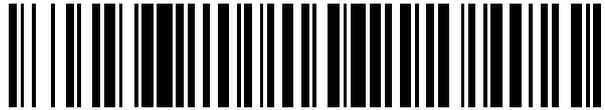


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 496**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31	(2006.01)	C12R 1/46	(2006.01)
C12N 15/54	(2006.01)		
C12N 9/10	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C07K 14/315	(2006.01)		
C12P 19/04	(2006.01)		
A61K 39/09	(2006.01)		
C12Q 1/14	(2006.01)		
C12Q 1/68	(2006.01)		
G01N 33/569	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.1999 E 99935176 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1098980**

54 Título: **Vacunas y pruebas de diagnóstico de Streptococcus suis**

30 Prioridad:

22.07.1998 EP 98202465
22.07.1998 EP 98202467

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

73 Titular/es:

**STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG
ONDERZOEK (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

SMITH, HILDA ELIZABETH

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 512 496 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

Vacunas y pruebas de diagnóstico de *Streptococcus suis*

- 5 La invención se relaciona con infecciones de cerdos por *Streptococcus suis*, con vacunas dirigidas contra esas infecciones, con pruebas para diagnosticar las infecciones de *Streptococcus suis* y con el campo de las vacunas bacterianas, más particularmente a las vacunas dirigidas contra las infecciones de *Streptococcus suis*.
- 10 Las especies de *Streptococcus*, de las cuales existen una gran variedad que causan infecciones en los animales domésticos y el hombre, se agrupan frecuentemente de acuerdo con los grupos de Lancefield. La tipificación de acuerdo con Lancefield ocurre sobre la base de determinantes serológicos o antígenos que están entre otros, presentes en la cápsula de la bacteria y que permiten sólo una determinación aproximada, frecuentemente las bacterias de un grupo diferente muestran reactividad cruzada uno con el otro, mientras que a otros *Streptococcus* no se les puede asignar un grupo-determinante en absoluto. Dentro de los grupos, la diferenciación además es frecuentemente posible sobre la base de la serotipificación; estos serotipos contribuyen además a la gran variabilidad antigénica de los *Streptococcus*, un hecho que crea una serie de dificultades dentro del diagnóstico de y la vacunación contra las infecciones *Streptocócicas*.
- 15 Las especies de *Streptococcus* (GAS, *Streptococcus pyogenes*) del grupo A de Lancefield, son comunes con los niños, que causan infecciones nasofaríngeas y complicaciones de las mismas. Entre los animales, especialmente el ganado es susceptible a GAS, de manera que a menudo se encuentra mastitis.
- 20 Los *Streptococcus* del grupo A son los agentes etiológicos de la faringitis estreptocócica e impétigo, dos de las infecciones bacterianas más comunes en los niños, así como una variedad de infecciones menos comunes pero potencialmente mortales, que incluyen infecciones de tejidos blandos, bacteriemia y neumonía. Además, GAS se asocia únicamente con los síndromes autoinmunes postinfecciosos de fiebre reumática aguda y glomerulonefritis post-estreptocócica.
- 25 Varios informes recientes sugieren que la incidencia tanto de infecciones graves debido a GAS como de la fiebre reumática aguda ha aumentado durante la última década, enfocándose renovado el interés en la definición de los atributos o factores de virulencia del organismo que pueden jugar un papel en la patogénesis de estas enfermedades.
- 30 GAS produce varios componentes de la superficie y productos extracelulares que pueden ser importantes en la virulencia. La proteína de superficie principal, la proteína M, se estudió con más detalle y demostró convincentemente que juega un papel en la virulencia y la inmunidad. Los aislamientos ricos en proteína M son capaces de crecer en la sangre humana, una propiedad pensada para reflejar la capacidad de la proteína M para interferir con la fagocitosis, y estos aislamientos tienden a ser virulentos en animales de experimentación.
- 35 Los *Streptococcus* del grupo B de Lancefield (GBS) los más frecuentemente se observan en el ganado, causando mastitis, sin embargo, los bebés humanos también son susceptibles, frecuentemente con consecuencias fatales. Los *estreptococos* del Grupo B (GBS) constituyen una causa principal de sepsis bacteriana y meningitis entre los neonatos humanos nacidos en los Estados Unidos y Europa occidental y están surgiendo como patógenos neonatales importantes en los países en desarrollo también.
- 40 Se estima que las cepas de GBS son responsables de entre 10,000 a 15,000 casos de infección invasiva en recién nacidos en los Estados Unidos solamente. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento temprano, la sepsis neonatal por GBS continúa produciendo una tasa de mortalidad de 15 a 20%. Además, los sobrevivientes de la meningitis de GBS tienen de 30 a 50% de incidencia de secuelas neurológicas a largo plazo. El reconocimiento cada vez mayor en las últimas dos décadas de GBS como un patógeno importante para los bebés humanos ha generado un interés renovado en la definición de los factores y huéspedes bacterianos importantes en la virulencia de GBS y en la respuesta inmune a la infección por GBS.
- 50 Se ha centrado particular atención en el polisacárido capsular como el antígeno de superficie predominante de los organismos. En una modificación del sistema desarrollado originalmente por Rebecca Lancefield, las cepas de GBS se serotifican sobre la base de diferencias de los antígenos en sus polisacáridos capsulares y la presencia o ausencia de proteínas C serológicamente definidas. Mientras los GBS aislados a partir de fuentes no humanas frecuentemente carecen de una cápsula serológicamente detectable, una gran mayoría de las cepas asociadas con la infección neonatal pertenecen
- 55

a uno de los cuatro principales serotipos capsulares, 1a, 1b, II o III. El polisacárido capsular forma la capa más externa alrededor del exterior de la célula bacteriana, superficial a la pared celular. La cápsula es distinta del carbohidrato del grupo B asociado a la pared celular. Se ha sugerido que la presencia de ácido siálico en la cápsula de la bacteria que causa meningitis es importante para esta bacteria atravesar la barrera sangre-cerebro. Claramente, en *S. agalactiae* el ácido siálico ha demostrado ser crucial para la función de la virulencia de la cápsula de tipo III. La cápsula de serotipo *S. suis* se compone de glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ramnosa y ácido siálico.

El polisacárido del grupo B, en contraste con la cápsula tipo-específica, está presente en todas las cepas de GBS y es la base para los serogrupos de los organismos en el grupo B de Lancefield. Los primeros estudios de Lancefield y colaboradores mostraron que los anticuerpos se elevaron en los conejos contra los organismos GBS completos protegieron a los ratones contra el desafío con cepas de tipo capsular homólogo, demostrando el papel central del polisacárido capsular como un antígeno protector. Los estudios en la década de 1970 por Baker y Kasper demostraron que la sangre del cordón de los lactantes humanos con sepsis por GBS de tipo III uniformemente tuvieron niveles bajos o no detectables de anticuerpos dirigidos contra la cápsula de tipo III, sugiriendo que una deficiencia del anticuerpo anticapsular fue un factor clave en la susceptibilidad de los niños recién nacidos a la enfermedad por GBS.

Las infecciones por el grupo C de Lancefield, tales como aquellas con *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae*, y otros se ven principalmente en caballos, ganado y cerdos, pero también pueden cruzar la barrera de especies a los humanos. Las infecciones por el grupo C de Lancefield (*S. bovis*) se encuentran en los mamíferos y algunas aves, resultando algunas veces en endocarditis o septicemia.

Los grupos E, G, L, P, U y V de Lancefield (*S. porcinus*, *S. canis*, *S. dysgalactiae*) se encuentran en varios huéspedes, y causan infecciones neonatales, infecciones nasofaríngeas o mastitis.

Dentro de los grupos de Lancefield R, S y T, (y con tipos no agrupados) *S. suis* se encuentra, una causa importante de meningitis, septicemia, artritis y muerte súbita en cerdos jóvenes. Incidentalmente, también puede causar meningitis en el hombre.

El *Streptococcus suis* es una causa importante de meningitis, septicemia, artritis y muerte súbita en cerdos jóvenes (4, 46). Incidentalmente, también puede causar meningitis en el hombre (1). Las cepas de *S. suis* generalmente se identifican y clasifican por sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas (58, 59, 46). La clasificación serológica se basa en la presencia de polisacáridos antigénicos específicos. Hasta ahora, se han descrito 35 serotipos diferentes (9, 56, 14). En varios países europeos el serotipo 2 de *S. suis* es el tipo más frecuente aislado de cerdos enfermos, seguido por los serotipos 9 y 1. La tipificación serológica de *S. suis* se lleva a cabo usando diferentes tipos de pruebas de aglutinación. En estas pruebas, las células de *S. suis* aisladas y caracterizadas bioquímicamente se aglutinan con un panel de 35 sueros específicos. Estos métodos son muy laboriosos y consumen mucho tiempo.

Poco se sabe acerca de la patogénesis de la enfermedad causada por *S. suis*, y mucho menos sobre sus varios serotipos tales como el tipo 2. Se han sugerido varios componentes bacterianos, tales como proteínas asociadas con la membrana celular y extracelular, fimbrias, hemaglutininas y hemolisina como factores de virulencia (9, 10, 11, 15, 16, 47, 49). Sin embargo, el papel exacto de estos componentes proteicos en la patogénesis de la enfermedad sigue siendo poco claro (37). Es bien conocido que la cápsula de polisacárido de varios estreptococos y otras bacterias gram-positivas juega un papel importante en la patogénesis (3, 6, 35, 51, 52). La cápsula permite que estos microorganismos resistan la fagocitosis y por lo tanto se considera como un factor de virulencia importante. Recientemente, se sugirió además un papel de la cápsula de *S. suis* en la patogénesis (5). Sin embargo, la estructura, organización y funcionamiento de los genes responsables de la síntesis de polisacáridos de la cápsula (*cps*) en *S. suis* se desconoce. Dentro de las cepas de *S. suis* los serotipos 1 y 2 pueden diferir en virulencia para cerdos (41, 45, 49). Algunas cepas de tipo 1 y 2 son virulentas, otras cepas no lo son. Debido a que tanto las cepas virulentas como las no virulentas del serotipo 1 y 2 se encapsulan completamente, incluso puede ser que la cápsula no es un factor pertinente necesario para la virulencia.

Los intentos por controlar las infecciones o enfermedad de *S. suis* aun se dificultan por la falta de conocimiento acerca de la epidemiología de la enfermedad y la falta de vacunas eficaces y pruebas diagnósticas sensibles. Es bien conocido y generalmente aceptado que la cápsula polisacárida de varios estreptococos y otras bacterias gram-positivas juegan un papel importante en la patogénesis. La cápsula permite a estos microorganismos resistir a la fagocitosis y por lo tanto se considera como un importante factor de virulencia.

En comparación con las cepas *S. suis* encapsuladas las cepas de *S. suis* no encapsuladas se fagocitan por los leucocitos polimorfonucleares murinos a un mayor grado. Además, se observó un aumento en el espesor de la cápsula para las cepas virulentas crecidas *in vivo* mientras que no se observó aumento de cepas avirulentas. Por lo tanto, estos datos demuestran una vez más el papel de la cápsula en la patogénesis de *S. suis* también.

Las especies de *Streptococcus*, no agrupadas tales como *S. mutans*, causan caries en los humanos, *S. uberis*, causa mastitis en el ganado, y *S. pneumoniae*, causa infecciones graves en los seres humanos, y *Enterococcus faecialis* y *E. faecium*, contribuyen adicionalmente al gran grupo de los estreptococos.

Streptococcus pneumoniae (el neumococo) es un patógeno humano que causa enfermedades invasivas, como la neumonía, bacteriemia y meningitis. A pesar de la disponibilidad de antibióticos, las infecciones neumocócicas siguen siendo comunes y aun pueden ser fatales, especialmente en los grupos de alto riesgo, tales como los niños pequeños y las personas de edad avanzada. Particularmente en los países en desarrollo, muchos niños menores de cinco años, mueren cada año de neumonía neumocócica. *S. pneumoniae* es también la causa principal de otitis media y sinusitis. Estas infecciones son menos graves, pero sin embargo incurren en costos médicos importantes, especialmente cuando conducen a complicaciones, tales como la sordera permanente. El nicho ecológico normal del neumococo es la nasofaringe del hombre. Toda la población humana se coloniza por neumococo en un momento u otro, y en un momento dado, hasta el 60% de los individuos pueden ser portadores. El portador nasofaríngeo de neumococo por el hombre es frecuentemente acompañado por el desarrollo de protección a la infección por el mismo serotipo. La mayoría de las infecciones no ocurren después de su transporte prolongado, pero sigue la adquisición de cepas recientemente adquiridas. Muchas bacterias contienen polisacáridos de superficie que actúan como una capa protectora contra el medio ambiente. Los polisacáridos de superficie de bacterias patógenas generalmente hacen las bacterias resistentes a los mecanismos de defensa del huésped, por ejemplo, la acción lítica de suero o fagocitosis. En este sentido, el polisacárido capsular (CP) serotipo-específico de *Streptococcus pneumoniae*, es un importante factor de virulencia. La cepas no encapsuladas son avirulentas, y los anticuerpos dirigidos contra el CP son protectores. La protección es específica al serotipo; cada serotipo tiene su propia estructura CP específica. Noventa serotipos capsulares diferentes se han identificado. Actualmente, CPs de 23 serotipos se incluyen en la vacuna.

Las vacunas dirigidas contra las infecciones de *Streptococcus* generalmente son objetivo en la utilización de una respuesta inmune dirigida contra la cápsula de polisacárido de las diversas especies de *Streptococcus*, especialmente ya que la cápsula se considera un factor principal de virulencia para estas bacterias. La cápsula, durante la infección, proporciona resistencia a la fagocitosis y por lo tanto promueve el escape de las bacterias del sistema inmune del huésped, protegiendo las bacterias de la eliminación por los macrófagos y neutrófilos.

La cápsula particularmente confiere la resistencia de la bacteria a la opsonofagocitosis mediada por el complemento. Adicionalmente, algunas bacterias expresan polisacáridos capsulares (CPs) que imitan las moléculas del huésped, evitando así el sistema inmune del huésped. Además, incluso cuando las bacterias se han fagocitado, la destrucción intracelular se dificulta por la presencia de una cápsula.

Se piensa generalmente que sólo cuando el huésped tiene anticuerpos u otros factores séricos dirigidos contra los antígenos de la cápsula, la bacteria conseguirá ser reconocida por el sistema inmune a través de los anticuerpos anticapsulares o factores del suero unidos a su cápsula, y a través de la opsonización, conseguirán fagocitarse y destruirse.

Sin embargo, estos anticuerpos son serotipo-específico, y frecuentemente conferirán sólo protección contra sólo uno de los muchos serotipos conocidos dentro de un grupo de *Streptococcus*.

Por ejemplo, las vacunas actuales de *S. suis* disponibles en el comercio que son, generalmente, basadas en las preparaciones de células-bacterianas completas o en fracciones enriquecidas de cápsula de *S. suis*, confieren sólo protección limitada contra las cepas heterólogas. Además, la actual vacuna neumocócica, licenciada en los Estados Unidos en 1983, consiste de CPs purificados de 23 serotipos neumocócicos mientras que existen al menos 90 tipos de CP.

La composición de esta vacuna neumocócica se basa en la frecuencia de aparición de los aislados de la enfermedad en Estados Unidos y la reactividad cruzada entre varios serotipos. Aunque esta vacuna protege a los adultos sanos contra las infecciones causadas por los serotipos incluidos en la vacuna, no logra elevar una respuesta inmune protectora en los bebés

menores de 18 meses y es menos eficaz en las personas de edad avanzada. Además, la vacuna confiere sólo protección limitada en pacientes con inmunodeficiencias y malignidades hematológicas.

5 A la luz de lo anterior, se necesitan vacunas mejoradas contra infecciones por *Streptococcus*. Se está prestando mucha atención a la producción de vacunas con CP mediante la producción de los polisacáridos pertinentes a través de medios químicos o recombinantes. Sin embargo, la síntesis química de los polisacáridos es costosa, y la síntesis del polisacárido capsular por medios recombinantes requiere conocimiento acerca de los genes pertinentes, que no siempre están disponibles y necesitan que se determinen para cada serotipo pertinente.

10 La descripción proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un agregado génico capsular (*cps*) de *Streptococcus suis*. La biosíntesis de los polisacáridos de la cápsula, generalmente, se ha estudiado en un número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (32). En las bacterias Gram-negativas, pero además en un número de bacterias gram-positivas, los genes que están implicados en la biosíntesis de polisacáridos se agrupan en un solo locus. Los genes capsulares de *Streptococcus suis* como se proporcionan por la descripción muestran una organización genética común que
15 implica tres regiones distintas. La región central es serotipo específico y codifica las enzimas responsables de la síntesis y polimerización de los polisacáridos. Esta región se flanquea por dos regiones conservadas en *Streptococcus suis* que codifican proteínas para las funciones comunes, tales como el transporte del polisacárido a través de la membrana celular. Sin embargo, entre las especies, sólo existen homologías bajas, dificultando la comparación fácil y detección de genes aparentemente similares. Conocer el ácido nucleico que codifica las regiones flanqueantes permite la determinación tipo-
20 específica del ácido nucleico de la región central de los serotipos de *Streptococcus suis*, como por ejemplo se describe en la parte experimental de la descripción de la exposición.

La descripción proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una agregado génico capsular de *Streptococcus suis* o un gen o fragmento de gen derivado de este. Un ácido nucleico de este tipo es por ejemplo
25 proporcionado por la hibridación del ADN cromosómico derivado de cualquiera de los serotipos de *Streptococcus suis* con un ácido nucleico que codifica un gen derivado de un agregado génico capsular de serotipo 1, 2 o 9 de *Streptococcus suis* como se proporciona por la descripción (ver por ejemplo las Tablas 4 y 5) y la clonación de los genes (tipo-específicos) como por ejemplo se describe en la parte experimental de la descripción. Al menos se identifican 14 marcos de lectura abiertos. La mayoría de los genes pertenecen a una sola unidad de transcripción, identificando un control coordinado de
30 estos genes, y las enzimas y proteínas que codifican, actúan en colaboración para proporcionar la cápsula con los polisacáridos pertinentes. La descripción proporciona genes *cps* y proteínas codificadas de estos implicadas en la regulación (*CpsA*), determinación de la longitud de la cadena (*CpsB*, *C*), exportación (*CpsC*) y la biosíntesis (*CpsE*, *F*, *G*, *H*, *J*, *K*). Aunque la organización total pareció a primera vista ser similar a la de los agregados génicos de *cps* y *yeps* de una serie de bacterias Gram-positivas (19, 32, 42), las homologías generales son bajas (ver la Tabla 3). La región implicada en la
35 biosíntesis se localiza en el centro del agregado génico y se flanquea por dos regiones que contienen genes con funciones más comunes.

La descripción proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una agregado génico capsular del serotipo 2 de *Streptococcus suis* o un gen o fragmento de gen derivado de este, preferentemente como se identifica en la
40 Figura 3. Los genes en este agregado génico se implican en la biosíntesis de polisacáridos de los componentes y antígenos capsulares. Para una descripción adicional de tales genes ver por ejemplo la Tabla 2 de la descripción, por ejemplo, un gen *cpsA* se proporciona funcionalmente codificando la regulación de la síntesis de polisacáridos capsulares, mientras que *cpsB* y la *cpsC* se implican funcionalmente en la determinación de la longitud de la cadena. Otros genes, tales como *cpsD*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* y genes relacionados, se implican en la síntesis de polisacáridos, que funcionan por ejemplo como glucosilo- o glicosiltransferasa. Los genes *cpsF*, *G*, *H*, *I*, *J* codifican más proteínas tipo-específica que los genes flanqueantes que se
45 encuentran más o menos conservados a través de las especies y pueden servir como base para la selección de iniciadores o sondas en experimentos de amplificación por PCR o hibridación cruzada para su posterior clonación.

Por ejemplo, la descripción proporciona además un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un agregado génico capsular de serotipo 1 de *Streptococcus suis* o un gen o fragmento de gen derivado de este preferentemente como se
50 identifica en la Figura 4.

Adicionalmente, la descripción proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un agregado génico capsular de serotipo 9 de *Streptococcus suis* o un gen o fragmento de gen derivado de este preferentemente como se
55 identifica en la Figura 5.

Además, la descripción proporciona, por ejemplo, un fragmento o sus partes del locus *cps*, implicado en la biosíntesis de polisacáridos capsulares, de *S. suis*, ejemplificado en la parte experimental para el serotipo 1, 2 ó 9, y permite la fácil identificación o detección de fragmentos relacionados derivados de otro serotipo de *S. suis*.

5 La descripción proporciona una sonda o iniciador de ácido nucleico derivado de un ácido nucleico de acuerdo con la descripción permitiendo la detección específica a especie o serotipo de *Streptococcus suis*. Una sonda o iniciador de ese tipo (en la presente descripción se usa indistintamente) es por ejemplo una sonda de ADN, ARN o PNA (ácido nucleico peptídico) que hibrida con el ácido nucleico capsular como se proporciona por la descripción. La detección específica de la especie se proporciona preferentemente seleccionando una sonda o secuencia de iniciador a partir de una región especie-específica (por ejemplo, región flanqueante), mientras que la detección específica de serotipo se proporciona preferentemente seleccionando una sonda o secuencia de iniciador de una región tipo-específica (por ejemplo, región central) de un agregado génico capsular como se proporciona por la descripción. Una sonda o iniciador de ese tipo puede usarse en una forma sin modificar además, por ejemplo, en experimentos de hibridación cruzada o la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) como por ejemplo se describe en la parte experimental de la descripción. En la presente la descripción proporciona el aislamiento y caracterización molecular de genes adicionales *cps* tipo específico de *S. suis* tipos 1 y 9. Adicionalmente, se describe la diversidad genética de loci *cps* de los serotipos 1, 2 y 9, entre los 35 serotipos de *S. suis* conocidos todavía. Las sondas tipo-específica se identifican. Además, una PCR tipo-específica, por ejemplo, se proporciona para el serotipo 9, siendo un ensayo rápido, fiable y sensible, que se usa directamente en exudados nasal o tonsilar u otras muestras de animales infectados o portadores.

La descripción proporciona además una sonda o iniciador de acuerdo con la descripción adicional proporcionada con al menos una molécula reportera. Ejemplos de moléculas reporteras son múltiples y conocidas en la técnica, por ejemplo una molécula reportera puede comprender ácido nucleico adicional proporcionado con una secuencia específica (por ejemplo, oligo-dT) que hibrida con una secuencia correspondiente a la que la hibridación se puede detectar fácilmente, por ejemplo, porque se ha inmovilizado en un soporte sólido.

Sin embargo, otras moléculas reporteras comprenden cromóforos, por ejemplo, fluorocromos para la detección visual, por ejemplo por microscopía de luz o técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH), o comprenden una enzima tal como peroxidasa de rábano picante para la detección enzimática, por ejemplo, en ensayos ligados a enzimas (EIA). Sin embargo, otras moléculas reporteras comprenden compuestos radiactivos para la detección en ensayos basados en radiación.

En un aspecto preferido de la descripción, al menos una sonda o iniciador se proporciona de acuerdo con la descripción (marcado) con una molécula reportera y una molécula de desactivación, proporcionando junto con la sonda o iniciador no marcado una prueba basada en PCR que permite la detección rápida de la hibridación específica.

La descripción proporciona además una prueba de diagnóstico o kit de prueba que comprende una sonda o iniciador como se proporciona por la descripción. Una prueba o kit de prueba de ese tipo, por ejemplo, una prueba de hibridación cruzada o prueba basada en PCR, se usa favorablemente en la detección rápida y/o la serotipificación de *Streptococcus suis*. La descripción proporciona además una proteína o fragmento de esta codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la descripción. Ejemplos de una proteína o fragmento de este tipo son por ejemplo las proteínas descritas por ejemplo, en la Tabla 2 de la descripción, por ejemplo una proteína *cpsA* se proporciona funcionalmente codificando la regulación de la síntesis de polisacárido capsular, mientras que *cpsB* y *cpsC* se implican funcionalmente en la determinación de la longitud de la cadena. Otras proteínas o fragmentos funcionales de estos como se proporciona por la descripción, tales como *cpsD*, E, F, G, H, I, J, K y proteínas relacionadas, se implican en la biosíntesis de polisacáridos, funcionando por ejemplo como glucosil- o glicosiltransferasa en la biosíntesis de polisacáridos del antígeno capsular de *Streptococcus suis*.

La descripción proporciona además un método para producir un antígeno capsular de *Streptococcus suis* que comprende usar una proteína o fragmento funcional de este como se proporciona por la invención descrita, y proporciona con ello un antígeno capsular de *Streptococcus suis* obtenible por un método de ese tipo. Una comparación de las secuencias de aminoácidos previstas de los genes *cps2* con secuencias encontradas en las bases de datos permitió la asignación de funciones a los marcos de lectura abiertos. La región central contiene las glicosiltransferasas tipo específicas y la polimerasa de polisacárido putativa. Esta región se flanquea por dos regiones que codifican para las proteínas con funciones comunes, tales como la regulación y transporte de polisacárido través de la membrana.

La biosíntesis del antígeno polisacárido capsular de *Streptococcus* usando una proteína o fragmento funcional de esta se usa favorablemente en la síntesis quimio-enzimática y el desarrollo de vacunas que ofrecen protección contra la enfermedad estreptocócica serotipo-específica, y se usa favorablemente además en la síntesis y el desarrollo de las vacunas multivalentes contra las infecciones estreptocócicas. Tales vacunas inducen anticuerpos anticapsular que confieren protección.

El documento de Quessy S y otros (1994) Can. J. Vet. Res., vol.58, pp.299-301 y el documento de Busque P y otros (1997) Can. J. Vet. Res., vol.61, pp.275-279 describe inmunización de resp ratones. de cerdos contra la infección por *S. suis* serotipo 2, usando la cepa de *S.suis* #1330 viva avirulenta serotipo 2. Dicha cepa # 1330 es una cepa avirulenta caracterizada por un defecto en el espesor de polisacárido capsular cuando se crece *in vivo*.

Resumen de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención proporciona un mutante sin cápsula de *Streptococcus suis* que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (CPS) para el uso en una vacuna, y una vacuna que comprende dicho mutante *s. suis* sin cápsula. Sorprendentemente, y en contra del grano de la doctrina común, la invención proporciona el uso de dicho mutante de *Streptococcus suis* sin cápsula deficiente en la expresión capsular y que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (CPS) en la preparación de una vacuna.

Los mutantes de *Streptococcus* sin cápsula se conocen desde mucho tiempo en la técnica y se pueden encontrar en la naturaleza. Griffith (J. Hyg. 27:113-159, 1928) demostró que los neumococos se puede transformar de un tipo a otro. Si se inyecta neumococos tipo 2 (sin cápsula o sin encapsular) vivo rugoso en los ratones, los ratones podrían sobrevivir. Cuando, sin embargo, se inyecta la misma dosis de tipo 2 viva rugosa mezclada con la de tipo 1 lisa destruida por calor (encapsulada) en un ratón, el ratón podría morir, y de la sangre se puede aislar neumococos vivo liso tipo 1. En ese momento, la importancia de este principio transformador no se entendió. Sin embargo, el entendimiento se produjo cuando se demostró que el ADN constituye el material genético responsable de los cambios fenotípicos durante la transformación.

Los mutantes de *Streptococcus* deficientes en la expresión capsular se encuentran en varias formas. Algunos son totalmente deficientes y no tienen ninguna cápsula en absoluto, otros forman una cápsula deficiente, caracterizada por una mutación en un agregado génico capsular. La deficiencia por ejemplo, puede incluir la formación capsular en donde la organización del material capsular se ha reorganizado, como por ejemplo demostrable por microscopía electrónica. Sin embargo, otros tienen una cápsula casi completamente desarrollada que sólo es deficiente en un componente particular de azúcar.

Ahora, después de mucho avance de la biotecnología y, a pesar del hecho de que todavía se sabe poco sobre la localización exacta y la secuencia de los genes implicados en la síntesis capsular en *Streptococcus*, es posible crear mutantes de estreptococos, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o mutagénesis de transposones, que por ejemplo, ha sido hecho por GAS (Wessels y otros, PNAS 88:8317-8321, 1991), para GBS (Wesels y otros, PNAS 86: 8983-8987, 1989), para *S. suis* (Smith, ID-DLO Annual report 1996, página 18-19; Charland y otros, Microbiol. 144:325-332, 1998) y para *S. pneumonia* (Kolkman y otros, J. Bact. 178:3736-3741, 1996). Tales mutantes recombinantes derivados, o mutantes isogénicos, se pueden comparar fácilmente con las cepas silvestres de la que se han derivado.

En una modalidad preferida, la invención proporciona el uso de un mutante de *Streptococcus suis* sin cápsula derivado recombinante que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (CPS) y deficiente en la expresión capsular en la preparación de una vacuna. Las técnicas recombinantes útiles en la producción de tales mutantes son, por ejemplo recombinación homóloga, mutagénesis de transposones, y otras, de manera que las deleciones, inserciones o mutaciones (puntuales) se introducen en el genoma. Las ventajas del uso de técnicas recombinantes son la estabilidad de los mutantes obtenidos (especialmente con las técnicas de recombinación homóloga y cruzamiento doble), y el conocimiento acerca del sitio exacto de la deleción, mutación o inserción.

En una modalidad mucho más preferida, la invención proporciona un mutante sin cápsula estable deficiente en la expresión capsular y que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (CPS) obtenible por ejemplo a través de

recombinación homóloga o cruzamiento en los eventos de integración. Ejemplos de un mutante de ese tipo se puede encontrar en la parte experimental de esta descripción, por ejemplo el mutante 10cpsB o 10cpsEF es un mutante estable de ese tipo como se proporciona por la invención.

5 La invención proporciona además un mutante de *Streptococcus suis* sin cápsula que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (CPS) como una cepa de vacuna y una vacuna que comprende dicho mutante de *Streptococcus*. Generalmente, dicha cepa o vacuna es aplicable dentro de toda la variedad de infecciones estreptocócicas, ya sea para aquellas con animales o el hombre o con infecciones zoonóticas. Por supuesto, es posible ahora seleccionar primero una cepa de vacuna común y derivar un mutante de *Streptococcus* deficiente en la expresión capsular de este para la selección de una cepa de vacuna y el uso en la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención.

