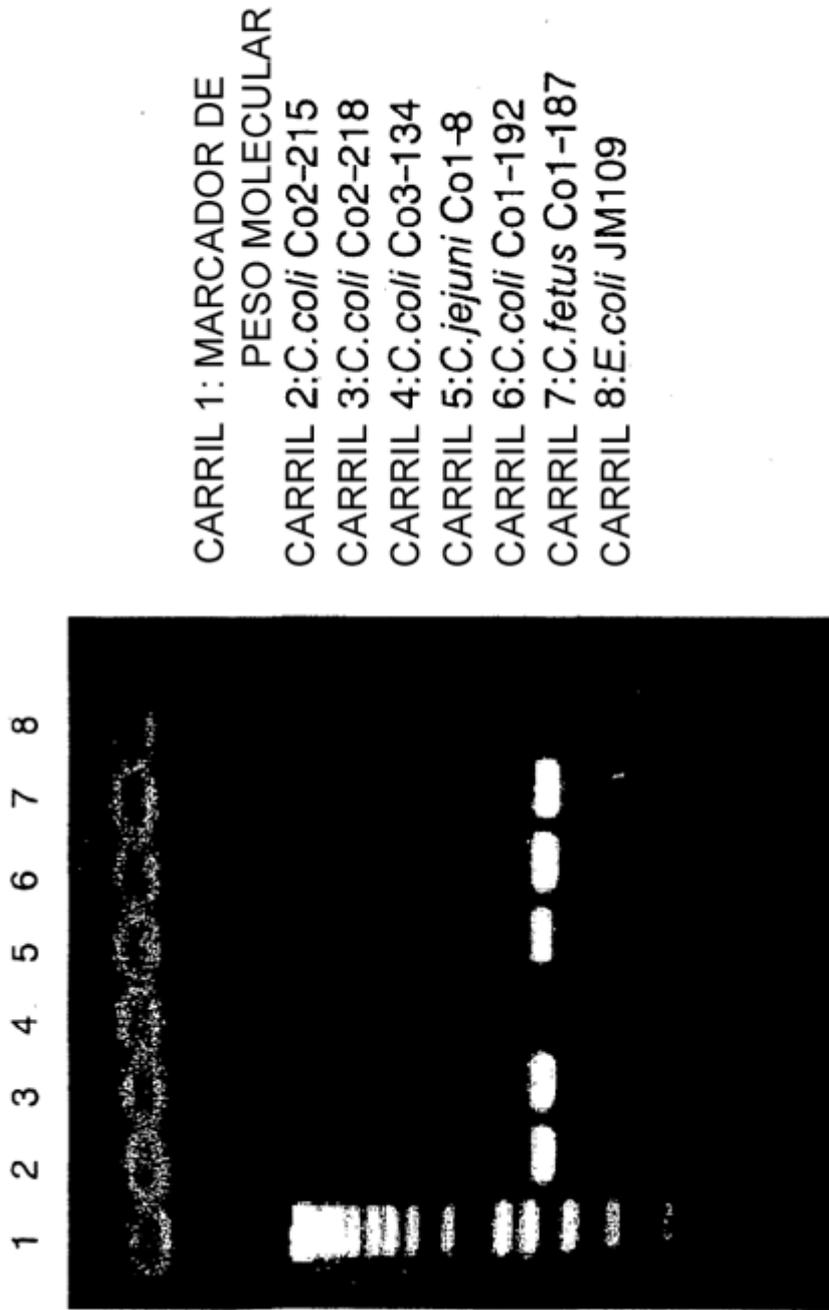


FIG. 6

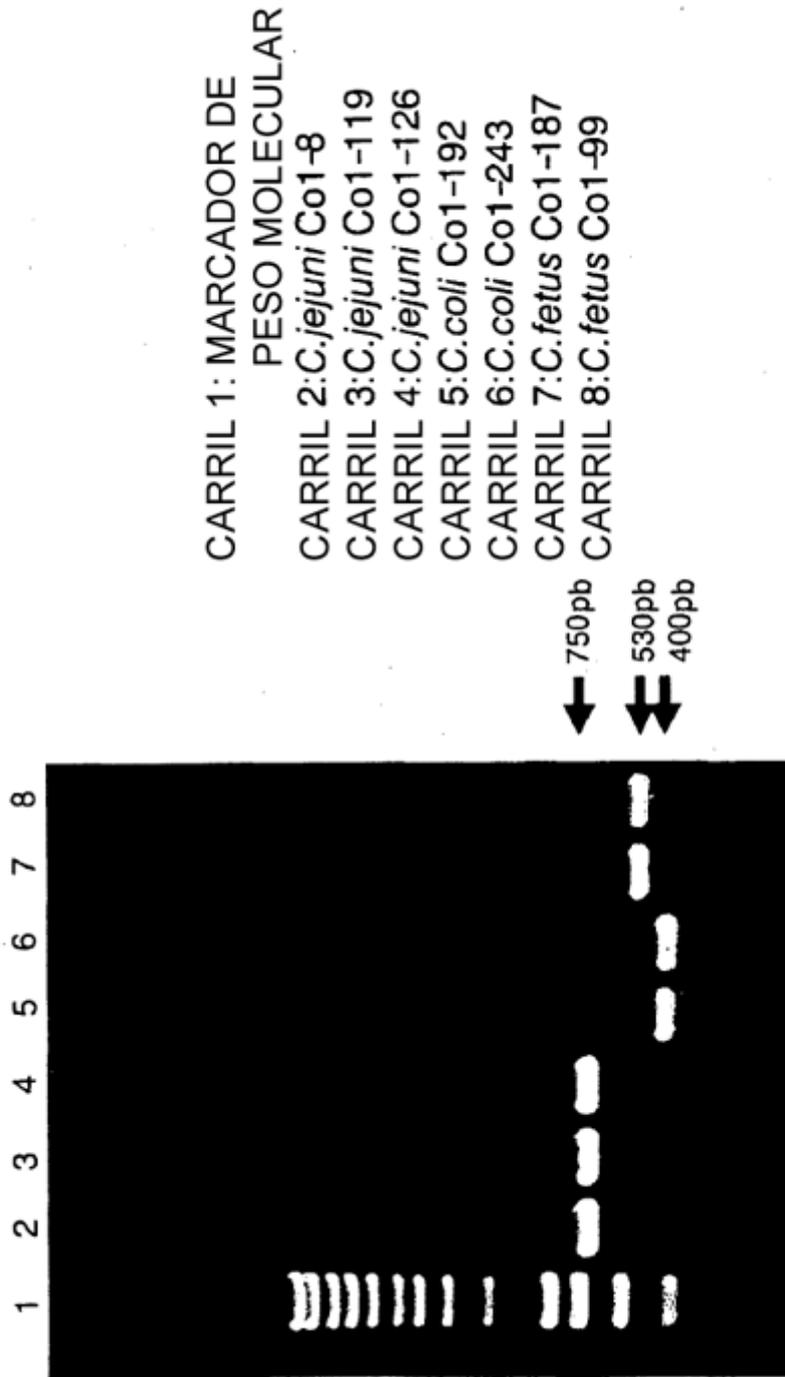
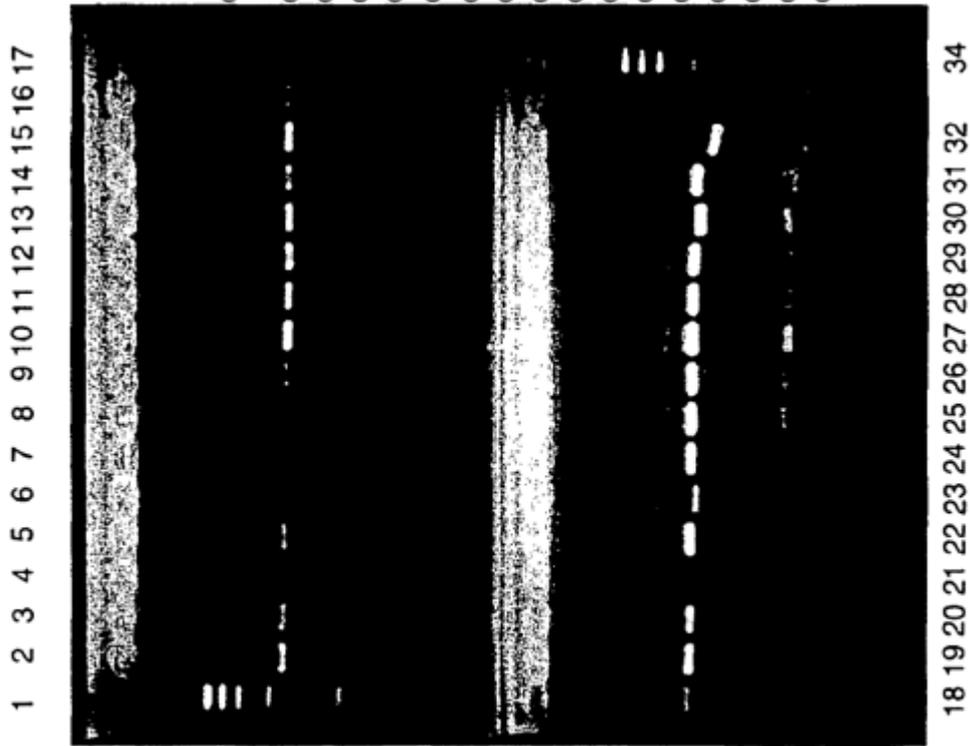