10 Con la presente la invención se proporcionan vacunas para usar con *Streptococci suis* notoriamente heterólogos, de los que existe una multitud de serotipos. Con una vacuna como se proporciona por la invención que se deriva de un mutante específico de *Streptococcus suis* que es deficiente en la expresión capsular, las dificultades relativas a la falta de protección heteróloga pueden eludirse ya que estos mutantes no se basan en antígenos capsulares per se para inducir protección.

15 En una modalidad preferida, dicha cepa de vacuna se selecciona por su capacidad para sobrevivir o incluso replicar en una célula inmunocompetente o células huésped y por lo tanto puede persistir por un período determinado, que varía entre 1-2 días a más de una o dos semanas, en un huésped, a pesar de su carácter deficiente.

20 Aunque un huésped inmunodeficiente soportará la replicación de una amplia variedad de bacterias que son deficientes en uno o más factores de virulencia, generalmente se considera una característica de la patogenicidad de estreptococos que pueden sobrevivir durante ciertos períodos o replicar en un huésped normal o células huésped tales como macrófagos. Por ejemplo, Williams and Blakemore (Neuropath. Appl. Neurobiol.: 16, 345-356, 1990; Neuropath. Appl. Neurobiol.: 16, 377-392, 1990; J. Infect. Dis.: 162, 474-481, 1990) muestran que tanto las células polimorfonucleares y las células de macrófagos son capaces de fagocitar *S. suis* patogénicos en cerdos que carecen de anticuerpos anti-*S. suis*, sólo la bacteria patogénica puede sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos en el cerdo.

25 En una modalidad preferida, la invención, sin embargo, proporciona una cepa vacunal o mutante deficiente o avirulenta como se especifica en las reivindicaciones, que es capaz de sobrevivir al menos 4-5 días, de preferencia al menos 8-10 días en dicho huésped, y de ese modo permitir el desarrollo de una respuesta inmune a la infección por *Streptococcus* posterior,

30 Debido a su carácter persistente, pero avirulento, un mutante o cepa de vacuna de *Streptococcus* como se proporciona por la invención y específica en las reivindicaciones es muy adecuado para generar respuestas inmunes específicas y/o de larga duración contra antígenos estreptocócicos, además porque posibles respuestas inmunes específicas del huésped dirigidas contra una cápsula son relativamente irrelevantes porque una cepa de vacuna como se proporciona por la invención y específica en las reivindicaciones generalmente no se reconoce por dichos anticuerpos.

35 Adicionalmente, la invención proporciona una cepa de vacuna de *Streptococcus* como se especifica en las reivindicaciones, cuya cepa comprende un mutante capaz de expresar un factor de virulencia o determinante antigénico de *Streptococcus*.

40 En una modalidad preferida, dicho factor de virulencia o determinante antigénico se selecciona de un grupo de componentes celulares, tales como la proteína liberada por muramidasa (MRP) factor extracelular (EF) y proteínas asociadas a la membrana de la célula, proteína de choque térmico de 60 kDA, proteína A de superficie neumocócica (Psp A), neumolisina, proteína C, proteína M, fimbrias, hemaglutininas y hemolisina o componentes funcionalmente relacionado a él.

45 En una modalidad mucho más preferida, la invención proporciona una cepa de vacuna de *Streptococcus* como se especifica en las reivindicaciones, cuya cepa comprende un mutante capaz de sobre-expresar dicho factor de virulencia. De esta manera, la invención proporciona una cepa de vacuna para la incorporación en una vacuna que específicamente causa un huésped para proporcionar una respuesta inmune dirigida contra determinantes de virulencia antigénicamente importantes (listados anteriormente), proporcionando de ese modo una protección específica dirigida contra dichos determinantes. La sobreexpresión por ejemplo se puede lograr por la clonación del gen implicado detrás de un promotor fuerte, que se expresa, por ejemplo constitucionalmente en un sistema multicopia, ya sea en un plásmido o mediante la integración en un genoma.

En aún otra modalidad, la invención proporciona una cepa de vacuna de *Streptococcus* como se especifica en las reivindicaciones, que comprende un mutante capaz de expresar una proteína no de *Streptococcus*. Un vector-cepa de vacuna de *Streptococcus* de ese tipo permite, cuando se usa en una vacuna, la protección contra otros patógenos de *Streptococcus*

5

Debido a su carácter persistente, pero avirulento, una cepa de vacuna o mutante de *Streptococcus* como se proporciona por la invención es muy adecuada para generar una respuesta inmunitaria específica y de larga duración, no sólo contra los antígenos estreptocócicos, sino también contra otros antígenos cuando éstos se expresan por dicha cepa. Especialmente los antígenos derivados de otro patógeno se expresan ahora sin los efectos perjudiciales de dicho antígeno o patógeno que de cualquier otra forma habrían perjudicado el huésped

10

Un ejemplo de un vector de ese tipo es una cepa de vacuna o mutante de *Streptococcus* como se especifica en las reivindicaciones en donde dicho antígeno se deriva de un patógeno, tales como *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Mycoplasmatae*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Serpulina* y otros.

15

La invención proporciona además una vacuna que comprende una cepa de vacuna o mutante de *Streptococcus* como se especifica en las reivindicaciones y que comprende además un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los portadores o adyuvantes son bien conocidos en la técnica, ejemplos son solución salina regulada con fosfato, soluciones salinas fisiológicas, emulsiones de aceite en agua (doble), hidróxido de aluminio, Specol, bloqueadores o co-polímeros, y otros.

20

Una vacuna como se especifica en las reivindicaciones puede comprender una cepa de vacuna ya sea en una forma muerta o viva. Por ejemplo, una vacuna muerta que comprende una cepa que tiene (sobre) expresa un antígeno estreptocócico o heterólogo o de factor de virulencia es muy adecuado para provocar una respuesta inmune. En una modalidad preferida, la invención proporciona una vacuna como se especifica en las reivindicaciones en donde dicha cepa está viva, debido a su carácter persistente, pero avirulento. Una cepa de la vacuna de *Streptococcus* que se especifica en las reivindicaciones es muy adecuada para generar respuestas inmunes específicas y de larga duración.

25

Ahora que una vacuna estreptocócica como se especifica en las reivindicaciones se proporciona por la invención, la invención proporciona además un método como se especifica además en las reivindicaciones para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica.

30

En una modalidad preferida, se proporciona un método para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica causada por *Streptococcus suis* que comprende probar una muestra, tal como una muestra de sangre, o exudado nasal o garganta, heces, orina, u otras muestras, tales como puede ser muestreada a o después del sacrificio, recogida de al menos un sujeto, tal como un bebé o un cerdo, en una población vacunada con una vacuna que se especifica en las reivindicaciones para la presencia de cepas de *Streptococcus suis* encapsulados. Ya que una cepa de vacuna o mutante de acuerdo con la invención no es patogénica, y puede distinguirse de las cepas silvestres mediante la expresión capsular, la detección de cepas estreptocócicas encapsuladas (completamente) indica que las infecciones silvestre todavía están presentes. Tales sujetos infectados con el silvestre pueden aislarse del resto de la población hasta que la infección ha desaparecido. Con los animales domésticos, tales como los cerdos, es aún posible eliminar en su conjunto seleccionando al sujeto infectado de la población. La detección de cepas silvestres se puede lograr a través de técnicas de cultivo tradicionales, o por técnicas de detección rápida, tales como la detección por PCR.

35

40

En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica causada por *Streptococcus suis* que comprende probar una muestra recogida de al menos un sujeto en una población vacunada con una vacuna como se especifica en las reivindicaciones para la presencia de anticuerpos específicos a la cápsula dirigidos contra las cepas de *Streptococcus suis*. Los anticuerpos específicos a la cápsula se pueden detectar con técnicas clásicas conocidas en la técnica, tales como las usadas para tipificar o serotipificar el grupo de Lancefield.

45

50

Una modalidad mucho más preferida de un método proporcionado por la invención para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica causada por *Streptococcus suis* en una población vacunada con una vacuna como se especifica en las reivindicaciones que comprende probar una muestra recogida de al menos un sujeto en dicha población para la presencia de las cepas de *Streptococcus suis* encapsuladas y/o para la presencia de anticuerpos específicos a la cápsula dirigidos contra cepas de *Streptococcus suis*.

55

Se describe además un ensayo de diagnóstico para probar una muestra para el uso en un método de acuerdo con la invención que comprende al menos un medio para la detección de cepas estreptocócicas encapsuladas y/o para la detección de anticuerpos específicos a la cápsula dirigidos contra cepas estreptocócicas.

La descripción proporciona además una vacuna que comprende un antígeno de acuerdo con la invención y que comprende además un portador o adyuvante adecuado. La inmunogenicidad de un antígeno capsular por ejemplo, se aumenta por el enlace a un portador (tal como una proteína portadora), permitiendo el reclutamiento de células T de ayuda al desarrollar una respuesta inmune.

La descripción proporciona además un microorganismo recombinante proporcionado con al menos una parte de un agregado génico capsular derivado de *Streptococcus suis*. La descripción proporciona, por ejemplo, una bacteria de ácido láctico proporcionada con al menos una parte de un agregado génico capsular derivado de *Streptococcus suis*. Varias bacterias del ácido láctico de calidad alimentaria (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus* y *Streptococcus gordonii* Plantarium) se han usado como sistemas de suministro para la inmunización de la mucosa. Se ha demostrado ahora que la administración oral (o mucosa) de *L. lactis* recombinante, *Lactobacillus*, y *Streptococcus gordonii* puede provocar respuestas locales de anticuerpo IgA y/o IgG para un antígeno expresado. Es deseable el uso de rutas orales para la inmunización contra las enfermedades infecciosas porque las vacunas orales son más fáciles de administrar, tienen mayores tasas de cumplimiento, y porque las superficies de las mucosas son las puertas de entrada para muchos agentes microbianos patogénicos. Está dentro de la experiencia del artesano proporcionar dichos microorganismos con genes (adicionales).

La descripción proporciona además un mutante de *Streptococcus suis* recombinante proporcionado con un agregado génico capsular modificado. Está dentro de la experiencia del artesano intercambiar genes dentro de una especie. En un aspecto preferido, un mutante de *Streptococcus suis* avirulento se selecciona para ser proporcionado con al menos una parte de un agregado génico capsular modificado de acuerdo con la descripción.

La descripción proporciona además una vacuna que comprende un microorganismo o un mutante proporcionado por la descripción. Una ventaja de una vacuna de ese tipo sobre las vacunas usadas actualmente es que comprenden microorganismos definidos exactamente y antígenos bien caracterizados, lo que permite la determinación exacta de respuestas inmunológicas contra varios antígenos de elección. La invención se explica además en la parte experimental de esta descripción sin limitar la invención a ella.

Parte experimental

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla 1. Las cepas *S. suis* se cultivaron en caldo Todd-Hewitt (código CM189, Oxoid), y sembraron en base de agar sangre Columbia (código CM331, Oxoid) que contiene 6% (v/v) de sangre de caballo. Las cepas *E. coli* se cultivaron en caldo Luria (28) y sembraron en caldo Luria que contiene 1.5% (p/v) de agar. Cuando se necesitó, se añadieron a las placas los antibióticos a las siguientes concentraciones: espectinomicina: 100 ug/ml para *S. suis* y 50 ug/ml para *E. coli* y ampicilina, 50 ug/ml.

Serotipificación. Las cepas de *S.suis* se serotipificaron por la prueba de aglutinación en lámina con anticuerpos serotipo-específicos (44).

Técnicas de ADN. Las manipulaciones de ADN de rutina se realizaron como se describe por Sambrook y otros (36).

Actividad de fosfatasa alcalina. Para tamizar las fusiones de PhoA en *E.coli*, se construyeron bibliotecas de plásmido. Por lo tanto, el ADN cromosómico de *S. suis* tipo 2 se digirió con *AluI*. Los fragmentos de 300-500-pb se ligaron a pPHOS2 digerido con *SmaI*. Las mezclas de ligación se transformaron con la cepa PhoA- *E. coli* CC118. Los transformantes se sembraron en medio LB suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, 50 ug/ml, Boehringer, Mannheim, Alemania). Las colonias azules se purificaron en placas nuevas de LB/BCIP para verificar el fenotipo azul.

- 5 **Análisis de secuencia de ADN.** Las secuencias de ADN se determinaron en un Sistema de Secuenciación de ADN 373A (Applied Biosystems, Warrington, GB). Las muestras se prepararon por el uso de un kit de reacción listo para la secuenciación en ciclo con terminador colorante ABI /PRISM (Applied Biosystems). Los datos de secuenciación se ensamblaron y analizaron usando el programa MacMollyTetra. Los iniciadores de secuenciación hechos por encargo se adquirieron de Life Technologies. Los tramos hidrofóbicos dentro de las proteínas fueron previstos por el método de Klein y otros (17). El programa BLAST disponible en Netscape Navigator™ se usó para buscar secuencias de proteínas relacionadas con las secuencias de aminoácidos deducidas.
- 10 **Construcción de mutantes knock-out específicos a los genes de *S. suis*.** Para construir las cepas mutantes 10cpsB y 10cpsEF electrotransformamos la cepa 10 del serotipo 2 patogénica (45, 49) de *S. suis* con pCPS11 y pCPS28 respectivamente. En estos plásmidos los genes de *cpsB* y *cpsEF* se alteraron por la inserción de un gen de resistencia a espectinomicina. Para crear pCPS11 el fragmento interno *PstI*-*Bam*HI de 400 pb del gen *cpsB* en pCPS7 se substituyó por el gen *Spc^R*. Para este propósito pCPS7 se digirió con *PstI* y *Bam*HI y se ligó al fragmento *PstI*-*Bam*HI de 1,200-bp, que contiene el gen *Spc^R*, de pIC-spc. Para construir pCPS28 se usó pIC20R. En este plásmido se insertó el fragmento *KpnI*-*SalI* de pCPS17 (resultando en pCPS25) y el fragmento *XbaI*-*ClaI* de pCPS20 (resultando en pCPS27). pCPS27 se digirió con *PstI* y *XhoI* y se ligó al fragmento de *PstI*-*XhoI* de 1,200-bp, que contiene el gen *Spc^R* de pIC-spc. La electrotransformación a *S. suis* se llevó a cabo como se describe anteriormente (38).
- 15 **Transferencia de Southern e hibridación.** El ADN cromosómico se aisló como se describe por Sambrook y otros. (36). Los fragmentos de ADN se separaron en geles de 0.8% agarosa y se transfirieron a membranas Zeta-Probe GT (Bio-Rad) como se describe por Sambrook y otros (36). Las sondas de ADN se marcaron con [³²P]dCTP (3000 Ci mmol⁻¹; Amersham) mediante el uso de un kit de marcaje por cebado al azar (Boehringer). El ADN en las membranas se hibridizó a 65 °C con sondas de ADN adecuadas como se recomienda por el proveedor de las membranas Zeta-Probe. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces con una solución de 40 mM fosfato sódico, pH 7.2, 1 mM EDTA, 5 % SDS por 30 min a 65 °C y dos veces con una solución de 40 mM fosfato sódico, pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 % SDS por 30 min a 65 °C.
- 20 **PCR.** Los iniciadores usados en la PCR de *decps2J* corresponden a las posiciones 13791-13813 y 14465-14443 en el locus de *S. suis cps2*. Las secuencias fueron: 5'-CAAACGCAAGGAATTACGGTATC-3' y 5'-GAGTATCTAAAGAATGCCTATTG-3'. Los iniciadores usados para la PCR de *cps1I* corresponden a las posiciones 4398-4417 y 4839-4821 en la secuencia de *S. suis cps1*. Las secuencias fueron: 5'-GGCGGTCTAGCAGATGCTCG-3' y 5'-GCGAACTGTTAGCAATGAC-3'. Los iniciadores usados en la PCR de *cps9H* corresponden a las posiciones 4406-4126 y 4494-4475 en la secuencia de *S. suis cps9*. Las secuencias fueron: 5'-GGCTACATATAATGGAAGCCC3' y 5'-CGGAAGTATCTGGGCTACTG-3'.
- 25 **Construcción de mutantes knock-out específicos a los genes de *S. suis*.** Para construir las cepas mutantes 10cpsB y 10cpsEF electrotransformamos la cepa 10 del serotipo 2 patogénica de *S. suis* con pCPS11 y pCPS28 respectivamente. En estos plásmidos los genes *cpsB* y *cpsEF* se alteraron por la inserción de un gen de resistencia a espectinomicina. Para crear pCPS11 el fragmento *PstI*-*Bam*HI de 400 pb interno del gen *cpsB* en pCPS7 se substituyó por el gen *Spc^R*. Para este propósito pCPS7 se digirió con *PstI* y *Bam*HI y se ligó al fragmento *PstI*-*Bam*HI de 1,200-bp, que contiene el gen *Spc^R*, de pIC-spc. Para construir pCPS28 se usó pIC20R. En este plásmido se insertó el fragmento *KpnI*-*SalI* de pCPS17 (resultando en pCPS25) y el fragmento *XbaI*-*ClaI* de pCPS20 (resultando en pCPS27). pCPS27 se digirió con *PstI* y *XhoI* y se ligó al fragmento de *PstI*-*XhoI* de 1,200-bp, que contiene el gen *Spc^R* de pIC-spc. La electrotransformación de *S. suis* se llevó a cabo como se describió antes (38).
- 30 **Ensayo de fagocitosis.** Los ensayos de fagocitosis se realizaron como se describe por Leij y otros (23). En resumen, para opsonizar las células, 10⁷ *S. suis* células se incubaron con 6% suero de cerdo SPF durante 30 minutos a 37 °C en un rotor de cabeza-sobre-cabeza a 6 rpm. 10⁷ AM y 10⁷ células opsonizadas de *S. suis* se combinaron y se incubaron a 37 °C bajo rotación continua a 6 rpm. A los 0, 30, 60 y 90 min, muestras de 1 ml se recogieron y mezclaron con 4 ml de EMEM helado para detener la fagocitosis. Los fagocitos se eliminaron por centrifugación durante 4 min a 110 x g y 4 °C. El número de unidades formadoras de colonias (ufc) en los sobrenadantes se determinó. Los experimentos de control se llevaron a cabo simultáneamente combinando 10⁷ células opsonizadas de *S. suis* con EMEM (sin AM).
- 35 **Ensayos de destrucción.** AM (10⁷/ml) y células opsonizadas de *S. suis* (10⁷/ml) se mezclaron 1 : 1 e incubaron durante 10 min a 37 °C bajo rotación continua a 6 rpm. EMEM helado se añadió para detener además la fagocitosis y destrucción. Para

eliminar las células *S. suis* extracelulares se lavaron dos veces los fagocitos (4 min, 110 xg, 4 °C) y se resuspendieron en 5 ml de EMEM que contiene 6% suero SPF. Los tubos se incubaron a 37 °C bajo rotación a 6 rpm. Después de 0, 15, 30, 60 y 90 minutos, se recogieron las muestras y mezclaron con EMEM helado para detener además la destrucción. Las muestras se centrifugaron durante 4 min a 110 x g a 4 °C y las células fagocíticas se lisaron en EMEM que contiene 1% saponina durante 20 min a temperatura ambiente. Se determinó el número de ufc en las suspensiones.

Cerdos. Cerdos libres de gérmenes, cruces de Gran Yorkshire y Dutch Landrace, se obtuvieron de las cerdas, por cesárea. La cirugía se realizó en aisladores estériles de película flexible. Los cerdos se asignaron a los grupos, cada uno que consiste en 4 cerdos, y se alojaron en incubadoras estériles de acero inoxidable.

Infecciones experimentales. Los cerdos se inocularon por vía intranasal con *S. suis* tipo 2 como se describió antes. Para predisponer a los cerdos para la infección con *S. suis*, cerdos de cinco días edad se inocularon por vía intranasal con aproximadamente 10^7 ufc de la cepa *Bordetella bronchiseptica* 92932. Dos días después, los cerdos se inocularon por vía intranasal con *S. suis* tipo 2 (10^6 ufc). Los cerdos se controlaron dos veces al día para los signos clínicos de la enfermedad, tales como fiebre, signos nerviosos y cojera. Las muestras de sangre se recogieron tres veces a la semana de cada cerdo. Los glóbulos blancos se contaron con un contador de células. Para controlar la infección con *S. suis* y *B. bronchiseptica* y comprobar la ausencia de contaminantes, se recogieron exudados de nasofaringe y heces diariamente. Los exudados se sembraron directamente sobre agar Columbia que contiene 6% sangre de caballo. Después de tres semanas los cerdos se sacrificaron y examinaron para cambios patológicos. Las muestras de tejido del sistema nervioso central, serosas, y articulaciones se examinaron histológicamente y bacteriológicamente como se describió antes (45, 49). La colonización de serosas se marcó positivamente cuando *S. suis* se aisló del pericardio, pleura torácica o el peritoneo. La colonización de las articulaciones se marcó positivamente cuando *S. suis* se aisló de una o más articulaciones (se marcaron 12 articulaciones por animal).

25 Vacunación y reto

Los cerdos de una semana se vacunaron por vía intravenosa con una dosificación de 106 ufc de las cepas de *S. suis* 10cpsEF o 10cpsB. Tres semanas más tarde los cerdos se retaron por vía intravenosa con la cepa 10 serotipo 2 patogénica (107 ufc). El control de la enfermedad, los exámenes hematológicos, serológicos y bacteriológicos, así como exámenes post-mortum fueron como los descritos antes en las infecciones experimentales.

Microscopía Electrónica. Las bacterias se prepararon para la microscopía electrónica como se describe por Wagenaar y otros (50). En breve, las bacterias se mezclaron con agarosa MP (Boehringer) de 37 °C a una concentración de 0.7%. La mezcla se enfrió inmediatamente en hielo. Tras gelificar, las muestras se cortaron en láminas de 1 a 1.5 mm y se incubaron en un fijador que contiene 0.8% glutaraldehído y 0.8% tetraóxido de osmio. Posteriormente, las muestras se fijaron y tiñeron con acetato de uranilo por estimulación de microondas, deshidrataron y embebieron en resina eponaraldita. Las secciones ultra-delgadas se contrastaron con citrato de plomo y examinaron con un microscopio electrónico Philips CM 10 a 80 kV.

Aislamiento de los macrófagos alveolares porcinos (AM). AM porcinos se obtuvieron de los pulmones de cerdos libres de patógenos específicos (SPF). Se recogieron muestras de lavado de pulmón como se describe por van Leengoed y otros (43). Las células se suspendieron en EMEM que contiene 6% (v/v) de suero de cerdos SPF y se ajustaron a 10^7 células por ml.

45 RESULTADOS

Identificación del locus de cps.

El locus *cps* locus de *S. suis* tipo 2 se identificó haciendo uso de una estrategia desarrollada para la identificación genética de las proteínas exportadas (13, 31). En este sistema hicimos uso de un plásmido (pPHOS2) que contiene un gen truncado de la fosfatasa alcalina (13). El gen carecía de la secuencia del promotor, el sitio de inicio de la traducción y la secuencia señal. El gen truncado se precede por un único sitio de restricción *Sma*I. ADN cromosómico de *S. suis* tipo 2, digerido con *Alu*I, se clonó al azar en este sitio de restricción. Debido a que la translocación de PhoA a través de la membrana citoplasmática de *E. coli* se necesita para la actividad enzimática, el sistema se puede usar para seleccionar fragmentos de *S. suis* que contienen una secuencia de promotor, un sitio de iniciación de la traducción y una secuencia señal funcional. Se probaron entre 560 clones individuales de *E. coli*, 16 mostraron un fenotipo azul oscuro cuando se sembraron en medios

que contienen BCIP. El análisis de secuencia de ADN de los insertos a partir de varios de estos plásmidos se realizaron (resultados no mostrados) y se analizaron las secuencias de aminoácidos deducidas. El perfil de hidrofobicidad de uno de los clones (pPHOS7, resultados no mostrados) demostró que la parte N-terminal de la secuencia se asemejaba a las características de un péptido señal típico: una región corta N-terminal hidrofílica es seguida por una región hidrofóbica de 38 aminoácidos. Estos datos indican que el sistema *phoA* se usó con éxito para la selección de genes *S. suis* que codifican proteínas exportadas. Además, las secuencias se analizaron para las similitudes presentes en las bases de datos. La secuencia de pPHOS7 mostró una alta similitud (37% de identidad) con la proteína codificada por el gen *cps14Cde Streptococcus pneumoniae* (19). Esto sugiere fuertemente que pPHOS7 contiene una parte del operon *cps* de *S. suis* tipo 2.

Clonación de los genes *cps* flanqueantes. Para clonar los genes flanqueantes *cps* de *S. suis* tipo 2 el inserto de pPHOS7 se usó como una sonda para identificar los fragmentos de ADN cromosómico que contienen los genes flanqueantes *cps*. Un fragmento *HindIII* de 6-kb se identificó y clonó en pKUN19. Este produjo el clon pCPS6 (Fig. 1C). El análisis de secuencia del inserto de pCPS6 reveló que pCPS6 más probablemente contuvo el extremo 5' del locus *cps*, pero todavía carece del extremo 3'. Por lo tanto, las secuencias de los extremos 3' de pCPS6 se usan a su vez como una sonda para identificar los fragmentos cromosómicos que contienen secuencias *cps* localizadas además corriente abajo. Estos fragmentos se clonaron además en pKUN19, resultando en pCPS17. Usando el mismo sistema de paseo cromosómico posteriormente generamos los plásmidos, pCPS18 pCPS20, pCPS23 y pCPS26, que contienen la secuencia *cps* corriente abajo.

Análisis del operón *cps*. Se determinó la secuencia completa de nucleótidos de los fragmentos clonados (figura 4) El examen de la secuencia compilada reveló la presencia de al menos 13 marcos de lectura abierto (Orfs), potenciales que se designaron como Orf 2Y, Orf2X y Cps2A-Cps2K (Fig. 1A). Además, un 14to incompleto, Orf (Orf 2Z) se localizó en el extremo 5' de la secuencia. Se identificaron dos posibles secuencias promotoras. Uno se localizó 313 bp (lugares 1885-1865 y 1884-1889) corriente arriba de Orf2X. La otra secuencia promotora potencial se localizó 68 bp corriente arriba de Orf2Y (lugares 2241-2236 y 2216-2211). Orf2Y se expresa en orientación opuesta. Entre Orfs 2Y y 2Z la secuencia contenía una estructura tallo-lazo potencial, que puede actuar como un terminador de la transcripción. Cada Orf se precede por un sitio de unión al ribosoma y la mayoría de los Orfs se enlazan muy estrechamente. La única interrupción intergénica significativa se encontró entre Cps2G y Cps2H (389 nucleótidos). Sin embargo, no se encontraron en esta región secuencias promotoras potenciales obvias o estructuras de tallo-lazo. Estos datos sugieren que Orf2X y Cps2A-Cps2K se disponen como un operón.

Una visión general de todos los Orfs con sus propiedades se muestra en la Tabla 2. La mayoría de los productos génicos previstos se relaciona con las proteínas implicadas en la biosíntesis de polisacáridos. Orf2Z mostró cierta similitud con la proteína YitS de *Bacillus subtilis*. YitS se identificó durante el análisis de la secuencia del genoma completo de *B. subtilis*. La función de la proteína se desconoce.

Orf2Y mostró similitud con la proteína YcxD de *B. subtilis* (53). Basado en la similitud entre YcxD y MocR de *Rhizobium meliloti* (33), YcxD se sugirió que es una proteína reguladora.

Orf2X mostró similitud con las proteínas YAAA hipotéticas de *Haemophilus influenzae* y *E. coli*. La función de esas proteínas se desconoce.

Los productos génicos codificados por los genes *cps2A*, *cps2B*, *cps2C* y *ycps2D* mostraron similitud aproximada con las proteínas CpsA, CpsC, CpsD y CpsB de varios serotipos de *Streptococcus pneumoniae*(19), respectivamente. Esto sugiere funciones similares para estas proteínas. Por lo tanto, Cps2A puede tener un papel en la regulación de la síntesis del polisacárido capsular. Cps2B y Cps2C se pueden implicar en la determinación de la longitud de la cadena de la cápsula de tipo 2 y Cps2C puede jugar un papel adicional en la exportación del polisacárido. La proteína Cps2D de *S. suis* se relaciona con la proteína CpsB de *S. pneumoniae* y con las proteínas codificadas por los genes de varias otras bacterias Gram-positivas implicadas en la síntesis de polisacárido o de exopolisacáridos, pero su función se desconoce (19).

La proteína codificada por el gen *cps2E* mostró similitud a muchas proteínas bacterianas con actividades de glicosil transferasa: Cps14E y Cps19fE de los serotipos 14 y 19F (18, 19, 29) de *S. pneumoniae*, CpsE de *Streptococcus salivarius* (X94980) y CpsD de *Streptococcus agalactiae* (34). Recientemente, Kolkman y otros (18) mostraron Cps14E es una glucosil-1-fosfato transferasa que une la glucosa a un portador lípido, la primera etapa en la biosíntesis de la unidad de repetición tipo 14 de *S. pneumoniae*. Basado en estos datos una función similar se puede cumplir por Cps2E de *S. suis*.

La proteína codificada por el gen *cps2F* mostró similitud con la proteína codificada por el gen *rfbU* de *Salmonella enteritica* (25). Esta similitud es más pronunciada en las regiones C-terminal de estas proteínas. El gen *rfbU* se demostró que codifica la actividad manosiltransferasa (25).

El gen *cps2G* codificó una proteína que muestra similitud moderada con el producto génico *rfbF* de *Campylobacter hyoilei* (22), el producto génico *epsF* de *S. thermophilus* (40) y el producto génico *capM* de *S. aureus* (24). Sobre la base de la similitud de los genes *rfbF*, *epsF* y *capM* se sugiere codificar las actividades de la galactosiltransferasa. De ahí que, una actividad similar a glicosil transferasa podría ser cumplida por el producto génico *cps2G*.

El gen *cps2H* codifica una proteína que es similar a la región N-terminal del producto génico *lgtD* de *Haemophilus influenzae* (U32768). Además, los gráficos de hidrofobicidad de Cps2H y LgtD parecieron muy similares en estas regiones (datos no mostrados). Basado en la similitud de secuencia se sugirió que el producto génico *lgtD* tiene actividad glicosilo transferasa (U32768).

El producto génico codificado por el gen *cps2I* mostró alguna similitud con una proteína de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AB002668). Esta proteína es parte de parte del agregado génico responsable del antígeno específico al serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*. La función de la proteína se desconoce.

Los productos génicos codificados por los genes *cps2J* y *cps2K* mostraron similitudes significativas con la proteína Cps14J de *S. pneumoniae*. El gen *cps14J* de *S. pneumoniae* mostró codificar una actividad β -1,4-galactosiltransferasa. En *S. pneumoniae* CpsJ es responsable de la adición de la cuarta (es decir, la última) azúcar en la síntesis del polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 14 (20). Aun algunas similitudes se encontraron entre Cps2J y Cps2K. 2, 25.5 % similitud). Esta similitud fue más pronunciada en las regiones N-terminal de las proteínas. Recientemente, dos pequeñas regiones conservadas se identificaron en el N-terminal de Cps14J y Cps14I y sus homólogos (20). Estas regiones fueron previstas que son importantes para la actividad catalítica. Ambas regiones, DXS y DXDD (Fig. 2), se encontraron también en Cps2J y Cps2K.

Distribución de los genes *cps2* en otros serotipos *S. suis*. Para examinar la relación entre los genes *cps2* y los genes *cps* en otros serotipos de *S. suis*, realizamos experimentos de hibridación cruzada. Los fragmentos de ADN de los genes *cps2* individuales se amplificaron por PCR, marcaron con ^{32}P , y usaron para sondear las membranas de Southern de ADN cromosómico de las cepas de referencia de 35 serotipos diferentes de *S. suis*. Se observaron grandes variaciones en los patrones de hibridación (Tabla 4). Como control positivo se usó una sonda específica para ARNr 16S. La sonda de ARNr 16S hibridizó con todos los serotipos probados. Sin embargo, ninguno de los otros genes probados fueron comunes en todos los serotipos. Basado en la organización genética de los genes sugerimos anteriormente que los genes *orfX* y *ycpsA-cpsK* son parte de un operón y que las proteínas codificadas por estos genes están todas implicadas en la biosíntesis de polisacárido. OrfY y OrfZ no son una parte de este operón, y su papel en la biosíntesis de polisacáridos no está clara. Basado en los datos de similitud de secuencias, OrfY se pueden implicar en la regulación de los genes *cps2*. Se propone que orfZ no está relacionado con la biosíntesis del polisacárido.

Las sondas específicas para los genes *orfZ*, *orfY*, *orfX*, *cpsA*, *cpsB*, *cpsC* y *cpsD* hibridan con la mayoría de los otros serotipos. Esto sugiere que la proteína codificada por estos genes no es de tipo-específica, pero puede realizar funciones más comunes en la biosíntesis del polisacárido capsular. Esto confirma los datos previos que mostraron que los genes *cps2A-cps2D* mostraron una fuerte similitud con los genes *cps* de varios serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Basado en esta similitud Cps2A es, posiblemente, una proteína reguladora, mientras que Cps2B y Cps2C pueden jugar un papel en la determinación de la longitud y la exportación del polisacárido. El gen *cps2E* hibridó con el ADN de los serotipos 1, 2, 14 y 1/2. El gen *cps2E* mostró una fuerte similitud con el gen *cps14E* de *S. pneumoniae* (18). Esta enzima demostró tener una actividad glucosil-1-fosfato y catalizó la transferencia de glucosa a un portador lipídico (18). Estos datos indican que una glicosiltransferasa estrechamente relacionada con Cps14E puede ser responsable de la primera etapa en la biosíntesis del polisacárido en los serotipos 1, 2, 14 y 1/2 de *S. suis*. Los genes *cps2F*, *cps2G*, *cps2H*, *cps2I* y *cps2J* hibridaron sólo con el ADN cromosómico de los serotipos 2 y 1/2. El gen *cps2G* mostró una señal de hibridación débil adicional con el ADN del serotipo 34. En las pruebas de aglutinación el serotipo 1/2 mostró aglutinación con sueros específicos para el serotipo 2, así como con sueros específicos para el serotipo 1. Esto sugiere que el serotipo 1/2 comparte determinantes antigénicos tanto con los tipos 1 como 2. Los datos de hibridación confirmaron estos datos. Todas las glicosiltransferasas putativas presentes en el serotipo 2, están presentes además en el serotipo 1/2. El gen *cps2K* mostró un patrón de hibridación similar como el

gen *cps2E*. Se observó la hibridación con el ADN de los serotipos 1, 2, 14 y 1/2. En conjunto estos datos de la hibridación muestran que el agregado génico *cps2* se puede dividir en tres regiones: una región central que contiene los genes tipo-específicos se flanquea por dos regiones que contienen genes comunes para varios serotipos.

5 **Clonación de los genes *cps* tipo-específicos de los serotipos 1 y 9.** Para clonar los genes *cps* tipo-específico de *S. suis* serotipo 1 usamos el gen *cps2E* como una sonda para identificar los fragmentos de ADN cromosómico de tipo 1, que contienen genes *cps* flanqueantes. Un fragmento *EcoRV* de 5 kb se identificó y clonó en pKUN19. Esto produjo pCPS1-1 (Figura 1B). Este fragmento se usó a su vez como una sonda para identificar un fragmento *HindIII* de superposición de 2.2 kb. pKUN19 que contiene este fragmento *HindIII* se designó pCPS1-2. La misma estrategia se siguió para identificar y clonar los genes *cps* tipo-específico del serotipo 9. En este caso, usamos los genes *cps2D* como una sonda. Un fragmento *HindIII-XbaI* de 0.8 kb se identificó y clonó, produciendo pCPS9-1 (Figura 1C). Este fragmento se usó a su vez como una sonda para identificar un fragmento *XbaI* de 4 kb. pKUN19 que contiene este fragmento *XbaI* 4 kb se designó pCPS9-2.

15 **Análisis de los genes *cps1* clonados.** La secuencia de nucleótidos completa de los insertos de pCPS1-1 y pCPS1-2 se determinó (figura 5). El examen de la secuencia reveló la presencia de cinco Orfs completos y dos incompletos (Figura 1B). Cada Orf se precede por un sitio de unión al ribosoma. De acuerdo con los datos obtenidos para los genes *cps2D* del serotipo 2, la mayoría de los Orf se enlaza muy estrechamente. Se encontró la única interrupción significativa (718 pb) entre Cps1G y Cps1H. No se pudieron encontrar secuencias promotoras evidentes o estructuras de tallo-lazo potenciales en esta región. Esto sugiere que, como en el serotipo 2, los genes *cps* en el serotipo 1 se disponen en un operón.

20 Una visión general de los Orfs y sus propiedades se muestra en la Tabla 2. Como era de esperar sobre la base de los datos de la hibridación (Tabla 4), la proteína codificada por el gen *cps1E* se relaciona con Cps2E de *S. suis* tipo 2 (identidad de 86 %). El fragmento clonado en pCPS1-1 careció de la región codificante para los primeros 7 aminoácidos del gen *cps1E*.

25 La proteína codificada por los genes *cps1F* y *cps1G* mostró fuerte similitud con las proteínas Cps14F y Cps14G de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14, respectivamente (20). La función del Cps14F no está completamente clara, pero se ha sugerido que Cps14F puede mejorar el papel de la actividad glicosiltransferasa. El gen *cps14G* de *S. pneumoniae* se mostró para codificar la actividad β -1,4-galactosiltransferasa. En el *S. pneumoniae* tipo 14 se necesita esta actividad para la segunda etapa en la biosíntesis de la subunidad de oligosacáridos (20). Basado en los datos de similitud encontraron la glicosiltransferasa similar y actividades que mejoran que se sugieren para los genes *cps1G* y *cps1F* de *S. suis* tipo 1.

30 La proteína codificada por el gen *cps1H* mostró similitud con la proteína Cps14H de *S. pneumoniae* (20). Basado en la similitud de secuencia Cps14H se propuso para ser la polimerasa del polisacárido (20).

35 La proteína codificada por el gen *cps1I* mostró cierta similitud con la proteína Cps14J de *S. pneumoniae* (19). El gen *cps14J* se mostró para codificar una actividad β -1,4-galactosiltransferasa, responsable de la adición de la cuarta (es decir, la última) de azúcar en la síntesis del polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae*.

40 Entre Cps1G y Cps1H se encontró una interrupción de 718 pb. Esta región reveló tres pequeños Orfs. Los tres Orfs se expresaron en tres marcos de lectura diferentes y no se precedieron por los sitios de unión al ribosoma potenciales, ni contenían los sitios de inicio potenciales. Sin embargo, los tres productos génicos potenciales codificados por esta región mostraron alguna similitud con tres regiones sucesivas de la parte C-terminal de la proteína de EpsK de *Streptococcus thermophilus* (27 % identidad, 40). La región relacionada con los primeros 82 aminoácidos falta.

45 **Análisis de los genes *cps9* clonados.** Determinamos además la secuencia de nucleótidos completa de los insertos de pCPS9-1 y pCPS9-2 (Figura 6). El examen de la secuencia reveló la presencia de tres Orfs completos y dos incompletos (Figura 1C). Al igual que en los serotipos 1 y 2, todos los Orfs se precedieron por un sitio de unión de ribosomas y están muy estrechamente acoplados. Como se sugirió por los datos de la hibridación (Tabla 4) las proteínas Cps2D y Cps9D se relacionaron altamente (Tabla 2). Basado en las comparaciones de secuencias pCPS9-1 careció de los primeros 27 aminoácidos de la proteína Cps9D.

50 La proteína codificada por el gen *cps9E* mostró cierta similitud con la proteína CapD de *Staphylococcus aureus* serotipo 1 (24). Basado en los datos de similitud de secuencias la proteína Cap1D se sugirió para ser una epimerasa o una deshidratasa implicada en la síntesis de N-acetilfructosamina o N-acetilgalactosamina (63).

Cps9F mostró cierta similitud con las proteínas CapM de *S. aureus* serotipos 5 y 8 (61, 64, 65). Basado en datos de similitud de secuencia Cap5M y Cap8M se proponen para ser glicosiltransferasas (63).

5 La proteína codificada por el gen *cps9G* mostró cierta similitud con una proteína de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AB002668_4). Esta proteína es parte de un agregado génico responsable de los antígenos específicos del serotipo b de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. La función de la proteína se desconoce.

10 La proteína codificada por el gen *cps9H* mostró cierta similitud con el gen *rfbB* de *Yersinia enterocolitica* (68). La proteína RfbB demostró ser esencial para la síntesis de O-antígeno, pero la función de la proteína en la síntesis del O:3 lipopolisacárido se desconoce.

15 **Genes *cps* específico a serotipo 1 y serotipo 9.** Para determinar si los fragmentos clonados en pCPS1-1, pCPS1-2, pCPS9-1 y pCPS9-2 contenían los genes tipo-específicos para el serotipo 1 y 9, respectivamente, se realizaron experimentos de hibridación cruzada. Los fragmentos de ADN de los genes individuales *cps1* y *cps9* se amplificaron por PCR, marcaron con ³²P, y usaron para sondear las membranas de Southern de ADN cromosómico de las cepas de referencia de los 35 serotipos diferentes de *S. suis*. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Basado en los datos obtenidos con la sonda *cps2E* (Tabla 4), la sonda *cps1E* se esperó hibridar con el ADN cromosómico de los serotipos 1,2, 14, 27 y 1/2 de *S. suis*. Las sondas *cps1H*, *cps9E* y *cps9F* hibridaron con la mayoría de los otros serotipos. Sin embargo, las sondas *cps1F* y *cps1G* y *cps1I* hibridaron sólo con el ADN cromosómico de los serotipos 1 y 14. Las sondas *cps9G* y *cps9H* hibridaron sólo con el serotipo 9. Estos datos sugieren que las sondas *cps9G* y *cps9H* son específicas para el serotipo 9 y, por tanto, pueden ser herramientas útiles para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápidas y sensibles para infecciones de *S. suis* tipo 9.

25 **PCR tipo específico.** Hasta ahora, las sondas se probaron sólo en las 35 cepas de referencia diferentes. Para probar el valor diagnóstico de las sondas *cps* tipo-específicas, se usaron varios otros serotipos 1, 2, 1/2, 9 y 14 de las cepas de *S. suis*. Además, dado que un método basado en la PCR puede ser aun más rápido y sensible que una prueba de hibridación, probamos si puede usarse una PCR para la serotipificación de las cepas de *S. suis*. Los conjuntos de iniciadores de oligonucleótidos se eligieron dentro de los genes *cps2J*, *cps1I* y *ycps9H*. Se esperaron fragmentos amplificados de 675 pb, 380 pb y 390 pb, respectivamente. Los resultados muestran que se amplificaron fragmentos de 675 bp en cepas de tipo 2 y 1/2 usando los iniciadores *cps2J*; se amplificaron fragmentos de 380 bp en cepas de tipo 1 y 14 usando los iniciadores *cps1I* y se amplificaron fragmentos de 390 bp en cepas de tipo 9 usando los iniciadores *cps9H*.

35 **Construcción de mutantes deficientes en la producción de cápsula.** Para evaluar el papel de la cápsula de *S. suis* tipo 2 en la patogénesis, construimos dos mutantes isogénicos en el que se alteró la producción de la cápsula. Para construir el mutante se usó 10cpsB, pCPS11. En este plásmido una parte del gen *cps2B* se sustituyó por el gen de resistencia a espectinomicina. Para construir la cepa mutante 10cpsEF se usó el plásmido pCPS28. En pCPS28 el extremo 3' del gen *cps2E* así como el extremo 5' del gen *cps2F* se sustituyeron por el gen de resistencia a espectinomicina. pCPS11 y pCPS28 se usaron para electrotransformar la cepa 10 de *S. suis* tipo 2 y las colonias resistentes a espectinomicina. Los experimentos de transferencia de Southern e hibridación se usaron para seleccionar el doble cruzamiento en los eventos de integración (resultados no mostrados). Para probar si se alteró la estructura capsular de las cepas 10cpsB y 10cpsEF, usamos una prueba de aglutinación en lámina con una suspensión de las cepas mutantes en suero hiperinmune anti-*S. suis* tipo 2 (44). Los resultados mostraron que aun en ausencia de antisueros específicos de serotipo, las bacterias aglutinaron. Esto indica que en las cepas mutantes, se alteró la estructura capsular. Para confirmar esto, secciones delgadas de las cepas silvestres y mutantes se compararon mediante microscopía electrónica. Los resultados mostraron que en comparación con el tipo silvestre (Fig. 3A) la cantidad de la cápsula producida por las cepas mutantes se redujo en gran medida (Figuras. y 3C 3B). Casi ningún material capsular pudo detectarse en la superficie de las cepas mutantes.

50 **Los mutantes capsulares son sensibles a la fagocitosis y destrucción por macrófagos alveolares porcinos (PAM).** Los mutantes capsulares se probaron para su capacidad de resistir la fagocitosis por PAM en presencia de suero SPF porcino. La cepa silvestre 10 parece que es resistente a la fagocitosis bajo estas condiciones (Fig. 4A). A diferencia, las cepas mutantes se ingerieron eficientemente por los macrófagos (Fig. 4A). Después de 90 min. más de 99.7% (cepa 10cpsB) y 99.8% (cepa 10cpsEF) de las células mutantes se ingerieron por los macrófagos. Además, como se muestra en la Fig. 4B las cepas ingeridas se destruyeron eficientemente por los macrófagos. 90-98 % de todas las células se destruyeron dentro

de los 90 min. Ninguna diferencia se pudo observar entre las cepas silvestre y mutante. Estos datos indican que la cápsula de *S. suis* tipo 2 protege eficazmente el organismo a partir de la captación *in vitro* por los macrófagos.

Los mutantes capsulares son menos virulentos para los lechones libres de gérmenes. Las propiedades de virulencia de las cepas silvestre y mutante se probaron después de la infección experimental de cerdos recién nacidos libres de gérmenes (45, 49). La Tabla 1 muestra que los signos específicos y no específicos de la enfermedad se pueden observar en todos los cerdos inoculados con la cepa silvestre. Además, todos los cerdos inoculados con la cepa silvestre murieron durante el curso del experimento o se destruyeron a causa de una enfermedad grave o trastornos nerviosos (Tabla 3). A diferencia, los cerdos inoculados con las cepas 10cpsB y 10cpsEF no mostraron signos específicos de enfermedad y todos los cerdos sobrevivieron hasta el final del experimento. La temperatura de los cerdos inoculados con la cepa silvestre aumentó 2 días después de la inoculación y permaneció alta hasta el día 5 (Tabla 3). La temperatura de los cerdos inoculados con las cepas mutantes algunas veces superó los 40 °C, sin embargo, pudimos observar diferencias significativas en el índice de la fiebre [es decir el % de las observaciones en un grupo experimental durante el cual los cerdos mostraron fiebre (>40 °C)] entre cerdos inoculados con cepas silvestre y mutante. Todos los cerdos mostraron números de leucocitos polimorfonucleares (PML) (>10 x 10⁹ PML por litro) aumentados (Tabla 3). Sin embargo, en los cerdos inoculados con las cepas mutantes el porcentaje de muestras con números de PML aumentados fue considerablemente inferior. Las cepas de *S. suis* y *B. bronchiseptica* se pueden aislar de muestras de exudados nasofaríngeos y heces de todos los cerdos a partir del día 1 post-infección hasta el final del experimento (Tabla 3). Postmortem, la cepa silvestre se pudo aislar frecuentemente del sistema nervioso central (SNC), riñones, corazón, hígado, bazo, serosas, articulaciones y amígdalas. Las cepas mutantes se pueden fácilmente recuperar a partir de las amígdalas, pero nunca se recuperaron a partir del riñón, hígado o bazo. Curiosamente, un número bajo de las cepas mutantes se aislaron del CNS, la serosa, las articulaciones, los pulmones y el corazón. En conjunto, estos datos indican fuertemente que las cepas mutantes de *S. suis*, deficientes en la producción de cápsula, no son virulentas para los cerdos jóvenes libres de gérmenes.

Describimos la identificación y la caracterización molecular del locus *cps*, implicado en la biosíntesis del polisacárido capsular, de *S. suis*. La mayoría de los genes parecen que pertenecen a una sola unidad de transcripción, lo que sugiere un control coordinado de estos genes. Le asignamos funciones a la mayoría de los productos génicos. De ese modo, identificamos regiones implicadas en la regulación (*Cps2A*), determinación de la longitud de cadena (*Cps2B*, *C*), exportación (*Cps2C*) y biosíntesis (*Cps2E*, *F*, *G*, *H*, *J*, *K*). La región implicada en la biosíntesis se localiza en el centro del agregado de genes y está flanqueado por dos regiones que contienen genes con funciones más comunes. El gen incompleto *orf2Z* se localizó en el extremo 5' del fragmento clonado. *Orf2Z* mostró cierta similitud con la proteína *YitS* de *B. subtilis*. Sin embargo, debido a que la función de la proteína *YitS* se desconoce esto no nos dio ninguna información sobre la posible función de *Orf2Z*. Debido a que el gen *orf2Z* no es parte del operón *cps*, no se espera un papel de este gen en la biosíntesis de polisacáridos. La proteína *Orf2Y* mostró cierta similitud con la proteína *YcxD* de *B. subtilis* (53). La proteína *YcxD* se sugirió que es una proteína reguladora. Del mismo modo, *Orf2Y* puede involucrarse en la regulación de la biosíntesis de polisacáridos. La proteína *Orf2X* mostró similitud con las proteínas *YAAA* de *H. influenzae* y *E. coli*. Se desconoce la función de estas proteínas. En *S. suis* tipo 2 el gen *orf2X* parece que es el primer gen en el operón *cps2*. Esto sugiere un papel de *Orf2X* en la biosíntesis de polisacáridos. En *H. influenzae* y *E. coli*, sin embargo estas proteínas no se asocian con los agregados de genes capsulares. El análisis de mutantes isogénicos deficientes de la expresión de *Orf2X* debe permitir comprender mejor el papel presuntivo de *Orf2X* en la biosíntesis de polisacáridos de *S. suis* tipo 2.

Los productos génicos codificados por los genes *cps2E*, *cps2F*, *cps2G*, *cps2H*, *cps2J* y *cps2K* mostraron poca similitud con las glicosiltransferasas de diversas bacterias Gram-positivas o Gram-negativas (18, 19, 20, 22, 25). El producto génico *cps2E* muestra cierta similitud con la proteína *Cps14E* de *S. pneumoniae* (18, 19). *Cps14E* es una glucosil-1-fosfato transferasa que une la glucosa a un portador lipídico (18). En *S. pneumoniae* esta es la primera etapa de la biosíntesis de la unidad de repetición del oligosacárido. La estructura de la cápsula de *S. suis* serotipo 2 contiene glucosa, galactosa, ramnosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico en una relación de 3:1:1:1:1 (7). Basado en estos datos concluimos que *Cps2E* de *S. suis* tiene actividad glucosiltransferasa, y está implicada en el enlace de la primera azúcar al portador lipídico.

La región C-terminal del producto génico *cps2F* mostró cierta similitud con la *RfbU* de *Salmonella enteritica*. *RfbU* mostró que tiene actividad manosiltransferasa (24). Debido a que el manosilo no es un componente del polisacárido de *S. suis* tipo 2, no se espera una actividad manosiltransferasa en este organismo. No obstante, *cps2F* codifica una glicosiltransferasa con otra especificación de azúcar.

Cps2G mostró similitud moderada con una familia de productos génicos sugeridos para codificar las actividades de galactosiltransferasa (22, 24, 40). Por lo tanto una actividad similar se muestra para Cps2G.

Cps2H mostró cierta similitud con LgtD de *H. influenzae* (U32768). Debido a que LgtD se propuso tener actividad glicosiltransferasa, una actividad similar se cumple por Cps2H.

5 Cps2J y Cps2K mostraron similitud con Cps14J de *S. pneumoniae* (20). Cps2J mostró similitud con Cps14I de *S. pneumoniae* también. Cps14I mostró tener actividad N-acetilglucosaminiltransferasa, mientras que Cps14J tiene una actividad β -1,4-galactosiltransferasa (20). En *S. pneumoniae* Cps14I es responsable por la adición del tercer azúcar y Cps14J por la adición del último azúcar en la síntesis de la unidad de repetición tipo 14 (20). Debido a que la cápsula de *S. suis* tipo 2 contiene galactosa así como componentes de N-acetil glucosamina, galactosiltransferasa así como N-acetil glucoaminiltransferasa se pueden prever las actividades de los productos génicos *cps2J* y *cps2K*, respectivamente. Como se observó para Cps14I y Cps14J, el N-terminal de Cps2J y Cps2K mostró un grado significativo de similitud de secuencia.

10 Dentro de los dominios N-terminal de Cps14I y Cps14J, dos regiones pequeñas se identificaron, las que se conservaron además en otras diversas glicosiltransferasas (22). Dentro de estas dos regiones, dos residuos Asp se propusieron que eran importantes para la actividad catalítica. Las dos regiones conservadas, DXS y DXDD, se encontraron además en Cps2J y Cps2K.

15 La función de Cps2I sigue siendo poco claro. Cps2I mostró cierta similitud con una proteína de *A. actinomycetemcomitans*. Aunque esta proteína es parte del agregado génico responsable por los antígenos específicos al serotipo-B, se desconoce la función de la proteína.

20 Describimos además la identificación y caracterización de los genes específicos de *cps* para *S. suis* serotipos 1, 2 y 9. Después el locus *cps2* entero de *S. suis* serotipo 2 se clonó y caracterizó, las funciones para la mayoría de los productos génicos *cps2* se pueden asignar por homologías de secuencias. Basado en los datos las actividades glicosiltransferasa, requeridas para la especificidad de tipo, se pueden ubicar en el centro del operón. Experimentos de hibridación cruzada, usando los genes individuales de *cps2* como sondas en los ADN cromosómicos de los 35 serotipos diferentes, confirmaron esta idea. Las regiones que contienen los genes tipo-específicos de los serotipos 1 y 9 se pueden clonar y caracterizar,

25 mostrando que existe una organización genética idéntica de los operones *cps* de otros serotipos de *S. suis*. Los genes *cps1E*, *cps1F*, *cps1G*, *cps1H*, y *cps1I* revelaron una similitud sorprendente con los genes *cps14E*, *cps14F*, *cps14G*, *cps14H* y *cps14J* de *S. pneumoniae*. Interesantemente, *S. pneumoniae* serotipo 14 es el serotipo más comúnmente asociado con las infecciones neumocócicas en niños pequeños (54), mientras que las cepas de *S. suis* serotipo 1 son las más comúnmente aisladas de lechones de menos de 8 semanas (46). En *S. pneumoniae* los genes *cps14E*, *cps14G*, *cps14I* y *cps14J* codifican las glicosiltransferasas requeridas para la síntesis de la unidad de repetición tetramérica tipo 14, mostrando que los genes *cps1E*, *cps1G* y *cps1I* codificaban las glicosiltransferasas. Las funciones precisas de estos genes, así como las especificidades del sustrato de las enzimas se pueden establecer En *S. pneumoniae* el gen *cps14E* se mostró que codifica una glucosil-1-fosfato transferasa que cataliza la transferencia de glucosa a un portador lipídico. Además, genes de tipo *cpsE* se encontraron en *S. pneumoniae* serotipos 9N, 13, 14, 15B, 15C, 18F, 18A y 19F (60). Mutantes *CpsE* se construyeron en los serotipos 9N, 13, 14 y 15B. Todas las cepas mutantes carecieron de actividad glucosiltransferasa (60).

30 Además, en todos estos serotipos de *S. pneumoniae* el gen *cpsE* parece que es el responsable de la adición de glucosa al portador lipídico. Basado en los datos sugerimos que en *S. suis* tipo 1 el gen *cps1E* puede cumplir una función similar. La estructura de la cápsula *S. suis* tipo 1 se desconoce, pero está compuesta por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico en una relación de 1: 2.4: 1: 1:1.4 (5). Por lo tanto, se puede fácilmente prever el papel de una actividad glucosiltransferasa de tipo- *cpsE*. Secuencias de tipo *CpsE* se encontraron además en serotipos 2, 1/2 y 14.

40 Para la biosíntesis de polisacáridos en *S. pneumoniae* tipo 14, la transferencia del segundo azúcar de la unidad de repetición al primer azúcar unido a lípido se realiza por los productos génicos de *cps14F* y *cps14G* (20). Similar a Cps14F y Cps14G, las proteínas de *S. suis* tipo 1 Cps1F y Cps1G pueden actuar como una glicosiltransferasa que realiza la misma reacción. Cps14F y Cps14G de *S. pneumoniae* mostraron similitud con la mitad N-terminal y mitad C-terminal de la proteína SpsK de *Sphingomonas*(20, 67), respectivamente. Esto sugiere una función combinada para ambas proteínas. Además, secuencias de tipo *cps14F* y *cps14G* se encontraron en diversos serotipos de *S. pneumoniae* y estos genes parecen que siempre existen juntos (60). Lo mismo se observó para *S. suis* tipo 1. Las sondas *cps1F* y *cps1G* hibridaron con cepas tipo 1 y tipo 14.

45 De acuerdo con la similitud encontrada entre el gen *cps1H* y el gen *cps14H* de *S. pneumoniae* (20), *cps1H* se espera que codifica una polimerasa de polisacárido.

50 La proteína codificada por el gen *cps1I* mostró cierta similitud con la proteína Cps14J de *S. pneumoniae* (19). El gen *cps14J* se mostró que codifica una actividad β -1,4-galactosiltransferasa, responsable por la adición del cuarto es decir último) azúcar en la síntesis del polisacárido *S. pneumoniae* serotipo 14. En *S. suis* tipo 2 las proteínas codificadas por los genes *cps2J* y *cps2K* mostraron similitud con la proteína Cps14J. Sin embargo, no se encontraron homologías significativas

entre Cps2J, Cps2K y Cps1I. En las regiones N-terminal de Cps14J y Cps14I se identificaron dos regiones conservadas pequeñas, DXS y DXDD (19). Estas regiones parecen que son importantes para la actividad catalítica (13). En las mismas posiciones de la secuencia Cps2I se contuvieron las regiones DXS y DXED.

En la región entre Cps1G y Cps1H se identificaron tres Orfs pequeños. Ya que los Orfs se expresaron en tres fragmentos de lectura diferentes, y no contenían sitios de inicio potenciales, no se esperó la expresión. Sin embargo, tres productos génicos potenciales codificados por esta región mostraron cierta similitud con tres regiones sucesivas de la parte C-terminal de la proteína EpsK de *Streptococcus thermophilus* (27 % de identidad, 40). La región relacionada con los primeros 82 aminoácidos está desprovista. La proteína EpsK se sugirió que juega un papel en la exportación del exopolisacárido produciendo el exopolisacárido polimerizado más hidrófobo a través de una modificación de lípido. Estos datos pueden sugerir que las secuencias en la región entre Cps1G y Cps1H se originaron a partir de la secuencia de tipo epsK. Los experimentos de hibridación mostraron que esta región de tipo epsk se presenta además en otras cepas de serotipo 1 así como en las cepas de serotipo 14 (resultados no mostrados).

La función de la mayoría de los genes serotipo 9 clonados se puede establecer. Basado en los datos de similitud de secuencia los genes *cps9E* y *cps9F* pueden ser glicosiltransferasas (61, 24, 63, 64, 65). Además, los genes *cps9G* y *cps9H* mostraron similitud con los genes ubicados en la región implicada en la biosíntesis del polisacárido, pero se desconoce la función de estos genes (68).

Los experimentos de hibridación cruzada usando los genes individuales *cps2*, *cps1* y *cps9* como sondas mostraron que las sondas *cps9G* y *cps9H* hibridaron específicamente con las cepas de serotipo 9. Por lo tanto, estos son útiles como herramientas para la identificación de cepas *S. suis* tipo 9 tanto para propósitos de diagnóstico así como en estudios epidemiológicos y de transmisión. Previamente desarrollamos un método de PCR que puede usarse para detectar cepas *S. suis* en exudados nasales y de amígdalas de cerdos (62). El método se usó para identificar por ejemplo cepas patogénicas (EF-positiva) de *S. suis* serotipo 2. Durante los últimos años, cepas de *S. suis* tipo 2 junto con cepas serotipo 9 se aíslan frecuentemente de los órganos de cerdos enfermos. Sin embargo, hasta ahora una prueba de diagnóstico rápido y sensible no estuvo disponible para las cepas de tipo 9. Por lo tanto, las sondas específicas al tipo 9 o el PCR específico al tipo 9 es de gran valor diagnóstico. Las sondas *cps1F*, *cps1G* y *cps1I* hibridaron con las cepas del serotipo 1 así como con el serotipo 14. En las pruebas de coagulación las cepas de tipo 1 reaccionan con el antisuero anti-tipo 1 así como con el antisuero anti-tipo 14 (56). Esto sugiere la presencia de epitopos comunes entre estos serotipos. Por otra parte, las cepas tipo 1 aglutinaron sólo con el suero anti-tipo 1 (56,57), indicando que es posible detectar diferencias entre esos serotipos.