FIG. 7



CARRIL 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR
 CARRIL 2: *C. jejuni* Co2-037
 CARRIL 3: *C. jejuni* Co2-128
 CARRIL 4: *C. jejuni* Co2-132
 CARRIL 5: *C. jejuni* Co2-146
 CARRIL 6: *C. jejuni* Co2-150
 CARRIL 7: *C. jejuni* Co2-193
 CARRIL 8: *C. jejuni* Co2-200
 CARRIL 9: *C. jejuni* Co2-214
 CARRIL 10: *C. jejuni* Co2-217
 CARRIL 11: *C. jejuni* Co3-007
 CARRIL 12: *C. jejuni* Co3-008
 CARRIL 13: *C. jejuni* Co3-011
 CARRIL 14: *C. jejuni* Co3-024
 CARRIL 15: *C. jejuni* Co3-036
 CARRIL 16: *C. jejuni* Co3-072
 CARRIL 17: *C. jejuni* Co3-078
 CARRIL 18: *C. coli* Co1-071
 CARRIL 19: *C. coli* Co1-106
 CARRIL 20: *C. coli* Co1-124
 CARRIL 21: *C. coli* Co1-194
 CARRIL 22: *C. coli* Co1-245
 CARRIL 23: *C. coli* Co1-247
 CARRIL 24: *C. coli* Co2-060
 CARRIL 25: *C. coli* Co2-082
 CARRIL 26: *C. coli* Co2-147
 CARRIL 27: *C. coli* Co2-173
 CARRIL 28: *C. coli* Co2-215
 CARRIL 29: *C. coli* Co2-218
 CARRIL 30: *C. jejuni* Col-8
 CARRIL 31: *C. coli* Col-192
 CARRIL 32: *C. fetus* Col-187
 CARRIL 34: MARCADOR DE PESO MOLECULAR