Las sondas *cps2F*, *cps2G*, *cps2H*, *cps2I* y *cps2J* hibridaron sólo con los serotipos 2 y 1/2. El serotipo 34 mostró una señal débil de hibridación con la sonda *cps2G*. Como se mostró en las pruebas de aglutinación las cepas tipo 1/2 reaccionan con el suero dirigido contra el tipo 1 así como con el suero dirigido contra las cepas tipo 2 (46). Por lo tanto, el tipo 1/2 compartió antígenos tanto con el tipo 1 como el 2. Basado en los patrones de hibridación de las cepas del serotipo 1/2 con los genes específicos *cps1* y *cps2*, el serotipo 1/2 parece que está más estrechamente relacionado con las cepas de tipo 2 que con las cepas de tipo 1. En nuestros estudios actuales, identificamos genes, iniciadores o sondas específicos de tipo que se usan para la discriminación de serotipos 1, 14 y 2 y 1/2 y aun otros de los 35 serotipos conocidos. Además, genes, iniciadores o sondas de tipo específico se pueden desarrollar ahora fácilmente para serotipos aún desconocidos, una vez que estén aislados.

Clonación y caracterización de una parte adicional del locus *cps2*.

Basado en la secuencia establecida de 11 genes, denominados *cps2L* a *cps2T*, *orf2U* y *orf2V*, se identificaron. Un gen homólogo a los genes implicados en la polimerización de la unidad de repetición de oligosacárido (*cps2O*), así como genes implicados en la síntesis en la síntesis del ácido siálico (*cps2P* a *cps2T*) se identificaron. Además, los experimentos de hibridación mostraron que los genes implicados en la síntesis del ácido siálico están presentes en *S. suis* serotipo 1, 2, 14, 27 y 1/2. Las regiones "*cps2M*" y "*cps2N*" mostraron similitud con las proteínas implicadas en la biosíntesis del polisacárido de otras bacterias gram-positiva. Sin embargo, estas regiones parecen estar truncadas o fueron no-funcionales como resultado de mutaciones puntuales o de cambio del marco. En su extremo 3' el locus *cps2* contuvo dos elementos insercionales ("*orf2U*" y "*orf2V*") que parecen ser no-funcionales.

Para clonar la parte restante del locus *cps2*, secuencias del extremo 3' de pCPS26 (Fig. 1C) se usaron para identificar un fragmento cromosómico que contiene secuencias de *cps2* ubicadas corriente abajo. Este fragmento se clonó en pKUN19 resultando en pCPS29. Usando un enfoque similar posteriormente aislamos los plásmidos pCPS30 y pCPS34 que contienen secuencias de *cps2* corriente abajo (Fig. 1C).

Análisis del operón de *cps2*.

Se determinó la secuencia completa de nucleótidos de los fragmentos clonados. El examen de la secuencia compilada reveló la presencia de : una secuencia que codifica la parte C-terminal de Cps2K, seis genes aparentemente funcionales (denominados *cps2O-cps2T*) y los restos de 5 genes ancestrales diferentes (denominados "*cps2L*", "*cps2M*", "*cps2N*", "*orf2U*" y "*orf2V*"). Los últimos genes parecen estar truncados o incompletos como resultado de la presencia de mutaciones

en los codones de parada o cambio del marco (Fig. 1A). Ni secuencias promotoras potenciales ni estructuras de tallo-lazo potenciales pueden identificarse dentro de la región secuenciada. Un sitio de unión a ribosoma precede a cada ORF y la mayoría de los ORF están muy estrechamente unidos. Tres interrupciones intergénicas se encontraron: una entre "cps2M" y "cps2N" (176 nucleótidos), una entre cps2O y cps2P (525 nucleótidos), y una entre cps2T y "orf2U" (200 nucleótidos). Estos datos y los nuestros anteriormente muestran que Orf2X y Cps2A-Orf2T son parte de una operón simple.

Una lista de todos los loci y sus propiedades se muestra en la Tabla 4. La región "cps2L" contuvo tres ORF potenciales, de los aminoácidos 103, 79 y 152, respectivamente, que sólo se separaron uno de otro por codones de parada. Sólo el primer ORF está precedido por un sitio de unión ribosomal potencial y contiene un codón inicial de metionina. Esto sugiere que "cps2L" se origina a partir de un gen ancestral cps2L, que codifica para una proteína de 339 aminoácidos. La función de esta proteína hipotética Cps2L sigue siendo poco claro hasta ahora: no se encontraron homologías significativas entre Cps2L y las proteínas presentes en las genotecas de datos. No está claro si el primer ORF de la región "cps2L" se expresa en una proteína de 103 aminoácidos. La región "cps2M" mostró homología con la N-terminal de 134 aminoácidos de las proteínas NeuA de *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* (AB017355, 32). Sin embargo, aunque la región "cps2 M" contuvo un sitio de unión al ribosoma potencial, se ausentó un codón de inicio de metionina. Comparada con la secuencia de *S. agalactiae*, el codón de inicio ATG se reemplazó por un codón AAG que codifica la lisina. Además, la región homóloga a los primeros 58 aminoácidos de la NeuA de *S. agalactiae* (identidad 77 %) se separó de la región homóloga a los aminoácidos 59-134 de NeuA con una secuencia de ADN repetida de 100 pb (ver después). Adicionalmente, la región homóloga a los aminoácidos 59 a 95 de NeuA (identidad 32%) y la región homóloga a los aminoácidos 96 a 134 de NeuA (identidad 50%) se presentaron en diferentes marcos de lectura. Por lo tanto, el homólogo de NeuA parcial y truncado es probablemente no funcional en *S. suis*. La región "cps2N" mostró homología con CpsJ de *S. agalactiae* (núm. de acceso AB017355). Sin embargo, carecieron en *S. suis* las secuencias homólogas a los primeros 88 aminoácidos de CpsJ. Además, la región homóloga se presentó en dos marcos de lectura diferentes. La proteína codificada por los genes cps2O mostró homología con las proteínas de varios estreptococos implicados en el transporte de la unidad de repetición de oligosacárido (núm. de acceso AB017355), lo que sugiere una función similar para Cps2O. Las proteínas codificadas por los genes cps2P, cps2S y cps2T mostraron homología con las proteínas NeuB, NeuD y NeuA de *S. agalactiae* y *E. coli* (núm. de acceso AB017355). Debido a que la región "cps2M" mostró también homología con NeuA de *E. coli*, el locus de cps2 en *S. suis* contiene un gen funcional neuA (cps2T) así como un gen no-funcional ("cps2M"). La homología mutua entre estas dos regiones mostró una identidad del 77 % a nivel de aminoácido en los aminoácidos 1-58 y 49 % en los aminoácidos 59-134. Cps2Q y Cps2R mostraron homología con las partes N-terminal y C-terminal de la proteína NeuC de *S. agalactiae* y *E. coli*, respectivamente. Esto sugiere que la función de la proteína NeuC de *S. agalactiae* en *S. suis* se cumple probablemente por dos proteínas diferentes. Los genes neu en *E. coli* se conocen que están implicados en la síntesis de ácido siálico. NeuNAc se sintetiza a partir de N-acetilmannosamina y fosfoenolpiruvato por la NeuNAc sintetasa. Posteriormente, NeuNAc se convierte en CMP-NeuNAc por la enzima CMP-NeuNAc sintetasa. CMP-NeuNAc es el sustrato para la síntesis de polisacárido. En *E. coli* K1 NeuB es la NeuNAc sintetasa, NeuA es la CMP-NeuNAc sintetasa. NeuC se involucró en la síntesis de NeuNAc, pero su papel preciso se desconoce. El papel preciso de NeuD se desconoce. Un papel de las proteínas Cps2P-Cps2T en la síntesis de ácido siálico puede ser fácilmente previsto, ya que la cápsula de *S. suis* serotipo 2 es rica en ácido siálico. En *S. agalactiae* se mostró que el ácido siálico era crítico para la función de virulencia de la cápsula tipo III. Además se sugirió que la presencia de ácido siálico en la cápsula de la bacteria que puede causar meningitis, puede ser importante para la capacidad de esta bacteria para atravesar la barrera hematoencefálica. Hasta ahora, sin embargo, el requisito del ácido siálico para la virulencia de *S. suis* sigue siendo poco claro.

"Orf2U" y "Orf2V" mostraron homología con las proteínas localizadas en dos elementos de inserción diferentes. "Orf2U" es homólogo con IS1194 de *Streptococcus thermophilus*, mientras que "Orf2V" mostró homología con una transposasa potencial de *Streptococcus pneumoniae*. Esta transposasa putativa recientemente se encontró que se asocia con el locus capsular tipo 2 de *S. pneumoniae*. Comparado con los elementos de inserción originales en *S. thermophilus* y *S. pneumoniae*, tanto "Orf2U" como "Orf2V" es probable que sean no-funcionales debido a las mutaciones de cambio en el marco dentro de sus regiones codificantes.

Una observación sorprendente fue la presencia de una secuencia de 100 pb (Fig. 9) que se repitió tres veces dentro del operón cps2. La secuencia está altamente conservada (entre 94% y 98%) y se encontró en las regiones intergénicas entre cps2G y cps2H, dentro de "cps2M" y entre cps2O y cps2P. No se encontraron homologías significativas entre esta secuencia de repetición directa de 100 pb y secuencias presentes en las genotecas de datos, lo que sugiere que la secuencia es única para *S. suis*.

Distribución de las secuencias cps2 entre los 35 serotipos de *S. suis*. Para examinar la presencia de ácido siálico que codifica genes en otros serotipos de *S. suis*, realizamos experimentos de hibridación cruzada. Los fragmentos de ADN de los genes cps2 individuales se amplificaron por PCR, radiomarcaron con 32P e hibridaron con ADN cromosómico de las cepas de referencia de los 35 serotipos diferentes de *S. suis*. Como control positivo se usó una sonda específica del ARN

16S de *S. suis*. La sonda de ARNr 16S hibridó con intensidades casi iguales a todos los serotipos probados (Tabla 4). La secuencia "cps2L" hibridó con el ADN del serotipo 1, 2, 14 y 1/2. Los genes "cps2M", cps2O, cps2P, cps2Q, cps2R, cps2S y cps2T hibridaron con el ADN del serotipo 1, 2, 14, 27 y 1/2. Debido a que los genes cps2P-cps2T están probablemente más implicados en la síntesis de ácido siálico estos resultados sugieren que el ácido siálico es también una parte de la cápsula en el serotipo 1, 2, 14, 27 y 1/2 de *S. suis*. Esto está de acuerdo con el hallazgo de que los serotipos 1, 2 y 1/2 poseen una cápsula que es rica en ácido siálico. Aunque se desconocen las composiciones químicas de las cápsulas del serotipo 14 y 27, estudios recientes de aglutinación usando lectinas de unión a ácido siálico sugirieron la presencia de ácido siálico en el serotipo 14 de *S. suis*, pero no en el serotipo 27. En estos estudios, se detectó ácido siálico también en los serotipos 15 y 16. Dado que esta última observación no está de acuerdo con nuestros estudios de hibridación, puede ser que otros genes, no homólogos a los genes cps2P-cps2T, sean responsables por la síntesis del ácido siálico en los serotipos 15 y 16.

Una sonda basada en secuencias "cps2N" hibridó con el ADN de los serotipos 1, 2, 14 y 1/2. Una sonda específica para "orf2U" hibridó con los serotipos 1, 2, 7, 14, 24, 27, 32, 34, y 1/2, mientras que una sonda específica para "orf2V" hibridó con muchos serotipos diferentes. Además, se preparó una sonda específica para la secuencia de repetición directa de 100 pb. Esta sonda se hibridó con los serotipos 1, 2, 13, 14, 22, 24, 27, 29, 32, 34 y 1/2 (Tabla 4). Para analizar el número de copias de la secuencia de repetición directa dentro del cromosoma de *S. suis* serotipo 2, se realizó una hibridación y análisis por transferencia de Southern. Por lo tanto, el ADN cromosómico de *S. suis* serotipo 2 se digirió con NcoI y se hibridó con una secuencia de repetición directa marcada con 32P. Sólo un fragmento de hibridación, que contiene tres repeticiones directas presente en el locus cps2, se encontró (resultados no mostrados). Esto indica que la secuencia de repetición directa de 100 pb sólo se asocia con el locus cps2. En *S. pneumoniae* una secuencia de repetición larga de 115-pb se encontró que se asociaba con los genes capsulares de los serotipos 1, 3, 14 y 19F. En *S. pneumoniae* esta secuencia de 115-pb se encontró además en el área adyacente de otros genes implicados en la virulencia neumocócica (genes de hialuronidasa y neuraminidasa). Una función reguladora de la secuencia de 115-pb en el control coordinado de estos genes relacionados con la virulencia se sugirió.

Para estudiar el papel de la cápsula en la resistencia a la fagocitosis y en la virulencia, construimos dos mutantes isogénicos en los que se alteró la síntesis de la cápsula. En 10cpsB, el gen *cps2B* se alteró con la inserción de un gen de resistencia a antibióticos, mientras que en 10cpsEF se reemplazaron partes de los genes *cps2E* y *cps2F*. Ambas cepas mutantes parecen estar completamente no-encapsuladas. Debido a que los genes *cps 2* parecen que son parte de un operón los efectos polares no se pueden excluir. Por lo tanto estos datos no dieron ninguna información sobre el papel de Cps2B, Cps2E o Cps2F en la biosíntesis de polisacáridos. Sin embargo, los resultados muestran claramente que el polisacárido capsular de *S. suis* tipo 2 es un componente de la superficie con la actividad antifagocítica. Las bacterias silvestres encapsuladas *in vitro* se ingieren por los fagocitos a una frecuencia muy baja, mientras que las bacterias mutantes no encapsuladas se ingieren eficientemente por los macrófagos porcinos. Dentro de las 2 horas, más de 99.6% de las bacterias mutantes se ingirieron y más del 92% de las bacterias ingeridas se destruyeron. Intracelularmente, las cepas silvestres, así como mutantes parece que se destruyen con la misma eficiencia. Esto sugiere que la pérdida de material capsular se asocia con la pérdida de la capacidad para resistir la captación por los macrófagos. Esta pérdida de resistencia a la fagocitosis *in vitro* se asoció con una atenuación sustancial de la virulencia en cerdos libres de gérmenes. Todos los cerdos inoculados con las cepas mutantes sobrevivieron el experimento y no mostraron ninguno de los signos clínicos específicos de la enfermedad. Sólo algunos signos clínicos inespecíficos de enfermedad pudieron observarse. Además, las bacterias mutantes se pueden reaislar a partir de los cerdos. Esto apoya la idea de que, como en otros estreptococos patógenos, la cápsula de *S. suis* actúa como un factor de virulencia importante. Los mutantes de transposón preparados por Charland alterados en la producción de cápsulas mostraron una virulencia reducida en cerdos y ratones. Para construir estos mutantes la cepa de referencia de tipo 2 S735 se usó. Anteriormente mostramos que esta cepa es sólo débilmente virulenta para los cerdos jóvenes. Además, el sitio de inserción del transposón está sin resolver hasta ahora.

Como un ejemplo adicional en la presente descripción se describe una prueba PCT rápida para *Streptococcus suis* tipo 7. Estudios epidemiológicos recientes sobre infecciones de *Streptococcus suis* en cerdos indican que, además de los serotipos 1, 2 y 9, el serotipo 7 se asocia frecuentemente también con animales enfermos. Para este último serotipo, sin embargo, no están disponibles métodos de diagnóstico rápidos y sensibles. Esto dificulta los programas de prevención y control. Describimos aquí el desarrollo de una prueba de PCR específica de tipo para la detección rápida y sensible de *S. suis* serotipo 7. La prueba se basa en secuencias de ADN de genes capsulares (cps) específicos para el serotipo 7. Estas secuencias se pueden identificar mediante la hibridación cruzada de varios genes cps individuales con los ADN cromosómicos de 35 diferentes serotipos de *S. suis*.

Streptococcus suis es una causa importante de meningitis, septicemia, artritis y muerte súbita en cerdos jóvenes [69,70]. Sin embargo, también puede causar meningitis en el hombre [71]. Los intentos de controlar la enfermedad se dificultan aun por la carencia de conocimientos suficientes sobre la epidemiología de la enfermedad y la carencia de vacunas eficaces y diagnósticos sensibles.

Cepas de *S. suis* se pueden identificar y clasificar por sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas [70, 73, 74]. La clasificación serológica se basa en la presencia de determinantes antigénicos específicos. Las células de *S. suis* aisladas y bioquímicamente caracterizadas se aglutinan con un panel de sueros específicos. Estos métodos de tipificación son muy laboriosos y consumen tiempo y sólo se pueden realizar en colonias aisladas. Además, se informó que se pueden producir reacciones cruzadas inespecíficas entre diferentes tipos de *S. suis* [75, 76].

Hasta ahora, se han descrito 35 serotipos diferentes [7, 78, 79]. *S. suis* serotipo 2 es el tipo más prevalente aislado a partir de los cerdos enfermos, seguido por los serotipos 9, y 1. Sin embargo, recientemente las cepas del serotipo 7 se aislaron frecuentemente también a partir de puercos enfermos [80, 81, 82]. Esto sugiere que las infecciones con cepas de *S. suis* serotipo 7 parece que son un problema aumentado. Además, la virulencia de las cepas de *S. suis* serotipo 7 se confirmó por la infección experimental de cerdos jóvenes [83].

Recientemente, se desarrollaron ensayos rápidos y sensibles de PCR específicos para los serotipos 2 (y 1/2), y 1 (14) y 9 [84]. Estos ensayos se basaron en los loci de cps de los serotipos 2, 1 y 9 de *S. suis* [84, 85]. Sin embargo, hasta ahora ninguna prueba de diagnóstico rápido y sensible está disponible para *S. suis* serotipo 7. En la presente describimos el desarrollo de una prueba de PCR para la detección rápida y sensible de cepas *S. suis* serotipo 7. La prueba se basa en las secuencias de ADN que forman una parte del locus de cps de *S. suis* serotipo 7. En comparación con los métodos serológicos de serotipificación el ensayo de PCR fue un ensayo rápido, fiable y sensible. Por lo tanto, esta prueba, en conjunto con las pruebas de PCR que previamente desarrollamos para el serotipo 1, 2 y 9, sin duda, contribuirá a un diagnóstico más rápido y fiable de *S. suis* y facilitará los programas de control y erradicación.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y serotipificación.

Las cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio se enumeran en la Tabla 7. Las cepas de referencia de *S. suis* se obtuvieron a partir de M. Gottschalk, Canadá. Las cepas de *S. suis* se crecieron en caldo Todd-Hewitt (código CM189, Oxoid), y sembraron en base de agar sangre Columbia (código CM331, Oxoid) que contiene 6 % (v/v) de sangre de caballo. Las cepas de *E. coli* se crecieron en caldo Luria [86] y sembraron en caldo Luria que contiene 1.5 % (p/v) de agar. Si requerida, se añadió ampicilina a las placas. Las cepas de *S. suis* se serotiparon mediante la prueba de aglutinación en lámina con anticuerpos serotipo-específicos [70].

Técnicas de ADN.

Manipulaciones de rutina con ADN y reacciones de PCR se realizaron como se describe por Sambrook y otros [88]. La transferencia e hibridación se realizó como descrito previamente [84,86].

Análisis de secuencia de ADN.

Secuencias de ADN se determinaron en un Sistema de Secuenciación de ADN 373A (Applied Biosystems, Warrington, GB). Las muestras se prepararon mediante el uso de un kit de reacción listo para secuenciación en ciclos con terminador colorante (Applied Biosystems). Cebadores de secuenciación hechos por encargo se adquirieron de Life Technologies. Los datos de secuenciación se ensamblaron y se analizaron usando el programa McMollyTetra. El programa BLAST se usó para buscar las secuencias de proteínas homólogas a las secuencias de aminoácidos deducidas.

Los iniciadores usados en la PCR de cps7H corresponden a las posiciones 3334-3354 y 3585-3565 en el locus cps7 de *S. suis*. Las secuencias fueron:

5'-AGCTCTAACACGAAATAAGGC-3' y 5'-GTCAAACACCCTGGATAGCCG-3'.

Las mezclas de reacción contuvieron 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mM de MgCl₂; 50 mM de KCl; 0.2 mM de cada uno de los cuatro trifosfatos desoxinucleótidos; 1 microM de cada uno de los iniciadores y 1U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Applied Biosystems, Nueva Jersey). La amplificación de ADN se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600 y el programa consistió en una incubación durante 10 min at 95 °C y 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 2' min a 56 °C y 2 min a 72 °C.

Resultados y discusión

Clonación de los genes cps específicos al serotipo 7.

Para aislar los genes cps de tipo específico de *S. suis* serotipo 7 se usó el gen cps9E de serotipo 9 como una sonda para identificar los fragmentos del ADN cromosómico de tipo 7 que contienen secuencias de ADN homólogo [84]. Un fragmento PstI de 1.6 kb se identificó y clonó en pKUN19. Este rindió el pCPS7-1 (Fig. 11C). A su vez, este fragmento se usó como una sonda para identificar un fragmento de superposición Scal-Clal de 2.7 kb. El pGEM7 que contiene el último fragmento se designó pCPS7-2 (Fig. 11C).

Análisis de los genes cps7 clonados.

Las secuencias de nucleótido completas de los insertos de pCPS7-1, pCPS7-2 se determinaron El examen de la secuencia cps7 reveló la presencia de dos marcos de lectura abiertos (ORF) completos y dos incompletos (Fig. 11C). Todos los ORF

se preceden por un sitio de unión al ribosoma. De acuerdo con los datos obtenidos para los genes *cps1*, *cps2* y *cps9* de serotipos 1, 2 y 9, respectivamente, los ORF de tipo 7 están muy estrechamente unidos entre sí. La única interrupción intergénica significativa que se encontró entre *cps7E* y *cps7F* (443 nucleótidos). No se encontraron secuencias promotoras evidentes o estructuras de tallo-lazo potenciales en esta región. Este sugiere que, como en el serotipo 1, 2 y 9, los genes *cps* del serotipo 7 forman parte de un operón.

Una visión general de los ORF y sus propiedades se muestra en la Tabla 8. Como esperado basado en los datos de hibridación [84], las proteínas Cps9E y Cps7E mostraron una alta similitud (identidad de 99 %, Tabla 8). Basado en las comparaciones de secuencias entre Cps9E y Cps7E, el fragmento PstI de pCPS7-1 carece de la región que codifica los primeros 371 codones de Cps7E. La parte C-terminal de la proteína codificada por el gen *cps7F* mostró cierta similitud con la proteína BpIG de *Bordetella pertussis* [88], así como con la parte C-terminal de Cps2E de *S. suis* [85]. Tanto BpIG como Cps2E se sugirieron con actividad glicosiltransferasa y probablemente están implicados en el enlace de la primera azúcar con el portador lipídico [85,88]. La proteína codificada por el gen *cps7G* mostró similitud con la proteína BpIF de *Bordetella pertussis* [88]. BpIF probablemente debe participar en la biosíntesis de un azúcar amino, lo que sugiere una función similar para Cps7G. La proteína codificada por el gen *cps7H* mostró similitud con la proteína WbdN de *E. coli* [89] así como con la parte N-terminal de la proteína Cps2K de *S. suis* [81]. Tanto WbdN como Cps2K se sugirieron con actividad glicosiltransferasa [85, 89].

Genes *cps* específicos al serotipo 7.

Para determinar si los fragmentos clonados en pCPS7-1 y pCPS7-2 contienen las secuencias de ADN específicas al serotipo 7, se realizaron experimentos de hibridación cruzada. Fragmentos de ADN de los genes *cps7* individuales se amplificaron por PCR, marcaron con ³²P, y usaron para sondar transferencias puntuales de ADN cromosómico de las cepas de referencia de 35 serotipos diferentes de *S. suis*. Los resultados se resumen en la Tabla 9. Como esperado, basado en los datos obtenidos con la sonda *cps9E* [84], la sonda *cps7E* hibridó con el ADN cromosómico de muchos serotipos diferentes de *S. suis*. Las sondas *cps7F* y *cps7G* mostraron hibridación con el ADN cromosómico de los serotipos 4, 5, 7, 17, y 23 de *S. suis*. Sin embargo, la sonda *cps7H* sólo hibridó con el ADN cromosómico del serotipo 7, indicando que este gen es específico para el serotipo 7.

PCR tipo-específico.

Probamos si podíamos usar la PCR en lugar de la hibridación para la tipificación de las cepas de *S. suis* serotipo 7. Para este propósito, seleccionamos un conjunto iniciador de oligonucleótidos dentro del gen *cps7H* con el cual se esperó un fragmento amplificado de 251 pb. Además, incluimos en nuestro análisis varias cepas de *S. suis* serotipo 7, excepto la cepa de referencia. Estas cepas se obtuvieron de diferentes países y se aislaron de diferentes órganos (Tabla 7). Los resultados muestran claramente que, un fragmento de aproximadamente 250 pb se amplificó con todas las cepas de tipo 7 usadas (Fig. 12B), mientras que no se obtuvieron productos de PCR con las cepas de los serotipos 1, 2 y 9 (Fig. 12A). Esto sugiere que la prueba de PCR como descrito aquí, es una herramienta de diagnóstico rápido para la identificación de cepas de *S. suis* serotipo 7. Hasta ahora una prueba de diagnóstico de este tipo no estaba disponible para cepas del serotipo 7. Junto con los ensayos de PCR recientemente desarrollados para el serotipo 1, 2, 1/2, 14 y 9, este ensayo puede ser una importante herramienta de diagnóstico para detectar cerdos portadores de las cepas de serotipo 2, 1/2, 1, 14,9 y 7 y pueden facilitar los programas de control y erradicación.

TABLA 1. Cepas bacterianas y plásmidos

ES 2 512 496 T3

cepa/plásmido	características pertinentes	fuentes/referencia
Cepa		
<i>E. coli</i>		
CC118	PhoA ⁻	(28)
XL2 blue	estratagen	
<i>E. coli</i>		
XL2 blue	estratagen	
<i>S. suis</i>		
10	cepa virulenta serotipo 2	(49)
3	serotipo 2	(63)
17	serotipo 2	(63)
735	cepa de referencia serotipo 2	(63)
T15	serotipo 2	(63)
6555	cepa de referencia serotipo 1	(63)
6388	serotipo 1	(63)
6290	serotipo 1	(63)
5637	serotipo 1	(63)
5673	serotipo 1/2	(63)
5679	serotipo 1/2	(63)
5928	serotipo 1/2	(63)
5934	serotipo 1/2	(63)
5209	cepas de referencia serotipo 1/2	(63)
5218	cepa de referencia serotipo 9	(63)
5973	serotipo 9	(63)
6437	serotipo 9	(63)
6207	serotipo 9	(63)
cepas de referencia	serotipos 1-34	(9, 56, 14)
<i>S. suis</i>		
10	cepa virulenta serotipo 2	(51)
10cpsB	mutante isogénico cpsB de la cepa 10	este trabajo
10cpsEF	mutante isogénico cpsEF de la cepa 10	este trabajo

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Plásmido		
pKUN19	funciones de replicación pUC, Amp ^R	(23)
pGEM7Zf(+)	funciones de replicación pUC, Amp ^R	Promega Corp.
pIC19R	funciones de replicación pUC, Amp ^R	(29)
pIC20R	funciones de replicación pUC, Amp ^R	(29)
pIC-spc	pIC19R que contiene el gen spc ^F de pDL282	colección del laboratorio
pDL282	funciones de replicación de pBR322 y pVT736-1, Amp ^R , Spc ^R	(43)
pPHOS2	pIC-spc que contiene el gen phoA truncado de pPH07 como un fragmento de <i>Pst</i> I- <i>Bam</i> HI	este trabajo
pPHO7	contiene el gen phoA truncado	(15)
pPHOS7	pPHOS2 contiene el ADN cromosómico de <i>S. suis</i>	este trabajo
pCPS6	pKUN19 que contiene el fragmento de 6 kb <i>Hind</i> III del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS7	pKUN19 que contiene el fragmento de 3,5 kb <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III de <i>cps</i> operon	este trabajo (Fig.1)
pCPS11	pCPS7 en el que el fragmento de 0.4 kb <i>Pst</i> I- <i>Bam</i> HI del gen <i>cpsB</i> se reemplaza por el gen SPC ^R de pIC-spc	este trabajo (Fig.1)
pCPS17	pKUN19 que contiene el fragmento de 3.1 kb <i>Kpn</i> I del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS18	pKUN19 que contiene el fragmento de 1.8 kb <i>Sna</i> BI del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS20	pKUN19 que contiene el fragmento de 3.3 kb <i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS23	pGEM7Zf(+) que contiene el fragmento de 1.5 kb <i>Mlu</i> I del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS25	pIC20R que contiene el fragmento de 2.5 kb <i>Kpn</i> I- <i>Sal</i> I de pCPS17	este trabajo (Fig.1)
pCPS26	pKUN19 que contiene el fragmento de 3.0 kb <i>Hind</i> III del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS27	pCPS25 que contiene el fragmento de 2.3 kb <i>Xba</i> I (blunt)- <i>Cla</i> I de pCPS20	este trabajo (Fig.1)
pCPS28	pCPS27 que contiene el gen de 1.2 kb <i>Pst</i> I- <i>Xho</i> I Spc ^R de pIC-spc	este trabajo (Fig.1)
pCPS29	pKUN19 que contiene el fragmento de 2.2 kb <i>Sac</i> I- <i>Pst</i> I del operón de <i>cps</i>	este trabajo (Fig.1)
pCPS1-1	pKUN19 que contiene el fragmento de 5 kb <i>Eco</i> RV del operón de <i>cps</i> de tipo 1	este trabajo (Fig.1)
pCPS1-2	pKUN19 que contiene el fragmento de 2.2 kb <i>Hind</i> III del operón de <i>cps</i> tipo 1	este trabajo (Fig.1)
pCPS9-1	pKUN19 que contiene el fragmento de 1 kb <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I del operón de <i>cps</i> de serotipo 9	este trabajo (Fig.1)
pCPS9-2	pKUN19 que contiene el fragmento de 4.0 kb <i>Xba</i> I- <i>Xba</i> I del operón de <i>cps</i> serotipo 9	este trabajo (Fig.1)
Amp ^R : resistente a la ampicilina Spc ^R : resistente a la espectomicina cps: polisacárido capsular		

Tabla 2 Propiedades de los Orf en el locus *cps* de *S. suis* serotipo 2 y similitudes con el producto génico de otras bacterias

ORF	posición del nucleótido en la secuencia	número de aminoácidos	% de GC	función propuesta del producto génico ¹	similitud con el producto génico (% de identidad)
Orf2Z	1-719	240	44	Desconocido	<i>B. subtilis</i> YitS (26 %)
Orf2Y	2079-822	419	38	Regulación de la transcripción	<i>B. subtilis</i> YcxD (39 %)
Orf2X	2202-2934	244	39	Desconocido	<i>H. influenzae</i> YAAA (24 %)
Cps2A	3041-4484	481	39	Regulación	<i>S. pneumoniae</i> Cps19fA (58 %)
Cps2B	4504-5191	229	40	Determinación de la longitud de cadena	<i>S. pneumoniae</i> tipo 3 Orf1 (58 %)
Cps2C	5203-5878	225	40	Determinación/Exportación de la longitud de cadena	<i>S. pneumoniae</i> Cps23fD (63 %)
Cps2D	5919-6648	243	38	Desconocido	<i>S. pneumoniae</i> CpsB (62 %)
Cps2E	6675-8052	459	33	Glicosiltransferasa	<i>S. pneumoniae</i> Cps14E (56 %)
Cps2F	8089-9256	389	32	Glicosiltransferasa	<i>S. pneumoniae</i> Cps23fT
Cps2G	9262-10417	385	36	Glicosiltransferasa	<i>S. thermophilus</i> EpsF (25 %)
Cps2H	10808-12176	457	31	Glicosiltransferasa	<i>S. mutans</i> RGPEC, ^N (29 %)
Cps2I	12213-13443	410	29	CP Polimerasa.	<i>S. pneumoniae</i> Cps23fI (48 %)
Cps2J	13583-14579	332	29	Glicosiltransferasa	<i>S. pneumoniae</i> Cps14J (31 %)
Cps2K	14574-15576	334	37	Glicosiltransferasa	<i>S. pneumoniae</i> Cps14J (40 %)
"Cps2L"	15618-16635	103	37	Desconocido	-
"Cps2M"	16811-17322	-	38	-	<i>S. agalactiae</i> CpsF ^N (77 %)
					<i>E. coli</i> NeuA, ^N (47 %)
"Cps2N"	17559-18342	-	39	-	<i>S. agalactiae</i> CpsJ (43 %)
Cps2O	18401-19802	476	40	Transportador de unidad de repetición	<i>S. agalactiae</i> CpsK (41 %)
Cps2P	20327-21341	338	39	síntesis de ácido siálico	<i>S. agalactiae</i> NeuB (80 %)
					<i>E. coli</i> NeuB (59 %)
Cps2Q	21355-21865	170	42	síntesis de ácido siálico	<i>S. agalactiae</i> NeuC ^N (61 %)
					<i>E. coli</i> NeuC ^N (54 %)
Cps2R	21933-22483	184	40	síntesis de ácido siálico	<i>S. agalactiae</i> NeuC ^C (55 %) <i>E. coli</i> NeuC ^C (40 %)

5
10
15

Cps2S	22501-23125	208	42	síntesis de ácido siálico	<i>E. coli</i> NeuD (32 %)
Cps2T	23136-24366	395	40	CMP-NeuNAc sintetasa	<i>S. agalactiae</i> CpsF (49 %)
					<i>E. coli</i> NeuA (34 %)
"Orf2U"	24566-25488	168	42	Transposasa	<i>S. thermophilus</i> S1194 (51 %)
"Orf2V"	25691-26281	116	37	Transposasa	<i>S. pneumoniae</i> orf1 (85 %)

¹ Predicho por similitud de secuencia
^N Similitud se refiere a la parte amino terminal del producto génico
^C Similitud se refiere a la parte carboxi terminal del producto génico
 Las ORF entre " " están truncadas o son no-funcionales como resultado de las mutaciones puntuales o de cambio de marco

Tabla 3. Propiedades de los ORF en los genes cps de S. suis serotipos 1 y 9 y similitudes con el producto génico de otras bacterias

ORF	posición del nucleótido en la secuencia	% de G + C	número de aminoácidos	masa molecular prevista (kDa)	pl predicho	función propuesta del producto génico ¹	similitud del producto génico (% de identidad)	referencia/ núm. de acceso
Cps1E ²	1-1363	34 %	454	52.2	8.0	Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus suis</i> (86 %)	Cps2E (26)
							<i>Streptococcus pneumoniae</i> (48 %)	Cps14E (12)
Cps1F	1374-1821	33 %	149	17.3	8.2	Desconocido	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (83 %)	Cps14F (14)
Cps1G	1823-2315	25 %	164	19.5	7.5	Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (50 %)	Cps14G (14)
Cps1H	3035-4202	24 %	389	45.5	8.4	CP Polimerasa.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (30 %)	Cps14H (14)
Cps1I	4197-					Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (38 %)	Cps14J (13)
							<i>Lactococcus lactis</i> (31 %)	EpsG (29)
							<i>Streptococcus thermophilus</i> (33 %)	EpsI (28)
Cps1J						Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cps14J ()
							(13)	
Cps1K ³		37 %	278	32.5	7.8	Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (44 %)	Cps14J (13)
Cps9D ²	1-646	37 %	215	24.9	8.1	Desconocido	<i>Streptococcus suis</i> (89 %)	Cps2D (26)
Cps9E	680-					Glicosiltransferasa	<i>Staphylococcus aureus</i> (27 %)	Cap1D (18)
Cps9F		36 %	200	22.3	8.2	Glicosiltransferasa	<i>Staphylococcus aureus</i> (52 %)	Cap5M (17)
Cps9G		35 %	269	31.5	8.0	Desconocido	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (43 %)	(AB002668_4)
							<i>Haemophilus influenzae</i> (43 %)	Lsg (005081)
Cps9H ³		30 %	143	16.5	7.2	Desconocido	<i>Yersinia enterocolitica</i> (28 %)	RfbB (33)

¹Predicho por similitud de secuencia

² parte N-terminal de la proteína está carente

³ parte C-terminal de la proteína está carente

Tabla 4. Hibridación de los genes *cps* serotipo 2 y secuencias adyacentes con el ADN cromosómico de otros serotipos

sondas de ADN	serotipos																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	1/2			
<i>ori2Z</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>ori2Y</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>ori2X</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2B</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2C</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2D</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2E</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2F</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2G</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2H</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2I</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2J</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2K</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>cps2L</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2M</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2N</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2O</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2P</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2Q</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2R</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2S</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cps2T</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ori2U</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ori2V</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
repetición <i>aoopb</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ARM7A55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 5 Hibridación de genes *cps* serotipos 1 y 9 con el ADN cromosómico de otros serotipos de *S. suis*

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

sondas de ADN										
serotipo	<i>cps1E</i>	<i>cps1F</i>	<i>cps1G</i>	<i>cps1H</i>	<i>cps1I</i>	<i>cps9E</i>	<i>cps9F</i>	<i>cps9G</i>	<i>cps9H</i>	16rRNA
1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
10	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
11	-	-	-	+	-	+	±	-	-	+
12	-	-	-	+	-	+	±	-	-	+
13	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
18	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
19	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	+	-	+	±	-	-	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
24	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	-	±	-	-	+
27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28	-	-	-	+	-	+	±	-	-	+
29	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
30	-	-	-	+	-	+	±	-	-	+
31	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	-	±	-	-	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1/2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

5

Tabla 6 Virulencia del mutante silvestre y capsular de cepas de *S. suis* en cerdos libres de gérmenes

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Cepas <i>S. suis</i> ¹	cerdos/ grupo [n]	mortalidad ² [%]	morbilidad ³ [%]	índice clínico del grupo		índice de fiebre ⁷	índice de leucocito ⁸	aislamiento de <i>S. suis</i> en cerdos [n] por grupo en		
				síntomas específicos ⁵	síntomas no- específicos ⁶			CNS	serosa	articulaciones
10	4	100	100	11	88	43	44	2	3	4
10cpsB	4	0	0	0	10	1	3	1	3	2
10cpsEF	4	0	0	0	0	1	0	1	3	2

¹ cepa 10 en la cepa silvestre, cepas 10cpsB y 10cpsEF son cepas mutantes capsulares isogénicas
² lechones que murieron espontáneamente o tuvieron que sacrificarse por razones de bienestar animal
³ considerando sólo los cerdos con síntomas específicos
⁴ índice clínico: % de las observaciones que coinciden con los criterios descritos
⁵ síntomas específicos: ataxia, cojera en al menos una articulación, rigidez
⁶ síntomas inespecíficos: inapetencia, depresión
⁷ % de observaciones en el grupo experimental con una temperatura corporal de > 40° C
⁸ % de muestras de sangre en el grupo en el cual el número de granulocitos > 10¹⁰/l

Tabla 7 Cepas bacterianas y plásmidos

cepa/plásmido.	características pertinentes
Cepa	
<i>E.coli</i>	
XL2 blue	
<i>S. suis</i>	
cepas de referencia	serotipos 1-34
5667	serotipo 7, amígdalas (1993)
7037	serotipo 7, órganos (1994)
7044	serotipo 7, cerebros (1994)
7068	serotipo 7 (1994)
7646	serotipo 7 (1994)
7744	serotipo 7, pulmones (1996)
7759	serotipo 7, articulaciones (1996)
8169	serotipo 7 (1997)
15913	serotipo 7, meninges (1998)
Plásmido	
pKUN19	funciones de replicación pUC, Amp ^R
pGEM7Zf(+)	funciones de replicación pUC, Amp ^R
pCPS9-1	pKUN19 que contiene el fragmento de 1 kb <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I del operón de <i>cps</i> del serotipo 9
pCPS9-2	pKUN19 que contiene el fragmento de 4.0 kb <i>Xba</i> I- <i>Xba</i> I del operón de <i>cps</i> del serotipo 9
pCPS7-1	pKUN19 que contiene el fragmento de 1.6-kb <i>Pst</i> I del operón de <i>cps</i> de tipo 7
pCPS7-2	pGEM7 que contiene el fragmento de 2.7-kb <i>Sca</i> I- <i>Cl</i> aI del operón de <i>cps</i> de tipo 7
Amp ^R : resistente a la ampicilina cps: polisacárido capsular	

Tabla 8 Propiedades de los Orf en los genes *cps* de *S. suis* serotipo 7 y similitudes con el producto génico de otras bacterias

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Orf	posición del nucleótido en la secuencia	función propuesta del producto génico	similitud del producto génico (% de identidad)
Cps7E	1-719	Glicosiltransferasa	<i>Streptococcus suis</i> Cps9E (99 %)
Cps7F	1164-1863	Glicosiltransferasa	<i>Bordetella pertussis</i> BpIG ¹ (43 %)
			<i>Streptococcus suis</i> Cps2E ¹ (33 %)
Cps7G	1872-3086	biosíntesis del azúcar amino	<i>Bordetella pertussis</i> BpIF (48 %)
Cps7H	3104-3737	Glicosiltransferasa	<i>Escherichia coli</i> WbdN (35 %)
			<i>Streptococcus suis</i> Cps2K ² (31 %)
¹ Similitud se refiere a la parte C-terminal del producto génico ² Similitud se refiere a la parte N-terminal del producto génico			

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1.
Organización del agregado génico de *cps2* de *S. suis* tipo 2.

5

(A) mapa genético del agregado génico de *cps2*. Las flechas sombreadas representan los ORF potenciales. Los ORF interrumpidos indican la presencia de codones de terminación o mutaciones de cambio de marco. Las designaciones de los genes se indican más abajo de los ORF. Las flechas cerradas indican la posición de las secuencias promotoras potenciales. I indica la posición de la secuencia reguladora de la transcripción potencial. | | | indica la posición de la secuencia de repetición de 100-pb.

10

(B) Mapa físico del locus *cps2*.

Los sitios de restricción son como sigue: A: AluI; C: ClaI; E, EcoRI; H, HindIII; K, KpnI; M, MluI; N, NsiI; P, PstI; S, SnaBI; Sa: SacI; X, XbaI.

15

(C) Los fragmentos de ADN clonados en varios plásmidos.

Figura 2

El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR obtenidos con el ADN cromosómico de las cepas de *S. suis* pertenecientes a los serotipos 1, 2, 1/2, 9 y 14 y los conjuntos de iniciadores de *cps2J*, *cps1I* y *cps9H* como se describió en Materiales y Métodos. (A) Iniciadores de *cps1I*.

20

(B) Iniciadores de *cps2J* y (C) iniciadores de *cps9H*. Carriles 1-3: cepas del serotipo 1; carriles 4-6: cepas del serotipo 2; carriles 7-9: cepas del serotipo 1/2; carriles 10-12: cepas del serotipo 9 y carriles 13-15: cepas del serotipo 14.

25

(B) El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR obtenidos con los exudados de amígdalas recogidos de cerdos portadores de las cepas de *S. suis* tipo 2, tipo 1 o tipo 9 y los conjuntos iniciadores de *cps2j*, *cps1I* y *cpsH* como se describió en Materiales y Métodos. El ADN bacteriano adecuado para la PCR se preparó usando los métodos tamizaje múltiple como se describió previamente (20). (A) Iniciadores de *cps1I*. (B) Iniciadores de *cps2J* y (C) iniciadores de *cps9H*. Carriles 1-3: productos de la PCR obtenidos con exudados de amígdalas recogidos de cerdos portadores de cepas de *S. suis* tipo 1; carriles 4-6: productos de PCR obtenidos con exudados de amígdalas recogidos de cerdos portadores de cepas de *S. suis* tipo 2; carriles 7-9: productos de PCR obtenidos con exudados de amígdalas recogidos de cerdos portadores de cepas de *S. suis* tipo 9; carriles 10-12: productos de PCR obtenidos con el ADN cromosómico de las cepas serotipo 9, 2 y 1 respectivamente; carril 13: control negativo, sin ADN presente.

30

Figura 3

Secuencias de nucleótidos de CPS2 y secuencias de aminoácidos correspondientes a partir de los marcos de lectura abierta.

35

Figura 4

Secuencias de nucleótidos de CPS1 y secuencias de aminoácidos correspondientes a partir de los marcos de lectura abierta.

40

Figura 5

Secuencias de nucleótidos de CPS9 y secuencias de aminoácidos correspondientes a partir de los marcos de lectura abierta.

45

Figura 6

Secuencias de nucleótidos de CPS7 y secuencias de aminoácidos correspondientes a partir de los marcos de lectura abierta.

50

Figura 7

Alineaciones de las partes N-terminales de Cps2J y Cps2K. Los aminoácidos idénticos están marcados con las barras. Los aminoácidos que se muestran en negrita se conservan también en Cps14I, Cps14J de *S. pneumoniae* y varias otras glicosiltransferasas (19). Los residuos de aspartato marcados con asteriscos están fuertemente conservados.

55

Figura 8

Micrografías de transmisión electrónica de secciones delgadas de varias cepas de *S. suis*.

(A) cepa silvestre 10;

(B) cepa mutante 10cpsB;
(C) cepa mutante 10cpsEF.

Bar = 100 nm

5

Figura 9

(A) Cinética de la fagocitosis de cepas silvestre y mutante de *S. suis* por macrófagos alveolares porcinos. La fagocitosis se determinó como se describió en Materiales y Métodos. El eje Y representa el número de UFC por mililitro en los fluidos sobrenadantes como se determina por conteo en placa, el X eje x representa el tiempo en minutos.

10

□ cepa silvestre 10;
○ cepa mutante 10cpsB;
Δ cepa mutante 10cpsEF.

15

(B) Cinética de destrucción intracelular de cepas silvestre y mutante de *S. suis* por AM porcino. La destrucción intracelular se determinó como se describió en Materiales y Métodos. El eje Y representa el número de UFC por ml en los fluidos sobrenadantes después de la lisis de los macrófagos como se determina por conteo en placa, el eje X representa el tiempo en minutos.

20

□ cepa silvestre 10;
○ cepa mutante 10cpsB;
Δ cepa mutante 10cpsEF.

25

Figura 10 Alineación de la secuencia de nucleótidos del elemento de repetición altamente conservado de 100-pb.

1) repetición de 100-pb entre cps2G y cps2H
2) repetición de 100-pb dentro de "cps2M"
3) repetición de 100-pb entre cps2O y cps2P

30

Figura 11. Los agregados génicos de cps2, cps9 y cps7 de *S. suis* serotipos 2, 9 y 7.

(A) Organización genética del agregado génico de cps2 [84]. Las flechas grandes representan los ORF potenciales. Las designaciones de genes se indican más abajo de los ORF. Las flechas idénticamente llenas representan los ORF que mostraron homología. Las flechas cerradas pequeñas indican la posición de secuencias de promotor potenciales. | indica la posición de la secuencia reguladora de la transcripción potencial.

35

(B) Mapa físico y organización genética del agregado génico de cps9 [15]. Los sitios de restricción son como sigue: B: BamHI; P: PstI; H: HindIII; X:XbaI. Los fragmentos de ADN clonados en varios plásmidos se indican. Las flechas abiertas representan los ORF potenciales.

40

(C) Mapa físico y organización genética del agregado génico de cps7. Los sitios de restricción son como sigue: C: ClaI; P: PstI; Sc: Scal. Los fragmentos de ADN clonados en varios plásmidos se indican. Las flechas abiertas representan los ORF potenciales.

45

Figura 12 (A) El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR obtenidos con el ADN cromosómico de las cepas de *S. suis* pertenecientes a la serotipos 1, 2, 9 y 7 y el conjunto iniciador de cps7H. Las designaciones de las cepas se indican por encima de los carriles. C: control negativo, sin ADN presente. M: marcador de tamaño molecular (λ digerida con EcoRI y HindIII).

50

(B) El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR obtenidos con las cepas serotipo 7 recogidas en diferentes países y a partir de diferentes órganos. El ADN bacteriano adecuado para la PCR se preparó usando los métodos tamizaje múltiple como se describió previamente [89]. Las designaciones de las cepas se indican por encima de los carriles. M: marcador de tamaño molecular (λ digerida con EcoRI y HindIII).

REFERENCIAS

55

1. Arends, J. P., y H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* 10:131-137.
2. Arrecubieta, C., E. Garcia, y R. Lopez. 1995. Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167: 1-7

3. Arrecubieta, C., R. Lopez, y E. Garcia. 1994. Molecular characterization of cap3A, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J. Bacteriol.* 176: 6375-6383.
- 5 4. Clifton-Hadley, F.A. 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br. Vet. J.* 139:1-5.
5. Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, y M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* serotipo 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiol.* 144:325-332.
6. Cross, A. S. 1990. The biological significance of bacterial encapsulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150: 87-95.
7. Elliott, S. D. y J. Y. Tai. 1978. The type specific polysaccharide of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* 148: 1699-1704.
- 10 8. Feder, I., M. M. Chengappa, B. Fenwick, M. Rider y J. Staats. 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* 32:1256-1260.
9. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, y J. Henrichsen. 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2590-2594.
10. Gottschalk, M., S. Lacouture, y J. D. Dubreuil. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* type 2 haemolysin. *Microbiology* 141:189-195.
- 15 11. Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques, y R. Higgins. 1990. Haemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2156-2158.
12. Guidolin, A., J. M. Morona, R. Morona, D. Hansman, y J. C. Paton. 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. 1994. *Infect. Immun.* 62: 5384-5396.
- 20 13. Guitierrez, C., y J. C. Devedjian. 1989. Plasmid facilitating in vitro construction of PhoA fusions in *Escherichia coli*. *Nucl. Acid. Res.* 17: 3999.
14. Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, y J. Henrichsen. 1995. Description of six new capsular types (28 through 34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:405-406
- 25 15. Jacobs, A. A., P. L. W. Loeffen, A. J. G. van den Berg, y P. K. Storm. 1994. Identification, purification and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 62: 1742-1748.
16. Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry B.y R. Higgins. 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* 172:2833-2838.
17. Klein P., M. Kanehisa y C. DeLisi. 1985. The detection and classification of membrane spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 851: 468-476.
- 30 18. Kolkman, M. A. B., D. A. Morrison, B. A. M. van der Zeijst, y P. J. M. Nuijten. 1996. The capsule polysaccharide synthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: identification of the glycosyl transferase gene cps14E. *J. Bacteriol.* 178: 3736-3541.
19. Kolkman, M. A. B., W. Wakarchuk, P. J. M. Nuijten, y B. A. M. van der Zeijst. 1997. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glicosiltransferasas required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. *Mol. Microbiol.* 26: 197-208.
- 35 20. Kolkman, M. A. B., B. A. M. van der Zeijst y P. J. M. Nuijten. 1997. Functional analysis of glicosiltransferasas encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *J. Biol. Chem.* 272: 1950219508.
- 40 21. Konings, R. N. H., E. J. M. Verhoeven, y B. P. H. Peeters. 1987. pKUN vectors for the separate production of both DNA strands of recombinant plasmids. *Methods Enzymol.* 153: 12-34.
22. Korolik, V., B. N. Fry, M. R. Alderton, B. A. M. van der Zeijst, y P. J. Coloe. 1997. Expression of *Campylobacter hyoilei* lipo-oligosaccharide (LOS) antigens in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 143: 3481-3489.
- 45 23. Leij, P. C. J., R. van Furth, y T. L. van Zwet. 1986. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 2. Cellular Immunology, pp. 46.1-46.21. Editado por D. M. Weir, L. A. Herzenberg, C. Blackwell y L. A. Herzenberg. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
24. Lin, W. S., T. Cunneen, y C. Y. Lee. 1994. Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176: 7005-7016.
- 50 25. Liu, D., A. M. Haase, L. Lindqvist, A.A. Lindberg, y P. R. Reeves. 1993. Glycosyl transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enteritica*: Identification and characterization of transferase genes of group B, C2, and E1. *J. Bacteriol.* 175: 3408-3413.
26. Manoil, C., y J. Beckwith. 1985. A transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8129-8133.
- 55 27. Marsh, J. L., M. Erfle, y E. J. Wykes. 1984. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32:481-485.
28. Miller, J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

29. Morona, J. K., R. Morona, y J. C. Paton. 1997. Characterization of the locus encoding the *Streptococcus pneumoniae* type 19F capsular polysaccharide biosynthesis pathway. *Mol. Microbiol.* 23: 761-763.
30. Munoz, R., M. Mollerach, R. Lopez y E. Garcia. 1997. Molecular organization of the genes required for the synthesis of type 1 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*; formation of binary encapsulated pneumococci and identification of cryptic dTDP-rhamnose biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 25: 79-92.
- 5 31. Pearce B. J., Y. B. Yin, y H. R. Masure. 1993. Genetic identification of exported proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 9: 1037-1050.
32. Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 285-315.
- 10 33. Rossbach, S., D. A. Kulpa, U. Rossbach, y F. J. de Bruin. 1994. Molecular and genetic characterization of the rhizopine catabolism (*rocABRC*) genes of *Rhizobium meliloti* L5-30. *Mol. Gen. Genet.* 245: 11-24.
34. Rubens, C. E., L. M. Heggen, R. F. Haft, y R. M. Wessels. 1993. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* 8: 843-855.
- 15 35. Rubens, C. E., L. M. R. Wessels, L. M. Heggen, y D. L. Kasper. 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7208-7212.
36. Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York.
- 20 37. Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann, y M. A. Smits. 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun.* 64: 4409-4412.
38. Smith, H. E., H. J. Wisselink, U. Vecht, A. L. J. Gielkens y M. A. Smits. 1995. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiol.* 141: 181-188.
39. Sreenivasan, P. K., D. L. LeBlanc, L. N. Lee, y P. Fives-Taylor. 1991. Transformation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by electroporation, utilizing constructed shuttle plasmids. *Infect. Immun.* 59: 4621-4627.
- 25 40. Stringele F., J.-R. Neeser, y B. Mollet. 1996. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 178: 1680-1690.
41. Stockhofe-Zurwieden, N., U. Vecht, H. J. Wisselink, H. van Lieshout, y H. E. Smith. 1996. Comparative studies on the pathogenicity of different *Streptococcus suis* serotipo 1 strains. In *Proceedings of the 14th IPVS Congress*. pp. 299.
- 30 42. van Kranenburg, R., J. D. Marugg, I. I. van Swam, N. J. Willem y W. M. de Vos. 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24: 387-397.
43. van Leengoed, L. A., E. M. Kamp, y J. M. A. Pol. 1989. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. *Vet. Microbiol.* 19: 337-349.
- 35 44. van Leengoed, L. A. M. G., U. Vecht, y E. R. M. Verheyen. 1987. *Streptococcus suis* type 2 infections in pigs in The Netherlands (part two). *Vet Quart.* 9, 111-117.
- 45 45. Vecht, U., J. P. Arends, E. J. van der Molen, y L. A. M. G. van Leengoed. 1989. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of newborn germfree pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50:1037-1043.
- 40 46. Vecht, U., L. A. M. G. van Leengoed, y E. R. M. Verheyen. 1985. *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (parte uno). *Vet. Quart.* 7:315-321
47. Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, y H. E. Smith. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59:3156-3162.
48. Vecht, U., H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, y H. E. Smith. 1996. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotipo 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Vet. Microbiol.* 51:125-136.
- 45 49. Vecht, U., H. J. Wisselink, J. E. van Dijk, y H. E. Smith. 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.* 60:550-556.
- 50 50. Wagenaar, F., G. L. Kok, J. M. Broekhuijsen-Davies, y J. M. A. Pol. 1993. Rapid cold fixation of tissue samples by microwave irradiation for use in electron microscopy. *Histochemical J.* 25: 719-725.
51. Wessels, M. R. and M. S. Bronze. 1994. Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12238-12242.
52. Wessels, M. R., A. E. Moses, J. B. Goldberg, y T. J. DiCesare. 1991. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8317-8321.
53. Yamane, K., M. Kumamano, y K. Kurita. 1996. The 25°-36° region of the *Bacillus subtilis* chromosome: determination of the sequence of a 146 kb segment and identification of 113 genes. *Microbiol.* 142: 3047-3056.
- 55 54. Butler, J. C., R. F. Breiman, H. B. Lipman, J. Hofmann, y R. R. Facklam. 1995. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* 171: 885-889.

55. Charland, N., M. Jacques, S. Lacoutre y M. Gottschalk. 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotipos 1, 2 and 1/2. *Microbiol.* 143:3607-3614.
56. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, y J. Henrichsen. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2633-2636.
57. Heath, P. J., B. W. Hunt, y J. P. Duff. 1996. *Streptococcus suis* serotipo 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet. Rec.* 2:450-451.
58. Hommeze, J., L. A. Devrieze, J. Henrichsen, y F. Castryck. 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* 16:349-355.
59. Killper-Balz, R., y K. H. Schleifer. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:160-162.
60. Kolkman, M. A. B., B. A. M. van der Zeijst, y P. J. M. Nuijten. 1998. Diversity of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in *Streptococcus pneumoniae*. Submitted for publication.
61. Lee, J. C., S. Xu, A. Albus, y P. J. Livolsi. 1994. Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176:4883-4889.
62. Reek, F. H., M. A. Smits, E. M. Kamp, y H. E. Smith. 1995. Use of multiscreen plates for the preparation of bacterial DNA suitable for PCR. *BioTechniques* 19: 282-285.
63. Sau, S., N. Bhasin, E. R. Wann, J. C. Lee, T. J. Foster, y C. Y. Lee. 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotipo 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiol.* 143: 2395-2405.
64. Sau, S., y C. Y. Lee. 1996. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178: 2118-2126.
65. Sau, S., y C. Y. Lee. 1997. Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:1614-1621.
66. Smith, H. E., M. Rijnsburger, N. Stockhofe-Zurwieden, H. J. Wisselink, U. Vecht, y M. A. Smits. 1997. Virulent strains of *Streptococcus suis* serotipo 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotipo 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J. Clin. Microbiol.* 35:1049-1053.
67. Yamazaki, M., L. Thorne, M. Mikolajczak, R. W. Armentrout, y T. J. Pollock. 1996. Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88. *J. Bacteriol.* 178:2676-2687.
68. Zhang, L., A. Al-Hendy, P. Toivanen, y M. Skurnik. 1993. Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotipo O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol. Microbiol.* 9:309-321.
69. Clifton-Hadley, F.A. (1983). *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br. Vet. J.* 139, 1-5.
70. Vecht, U., van Leengoed, L. A. M. G. y Verheyen, E. R. M. (1985). *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (parte uno). *Vet. Quart.* 7, 315-321
71. Arends, J. P. y Zanen, H. C. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* 10, 131-137.
72. Hommeze, J., Devrieze, L.A., Henrichsen, J. y Castryck, F. (1986). Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* 16, 349-355.
73. Killper-Balz, R. y Schleifer, K. H. (1987). *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 160-162.
74. Gottschalk, M., Higgins, R. y Jacques, M. (1993). Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotipo 2 under different conditions. *Can. J. Vet. Res.* 57, 49-52.
75. Higgins, R. y Gottschalk, M. (1990). Un update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 249-252.
76. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M. y Henrichsen, J. (1991). Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2590-2594.
77. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Mittal, K. R. y Henrichsen, J. (1989) Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2633-2636.
78. Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. and Henrichsen, J. (1995). Description of six new capsular types (28 through 34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 405-406
79. Aarestrup, F. M., Jorsal, S. E. y Jensen, N. E. (1998). Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet. Microbiol.* 15, 59-66.
80. MacLennan, M., Foster, G., Dick, K., Smith, W. J. y Nielsen, B. (1996). *Streptococcus suis* serotipos 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. *Vet Rec.* 139, 423-424.
81. Sihvonen, L., Kurl, D. N. y Henrichsen, J. (1988). *Streptococcus suis* isolates from pigs in Finland. *Acta Vet. Scand.* 29, 9-13.
82. Boetner, A. G., Binder, M. y Bille-Hansen, V. (1987). *Streptococcus suis* infections in Danish pigs and experimental infection with *Streptococcus suis* serotipo 7. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B*, 95, 233-239.
83. Smith, H. E., Veenbergen, V., van der Velde, J., Damman, M., Wisselink, H. J. y Smits, M. A. (1999). The *cps* genes of *Streptococcus suis* serotipos 1, 2 y 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* submitted

84. Smith, H. E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. y Smits, M. A. (1999). Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotipo 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67, 1750-1756.
- 5 85. Miller, J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
86. Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
87. Allen, A. y Maskell, D. (1996). The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 19, 37-52.
- 10 88. Wang, L. y Reeves, P. R. (1998). Organization of *Escherichia coli* 0157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect. Immun.* 66, 3545-3551.
89. Wisselink, H. J., Reek, F. H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M. A. y Smith, H. E. (1999). Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Vet. Microbiol.* 67, 143-157.
- 15 90. Konings, R. N. H., Verhoeven, E. J. M. y Peeters, B. P. H. (1987). pKUN vectors for the separate production of both DNA strands of recombinant plasmids. *Methods Enzymol.* 153, 12-34.