FIG. 8

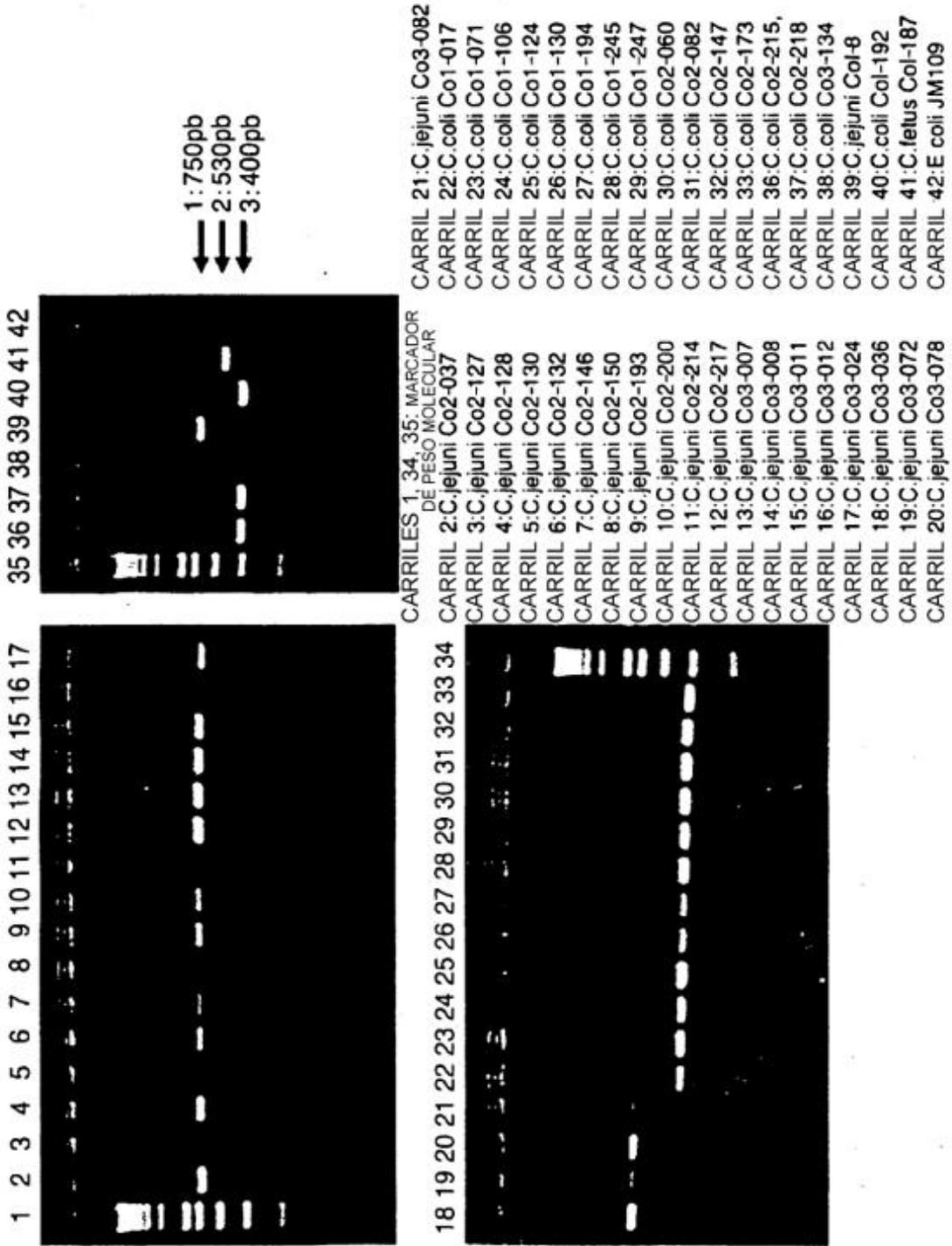


FIG. 9

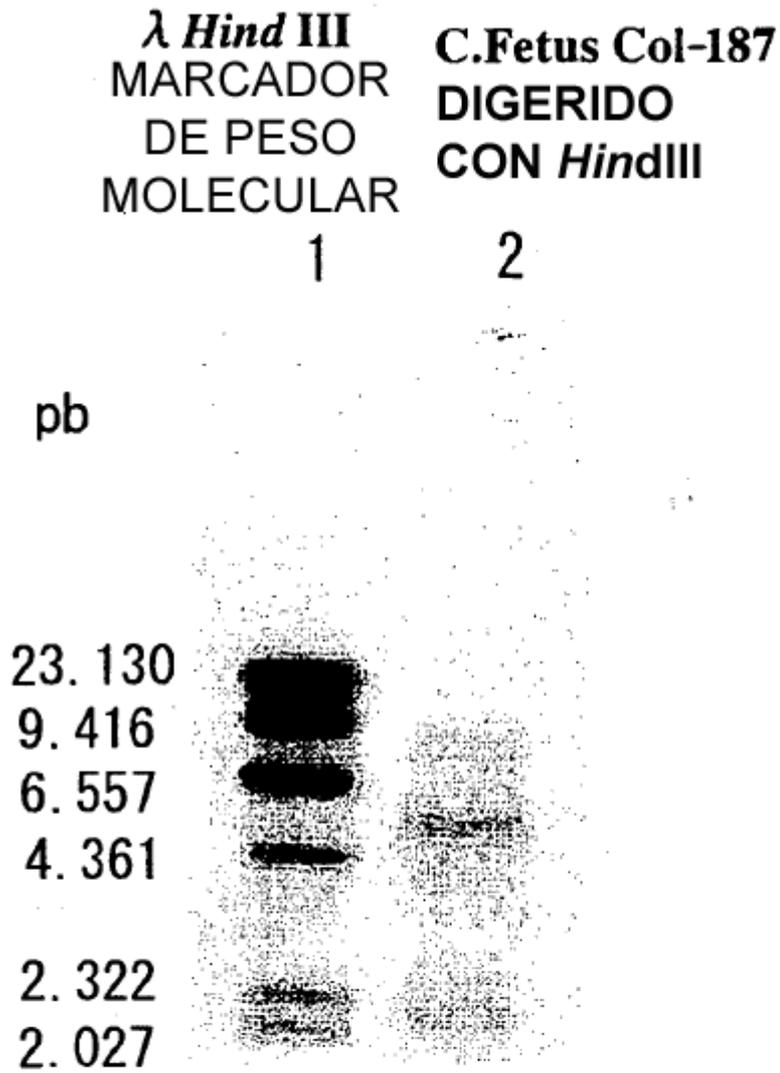


FIG. 10