Reivindicaciones

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
1. Uso de un mutante sin cápsula de *Streptococcus suis* que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (cps) para la preparación de una vacuna.
 2. Una vacuna que comprende un mutante sin cápsula de *Streptococcus suis* que tiene una mutación en el agregado génico del polisacárido capsular (cps).
 3. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho mutante de *Streptococcus suis* es una cepa de *Streptococcus suis* serotipo 2.
 4. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en donde dicho mutante es capaz de expresar un factor de virulencia o determinante antigénico de *Streptococcus*.
 5. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 en donde dicho mutante es capaz de expresar una proteína que no es de *Streptococcus*.
 6. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicha proteína que no es de *Streptococcus* se deriva de un patógeno.
 7. Un método para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica causada por *Streptococcus suis* que comprende probar una muestra recogida de al menos un sujeto de una población vacunada con una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para la presencia de cepas encapsuladas de *Streptococcus suis*.
 8. Un método para controlar o erradicar una enfermedad estreptocócica causada por *Streptococcus suis* que comprende probar una muestra recogida de al menos un sujeto de una población vacunada con una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para la presencia de anticuerpos específicos a la cápsula dirigidos contra las cepas *Streptococcus suis*.

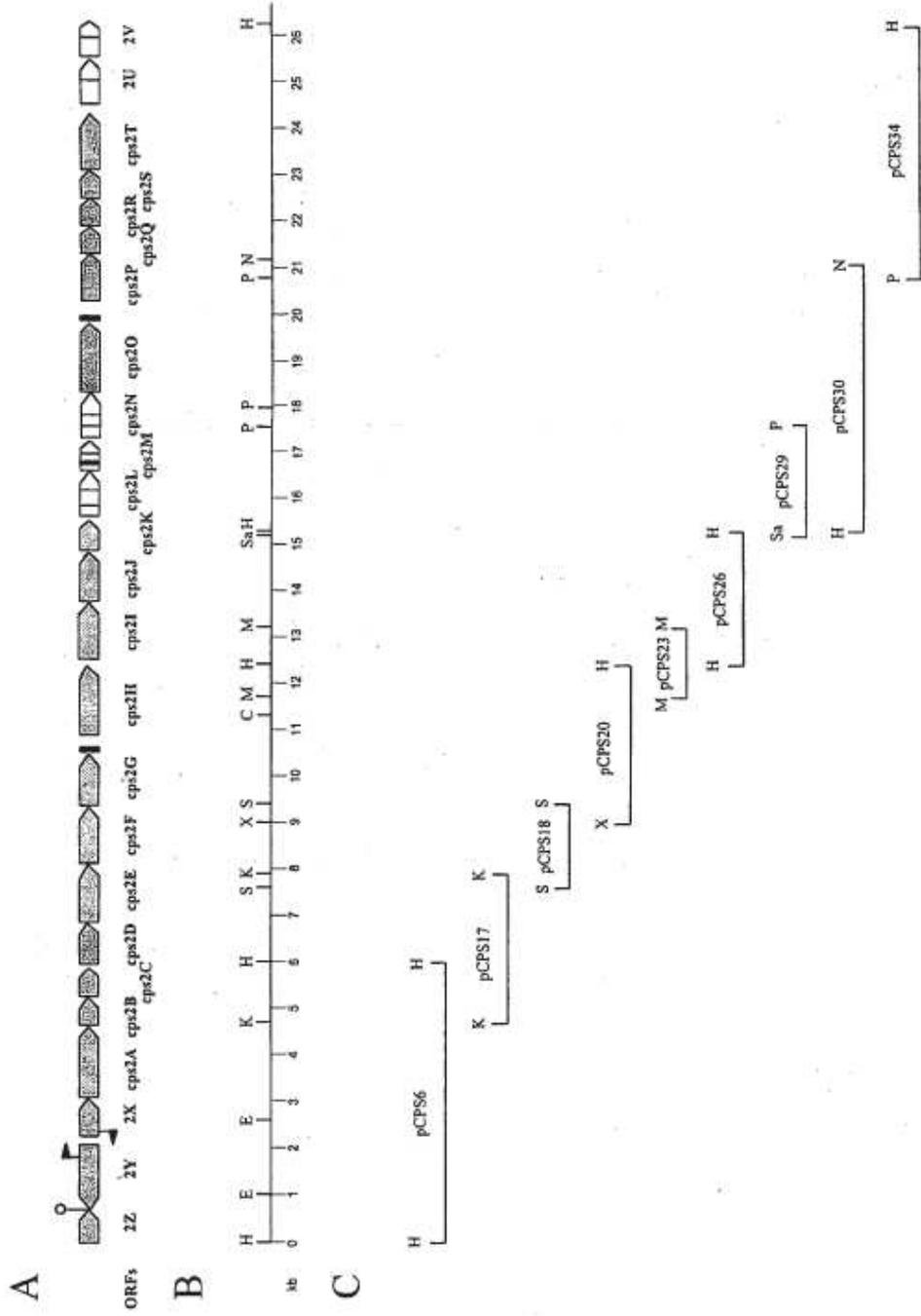


Fig. 1

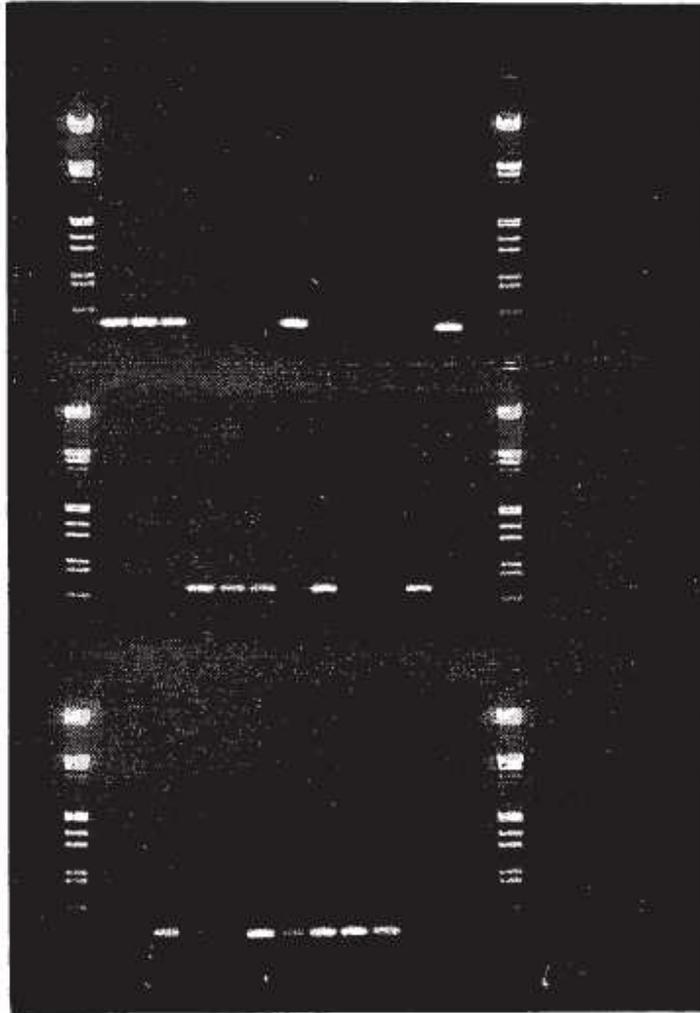


Fig. 2

AAGCTTGGAT ATTGATCACA TGATGGAGGT GATGGAAGCA TCTAAGTCTG CAGCGGGGTC
GGCGTGCCCA AGTCCGCAGG CTTATCAGGC AGCTTTTGAG GGAGCTGAGA
ACATTATCGT TGTGACGATT ACAGGTGGGC TATCGGGTAG TTTTAAATGCG GCACGTGTAG
CTAGGGGATAT GTATATCGAA GAGCATCCGA ATGTCAATAT CCATTTGATA
GATAGTTTGT CAGCCAGTGG GGAAATGGAT TTACTTGTAC ACCAAATCAA TCGCTTAATT
AGTGCAGGAT TAGATTTTCC ACAAGTAGTA GAAGCGATAA CTCACTATCG
GGAACACAGT AAGCTCCTCT TTGTTTTAGC GAAAGTTGAT AATCTTGTTA AGAATGGAAG
ACTGAGCAAA TTGGTAGGCA CTGTCTGTTG TCTTCTCAAT ATCCGTATGG
TTGGTGAGGC AAGTGTGAA GGAAATTAG AGTTGCTTCA AAAGGCGCGT GGTGATAAGA
AATCTGTGAC AGCAGCCTTT GAAGAAATGA AAAAAGCAGG CTATGATGGT
GGTCGAATTG TTAGGGCCCA CCGCAACAAT GCTAAGTTCT TCCAACAATT CTCAGAGTTG
GTAAAAGCAA GTTTTCCAAC GGCTGTTATT GACGAAAGTTG CAACATCAGG
TCTATGCAGT TTTTATGCTG AAGAAGGTGG ACTTTTGATG GGCTACGAAG TGAAGCGTG
ATTACAGAG TAATAATTTT GGGCTGTAAT TTCCGCTATA GAATAATCCC
CCTCTTCTTC TAAGTTCGAG GGGGATTGTT TGTATGAGAC TATTGGATTT CATTCATTCA
AATATCTTAC GAATTGCTCC AGTTTATCTG CAAAATCTTG TTCAAAGAAG
ATCTGTAAGA AATCAGCTTT CTGTCCGCTG AAATAATAAC ATTTTCCAAA CATGTGTTGG
ATGCTAGGAG AAAGAATCCC CTTGCTTAGC TGAAGGTCA CGTCCCTT
TGGAATTCGA TACGGGATGT TTAAGCGTA TTCTCTAGA CAGTCTTTTA TTTTATCCA
TTGAGCGTGA TAAATGTGAT GAAGATGCTG TGTGTTCCGC GCAAACATAC
CGTTATCAAT GTAGAGCGAG AGAGCTTTTT GCATGATAAG ATTGGTATCG TAGTCGATTA
GACTCTTATG TTTGATGAAG ATATCACGTA GCTGATTAGG AAGGCTGATT
GCACCGATTC GGAGGGCAGG AAAGAGTGTG GGTGTAAGG ATTTTATATA GATGACGCGA
TTATCTGTAT CAAGATAGTG TAAAGGTAGG CTATGACTAG AGTCGAAATC
TGCTAAATAG TCATCCTCAA TGATGTAGAC ATCGTATTGC TTTGCTAATT TTACGATGGC
TGTTTTTGTG GCTATATCAT AGGTTGAACC GAGAGGGTTG TGCAAGCGAG
GAATTTGTGA GAAAACTTA ATTTTCCAG TTTGGAAGAT ACTTTCCAA TCTTCTAGGT
CAATTCATC TAAATCCCGT TCAATTTGTT GATAGGGGAT TCCTTGATGT
CGAATGAGCT CTATCATTCC TGAATAGGTA GGGTTCTCTA TCAAGATTC CGTTTTTCCA
GCCAAGGTTT CCATTTGTGT GAGAATATAT AGAGCTTGT GACTACCAGC
TGTGATAACC AGCTGGTCTT TTTTGTATA GACATGATAG TCCATTAACA GACTTTGAAC
GGAGGAAATC AATCTGCCA ATCCCTCTTG CTGGTGATAG TAGTTGAATA
GGTAATTTTC CCGCCCAATA AGACTTCTT TTAGACAAAT CCGAAAATCT TCATAGGTAA
TTCTTGAAAG TCTGTAGGAT TGAGCTCTAC AGGTATGGTC TTGGAAATCT
CTATCCTCTA AGATATAATA ACCGCTTTTT TCGACAGCGT AGATCTTATT TTGSTATTTT
AATTCCAACA TAGCCTTTTG GACAGTGTCT TTGCTACAAT GATATTGCTC
GCGGAGTTGA CGGATAGAAG GTAATTTCTC TCCACGTTTG AATCGATGTT CCTCTATTCC
AGTCAAAATA TCTTGGATGA TAAGTTGATA TTTTTTCATC TAGGTCCCTT
TTTTTATAGA CTATGTTACT AGCTAGTATA TAGAAAAAAT TAGAAGAAAGA CAATATATGA
ATAATGGGGT TGAGGTTCCAG GAATTAAGCT ACTCTATGGT ATAAATTAAGT
GATGAAAATA ATTATACCTA ATGCAAAAGA AGTAAATACA AATCTAGAGA ATGCCTCGTT
TTATCTCCTG TCTGATCGAA GCAAGCCGGT GCTGGATGCC ATAAGTCAAT
TTGATGTAAG AAAGATGGCT GCCTTTTATA AATTGAATGA AGCAAAGGCT GAGTTAGAAG
CTGACCGTTG GTATCGAATC AGGACAGGTC AAGCAAAAAC CTATCCAGCC
TGCCAGTTAT ATGATGGTCT CATGTATCGT TATATGGATA GCGGAGGTAT AGATTCGAAA
GAAGAAAATT ATTTACGTGA CCACGTTCTG GTAGCGACAG CCTTATACGG
ATTGATTCAT CCTTTTGAAT TCATTTACC TCACCCTTA GATTTTCAAG GGAGCTTAAA
GATAGGCAAT CAGTCTTTGA AACAGTACTG GCGACCGTAT TATGACCAAG
AAGTTGGTGA TGATGAACTG ATTCTCTCAC TGGCTTCGTC AGAATTTGAG CAGGTGTTTT
CTCCCCAGAT TCAGAAAAGA TTAGTTAAAA TTCTTTTCAT GGAAGAAAA
GCAGGTCAGC TAAAAGTTCA CTCGACTATA TCAAAAAAAG GCAGAGGAAG ATTGCTGTCC
TGTTTGGCTA AGAACAATAT TCAGGAATTA TCGGACATC AAGATTTTAA
GGTGGATGGC TTTGAATATT GTACTTCCGA ATCAACGGCA AACCAACTTA CCTTCATACG
ATCAATAAAA ATGTGAAAT ATGAAAAGA TAACGTTTTT CAGCGCTAAA
AAGGGTAGAA AAATATTAAT TTCTATGATA TAATGGATGC GTTATAGGTA AAAGCTAGG
AAGGTTGTTT ATGAAAAAGA GAAGCGGACG AAGTAAGTCG TCCAAGTTCA
AATTGGTAAA TTTTGGCTT TTGGGACTTT ATTCCATTAC TCTATGTTT TTCTTAGTGA
CCATGTATCG CTATAACATC CTAGATTTCC GGTATTTAAA CTATATTGTG
ACCGTTTTGC TAGTAGGAGT GGCAGTATTG GCTGGATTAT TGTGTGGCG TAAGAAAGCG
CGCATATTTA CAGCGCTCTT ACTTGTTTTT TCACTGGTCA TCACGTCTGT

TGGGATCTAT GGAATGCAAG AAGTTGTAAA ATTTTCAACA CGACTAAATT CAAATTCGAC
 ATTTTCAGAA TATGAAATGA GTATCCTTGT CCCAGCAAT AGTGATATTA GATAACATCA
 CGGACGTTTCG TCAGCTTACT AGTATCCTTG CTCCAGCCGA ATACGACCAA GATCAACATCA
 CCGCTTTTATT GGATGACATA TCCAAAATGG AATCTACTCA ACTAGCAACT
 AGCCCCGGGA CTTCTTACCT GACAGCATAT CAATCTATGT TGAATGGCGA GAGTCAAGCG
 ATGGTGTTC ACGGAGTTTT TACCAATATT TTAGAAAATG AAGATCCAGG
 CTTTTCTTCA AAAAGTAAAA AAATATATAG TTTCAAAAGT ACTCAGACTG TTGAAACAGC
 TACTAAGCAG GTGAGTGGAG ATAGCTTTAA TATCTATATT AGTGGTATTG
 ATGCTTATGG ACCGATTCT ACGGTCTCTC GTTCAGATGT CAATATCATT ATGACTGTCA
 ATCGTGCGAC ACATAAGATT TTATTGACAA CTACTCCACG AGATTCATAC
 GTTGCTTTTCG CAGATGGCGG GCAAAATCAA TACGATAAAC TAACACATGC TGGTATTTAC
 GGTGTCAATG CTTCTGTGCA CACCTTAGAA AATTTTTATG GGTATGACAT
 TAGCAATTAT GTGCGGTTGA ACTTCATTTT CTTCCCTCAA TTAATCGACT TGGTGGGTGG
 AATTGATGTA TATAACGATC AAGAATTTAC AAGTTTACAT GGGAATTATC
 ATTTCCCTGT TGGACAAGTT CATTTAACCT CAGACCAAGC ATTAGGCTTC GTTCGAGAGC
 GCTACTCTTT AACAGGGGGT GACAATGACC GTGGTAAAAA CCAGGAAAAA
 GTGATTGCTG CCTTGATTAA AAAGATGAGT ACGCCAGAGA ATCTAAAAAA TTACCAGGCA
 ATCCTATCTG GATTGGAAGG CTCATTCAA ACGGATTTGA GCTTAGAAAC
 GATTATGAGT TTAGTGAATA CCCAACTAGA ATCAGGAACA CAATTTACAG TAGAGTCACA
 AGCATTGACA GGAACAGGAC GCTCAGACTT ATCTTCTTAT CCGATGCCTG
 GATCACAACT TTATATGATG GAAATTAACC AAGATAGTCT GGAGCAATCA AAGGCAGCGA
 TTCAGTCCGT ACTTGTGAA AAATAAAGAT TTTAGGAGAA AATATGAACA
 ATCAAGAAGT AAATGCAATC GAAATCGATG TTTTATTCTT ACTAAAAACA ATTTGGAGAA
 AGAAAATTTT AATTCTCTTA ACTGCAAGTGT TGACTGCGGG GTTGGCATT
 GTCTACAGTA GTTTTTTAGT GACACCTCAA TATGACTCCA CTACCCGTAT CTATGTAGTG
 AGTCAAATG TTGAAGCCGG TGGCGGCTTG ACTAACCAAG AGTTACAAGC
 GGGTACCTAT TTGGCAAAAG ACTATCGGGA AATATCCTA TCACAAGATG TATTGACACA
 AGTAGCAACG GAATTGAATC TGAAAGAGAG TTTGAAAGAA AAAATATCAG
 TTTCTATTCC TGTTGATACT CGTATCGTTT CTATTTCTGT GCGTGATCGG GATCCAAATG
 AAGCGGCACG TATTGCAAAAT AGCCTTCGCA CCTTTGCAGT GCAAAAAGTT
 GTTGAGGTCA CCAAGGTAAG CGATGTGACG ACCTTGAAG AAGCAGTCCC AGCGGAAGAA
 CCAACCACCT CAAATACAAA ACGAAATATC TTGCTTGGTT TATTAGCTGG
 AGGTATCTTG GCAACAGGTC TTGTACTGGT TATGGAGGTT TTGGATGACC GTGTAACAGC
 TCCTCAGGAC ATCGAAGAGG TAATGGGATT GACATTGCTA GGTATAGTAC
 CAGATTTCGAA GAAATTAATA TAGGAGAACA ATATGGCGAT GTTAGAAATT GCACGTACAA
 AAAGAGAGGG AGTAAATAAA ACCGAGGAGT ATTTCAATGC TATCCGTACC
 AATATTCAGC TTAGCGGAGC AGATATTAAG GTTGTGGTA TTACCTCTGT TAAATCGAAT
 GAAGGTAAAG GTACAACCTG GCTAGTCTC GCTATTGCCT ATGCTCGTTC
 AGGTTATAAG ACCGTCTTGG TGGATGCAGA TATCCGAAAT TCAGTCAATG CTGGTTTCTT
 CAAGCCAAT ACAAAGATTA CAGGTTTGAC GGATTACCTA GCAGGGACAA
 CAGACTTGTC TCAAGGATTA TGCATACAG ATATTCCAAA CTTGACCSTA ATTGAGTCAG
 GAAAGGTTTC TCCCAACCCT ACTGCCCTTT TACAAAGTAA GAATTTTGAA
 AATCTACTTG CGACTCTTCG TCGCTATTAT GATTATGTTA TCGTTGACTG TCCACCATTA
 GGAAGGTTAA TTGATGCAGC TATCATTGCA CAAAATGTG ATGCGATGGT
 TGCAGTAGTA GAAGCAGGCA ATGTTAAGTG CTCATCTTTG AAAAAAGTAA AAGAGCAGTT
 GGAACAAACA GGCACACCGT TCTTAGGCGT TATCTTGAAC AAATATGATA
 TTGCCACTGA GAAGTATAGT GAATACGGAA ATTACGGCAA AAAAGCCTAA TTTCTCAGAT
 AACATAAGTT TGATAAGTAG GTATTAATAT GATTGATATC CATTCCGATA
 TCATATTTGG TGTGGATGAC GGTCCCAAAA CTATTGAAGA GAGCCTGAGT TTGATAAGCG
 AAGCTTATCG TCAAGGTGTT CGCTATATCG TAGCGACATC TCATAGACGA
 AAAGGGATGT TTGAAACACC AGAAAAATC ATCATGATTA ACTTTCTTCA ACTTAAAGAG
 GCAGTAGCAG AAGTTTATCC TGAAATACGA TTGTGCTATG GTGCTGAATT
 GTATTATAGT AAAGATATCT TAAGCAAACCT TGAAAAAAG AAAGTACCAA CACTTANTGG
 CTGCTGCTAT ATTCTCTTGG AGTTCAGTAC GGATACTCCT TGGAAAGAGA
 TTCAAGAAGC AGTGAACGAA ATGACGCTAC TTGGGCTAAC TCCCGTACTT GCCCATATAG
 AGCGTTATGA TGCTCTGGCA TTTCAAGTAC AGAGAGTAGA AAAGCTAATT
 GACAAGGGAT GCTACACTCA GGTAAATAGT AACCATGTGT TGAAGCCTGC TTTAATTGGC
 GAACGAGCAA AAGAATTTAA AAAACGTA CTGATTTTTT TAGAGCAGGA
 TTTAGTACAT TGTGTTGCTA GCGATATGCA TAATTTATAT AGTAGACCTC CGTTTATGAG
 GAGGCGTAT CAGCTTGTA AAAAAAGTA TGGTGAGGAT AGAGCGAAGG

Fig. 3 cont.

```

CTTTGTTCAA GAAAAATCCT TTGTTGATAT TGAAAAATCA AGTACAGTAA CCTCATAGAA
ATAGTGGAGG AGCTATGAAT ATTGAAATAG GATATCGCCA AACGAAATTG
GCATTGTTTG ATATGATAGC AGTTACGATT TCTGCAATCT TAACAAGTCA TATACCAAAT
GCTGATTTAA ATCGTCTCTGG AATTTTTATC ATAATGATGG TTCATTATTT
TGCAATTTTT ATATCTCGTA TGCCGGTTGA ATTTGAGTAT AGAGGTAATC TGATAGAGTT
TGAAAAACA TTTAACTATA GTATAATATT TGTAATTTTT CTTATGGCAG
TTTCATTTAT GTTAGAGAA AATTTTCGCAC TTCAAGACG TGGTGCCGTG TATTTACAT
TAATAAACTT CGTTTTGGTA TACCTATTTA ACCTAATTAT TAAGCAGTTT
AAGGATAGCT TTCTATTTTC GACAACCTAT CAAAAAAGA CGATTCTAAT TACAACGGCT
GAACATGGG AAAATATGCA AGTTTTATTT GAATCAGATA TACTATTTCA
AAAAATCCTT GTTGCAATGG TAATTTTAGG TACAGAAATA GATAAAATTA ATTTACCATT
ACCGCTCTAT TATTCTGTTG AAGAAGCTAT AGGGTTTTCA ACAAGGGAAG
TGGTCGACTA CGTCTTTATA AATTTACCAA GTGAATATTT TGACTTAAAG CAATTAGTTT
CAGACTTTGA GTTGTAGGT ATTGATGTAG GCCTTGATAT TAATTCATT
GGTTTTACTG TGTGAAGAA TAAAAAATC CAAATGCTAG GTGACCATAG CATCGTCACT
TTTTCCACAA ATTTTATAA GCCTAGTCAC ATCTGGATGA AACGACTTTT
AGATATACTT GGAGCAGTAG TCGGGTTAAT TATTAGTGGT ATAGTTTCTA TTTTGTTAAT
TCCAATTATT CGTAGAGATG GTGGGCCAGC CATTTTTGTCT CAGAAACGAG
TTGGACAGAA TGGACGCATA TTTACATTCT ACAAGTTTCG TTCGATGTTT GTTGATGCCG
AGGTACGTAA GAAAGAATTA ATGGCTCAA ACCAGATGCA AGGTGGGATG
TTCAAATGG ACAACGATCC TAGAATTACT CCAATTGGAC ACTTCATACG AAAACAAGT
TTAGATGAGT TACCACAATT TTATAATGTT CTAATTGGAG ATATGAGTCT
AGTCGGTACC CGTCCGCTA CAGTTGATGA ATTTGAAAA TATACTCCTA GTCAAAAGAG
AAGATTGAGT TTTAAACCAG GGATTACAGG TCTTTGGCAA GTGAGCGGAA
GAAGTGATAT CACAGATTTT AATGAAGTCG TTAGGCTGGA CCTAACATAC ATTGATAAAT
GGACCATCTG GTCAGACATT AAGATTTTAT TGAAGACAGT GAAAGTTGTA
TTGTTGAGAG AGGGAGGTCA GTAAGACTCC TTTAAAACAA AGAATAGTAG TAGGGGATAT
GAGAACAGTT TATATTATTG GTTCAAAGG AATACCAGCA AAGTATGGTG
GTTTCGAGAC TTTCTAGAA AAATTAACCT AGTATCAGAA AGATAAATCA ATTAATTATT
TTGTTGCATG TACAAGAGAA AATTCAGCAA AATCAGATAT TACAGGAGAA
GTTTTTGAAAC ATAATGGAGC AACATGTTTT AATATTGATG TGCCAAATAT TGGTTCAGCA
AAAGCCATTC TTTATGATAT TATGGCTCTC AAGAAATCTA TTGAAATTCG
CAAAGATAGA AATGATACCT CTCCAATTTT CTACATTCTT GCTGTGCGGA TTGGTCCTTT
CATTTATCTT TTTAAGAAGC AGATTGAATC AATGGGAGGT CAACTTTTCG
TAAACCCAGA CGGTCATGAA TGGTACGTCG AAAAGTGGAG TTATCCCGTC CGACAGTATT
GGAAATTTTC TGAGAGTTTG ATGTTAAAT ACCTGATTT ACTAATTTGT
GATAGCAAAA ATATTGAAAA ATATATTCAT GAAGATTATC GAAAATATGC TCCTGAAACA
TCTTATATTG CTTATGGAAC AGACTTAGAT AAATCACGCC TTTCTCCGAC
AGATAGTGTA GTACGTGAGT GGTATAAGGA GAAGGAAAT TCAGAAAATG ATTACTATTT
GGTTGTTGGA CGATTTGTGC CTGAAAATAA CTATGAAGTA ATGATTCGAG
AGTTTATGAA ATCATATTCA AGAAAAGATT TTGTTTTGAT AACGAATGTA GAGCATAAAT
CCTTTTATGA GAAATGAAA AAAGAAACAG GGTTCGATAA AGATAAGCGT
ATAAAGTTTG TTGGAACAGT CTATAATCAG GAGCTGTTAA AATATATTCG TGAAAATGCA
TTTGCTTATT TTCATGGTCA CGAGTTTGA GGAACGAACC CATCTTTACT
TGAAGCACTT TCTTCTACTA AACTAAATCT TCTTCTAGAT GTGGGCTTTA ATAGAGAAGT
AGGGGAAGAA GGAGCGAAAT ACTGGAATAA AGATAATCTT CACAGAGTTA
TTGACAGTTG TGAGCAATTA TCACAAGAAC AAATTAATGA TATGGATAGT TTATCAACAA
AACCAAGTCAA AGAAAGATTT TCTTGGGATT TTATTGTTGA TGAGTATGAG
AAGTTGTTTA AAGGATAAGT TATGAAAAAG ATTCTATATC TCCATGCTGG AGCAGAATTA
TATGGGGCAG ATAAGTTTCT CTTGGAACCT ATAAAAGGCT TAGATAAGAA
TGAATTTGAA GCGCATGTTA TCCTACCTAA TGATGGAGTC CTAGTGCCAG CATTAAGAGA
AGTTGGTGGC CAAGTTGAAG TTATTAACTA TCCAATTCCTA CGTAGGAAAT
ATTTTAAATCC AAAAGGGATT TTTGACTACT TCATATCATA TCATCACTAT TCTAAACAGA
TTGCTCAATA TGCCATAGAA AATAAGGTTG ACATAATTCA CAATAACT
ACCGCTGCTCT TAGAAGGCAT TTATCTGAAG CGAAAACTCA AATTACCTTT GTTGTGGCAT
GTTCAATGAGA TTATTGTCAA ACCTAAATTC ATCTCTGATT CGATCAATTT
TTAATGGGG CGTTTTGCTG ATAAGATTGT GACAGTTTCA CAGGCTGTGG CAAACCATAT
AAAACAATCA CCTCATATCA AAGATGACCA AATCAGTGTG ATCTACAATG
GGGTAGATAA TAAAGTGTTC TATCAGTCCG ATGCTCGGTC TGTTGAGAA AGATTTGACA
TTGACGAAGA GGCTCTTSTC ATTTGATGAG TCGGTCGAGT CAATGCGTGG

```

Fig. 3 cont.