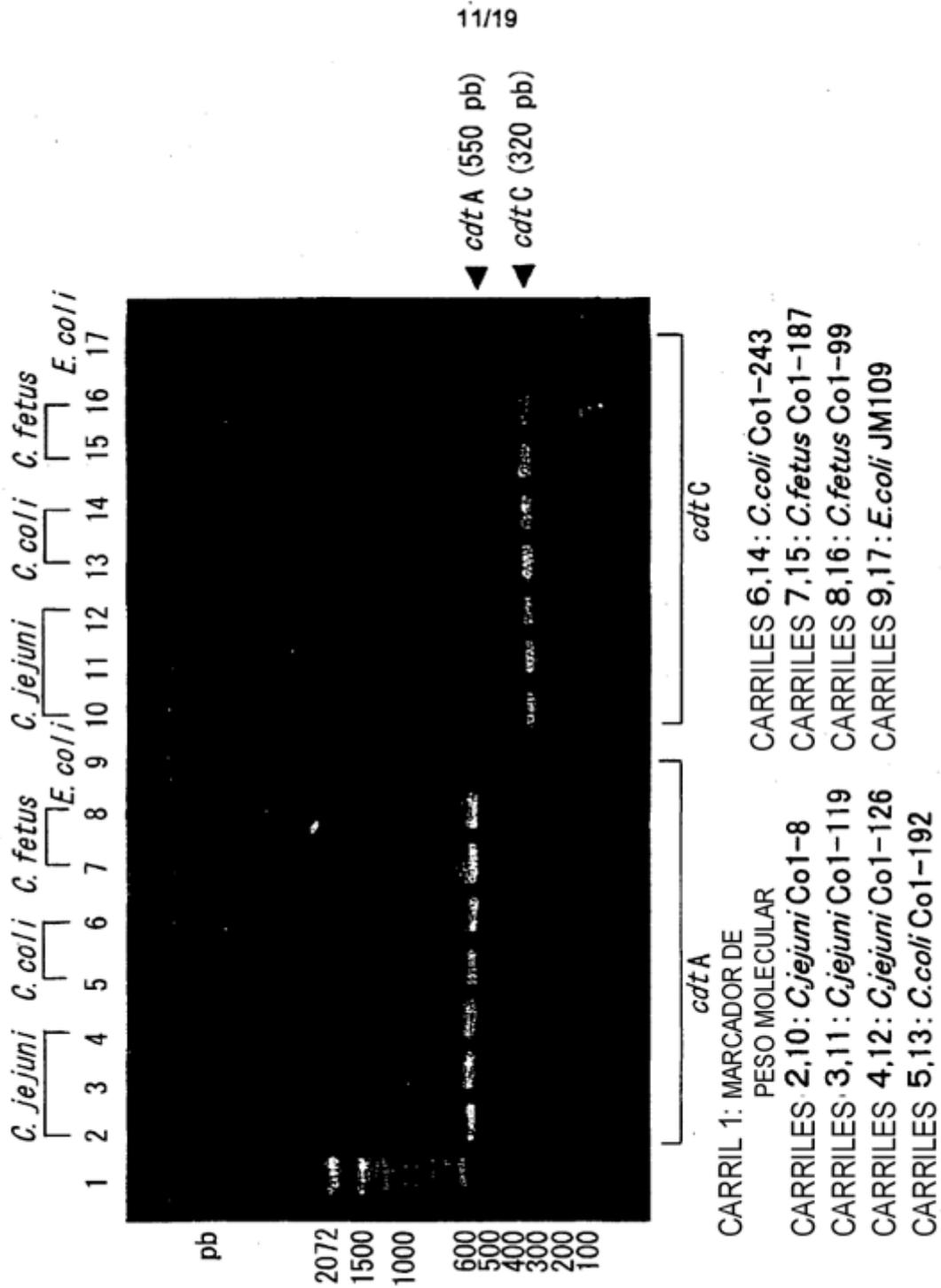
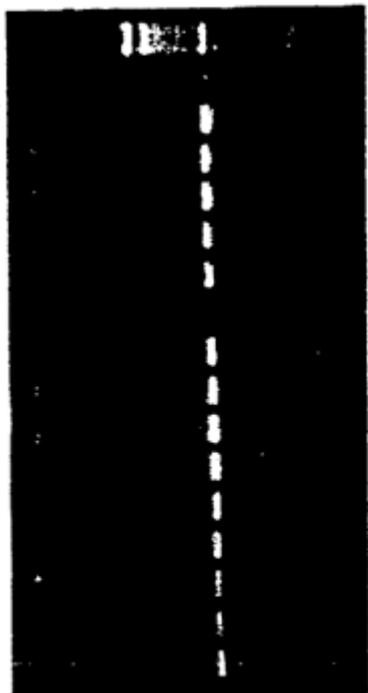
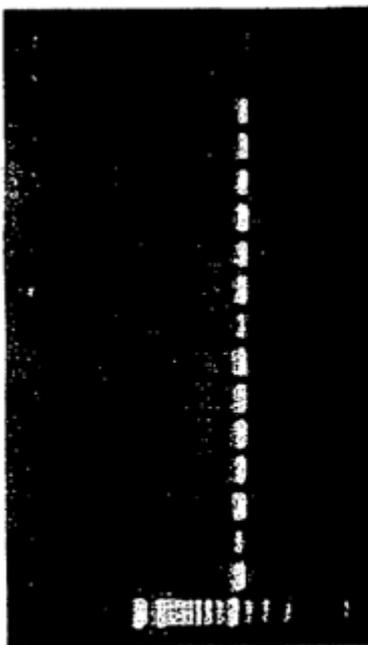


FIG. 11

1819 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



CARRILES 1, 34, 35: MARCADOR DE PESO MOLECULAR

- CARRIL 21: *C.jejuni* Co3-082
- CARRIL 22: *C.coli* Co1-017
- CARRIL 23: *C.coli* Co1-071
- CARRIL 24: *C.coli* Co1-106
- CARRIL 25: *C.coli* Co1-124
- CARRIL 26: *C.coli* Co1-130
- CARRIL 27: *C.coli* Co1-194
- CARRIL 28: *C.coli* Co1-245
- CARRIL 29: *C.coli* Co1-247
- CARRIL 30: *C.coli* Co2-060
- CARRIL 31: *C.coli* Co2-082
- CARRIL 32: *C.coli* Co2-147
- CARRIL 33: *C.coli* Co2-173
- CARRIL 36: *C.coli* Co2-215
- CARRIL 37: *C.coli* Co2-218
- CARRIL 38: *C.coli* Co3-134
- CARRIL 39: *C.jejuni* Col-8
- CARRIL 40: *C.coli* Col-192
- CARRIL 41: *C.fetus* Col-187
- CARRIL 42: *E.coli* JM109

35 36 37 38 39 40 41 42

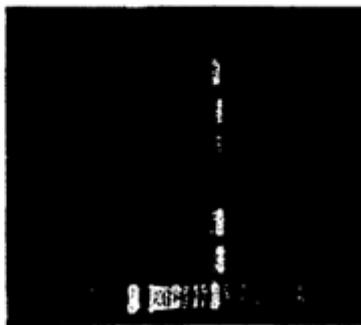


FIG. 12

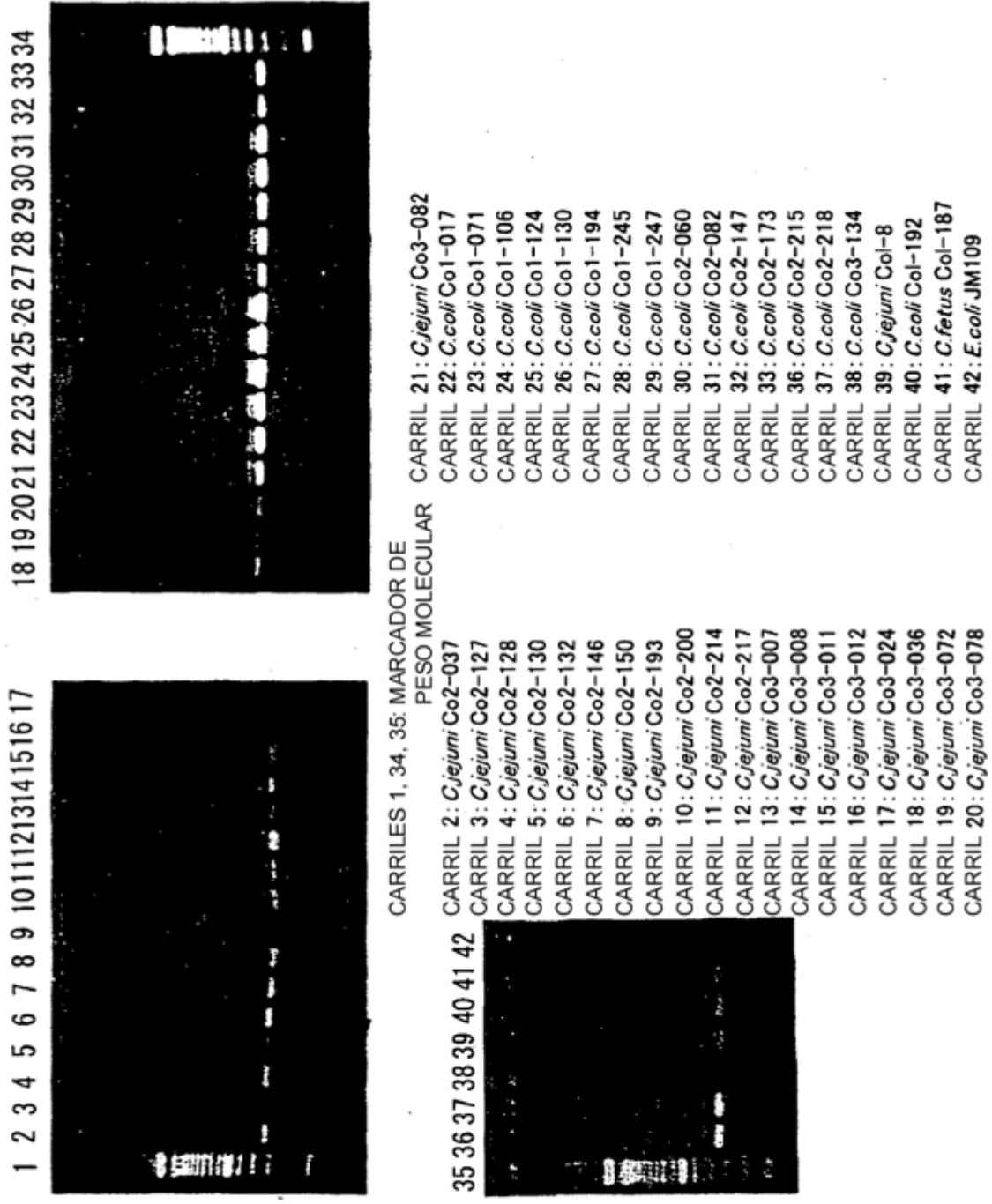


FIG. 13

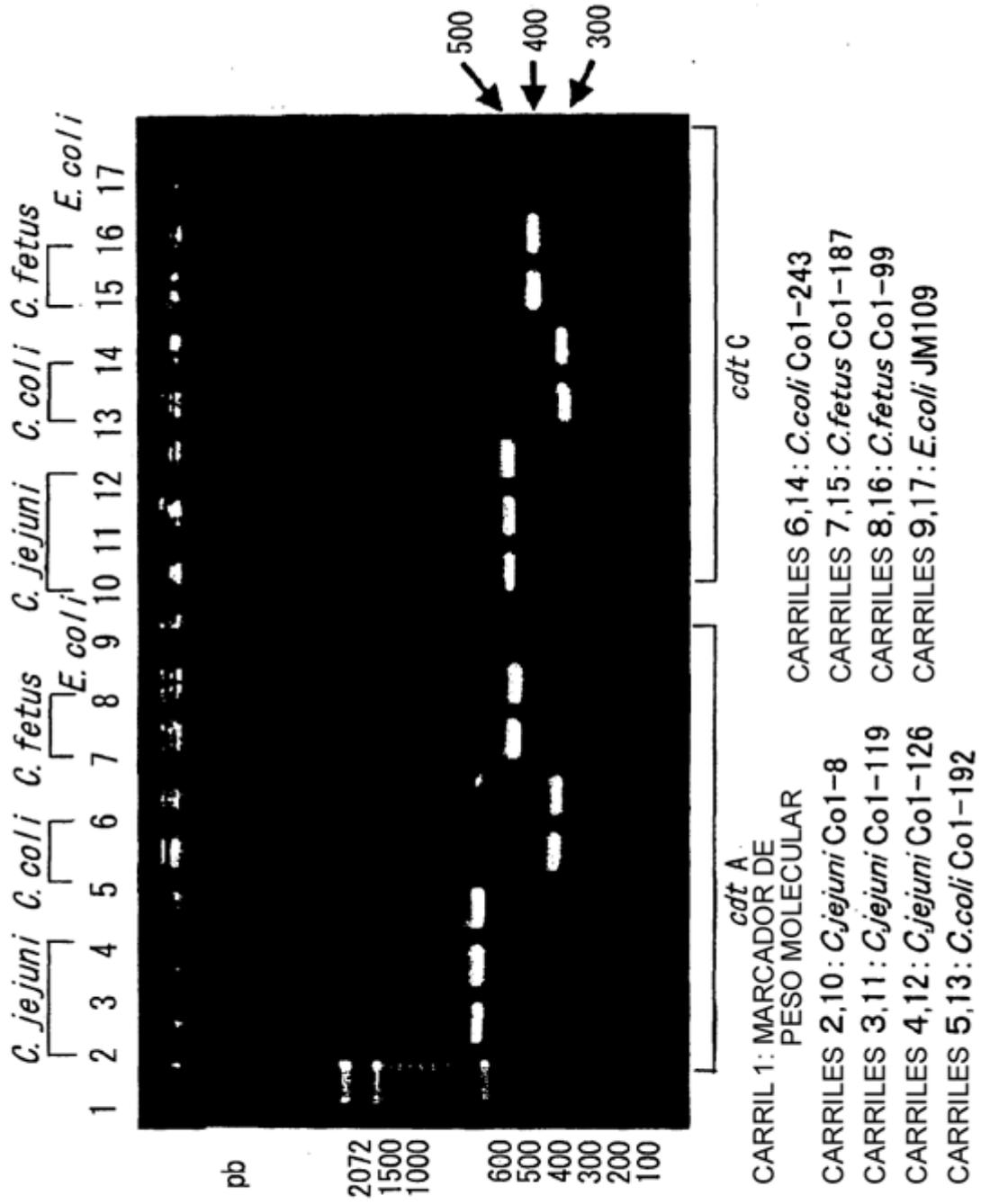
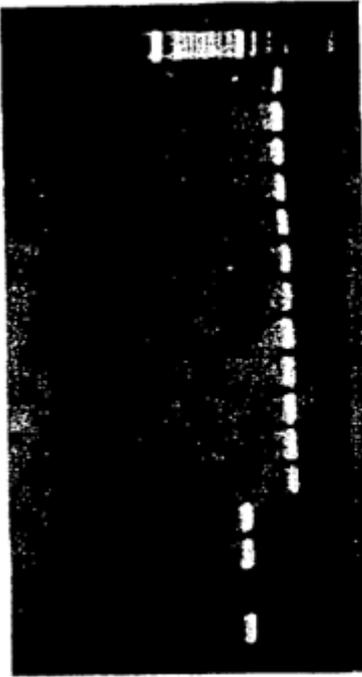


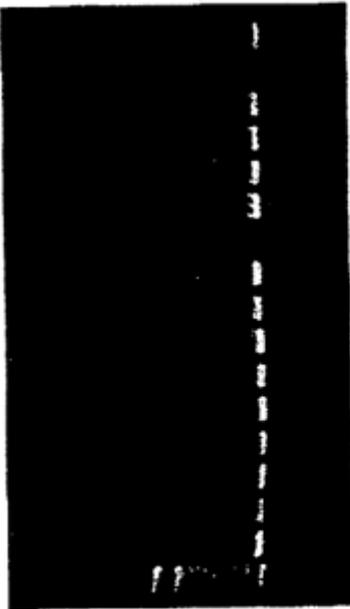
FIG. 14

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34



CARRIL 21: *C.jejuni* Co3-082
 CARRIL 22: *C.coli* Co1-017
 CARRIL 23: *C.coli* Co1-071
 CARRIL 24: *C.coli* Co1-106
 CARRIL 25: *C.coli* Co1-124
 CARRIL 26: *C.coli* Co1-130
 CARRIL 27: *C.coli* Co1-194
 CARRIL 28: *C.coli* Co1-245
 CARRIL 29: *C.coli* Co1-247
 CARRIL 30: *C.coli* Co2-060
 CARRIL 31: *C.coli* Co2-082
 CARRIL 32: *C.coli* Co2-147
 CARRIL 33: *C.coli* Co2-173
 CARRIL 36: *C.coli* Co2-215
 CARRIL 37: *C.coli* Co2-218
 CARRIL 38: *C.coli* Co3-134
 CARRIL 39: *C.jejuni* Col-8
 CARRIL 40: *C.coli* Col-192
 CARRIL 41: *C.fetus* Col-187
 CARRIL 42: *E.coli* JM109