AAAGGACAAG GAGATTTTTT AGAAGCAGTT GCTCCTATAC TCGAACAGAA TCCAAAAGCT
ATCGCCTTTA TAGCAGGAAG TGCTTTTGAA GGAGAAGAGT GGCGAGTAGT
AGAANTTAGAA AAGAAGATT CTCAATTAATA GGTCTCTTCT CAAGTCAGAC GAATGGATTA
TTATGCAAAAT ACCACTGAAT TATATAATAT GTTTGATATT TTTGTACTTC
CAAGTACTAA TCCAGACCCT CTACCAACGG TTGTAATAAA AGCAATGGCA TCGGGTAAAC
-CTGTTGTCGG-TTACCGACAT GGTGGTGTTC GTGAGATGGT-GAAAGAAGGT
GTTAACGGTT TCTTAGTCAC TCCGAACTCA CCGTTAAATT TATCAAAAAGT AATTCTTCAG
TTATCGGAAA ATATAAATCT CAGAAAAAAA ATTGGTAATA ATCTATAGA
ACGTCAAAAA GAACATTTTT CGTTAAAAAG CTATGTAAAA AATTTTTCGA AAGTCTACAC
CTCCCTCAAA GTATACTGAT TGGCTGAAGT GAATGCTTTA GTATAGCGAT
TTATCGTATT CTCATTCCAT AAAACAAATG TTCAGAAACA GTTATAAGT AATTCTAAAG
GGCACTCTA TAAACTCCCA AAATTGCGAA TTTGGAGTTA CGAAAGCCTT
GTTAAATCAA CATTTTTAAAT TTTAGAAAAT TAGTTTTTAG AGCTCCCCTA AAATAGAAGA
TAACAGAAGG GAGCCTTCAA AAACCTCATT TTTAATTGGA TTGTAGAAAA AAGTCTACAC
ACTGTTAAAT CAATATTTAG ATTTTTAGGA GTTCAGTTTT TGGGGGGAGA GCTTAATAAT
CTATGCACATA TATTTGAAA AATATATGGT GTAAAATCAG AACTGATGGT
CGTGGCAAAA AAGAGAATGA GGAATTTATG AAAATTTATT CTTTTACAAT GGTAAATAAC
GAAAGTGAGA TAATAGAGTC ATTTATACGG TATAATTATA ACTTTATTGA
CGAGATGGTC ATTATTGATA ATGTTGTGAC AGATAACACG ATGCAAATTA TTTTTAATTT
GATTAAGAG GGATATAAAA TATCCGTATA TGATGAGTCT TTAGAGGCAT
ATARTCAGTA TCGACTTGAT AATAAATATC TAACGAAAT AATTGCTGAA AAAAATCCAG
ATTTGATAAT ACCTTTGGAT GCGGATGAAT TTTTAAACAG CGATTCAAAT
CCACGGAAAC TTTTGAACA ACTGGACTTA GAAAAGATAC ATTTATGTGA TTGGCAATGG
TTTTGTTATGA CTAaaaaaaga TGATATTAAT GATTCGTTTA TACCACGTAG
AATGCAATAT TGTTTTGAAA AACCTGTTTG GCATCATTCT GATGGTAAAC CAGTTACTAA
ATGTATAAT TCCGCTAAGT ATTACAAAAA AATGAATTTA AAGCTATCGA
TGGGACATCA CACTGTTTTT GGTAACCCAA ATGTAAGGAT AGAACATCAT AATGATTGGA
AATTTGCACA TTATCGAGCT ATTAGCCAAG AGCAATTAAT TTATAAAACA
ATTTGTTACA CTATTCGCGA TATTGCTACT ATGAGAAACA ATATCGAAAC AGCTCAAAGA
ACAAATCAGA TGGCGCTCAT TGAATCTGGC GTGGATATGT GGGAAACGGC
GAGAGAAGCC TCTTATTAG GTTATGATTG TAATGTTATA CATGCACCAA TTGATTTAAG
TTTTTGTAAM GAAATATTG TAATAAATA TAACGAATA TCCAGAGAAA
CAGTAGCAGA ACGCGTGATG AAAACGGGAA GAGAAATGGC TGTTCTGCA TATAATGTGG
AGCGAAAACA AAAAGAAAAG AAATTTCTAA AACCTATTAT ATTTGTATTA
GATGGGTTAA AAGGAGATGA GTATATTCAT CCCAATCCAT CAAATCATTT GACGATCTTA
ACTGAATGT ATAACGTCAG AGGCTTACTT ACCGATAATC ACCAAATTA
ATTTCTCAAA GTTAATTATA GATTAATTAT AACTCCAGAT TTTGCTAAGT TTTTACCGCA
TGAATTTATT GTTGTAACCAG ATACCTTGGA TATAGAGCAA GTTAAAAGCC
AGTATGTTGG TACAGGTGTA GACTTGTCAG AGATTATTC TTTAAAAGAG TATCGAAAAG
AGATAGGCTT TATTGGTAAT TTGTATGCGC TTTTAGGATT TGTTCCGAAT
ATGCTCAATA GAATTTATCT ATATATTCAG AGAAACGGTA TTGCAAACAC TATTATAAAA
ATCAAGTCGA GATTGTGAGA GTTGTTTACT TTTATTTGTA ATTTAAAAG
TAATGCAGGC AGATAGGAGA AAAACGTTTG GAAAATGAG AATAAGAATT AATAATTTGT
TTTTGTTGTC CATAGCGTTT ATGGGCATAA TTATTAGTAA TTCGCAAGTT
GTTCTAGCGA TAGGCAAAGC TTCTGTGATT CAGTATCTAT CTTATTTAGT TTTGATTTTA
TGTATAGTTA ATGATTTAT AAAAATAAC AAACATATTG TAGTTTATAA
ATTAGGATAT TTGTTCTTA TTATATTTT ATTTACTATC GGAATATGTC AGCAAATCT
TCCTATAACA ACTAAAATAT ATTTATCAAT TTCAATGATG ATTTATTCAG
TTTTAGCAAC GTTGCCAATA AGTTTSATAA AAGATATTGA TGATTTTAGA CGGATTTCAA
ATCATTGTT ATTCGCTCTT TTTATAACTT CGATATTAGG AATAAAGATG
GGGGCACGA TGTTACCGGG GGCAGTAGAA GGTATCGGTT TTAGTCAGGG TTTTAAATGGA
GGATGACGC ATAAGAACTT TTTTGAATA ACTATTTTAA TGGGGTTCGT
ATTAECTTAC TTGGCGTATA AGTATGGTTC CTATAAAAGA ACGGATCGTT TTATTTTAGG
ATTAGAATTG TTTTGTATTC TTATTTCAAA CACACGCTCA GTTTATTTAA
TACTATTGCT TTTTCTATT CTGTGTAATC TTGACAAAAT CAAAATAGAA CAAAGACAAT
GGAGTACGCT TAAATATATT TCCATGCTAT TTTGTGCTAT TTTTTTATC
TATTTCTTTG GTTTTTAAT AACACATAGT GATTCCTACG CTCATCGCGT TAATGGTCTT
ATTAATTTTT TTGAGTATTA TAGAAATGAT TGTTCCATC TAATGTTGG
TGCAGCGGAT TTGGCATATG GGGATTTAAC TTAGACTAT GCTATAAGGG TTAGACGCGT
TTTAGGTTGG AATGGAACGC TTGAAATGCC CTTACTGAGT ATTATGTTAA

Fig. 3. cont.

AAAATGGTTT TATCGGTCTG GTAGGGTATG GGATTGTTTT ATATAAACTT TATCGTAATG
 TAAGAATATT AAAACAGAT AATATAAAA CAATAGGAAA GTCTGTATTT
 ATCATTGTAG TCCTATCTGC AACAGTAGAA AATTATATTG TAAATTTAAG TTTTGTATTT
 ATGCCAATAT GTTTTTGTTT ATTAATTTCT ATATCTACTA TGGAAATCAAC
 TATTAACAAA CAACTGCAAA CATAAATTGG CAGGAATAGA GTTTTGAGTT GCTATTAATT
 TGGTAGAGCA TATGTTCTAT AGGTGGCAAG ATAAGATAG TATTTTTTAC
 ATGATGATTT TTATGATAGC AAAGCAAGTT ACGGCATAAA AGGAATTAGA GGATGGAAAA
 AGTCAGCATT ATTGTACCTA TTTTAATAC GGAAAAGTAC TTAAGAGAGT
 GTTTAGATAG CATTATTTCC CAATCGTATA CTAATCTAGA GATCTTTTG ATAGATGACG
 GTTCTTCAGA TTCATCAACG GATATATGTT TGGAAATACGC AGAGCAAGAT
 GGTAGAATAA AACTTTTCCG GTTACCAAAT GGTGGTGTTT CAAACGCAAG GAATTACGGT
 ATCAAAAATA GCACAGCAAA TTATATTATG TTTGTAGATT CTGATGATAT
 TGTGACGGC AACATTGTTG AGTCCTTATA CACCTGTTTA AAAGAGAATG ATAGTGATTT
 GTCGGGAGGG TTACTTGCTA CTTTTGATGG AAATTATCAA GAATCTGAGC
 TGCAAAAGTG TCAAATTGAT TTGGAAGAGA TAAAAGAGGT GCGAGACTTA GGAATGAAA
 ATTTCCCAA TCATTATATG AGCGGTATCT TTAATAGCCC TTGTGCAAA
 CTTTATAAGA ATATATATAT AAACCAAGGT TTTGACACTG AACAGTGGTT AGGAGAGGAC
 TTATTATTTA ATCTAAATTA TTTAAGAAT ATAAAAAAG TCCGCTATGT
 TAACAGAAAT CTTATTTTG CCAGAAGAAG TTTACAAAGT ACTACAAATA CGTTAAATA
 TGAATGTTTT ATTCAATTAG AAAATTAGA AGAAAAAACT TTTGATTTGT
 TTGTTAAAT ATTTGGTGA CAATATGAAT TTTCTGTTTT TAAAGAGACG CTACAGTGGC
 ATATTATTTA TTATAGCTTA TTAATGTTCA AAAATGGAGA TGAATCGCTT
 CCAAAGAAAT TGCATATATT TAAGTATTTA TACAATAGGC ATTCTTTAGA TACTCTAAGT
 ATTAACGAA CGTCTCTGT TTTTAAAAGA ATATGTAAAT TAATTGTTGC
 TAATAATTTG TTTAAAATTT TTTTAAATAC TTTAATTAGG GAAGAAAAAA ATAATGATTA
 ACATTTCTAT CATCGTCCCA ATTTACAATG TTGAACAATA TCTATCCAAG
 TGTATAAATA GCATTGTAAA TCAGACCTAC AAACATATAG AGATTCTTCT GGTGAATGAC
 GGTAGTACGG ATAAATTCGA AGAAATTTGT TTAGCATATG CGAAGAAAGA
 TAGTCGCATT CGTTATTTTA AAAAAGAGAA CCGCGGGCTA TCAGATGCCC STAATTATGG
 CATAAGTCGC GCCAAGGGTG ACTACTTAGC TTTTATAGAC TCAGATGATT
 TTATTCAATC GGAGTTCATC CAACGTTTAC ACGAAGCAAT TGAGAGAGAG AATGCCCTTG
 TGGCAGTTGC TGTTATGAT AGGGTAGATG CTTGCGGGCA TTTCTTAACA
 GCAGAGCCGC TTCTACAAA TCAGGCTGTT CTGAGCGGCA GGAATGTTTG TAAAAAGCTG
 CTAGAGGCGG ATGGTCATCG CTTTGTGGTG GCCTGGAATA AACTCTATAA
 AAAAGAARCTA TTTGAAGATT TTCGATTTGA AAAGGGTAAG ATTCATGAAG ATGAATACTT
 CACTTATCGC TTGCTCTATG AGTTAGAAAA AGTTGCAATA GTTAAGGAGT
 GCTTGTACTA TTATGTTGAC CGAGAAAATA GTATCATAAC TTCTAGTATG ACTGACCATC
 GCTTCCATTG CCTACTGGAA TTTCAAAATG AACGAATGGA CTTCTATGAA
 AGTAGAGGAG ATAAAGAGCT CTTACTAGAG TGTATCGTT CATTTTTAGC CTTTGTCTTT
 TTGTTTTTGA GCAAATATAA TCATTGGTTG AGCAAACAGC AAAAGAAGCT
 TCTCCAAACG CTATTTAGAA TTGTATATAA ACAATTGAAG CAAAATAAGC GACTTGCTTT
 ACTAATGAAT GCTTATTATT TGGTAGGGTG TCTTCATCTT AATTTTAGTG
 TCTTTCTGAA AACGGGGAAA GATAAAATTC AAGAAAGATT GAGAAGAAGT GAAAGTAGTA
 CTCGGTAAGA ATGTTGTAAT AAATGGTTGA AAGAAAAGGG GATTAATG
 AATCCAACAA ATAGTAGAAT AGCACTCTTT GATACGATTA AATGTATCAT GGTACTTTGT
 GTTATTTTTA CACATCTGGA TTGGTCTGTT GAGCAGCGTC AATGGTTTAT
 CTTTCCGTAT TTCGTTGACA TGGCTGTTCC AATTTTTCTG TTGCTTTCTG CCTATTTTCG
 AACGAATAAG TGAATACAA AACAAGAGAC GCTAAAGCTC AAGTTCAGCA
 GTGGTATAAA AGAAAGTATA AACATGCTTT GTCTCTATGC TATCGTGATG GCTGTTAATG
 TTTTATTGAG CTATTCGAGA ACCATCTGAT AGGAGTAAAG CCTTTTTAGC
 GTTCTTCAATC GCTCCGTTCA TTTGTCTCTG GGCTACTTTC TGGAGAATCG GGTCCAGGGA
 GTTGGGAGTT ACTATGTTCC GTTGTGATT CAGGTAGTTT TTTTATTACC
 AATTTTGTAT GTTCTTTTCG AGAAAAATAA ATGGTTGGGC TTGCTTACTT GTTTTTTAGT
 AAATTTTCA GTGGATGCCA TATTTGCTAA CATGGCTGAA CACGGCATAT
 ATATATAGAC TAATATCACT TCGTTATCTT TTTGTTCTAG GGCTTGGTTT TTTCTTTCAA
 AGCAGGATGT GCGTTCCAAG GTAGATACTT TCATTGCGAC CCTATTTGGG
 ATTATTGGAG CAATTTCTGAT TTTTGTGAAT CATTCTATAG AGCCCTTCTC CTGGTTTTAT
 GGTGGAAAGT CTAATTCCTT TCTATGCGTC CCATTTGCGT ATGCTATGCT
 ATTTTTTATG ATAAAGTATG GACAGAAGAT TCCAGCAATA CTGTTGTCAA AATTGGGAGT
 TGCTTCTTAT CATATCTACT TGACCCAGAT GCTGTATTTT TCAGTAGTCG

Fig. 3 cont.

CACCATTTTT AGCAGTGCAA TTTAAGGTAT CTTGCTTGAA TTTGTGGAAC GGCTTGTTTA
 CCTTTCTAAT TTGCTGTTT GGTGGCTATA TTTTCTACAA AGTGGATCTG
 TTTATGAGAG TACGTGGAAA ACGATAATGA CTCATTTTCAG ATTAGCAGAT GCCATTTTCGT
 TTATTAGCAG ATTCGCATGT TAAATTCOG ACAAGAAAT TCAAATAGGT
 TGACGAGAGA GGAGTGGTAT CTGTTTCTAA ACCCCAGTAT CCCCCTTTAT TTTCAAAGCT
 ATATTTATTA ACTGAACAAG GAGAATTTTT AAGAGAACTG TTTGTTTAAAT
 CCCAGCACGA TCTGGTTCGA AAGGCTTACC GAATAAAAAC ATGCTATTTT TGGACGGGAA
 ACCCATGATT TTTCACACGA TTGATGTGGC AATTGAATCA GGTTGTTTG
 AGAAAGAAGA CATCTATGTC AGTACGGATT CAGAAATGTA TAAGGGGGGC ACCTCTATAA
 ATCCCAAAA TTGCGAATTT GGAGTTACGA AAGCCTTGT AAATCAACAT
 CTTAAATTTT AGAAAATTAG TTTTASAGG TCCCAAGGG GATTTGCGAG ACAAGAGGCA
 TCAATGTATT GTTAAGACCC AAAGAACTAT CTACTTATCA TACTCCATCG
 AATGAAGTCA GTACGCACTT TTTTACGAAT CTGGATTTA TGAAGATTGT ATATTTGTTC
 TTCTGCAAGT CACCTCACCG TTACGGACTG GCGAACAGAT AAAAGAAGCC
 ATGAATATGT ACTTACAGGG GGACTCAGAA AATGTTTTGC ATTTCAATGA TGAAGGGCAA
 GAAAGAGTGA ATCAGTACAT TATCGAAGCT GTACAGGGGT TATAAAAAGG
 GGTTACTTAT CCTTAAAGTC TGTATGTAGA AGGAGAAAAA TTGAGACGAA TTTATATTTG
 CCATACGATG TATCAGATCC TGATTTCCCTT GTTAAAGATG GACGTTGAGA
 GAGATATGTT GATGTCCGTT GATATCATCG GGCAATTTCC AGATGTCAGG GAGCAACTGC
 AGCAGCATGT TCATCTAATC GAGGGAGACG GAGCGTTCAT TTGATCTATA
 TTCTTTGATA GCTAGATCAA AAACAAAAGA ACGCCTTCC TTGTTACAGA GCTATGACGA
 GGTGATCATT TTTCAAGAT ACCGTCAAGT CGGTCAATTT TTAATAAAC
 ATCGGATTTCC CTATTTCTTT TTGAGGATG GTTATAATTT TTTCAAGGAT AAAAGAGTGT
 GCGATTTGGA GTCAATTCRA TCATCTGTCT GGAAGAGACT CTTTTATCAA
 TGGTATTTTA AACCAACATA TTTGATTGGT TCAAGTCTCT ATTGTCAATC CATTGAGGTC
 AATGATCTGT CGCTCGTACA ATTTGACTAG GCTTATAAAC CCTTTGTAGA
 AGTTCCGAGA AAGCAATTAT TTGATCAAGC ATCGCCAGAG AAGGTGCAAG CGCTGCTGCA
 GATATTTGGA GCAAGGGCGA TAGTAGCGGA TGAAGAGTCT TCTCAAAAAC
 GATTGCTATT ATTGACCCAG CCCTTGCTTT GGGATTATCA TGTGACCGAA GAGAGTTGTT
 GGAGATTTAT GTAGCAGGTC TTGCCCTTA TCGGGAAGAC TATACAATCT
 ACATAAAACC GCACCCACGA GATGGGGTTG ATTATTCATT TCTGGGTAAG GCTGTGGTGC
 TTCTGCCTCA AGSTATTCCG TTTGAGTTGT TCGAAATGGC AGGTAATATC
 CGTTTTGATA TCGGTATGAC CTATAGTTCG TCTGCTTAG ATTTTTTAAA TTGTTTTGAA
 GAGAAAGTGT ATTTAAAGGA CACTTTTCCT CTCTTTCAA AAAATGATAT
 TTTGCGTGAG GGGATAGAAAT AGGAGGATTC ATGTCTAAAA AATCAATAGT TGTCTCAGGT
 CTCGCTCATA CGATTGGAAC CATCCTCGTT CAGGGATTAG CCTTCATTAC
 CCTCCCCATC TATACTCGTG TCATTTCTCA GGAAGTATAT GGGCAGTTTA GCTTGATAA
 TTCGTGGGTG GGGCTAGTTG GTCTCTTAT CGGTCTACAG TTAGGTGGGG
 CTTTTGGCCC GGGATGGGTA CACTTCCGCG AGAAATTTGA TGATTTGCTA TCCACCTTGA
 TGGTCTCTTC TATCGCTTTC TTTTACCAA TTTTGGGCT ATCTTTCTC
 CTCAGTCAGC CCTATCGCT CCTATTGGT TTGCCTGATT GGGTCGTTCC GCTTTACTTT
 TTGCAAAGTT TTATGAGTGT TGTGCAAGGA TTTTTTACGA CCTATTAGT
 GCAGCGGCAG CAGTCCATGT GGACTTTACT CCTATCGGTA CTGAGCGCTG TTAACAACAC
 TGCTTTATCT TTATTTCTCA TCTTTTCGAT GGAGAATGAT TTCAATGCTC
 GTGTAATGGC AAACCTCGGA ACGACTGGTG TTTTGTCTG TGTGTCTTGT TTGTTTTCT
 ATAAGAAGAT TGGCTTCAT TTTCGAAAGG ACTATCTTCG GTATGGTTTA
 AGTATATCGA TTCTCTTAT TTTTCATGGA TTAGGTCATA ATGTACTCAA TCAATTTGAC
 AGAATCATGC TCGCAAGAT GCTAACACTG TCAGATGTAG CCCTATACAG
 TTTGCGCTAC ACACTTGCGT CTATCTTACA AATTGTGTTT TCGAGCTTGA ATACGGTATG
 GTGTCGCTGG TATTTTGAGA AAAAGAGAGG TGCAGATAAA GATTTGCTCA
 GTTATGTCCG TTACTATCTG GCGATTGGCC TGTTTGTGAC TTTTGGATT CTAAACAATTT
 ACCCTGAAT AGCGATGTTG TTAGGTGGAT CTGAGTATCG TTTTCAATG
 GGATTTATTC CCATGATTAT TGTGCGGGTG TTCTTTGTAT TTCTTATAG TTTTCCAGCC
 AATATCCAGT TTTATAGTGG AAATACAAA TTTTGGCAA TTGGTACTTT
 TATAGCAGGT GACTAAATA TTTCCGTCCA CTTTGTTTG ATACCGACAA AGAATTTATG
 GTGCTGCTTT GCAACGACTG CTTCTATCT GTTGTGCTA GTCTTGCTT
 ATTTGTTGC TAAGAAAAAG TATGCTTACG ATGAAGTTGC GATTTCAACA TTTGTTAAGG
 TAATTGCTCT TGTSTCGTC TATACAGGCT TGATGACAGT ATTTGTCGGT
 TCAATCTGGA TTGCTGGTC ACTAGGAATA GCGGTTCTAG TCGTTTATGC CTACATTTTT
 AGAAAGGAAT TAACAGTTGC CCTCAATACA TTCAGGGAAA AACGGTCTAA

Fig. 3 cont.

ATAAGGGCAC CTCTATAAAC TCCCAAAAT T GCGAATTTGG AGTTACGAAA GCCTTGTTAA
ATCAAACATT TTAAATTTTA GAAAAATTAGT TTTTAGAGGT CCCCATATAA
AAACGTCCCA AATGAGAGGT GCTCATAAGA ATTGACCATC ACTGCCATCT ACCCAAAGTT
CAAGTATTCT CTACCATGAA AATTGTGCTA TAATCAAGTA TAAAGAAGGG
AATGTTTCTT AAAGGACGTA TCGCCTCTG CTTATGCCAG AAGTCATGAG GTAAATCTCC
CTAAAAATG GGTAGAAAAG CAGATTAAAC TTCCACCAAT CTATTGAAGA
TCGTGTTGAA GAGCAGGCTT TAGAAGCAAC AAGCCTGAG ACTATTCGAA AGAAATCTAG
GGCTATTTTT TCTAATCGGC TATCAGAAGT GAAGTAGCGA TCTTTATTAG
TGTTCTTTTA CTACTTAAGG AAAACCAAGC TGCTCCCTCA AGACTTTATG GGAGCGATT
ACAGTCATTT TTAGAAAGGA AATAAAATGG TTTATATTAT TGCAGAAAT
GGTTGTAATC ACAACGGTGA TGTTTATCTA GCACGGAAAA TGGTAGAAGT TGCCGTTGAT
TGTGGTGTGG ATGCCGTTAA ATTTACAGCA TTTAAGGCAG ATTTGTTGAT
TTCAAAATAC GCACCAAAGG CCGAATACCA AAAAAATTACA ACAGGAGAGT CAGATTCTCA
GCTCGAAATG ACTCGTCGTT TGAATTTGAG CTTTGAAGAG TATCTTGATT
TGGGTGATTA CTGTCTTGAA AAGGGAGTTG ATGTGTTTTC GACACCTTTT GATGAGGAAT
CATTGGACTT CTTGATTAGC ACAGATATGC CCGTTTATAA GATTCCATCT
GGTGAGATTA CCAATCTTCC CTATTTGGAA AAAATTTGGT GTCAAGCTAA GAAAGTTATT
CTTCAACTG GTATGGCTGT TATGGATGAA ATTCATCAAG CGGTGAAGAT
TTTGCAGGAA AATGGAACGA CCGATATTTT GATTTTGCAT TGTACAACCG AGTATCCAAC
TCCAAACTT AACAAATGGC TATTACAGACC ATAGTGTGGG TTCAGAAAGTA CCCATCGCTG
CTGCAGCAAT GGGAGCTGAA TTGATTGAAA AGCACTTTAC TCTGGACAAT
GAAATGGAAG GACCAGATCA TAAAGCGAGT GCTACTCCTG ATATCTTAGC AGCCTTGGA
AAAGGAGTGA GGATAGTGA ACAATCTCTT GGTAAATTTG AAAAAAGACC
AGAAGAAGTT GAAGTACGAA AAAAAATTTG AGCTAGAAAA TCTATTGTTG CCAAAAAAGC
AATGCTAAA GCGAAGTCT TTACAGAAGA AAACATCACT GTCAAAAAGAC
CAGGAAATGG AATTTGCGCA ATGGAATGGT ACAAAGTCTT GGGGCAGGTG AGTGAGCAGG
ATTTGAGGA AGACCAAAAT ATTTGCCATA GTGCTTTTGA AAATCAAATG
TAAGCGGAGT AAGGATGAAA AAAATTTGTT TTGTGACAGG CTCTCGTGCC GAATATGGGA
TTATGCGTCC CTTATTGAGC TATCTACAGG ATGATCCAGA AATGGAGCTG
GATCTTGATG TGACAGCCAT GCATCTAGAA GAAAAATATG GGATGACGGT CAAAGACATC
GAAGCGGACA AGCSTAGGAT TGTCAAGCGG ATTCCAATGC ATTTGACGGA
TACGTCTAAG CAGACAATCC TCAAATCTTT AGCGACCTG ACAGAGCAAC TCACGGTTCT
TTTTGAAGAA GTCCAGTATG ACTTGGTGTG GATTTCTGGGG GATCGCTATG
AGATGCTACC AGTTGCCAAT GCTGCGTTGC TTTATAATAT TCCTATTGCG CATATTCTAG
GTGGTGA AAAA ACCCATGGGA AATTTTGATG AGTCGATTCC CCATGCCATT
ACCAAGATGA GTCACCTTCA TCTGACATCA ACGGATGAAT TTAGAAATCG TGTCAATCAA
AATGTTTTAA AACAAAGACT TTTGACAAGA GAAGASTTGG CGATGGAATC TGGAAATGAT
TTTGCCGAGG ATTACTATGT TGTACTCTTT CACCCTGTTA CCTTGGAGGA
TAACACAGCC GAAGAACAAA CGCAGGCCCT ATTAGATGCT CTAAAAGAAG ATGGTAGCCA
GTGTTTGATA ATTTGATCCA ATTCGGATAC ACATGCCGAT AAGATAATGG
AATTGATGCA TGAATTTGTA AAACAAGACT CTGATTCTTA CATCTTTACT TCGCTTCCAA
CTCGTTATTA CCATTCCCTG GTCAAGCATT CACAAGGTTT AATAGGGAAAT
TCTTCGTCCAG GTTTGATTGA AGTGCCCTCA TTACAGGTTT CGACCTTAAA TATTGGAAAT
CGCCAAATTT GACGTTTGTG AGGACCGAGT GTGGTACATG TTGGAACCTT
TAAGGAAGCG ATTGTTGGTG GTTTGGGGCA ATTACGTGAT GTGATAGATT TTACCAATCC
ATTTGAACAA CCTGATTCTG CTTTACAAGG TTATCGAGCT ATCAAGGAAT
TTTTATCTGT ACAGGCCTCA ACCATGAAAG AGTTTTATGA TAGATAGGGG AGAAAGTTTG
ATGAAAAAAG TAGCCTTTCT AGGAGCGGGT ACCTTTTCAG ATGGTGTCTT
TCCTTGTTG GATAGAATC GATATGAACT CATTGGATAT TTTGAAGATA AACCGATCAG
TGACTATCGT GGCTATCCTG TATTTGGTCC CTTGCAAGAT GTCCTAACCT
ATTTGGATGA TGGAAAAGTA GATGCTGTCT TCGTCACTAT AGGTGACAAAT GTCAGCGCA
AGGAAATCTT TGAATTTGCT GCCAAAGATC ATTATGATGC TTTGTTCAAC
ATCATTAGCG AGCAAGCCAA TATTTTTTCC CCAGATAGTA TCAAGGGACG AGGGGTTTTT
ATAGTTTTTT CAAGTTTTGT AGGAGCCGAT TCCTATGTCT ATGACAATTTG
TATCATCAAT ACGGGTGGCA TTGTGGAACA TCATACCACG GTGGAGGCCC ATTTGTARCAT
TACTCCAGGA GTGACCATAA ATGGCTTGTG CCGTATCGGA GAAAGCACTT
ATATTGGAAG TGGTTCAACA GTGATTCAAT GTATCGAGAT TGCACCTTAT ACAACATTTG
GGGCAGGGAC AGTTGTTTTG AAATCGTTGA CGGAGTCAGG GACCTATGTT

Fig. 3 cont.