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



CARRILES 1, 34, 35: MARCADOR

DE PESO MOLECULAR

CARRIL 2: *C.jejuni* Co2-037
 CARRIL 3: *C.jejuni* Co2-127
 CARRIL 4: *C.jejuni* Co2-128
 CARRIL 5: *C.jejuni* Co2-130
 CARRIL 6: *C.jejuni* Co2-132
 CARRIL 7: *C.jejuni* Co2-146
 CARRIL 8: *C.jejuni* Co2-150
 CARRIL 9: *C.jejuni* Co2-193
 CARRIL 10: *C.jejuni* Co2-200
 CARRIL 11: *C.jejuni* Co2-214
 CARRIL 12: *C.jejuni* Co2-217
 CARRIL 13: *C.jejuni* Co3-007
 CARRIL 14: *C.jejuni* Co3-008
 CARRIL 15: *C.jejuni* Co3-011
 CARRIL 16: *C.jejuni* Co3-012
 CARRIL 17: *C.jejuni* Co3-024
 CARRIL 18: *C.jejuni* Co3-036
 CARRIL 19: *C.jejuni* Co3-072
 CARRIL 20: *C.jejuni* Co3-078

35 36 37 38 39 40 41 42

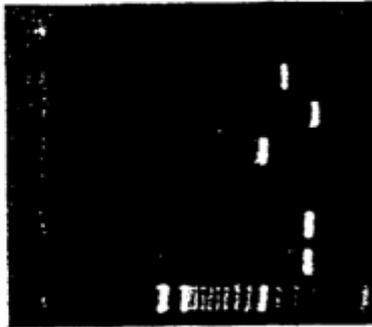


FIG. 15

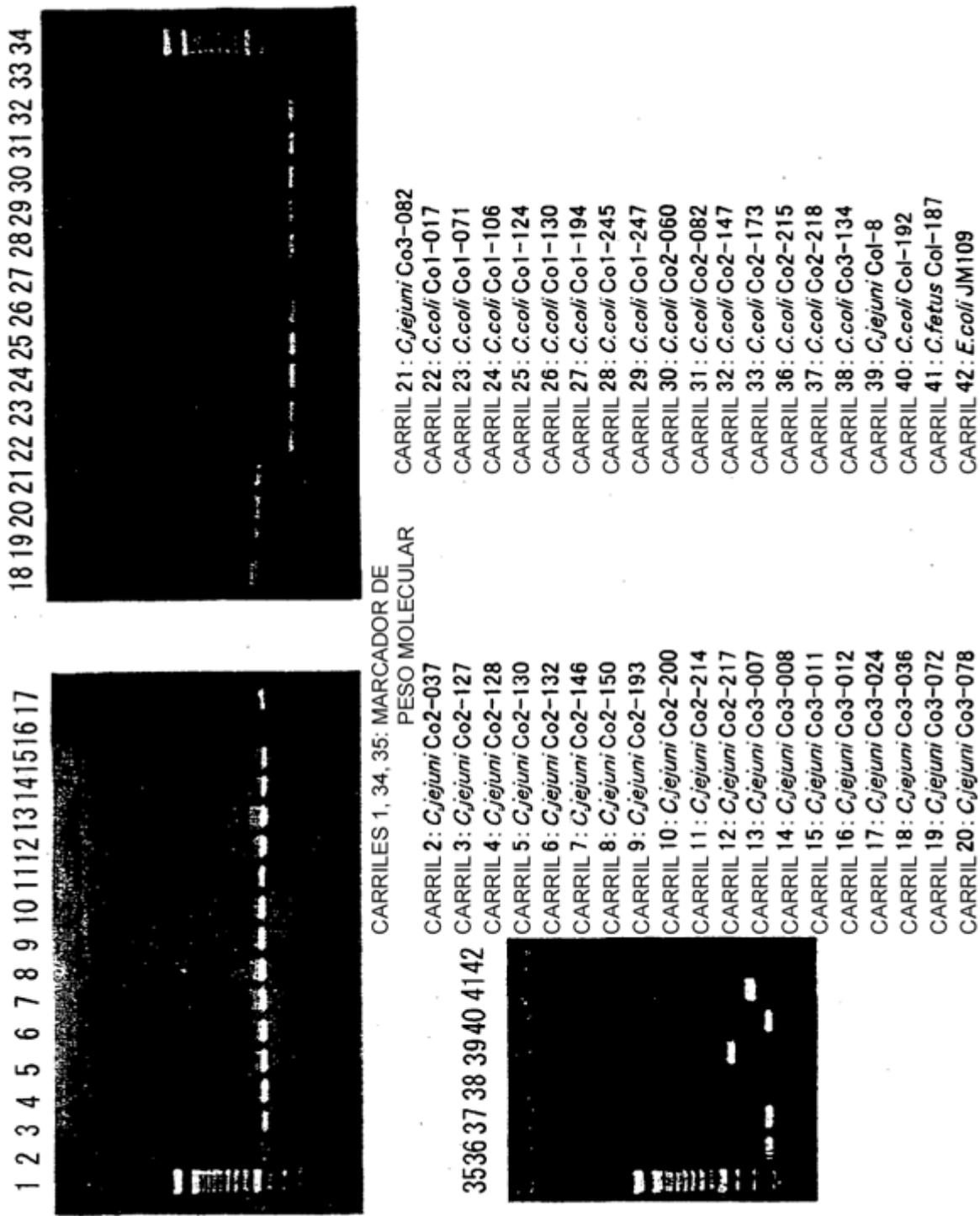


FIG. 16

ORF de cdt de *C. jejuni*

ATGCAAAAATTATAGTTTTATTTATGTTGTTTTATGACTTTTTTCTTTATGCATGTTCTTCTAAATTTGAAAATGT
 AAATCCTTTGGGGCGTTTCATTTGGAGAATTT₆GAAGATACTGATCCTTTAAAACT₇AGGACTTGAACCTACTTTTC₈CT
 ACCAATCAAGAAATCCAAGTTAATTAGCGGTGCTGATTTAGTACCTATTACTCCTATTACCCACCTTTAACTAGAAC
 AAGCAATAGTGCCAACAATAATGCAGCAAATGGGATCAATCCTCGCTTTAAAGACGAAGCTTTAATGATGTTTTAATTT
 TTGAAAATCGCCCTGCGGTTTCTGATTTTTAACCATTTTAGGCCCTAGCGGAGCAGCTTTAACGGTTTGGGCTTTAGCA
 CAAGGAAATGGATTTGGGGCTATACTTTAATCGATAGCAAAGGATTTGGCGATGCTAGAGTTTGCAACTTTTGCTTTA
 TCCTAATGATTTTGAATGATTAATAATGCCAAAACCAATACTTGTCTTAATGCTTATGGTAATGGAATTGCCATTATC
 CTTGTGATGCAAGCAATCACGCACAAATGTGGAACTTATCCCTATGAGCAATACAGCGTTCAAATTAATAATTTAGGA
 AATGGAAAA₅TGCATACAAGCACCTATTACAAATCCTTATGGTATTTTACAAGTTTTTAAAAATTTTACCCTAGAG
 TGTGCAAAAAAGATAATTTTATGATCAACAAT₉GGTTTTAACTACTCCGCC₁₁TTTACC₁₁AAACCTTTATATCGCCA
 AGGAGAGGTACGATGAAAAAATTATATGTTTATTTTATC₁₇TTTTAACCTTGCTTTTGCAAATTTAGAAAATTTAAT
 GTTGGCACTTGGAAATTTGCAAGGC₉TCATCCGAGCCACAGAAAGCAAATGGA₁₈GTGTTAGTGAAGACAACCTTGAAGT
 GGAGCAAACCCCTAGATATCTTAATGATAC₂₆AAGAAGCAGGAACCTTACCAAGAAC₂₉AGCCACTCCAACAGGACGCC₁₉
 ATGTGCAACAAGGTGGAACACC₂₇TATTGATGAATATGAGTGGAAATTTAGC₂₉AACTCTTCAAGGCCTGATAGGGTTTTT
 ATTTATTATTCTCGGTTGATGTAGGAG₄₈CTAATCGTGAAATTTAGCTATAGT₁₁CAAGAATGCAAGCTGAA₂₁GAAGT
 GATTGTTTTACCTCCACTACTACAGTTCAAGACCCATTATAGGAATTCGCAATGGAATGATGCTTTTTTCAATATCC
ATGCTTTAGC₄₉TAATGGAGGAACAGATGTAGGAGCAATTATCACAGCTGTAGATGCACA₂₂TTTTGCAAATATGCCTCAA
 GTTAACTGGATGATAGCAGGGGATTTTAA₅₉CCGTGATCCTTCTACTATAACAAGT₂₃ACAGTGGATAGAGAATTAGCAA
 TAGAATTAGAGTGGTTTTTCCAAGTACGCAACTCAAGCAAGCGGAGGACTCTTGATTATGCAATTACAGGAAATTCAA
 ATA₇GACAACAAACCTATACTC₁₂CACCGCTTTTAGCTGCGATTTAATGCTTGCAGTTTAAAGATCTCATAT₂₅AGTTTC
 AGATCATTTCCAGTAAATTTAGA₁₀AAATTTAGGACATTTAATATGAAAAAATTATTACTTTGTTTTTATGTTTA
 TAACTTTAGCCTTTGCAACTCCTA₇₄CTGGAGATTTGAAAGATTTTACCGAAATGGTTTCTATAAGAAGCTTAGAAAACGG
 GAATTTTTTAAAGCGCCTTAGGGATACCTCAAAA₅₈GATCCTATTGATCAAAATTGGAAATATTAAGAAATTTGTTTTAA
 GCGATGAGTAAAAAAGATAAATTAGCTGATGAACCTCCTTTTGGTTATGTGCAATTTACAAATCCAAAAGAAAGC
 GATCTTTGTTTAGCCATCTTGAAGATGGAACCTTTGGAGCAAATCTTGTCAAGATGATCTAAAAGATGGTAAATTAGA
 AACTGTATTTTCTATAATGCCAACAACAACCTCAGCTGTGCAAATTCGTTCTTTAGTTTTGGAATCTGATGAATGTATAG
 TAACTTTTTTAAATCCAAATATTCTATACAAAAACGCTTTGGAA₅TAGC₅₇CCCTGCACCCTAGATCCTATTTTTTTT
 GCTGAAGTAAATGAACTAATGATTATAACCCACCTTTAACAGCTGCTACCCCTT₇₅TAGAATAA

FIG. 17

ORF de cdt de *C. coli*

ATGCAAAAAATAAAATTAAGCCTAATGTTTTGATTGTAACAATCATTTTTTAGCTTGTTCTTCAAAGAACAACAAT
 CAATCCTTTAGGAAGATCTTACGGTAAATTT₆AACGATAACGATCCTTTAAAAGT₇TGGTTCAAACCTACACCCCCTG
 TCAAACAAAAACACCAAGCTTGGTAGAAGGTAATAATTTCCGCCATACCCTTGTCACCTGTAATCACTCCTAAT
 ACCTTTAAAGGAGATAATGCCGTCAAAGGCCATTGCCAAGGCTAAATCTC₇₀CAAACGAATTTGCTTCAAATGCTTTA
 TACGAAAACACAGGTATGGTAAGTGATTTTGTCACTATTATGAATCCTAATGGAGCATCTTTAACAATCTGGGCTTTAA
 TCCTGGCAATTGGATATGGGATATAGTTATTTGCTAGTAGACCTTTGGAGATGCAAGAGCTTGGCAGCTTATTGAAT
 TTCAAACAATACAGTAATGATTAATAATGCAAAAACATTTACTTGCTTAAACGCCATAGAAATGGCATCGTTCATTAT
 CCTTGTGATCAAACAAATTTTGGCAGTTTTGGAGACTTTATC₇₇CGATGACTAATGGAGCTTATCAAATTCAAAATTT
 GCCACCCAACA₈₃ATGTATACAAACACCTGTTTC₈₄AAATGTAATGGAAGAATTAATTTGAGCTTTTATAATTTATTTA
 ACCGATTGTTTAAAGAAAAAGAAAAGAATTTGGATAGACAGTGGTATATAGGCGCTCCTATTTAATTTTTTCGCTATGA
 AAGGAAGATAATGAAAAAATAGTATTTTTGATTTAAGTTTAAATGTATTATTTGCCGC₁₃TTTAGAAAATTACAACAC
 CGGAACTTGGAAATTTGCAAGGC₉TCATCAGCTGCAACTGAAAGCAAATGGAATGTTAGTATAAGACAACCTCATAACCGGT
 GCAATCCTATGGATGTTTTAGCTGTTCAAGAAGCGGGGTTTTACCTAGTACAGCTATGATGACTCCTAGACAGGTACA
 ACCCGTGGCGTGGGTATTCTATACATGAATACATATGGAATTTAGGCTCTGTATCAAGACCTAGCTCTC₃₀TTTATAT
 ATATTATTCTAGAGTGGATGTAGGAGCAAATCGTGTGAATTTAGCTATCGTTAGCAGAGTGCAAGCGGATGAAGTTTTTG
 TTTTACCCCTCCAACAGTTGCTTCAAGACCTATTATAGG₃₁CATACGCATAGGCAATGA₄TGCTTTTTTCAATATACAC
 GCTCTAGCAAGTGGGGAAATGACGCAGGAGCCATTGTCCGTCT₃₂GTGGATATGTTTTTAGAAATAGACCTGATATT
 AATTGGATGATTTTAGCGATTTTAAATAGAGAATCAGGCGCCTTAGTAACCTTGCTAGATCCTGACTTAAGAGCAGGCAC
TCG₃₃CGTAGTTGTTCCGCCTTCT₃₅CTACGCAACAAGTGAAGAACGATTGATTATGCTATCACTGGAAATCCAACA
 CTGCAGCTTTATACAACCACCACCGATAGTT₂₈GCGATTTTAGCTTTAGAAGGATTAAGAACCCTTTTGG₃₄CTTCAGAT
 CATTTTCCTGTAATTTTAGA₁₀AGACCTTAGGAGCTTAATATG₃₅AAAAATTTTTTATTTTATTTTTGCCCTTTTGG
 CTTTTGAAAGCAGAGCCTAGCTTGGATGAATTAGCAGACTTTACTCCTATGTTTGCTATAAGATCTTTAGAAACAGGAA
 TTTCTTTAAGTCTTTTAGAAAACTTCAAAA₆₉AGGTTAGAAGATCAAATGG₇TTTTTAAAGAGATTGTAGCAAATG
 ATGAGCTAAAAGCTAGGGATATGCACGCAAAAAGA₇₆TTTGCCTTTGGCTATGTTCAAGTTATAAGCCCTAGGGCGGATG
 ATATATGCCTAGCTGTTTTAAGTAAAAAAGTTTTGGCACCAATCTTGCAAACAAGATTTGCAAGATGGAACAATGCAG
 ACTATTTTTCTATCATACCAATGACAAATGGTTCTATACAAATTAGATCTTTAACCAATGGTGGCAATCAATGCATGAG
 CACTTTTCCTGACTCTAGTATCGCCATAGAAAATCGCTT₈TGGTTTAGG₇AGAATGCCTTTTGGATCGTTCTATCGTAA
CTGTATTAAGC₇₇AAACTTTTTCTTTTCTCCCTGCTATAATCGAAGCAAGCGCAATTTACTAA

FIG. 18

ORF de cdt de *C. fetus*

ATGACTAAAATTATTTTCAAGCATATTA AAAAATAGTCTTATTTTACTATTTTGTATCGCTCTTTT TAGTGC TTGCTCATC
 AAAAACGACAAATGTAAGCACTC₇₂AAAAATAAATCCATTAGGAAGCATT TTTGGCAAACG₆₄GATGATCCAGATCCAC
 TAAA TTTAGGCGATTTTCCAAC TCTTCTAACATCAAATTTTACAAATCCTATGCCGACTAGAACGCCATCGCCACTTAA
 AAAAGTGGATTTGCCTGTAATGAACTCATTAAACATGGTCCGATGTTTCAAGTGC TTTTAGTAAACCGGACTTGAATT
 TCAAACAACCTACTATCAGTCTACAAGGTATCCCGCTGATCTATTTGATAGAACAAGCGATTTTATGGTGATAATGGGT
 GCAAACGGCGTTGTGATCACTATTTGGTACACATCTCCTGAAA ACTGGTTATGGGGCTACTCGCTCTATGAAAGCGGCAA
 TTTAGGAGGATATCGTGT TTTGGCGTCTAATTTTACTACCAAATAATGAAGTCATGATAGTAAATTTCAACACTCGCACGA
 CTTGCATAAATA₇₃CTTATAAAAACGGAGTAATTCACTCACCTTGAATAAAGATAATCCTTTTCAGAAATTTACGTTTC
 GTCCAATGACAAACGGAGCCGTACAAATTTATAACAAAGCTACTAATTGCG₆₉TGCTTGCAAACGCCGTTAATAATCTA
 TTCGGTTTTGACGTTTTTGGGGCGATAAATCTTACGACAAAATGCACTGATACTATCGATCAACAATGGTATTTGCTCCC
 GCCGCCGAAGTTGGAAGACTAT₁₅TTTATTAGGAGTAAAAATGCGAAATGTTATTATGATTATATTTATAGCAACTTAA
 GGC₃₈TTTGCAAAC CAGAAGATTATAAAATGCTACTTGG AATTGCAAGGC₉AGTTCGGCTATAACCGAAAGCAAATGG
 A₄₇ATATAAGCGTACGTCAAATAATTAGCGGTGAAAATCCAGCAGATATATTAGCCGTTCAAGAAGCAGGAAATTTACCT
 CAAACCGCTCTTC₃₉CTACAGGTAGAAGCATAAATCAAGGCCGGCAGGATC₄₀GTAAGT GAGCATTATGGCAGCTAGGCAG
 TATATCTAGACCGTTCCAA₄₁GTCTATATATATTATGCTCAAATCGACACAGGGCAAATAGAGTAAATTTAGCAATCGT
 TTCACGCATAAAAAGCTGATGAAATCATCATCTTGCCGCTCCT₄₂ACGGTAGCTTCTCGTCCGCTCATAGGTATAAGAAT
 AGGAAACGACGTATTTTCAACATACAGGCTCTAGCAAATGGCGGAGTCGATGCTCCGGCGATAATAAA₁₆TTCAATATT
 TGACAGATTTAGAAATATGCCAAATCACTTGGATGATTTTAGGGATTTTAACCGCTCACCTGAGAGTTAAGA₄₃GG
 AACTCTTGGATTAGAAACTC₄₄GCGTCAGAGTAACGTTTTTAACA₃₇CCTCCGGCCCTACTCAAGAAGCGGGCGAACCG
 TTGACTGGGCTATAGTTGAAA ACTCAGCCGGCGATCTTGCCGAAC₄₅TACGCTGTAGCAGTATTGATGCTAGCAAACC
 TGCGGACTCACCTA₄₆GTTTCGGACCATTTTCCGGTAAATTTTAGA₁₀AAATTTGGAGATACTAATGAAAGCTTTAGCAA
 TAATATTTTATTTGTAAAGCATAAGTTTTGCAAACG₇₈AAAACATAACCGACCGTTTTTCAAATACGCAATGCAAACACCG
 GAATTCCTATAAATATAAAGCGATTTTCAGGG₆₆CAGTTTAATTACCAAAACTGGTTTTTTAAATGATTTAGGAGTAGATC
 CTAAGATAAAAAAAGTAGATAAATTTCAAATCTTTTCCTTTTGGATACGTGCAATTTCAAGTAGCAGCCGACGTA AAA
 ATGTGCCCTCAGATCGCTCCTAGCGGATTTTAGCACTAAAAAACTGCAAGCAAGACTACGATAGCGGAGAGTTTGAGAC
 TATTTTTCAGATCATCCCTACAAGTAGTGGAGCTATGCAGCTACGATCACTAGTTCTAAAAACAACGAGTGCTTAGGAA
 CATTTGAAAATCCAAC₇₉GTGCCGATCGAAGATAGAGTAGGACTAGT₆₇ACGCTGCGTTTTAGAAATTTTGTGACATA
 GAGCCTAAACAAC TTTTGTATTTTACC GCGCTTAGTGAAGCTAAGGTAATTAGATAA

FIG. 19