GGTGTAACCTG CTAGAAAGAT TAAATAGGTG AATTGATGGA ACCAATTTGT CTGATTCCTG
 CTCGGTCAGG ATCARAAAGGT TTACCAAATA AAAACATGTT ATTTTTAGAT
 GGTGTACCGA TGATTTTCCA TACCATTCPGA GCTGCGATTG AGTCTGGATG TTTTAAGAAA
 GAAAATATAT ATGTCAGTAC TGATTACAGG GTTTACAAGG AAATTTGTGA
 AACAACTGGG GTTCAAGTCC TCATGCGTCC AGCTGACTTG GCGACAGATT TTACAACCTC
 TTTTCAACTG AACGAACATT TTTTACAAGA TTTTCTGAT GACCAAGTAT
 TTGTTCTCCT GCAAGTTACG TCCCCATTAA GATCGGGAAA ACATGTCAAG GAGGCGATGG
 AGTTATATGG GAAAGGTCAA GCTGACCACG TTGTTAGCTT TACCAAAGTC
 GATAAGTCTC CAACATTGTT TTCAACTTTA GACGAAAACG GATTGCTTAA GGATATTGCA
 GGATTAGGTG GCAGTTATCG TCGTCAAGAT GAGAAAACAC TCTACTATCC
 TAATGGAGCG ATTTATATTT CTCTAAGCA GGCTTATTTA GCGGATAAAA CTTATTTTTIC
 TGAAAAAACA GCGGCCATG TGATGACGAA GGAAGATTG ATGATGTAG
 ATGATCACTT TGATTTTACT GGTGTTATTG GTCGAATTTA CTTTGATTAC CAGCGTCGTG
 AGCAACAAAA CAACCCATT TATAAAAGAG AGTTAAAGCG TTTATGTGAG
 CAACGAGTCC ATGATAGTCT TGTGATTGGC GATAGTCTGTC TGTAGCCTT GTTACTGGAT
 GGTTCGATA ATATCAGCAT CGGTGGGATG ACAGCTTCGA CAGCACTGA
 AAACCAAGGT CTCTTTTTGG CTACTCCGAT AAAGAAAGTT TTGCTTCTC TTGGTGTGAA
 TGATTTGATT ACTGACTATC CCTTGATAT GATTGAGGAT ACTATTCGCC
 AGCTGATGGA AAGTCTTGT TCCAAAGCAG AGCAGGTTT TGTGACGACG ATTGCCTACA
 CGCTGTTTCG TGATAGCGTT TCCAATGAAG AAATTTGGA GCTGAATGAC
 GTTATTGTTT AGTCAGCAAG TGAACGGGT ATTTCAAGTGA TTGATCTAAA TGAAGTTGTT
 GAAAAAGAGG CGATGCTTGA CTATCAGTAT ACCAATGATG GATTGCATTT
 CAATCAGATT GGACAAGAGC GTGTGAATCA GCTGATTTG ACAAGTTTGA CAAGATAATT
 TGGTGATAGA AGCTATTTCA GTGGCTAGAC TATGTTGGTA TGTGTTTGTAG
 AGCCCAAGAA TAACATCTGT AGAGGATGCT AGCCTTGAGA ATTGACAACC ATTTAGTTGT
 TTTAATTATA TAAGGGGACC TCTAAAACCT CCCTAAATTT CCCAAAAATG
 AGATAATAGA ATAAAAAGTA ATGAGGAGAG CTGTCAATGCA TTTATTCACA GACGATGAAA
 AAATCTTGTG AAAACTATCA GAGAAAGGCA ATCCCTTAGA ACGTTTGGAT
 GCCGTTATGG ATTTGGAATAT CTTTCTTCCA TTGTTGTCAG AGTTATTCAG TCGTAAAGAT
 AAAGTCATCA GTCGTGGCGG TCGTCTCAC CTAGACTATC TCATGATGTT
 CAAAGCGCTC TTGCTTCAAC GTCTTCATAA CCTATCTGAC GATGCCATGG AATATCAACT
 GCTGGATCGT ATATCTTTTC GTCGTTTTGT TGGTTGTCAT GAAGACACTG
 TTCCCGATGC GAAAACATC TGGCTCTATC GTGAGAAATT AACCAAGTCA GGTGCTGAAA
 AGGAGTTGTT CGATTTGTTT TATGCCATC TCACAGATGA AGGGGTGATT
 GCCCATTCAG GTCAGATTGT GGATGCTACC TTTGTCGAAT GCCCTAAACA ACGCAATTCA
 CGTGAGTACA ATCAGAAAAAT CAAAACCTAT CGAAAATTAT GAGGTCACAA
 CAGCTAGTGT ACACGACTCC AATGTCCTAG CTCCTCTTTG TGATGCCAAT GAAGCGGTTT
 TTGATGACAG TGCTTATGTT GGAATCAG TACCAGAAGG TTGTCGCCAC
 CACACGATTC GTCGTGCTTT TAGAAATAAA CCGTTGACTG AGACTGATAA GGTCAATTAAT
 CGACATATTA CCAAAGTCCG TTGTCGCGTT GAGCATGGTT TTGGCTTCAT
 TGAABACTAAC ATGAAAGGTA ACATCTGTCG AGCAATTTGG AAGGCACGAG CTGAAACCAA
 TGTGACCTTA ACCAACCTGC TCTACAATAT CTGTCGTTTT GAGCAATCA
 AACGACTGGG ATTACCATCC GTGGGCTTAG TGCGCCCAA AAATAGGAAA ATAAGCAAAA
 AGAGGCTGGG CAAAACTAG TTTCTCACAA TAAAAAACG GCTCTTGTG
 AACTGTAGTG GGTAGACGAA AAGCTAACAC CTAGAGAGGA CGAAATTCGT TCTCTCATTT
 TTGATGTTTA AAGCGTAACC GCCTAATAAC AAGGTATCTA TCCAATCACA
 CATTCCTCCA TTATATAGTT AAATGAAACA AAAACAGTAC ATCTATGATA TAATGTATTT
 ATGGCATAT CATTAGATTT TCGTAAAAAA GTTCTCGCAT ACTGTGAGAA
 AACCGGCAGT ATTACTGAAG CATCAGCTAT TTTCCAAGTT TCACGTAACA CTATCTATCA
 ATGGCTAAAA TTAAAAGAGA AAACCGGCGA GCTTCATCAC CAAGTTAAAG
 GAACCAAGCC AAGAAAAGTG GATAGAGATA AATTAAAGAA TTATCTTGAA ACTCATCCAG
 ATGCTTATTT GACTGAAATA GCTTCTGAAT TTGACTGTCA TCCAACAGCT
 ATTCATACC CCTCAAAGC TATGGGATAT ACTCGAAAAA AAAGAGCTGT ACCTACTATG
 AACAAAGCCC TGAAAAAGTA GAACTGTTCC TTAAGAATT GAATAACTTA
 AGCCACTTGA CTCCTGTTTA TATTGACGAG ACAGGGTTTG AGACATATTT TCATCGAAAA
 TATGGTCGCT CTTGAAAGG TCAAGTGTGA AAAGGTAAG TCTCTGGAAG
 AAGATACCAG CGGATATCTT TAGTAGCAGG TCTCATAAAT GGTGCGCTTA TAGCCCGGAT
 GACATACAAA GATACTATGA CGAGTGGCTT TTTCAAGCT T

Fig. 3 cont.

SLDIDHMEVMEASKSAAGSACPSQAYQAAFEGAENIIVVTITGGLSGSFNAARVARDM
YIEHPNVNIHLIDSLASGEMDLLVHQINRLISAGLDFPQVVEAITHYREHKLFLVLA
KVDNLVKNGRLSKLVGTVVGLLNIRMVGEASAEGKLELLQKARGHKKSVTAAFEEMKKAG
YDGRIVMAHRNNAKFFQFSELVKASFPTAVIDEVATSGLC SFYAEEGLLMGYEVKA

Fig. 3 cont.

ORF2Z

MKKYQVIIQDILTGIEEHRFKRGEKLPSIRQLREQYHCSKDTVQKAMLELKYQNKIYAVE
KSGYYILED⁻⁻⁻DRDFQDHTCRAQSYRLSRITYEDFRICLKESLIGRENYLFNYHQEGLAEL
ISSVQSLMDYHVYTKKQQLVITAGSQQALYILTQMETLAGKTEILLENPTYSRMIELIR
HQGIPYQTIERNLDGIDLEELESIFQTGKIKFFYTI⁻⁻⁻PRLHNPLGSTYDIATKTAIVKLAK
QYDVYIIEDDY⁻⁻⁻LADFDSSHSLPLHYLDTDNRVIIKSFTPLFPALRIGAISLPNQLRDI
FIKHKSLIDYDTNLMQKALS⁻⁻⁻LYIDNGMFARNTQHLHHIYHAQWNKIKDCLEKYALNIPY
RIPKGSVTFQLSKGILSPSIQHMF⁻⁻⁻GKCYFSGQKADFLQIFFEQDFADKLEQFVRYLNE

Fig. 3 cont.

ORF2Y

MKIIIPNAKEVNTNLENASFYLLSDRSKPVLDAISQFDVKKMAAFYKLNEAKAELEADRW
YRIRTGQAKTYPAWQLYDGLMYRYMDRRGIDSKEENYL RDHVRVATALYGLIHPFEFISP
HRLDFQGSLKIGNQSLKQYWRPYYDQEVGDDELILSLASSEFEQVFSPOIQKRLVKILFM
EEKAGQLKVHSTISKKGRGRLLSWLAKNNIQELSDIQDFKVDGFYCTSESTANQLTFXR
SIKM

Fig. 3 cont.

ORF2X

MKKRSGRSKSSKFKLVNFALLGLYSITLCLFLVTMYRYNILDFRYLNYIVTLLLVGVAVL
AGLLMWRKKARIFTALLLVFSLVITSVGIYGMQEVVKFSTRLNSNSTFSEYEMSILVPAN
SDITDVRQLTSILAPAEYDQDNITALLDDISKMESTQLATSPGTSYLTAYQSMLNGESQA
MVFNQVFTNILENEDPGFSSKVKKIYSFKVTQTVETATKQVSGDSFNIIYISGIDAYGPIS
TVSRSDVNIIMTVNRATHKILLTTTPRDSYVAFADGGQNQYDKLTHAGIYGVNASVHTLE
NFYGIDISNYVRLNFISFLQLIDLVGIDVYNDQEFSLHGNYHFPVGQVHLNSDQALGF
VRERYSLTGGDNRGKNQEKVIAALIKKMSTPENLKNYQAILSGLECSIQTDLSLETIMS
LVNTQLESGTQFTVESQALTGTGRSDLSSYAMPGSQLYMMEINQDSLEQSKAAIQSVLVE
K

Fig. 3 cont.

CPS2A

MNNQEVNAIEIDVLFLLKTIWRKKFLILLTAVLTAGLAFVYSSFLVTPQYDSTTRIYVVS
QNVEAGAGLTNQELQAGTYLAKDYREIILSQDVLTVATELNLKESLKEKISVSI PVDTR
IVSISVRDADPNAAARIANSLRTFAVQKVVEVTKVSDVTTLEEAVPAEPTTPNTRNIL
LGLLAGGILATGLVLVMEVLDDRVKRPQDIEEVMGLTLLGIVPDSKCLK

Fig. 3 cont.

CPS2B

MAMLEIARTKREGVNKTEEFNAIRTNIQLSGADIKVVGITSVKSNEGKSTTAASLAIAY
ARSGYKTVLVDADIRNSVMPGFFKPITKITGLTDYLAGTTDLSQGLCDTDIPNLTVIESG
KVSPNPTALLOSKNFENLLATLRRYYDYVIVDCPPLGLVIDAAIIAQKCDAMVAVVEAGN
VKCSSLKKVKEQLEQTGTPFLGVILNKYDIATEKYSEYGNYGKKA

Fig. 3 cont.

CPS2C

MIDIHSHIIFGVDDGPKTIEESLSLISEAYRQGVRYIVATSHRRKGMFETPEKIIMINFL
QLKEAVAEVYPEIRLCYGAELYYSKDILSKLEKKKVPTLNGSCYILLEFSTDTPWKEIQE
AVNEMTLGLTPVLAHIERYDALAFQSERVEKLIDKGCYTQVNSNHVLKPALIGERAKEF
KKRTRYFLEQDLVHCVASDMHNLYSRPPFMREAYQLVKKEYGEDRAKALFKKNPLLILKN
QVQ

Fig. 3 cont.

CPS2D

MNIEIGYRQTKLALFDMIAVTISAILTSHIPNADLNRSIGFIIMMVHYFAFFISRMPVEF
EYRGNLIEFEKTFNYSIIFVIFLMAVSFMLENNFALSRRGAVYFTLINFVLVYLFNVIIK
QFKDSFLFSTTYQKKTILITTAELWENMQVLFESDILFQKNLVALVILGTEIDKINLPLP
LYYSVEEAIGFSTREVVDYVFINLPSEYFDLKQLVSDFELLGIDVGV DINSFGFTVLKKN
KIQMLGDHSIVTFSTNFYKPSHIWMKRLLDILGAVVGLIISGIVSILLIPIIRRDGGPAI
FAQKRVGQNGRIFTFYKFRSMFVDAEVRKKELMAQNMQGGMFKMNDPRITPIGHFIRK
TSLDELPOFYNVLIGDMSLVGTRPPTVDEFEKYTPSQKRRLSFKPGITGLWQVSGRSDIT
DFNEVVRLDLTYIDNWTIWSDIKILLKTVKVLLREGGQ

Fig. 3 cont.

CPS2E

MRTVYIIGSKGIPAKYGGFETFVEKLETEYQKDKSINYFVACTRENSAKSDITGEVFEHNG
ATCFNIDVPNIGSAKAILYDIMALKKSIEIAKDRNDTSPIFYILACRIGPFIYLFKKQIE
SIGGQLFVNPDGHEWLREKWSYPVRQYWKFSESLMLKYADLLICDSKNIEKYIHEDYRKY
APETSYIAYGTDLKSRLSPTDSVVREWYKEKEISENDYYLVVGRFVPENNYEVMIREFM
KSYSRKDFVLI TNVEHNSFYEKLKKETGFDKDKRIKFVGTVYNQELLKYIRENAFAYFHG
HEVGGTNPSLLEALSSTKLNLLLDVGFNREVGEAGAKYWNKDNLHRVIDSCEQLSQEQIN
DMDSLSTKQVKERFSWDFIVDEYEKLFKG

Fig. 3 cont.

CPS2F

MKKILYLHAGAELYGADKVLELIKGLDKNEFEAHVILPNDGVLVPALREVGAQVEVINY
PILRRKYFNPKGIFDYFISYHHYSKQIAQYAIENKVDIIHNNTTAVLEGIYLRKRLKPL
LWHVHEIIVKPKFISDSINFLMGRFADKIVTVSQAVANHIKQSPHIKDDQISVIYNGVDN
KVIFYQSDARSVRERFDIDEEALVIGMVRVNAWKGGDFLEAVAPILEQNPKAIAFIAGS
AFEGEEWRVVELEKKISQLKVSSQVXRMDYYANTTELYNMFDFVLPSTNPDPLPTVVLK
AMACGKPVVGYRHGGVCEMVKEGVNGFLVTPNSPLNLSKVILQLSENINLRKKIGNNSIE
RQKEHFSLKSYVKNFSKVYTSLKVY

Fig. 3 cont.

CPS2G

MKIISFTMVNNESEIIESFIRYNYNFIDEMVIIDNGCTDNTMQIIFNLIKEGYKISVYDE
SLEAYNQYRLDNKYLTKIIAEKNPDLIIPLDADEFALTADSNPRKLEQLDLEKIHVNWQ
WFMVTKKDDINDSFIPRRMQYCFEKPVWHHSDGKPVTKCII SAKYKKMNLKLSMGHHTV
FGNPNVRIEHHNDLKFAHYRAISQEQLIYKTICYTIRDIATMENNIETAQRNQMALIES
GVDMWETAREASYSGYDCNVIHAPIDLFSCKENIVIKYNELSRETVAERVMKTGREMAVR
AYNVERKQKEKKFLKPIIFVLDGLKGDEYIHPNPSNHLTILTEMYNVRGLLTDNHQIKFL
KVNYRLIITPDAKFLPHEFIVVPDTXDIEQVKSQYVGTGVDLSKII SLKEYRKEIGFIG
NLYALLGFVPNMLNRIYLYIQRNGIANTI I KIKSRL.

Fig. 3 cont.

CPS2H

MQADRRKTFGKMRIRINNLFFVAIAFMGIIISNSQVFLAIGKASVIQYLSYLVLILCIVN
DLLKNNKHIVVYKLGYLFLIIFLFTIGICQQILPITTKIYLSISMMIISVLATLPISLIK
DIDDFRRI SNHLLFALFITSILGIKMGATMFTGAVEGIGFSQGFNGGLTHKNFFGITILM
GFVLTYLAYKYGSYKRTDRFILGLELFLILISNTRSVYLILLLFLFLVNLDKIKIEQRQW
STLKYISMLFCAIFLYYFFGFLITHSDSYAHRVNGLINFFEYYRNDWFHLMFGAADLAYG
DLTLDYAIRVRRVLGWNGTLEMPLLSIMLKNGFIGLVGYGIVLYKLYRNVRIKTDNIKT
IGKSVFIIVVLSATVENYIVNLSFVFMPICFCLLNSISTMESTINKQLQT

Fig. 3 cont.

CPS2I

MEKVSIIIVPIFNTEKYLRECLDSIIISQSYTNLEILLIDDGSSDSSTDICLEYAEQDGRIK
LFRLPNGGVSNARNYGIKNSTANYIMFVDSDDIVDGNIVESLYTCLKENDSDLSGGLLAT
FDGNYQESELQKCQIDLEEIKEVRDLGNENFPNHMSGIFNSPCKLYKNIYINQGFDE
QWLGEDLLFNLNYLKNIKKVRYVNRNLYFARRSLQSTTNTFKYDVFIQLENLEEKTFDLF
VKIFGGQYEFVFKETLQWHIIYYSLLMFKNGDES LPKKLHIFKYLYNRHSLDTLSIKRT
SSVFKRICKLIVANNLFKIFLNTLIREEKND

Fig. 3 cont.

CPS2J

MINISIIVPI YNVEQYLSKC INSIVNQTYK HIEILLVNDG STDNSEEICL AYAKKDSRIR
YFKKENGGLS DARNYGISRA KGDYLA FIDS DDFIHSEFIQ RLHEAIEREN
ALVAVAGYDR VDASGHFLTA EPLPTNQAVL SGRNVCKKLL EADGHRFVVA WNKLYKKELF
EDFRFEKGKI HEDEYFTYRL LYELEKVAIV KECLYYYVDR ENSIITSSMT
DHRFHCLLEF QNERMDFYES RGDKELLEEC YRSFLAFAVL FLGKYNHWLS KQOKKLLQTL
FRIVYKQLKQ NKRLALLMNA YYLVGCLHLN FSVFLKTGKD KIQERLRSE
SSTR

Fig. 3 cont.

CPS2K

```

MSKKSIVVSG LVYTIGTILV QGLAFITLPI YTRVISQEVY GQFSLYNSWV GLVGLFIGLQ
LGGAFGPGWV HFREKFDDFV STLMVSSIAF FLPIFGLSFL LSQPLSLLFG
LPDWVVPLIF LOSLMIVVQG FFTTYLVQRQ QSMWTLPLSV LSAVINTALS LFLTFFPMEND
FIARVMANPA TTGVLACVSX WFSQKKNGLH FRKDYLRYGL SISIPLIFHG
LGHNVLNQFD RIMLGKMLTL SDVALYSFGY TLASILQIVE SSLNTVWCPW YFEKKGADK
DLSYVRYYL AIGLFVTFGF LTIYPELAML LGGSEYRFSM GFIPMIIVGV
FFVELYSFPA NIQFYSGNTK FLPIGTFIAG VLNISVHFVL IPTKNLWCCF ATTASYLLLL
VLHYFVAKKK YAYDEVAIST FVKVIALVVV YTGLMTVFEVG SIWIRWSLGI
AVLVVYAYIF RKELTVALNT FREKRSK

```

Fig. 3 cont.

CPS20

MVYIIAEIGC NHNGDVHLAR KMVEVAVDCG VDAVKFQTFK ADLLISKYAP KAEYQKITG
ESDSQLEMTR RLELSFEEYL DLRDYCLEKG VDVSTPFDE ESLDFLISTD
MPVYKIPSGE ITNLPYLEKI GRQAKK VILS TGMAMDEIH QAVKILQENG TTDISILHCT
TEYPTYPAL NLNVLHTLKK EFPNLTIGYS DHSVGSEVPI AAAAMGAELI
EKHFTLDNEM EGPDHKASAT PDILAALVKG VRIVEQSLGK FEKEPEEVEV RNKIVARKSI
VAKKAIKGE VFTEENITVK RPGNGISPME WYKVLGQVSE QDFEEDQNIC
HSAFENQM

Fig. 3 cont.

CPS2P

MKKICFVTGS RAEYGIMRRL LSYLQDDPEM ELDLVVTAMH LEEKYGMTVK DIEADKRRIV
KRIPLHLTDT SKQTIVKSLA TLTEQLTVLF EEVQYDLVLI LGDRYEMLPV
ANAALLYNIP ICHIHGGEKT MGNFDESIRH AITKMSHLHL TSTDEFNRNV IQLGENPTMY

Fig. 3 cont.

CPS2Q

MELGIDFAED YYVLFHPVT LEDNTAEEQT QALLDALKED GSQCLIIGSN SDTHADKIME
LMHEFVKQDS DSYIFTSLPT RYYHSLVKHS QGLIGNSSSG LIEVPSLQVP
TLNIGNRQFG RLSGPSVVHV GTSKEAIVGG LGQLRDVIDF TNPFEQPDSA LQYRAIKEF
LSVQASTMKE FYDR

Fig. 3 cont.

CPS2R

MKKVAFLGAG TFS DGVL PWL DRTRYELIGY FEDKPISDYR GYPVFGPLQD VLTYLDDGKV
DAVFTIGDN VKRKEIFDLL AKDHYDALFN IISEQANIFS PDSIKGRGVF
IGFSSFVGAD SYVYDNCIIN TGAIVEHHTT VEAHCNITPG VTINGLCRIG ESTYIGSGST
VIQCIEIAPY TTLGAGTVVL KSLTESGTYV GVPARKIK

Fig. 3 cont.

CPS2S

MEPICLIPAR SGSKGLPNKN MLFLDGVPMI FHTIRAAIES GCFKKENIYV STDSEVYKEI
 CETTGVOQLM RPADLATDFT TSFQLNEHFL QDFSDDQVFV LLQVTSPLRS
 GKHVKEAMEL YGKGQADHVV SFTKVDKSPT LFSTLDENGF AKDIAGLGGG YRRQDEKTLY
 YPNGAIYISS KQAYLADKTY FSEKTAAYVM TKEDSIDVDD HFDFTGVIGR
 IYFDYQRREQ QNKPFYKREL KRLCEQRVHD SLVIGDSRLI ALLLDGFDNI SIGGMTASTA
 LENQGLFLAT PIKKVLLSLG VNDLITDYPL HMIEDTIRQL MESLVSKAEQ
 VVVTTIAYTL FRDSVSNEEI VQLNDVIVQS ASELGISVID LNEVVEKEAM LDYQYTNDGL
 HFNQIGQERV NQLILTSLTR

Fig. 3 cont.

CPS2T

ATCGCCAAAC GAAATTGGCA TTATTTGATA TGATAGCAGT TGCAATTTCT GCAATCTTAA CAAGTCATAT
 ACCAAATGCT GATTTAAATC GTTCTGGAAT TTTTATCATA
 ATGATGGTTC ATTATTTTGC ATTTTATATA TCCTCGTATGC CAGTTGAATT TGAGTATAGA GGTAATCTGA
 TAGAGTTTGA AAAAACATTT AACTATAGTA TAATATTTGC
 AATTTTTCTT ACGGCAGTAT CATTTTTGTG GGAGAATAAT TTCGCACTTT CAAGACGTGG TGCCCGTGTAT
 TTCACATTAA TAAACTTCGT TTTGGTATAC CTATTTAACG
 TAATTATTAA GCAGTTTAAAG GATAGCTTTC TATTTTCGAC AATCTATCAA AAAAAGACGA TTCTAATTAC
 AACGGCTGAA CGATGGGAAA ATATGCAAGT TTTATTTGAA
 TCACATAAAC AAATTCAAAA AAATCTTGT GCATTGGTAG TTTTAGGTAC AGAAATAGAT AAAATTAATT
 TATCATTACC GCTCTATTAT TCTGTGGAAG AAGCTATAGA
 GTTTTCAACA AGGGAAGTGG TCGACCACGT CTTTATAAAT CTACCAAGTG AGTTTTTAGA CGTAAAGCAA
 TTCGTTTCAG ATTTTGAGTT GTTAGGTATT GATGTAAGCG
 TTGATATTAA TTCATTCCGT TTTACTGCGT TGA AAAACAA AAAAATCCAA CTGCTAGGTG ACCATAGCAT
 TGTAACTTTT TCCACAAAAT TTTATAAGCC TAGTCATATC
 ATGATGAAAC GACTTTTGGG TATACTCGGA GCGGTAGTGC GGTTAATTAT TTGTGGTATA GTTCTTATTT
 TGTTAGTTC AATTATTTCG AGAGATGGTG GACCCGGCTAT
 TTTTGCTCAG AAACGAGTTG GACAGAAATGG ACGCATATTT ACATTCTACA AGTTTCGATC GATGTATGTT
 GATGCTGAGG AGGCAAAAA AGACTTGCTC AGCCAAAAACC
 AGATGCAAGG GTGGGTATGT TTTAAAAATGG GAAAAACGAT CCTAGAATTA CTCCAATTGG ACATTTCCATA
 CGCAAAAAACA AGTTTAGACG AGTTACCACA GTTTTATAAT
 GTTTAATTG GCGATATGAG TCTAGTTGGT ACACGTCCAC CTACAGTTGA TGAATTTGAA AAATATACTC
 CTGGTCAAAA GAGACGATTG AGTTTAAAC CAGGGATTAC
 AGSTCTCTGG CAGGTTAGTG GTCGTAGTAA TATCACAGAC TTCGACGACG TAGTTCGGTT GGACTTAGCA
 TACATTGATA ATTGGACTAT CTGGTCAGAT ATTAAAAATTT
 TATTAAGAC AGTGAAAGTT GTATTGTGTA GAGAGGGAAAG
 CGGTTCTTCA GGGGGACATT TGACTCACTT GTATTTGTTA
 AAACCGTTTT GGAAGGAAGA AGAACGTTTT TGGGTAACAT TTGATAAAGA GGATGCAAGA AGTCTTTTGA
 AGAATGAAAA AATGTATCCA TGTTACTTTC CAACAATCG
 CAATCTCAAT AATTTAGTGA AAAATACTTT CTTAGCTTTC AAAATTTTAC GTGATGAGAA ACCAGATGTT
 ATTATTTCA CTGGTCCGGC CGTTGCTGTC CCTTCTTTT
 ACATCGGAAA ACTATTTGGA GCAAAGACGA TTTATATGTA AGTATTTGAT CGAGTTAATA AATCTACATT
 AACTGGAAAA CTAGTTTATC CCGTAACAGA TATTTTATTT
 GTTCAGTGGG AAGAAATGAA GAAGGTATAT CCTAAATCTA TTAAC TTGGG GAGTATTTTT TAATGATTTT
 TGTAACAGTA GGAACCTATG AACCAAGATT TAATCGATTG
 ATAAAAGAGA TTGATTTATT GAAAAAAAT GGAAGTATAA CCGACGAAAT ATTTATTCAA ACAGGATATT
 CTGACTATAT TCCAGAAATAT TGCAAGTATA AAAAATTTCT
 CAGTTACAAA GAAATGGAAC AATATATTA CAATCAGAAA GTAGTTATTT GCCACGGAGG CCCCCTACT
 TTTATGAAAT CATTATCCAA AGGAAAAAAA CAATTATFTG
 TTCCTAGACA AAAAAGTAT GGTGAACATG TAAATGATCA TCAAGTAGAG TTTGTAAGAA GAATTTTACA
 AGATAATAAT ATTTTATTTA TAGAAAATAT AGATGATTTG
 TTTGAAAAAA TTATTGAAAT TTCTAAGCAA ACTAACTTTA CATCAAATAA TAATTTTTTT TGTGAAAGAT
 TAAAACAAAT AGTTGAAAAA TTTAATGAGG ATCAAGAAAA
 TGAATTAATA AAAAGATGCA TATTTGATAA TGGCTTATCA TAATTTTTCT CAGATTTTAC TGGAGAGGGA
 TACAGATATT ATCATCTTCT CTCAGGAGAA TGCACACCAT
 TAGTTCCTTC AGAATACCTG TATAATTATT TTAATATTC TCAGGATTTA TATGTTGAAT TTACAAAAGA
 TGAGCAAAAA TATAAAGAAA ATAGGATATA TGAACGAGTT
 AAATGTTACA GATTATTCC TAATATATCA GAAAAAACTA TFGATAATGT ACTGTTTAGA ATTTTATTAA
 GAATGTATCG AGCTTTTGAA TACTATTTAC AAAGATTGTT
 GTTTATTGAT AGAATAAAAA ACATGGTCTA AGAATAAGAT TTGGTCTAA TTGGGTTTCG CTCCACATG
 ATTTGTGCGC AATTCTTTTA TCAAATGAAA ACGAAACAGC
 TTATTTATTT AAGTAATCTA AATGTCCAGA TGAATATTT ATACAGACAA TTATAGAAAA ATATGAATTT
 TCAAATAGAT TATCTAATA TGGAAATTTA AGATATATAA
 AGTGGAAAAA ATCAACATCT TCTCCTATTG TCTTTACAGA TGATTCTATT GATGAATTGC TAAATGCAAG
 AAATTTAGGT TTTTATTTG CTAGAAAAGT AAAAATAGAA
 AATAAATCTA AATTTAAAGA AATTATTACT AAAAAATAA ATAGTTGATT TTGTGAGAGT AATGTATGTT
 TAAATATTT AATATGACC CGGAATATTT TATTTTAAAG
 TACTCTGGT TGATTATTTT TATTCAGAG CAAAAGTATG TATTTTTAT AATTTTTATG AATTTAATTT
 TATTTCATAT AAAATTTTGG AAAACTAAGC TAATATTA
 AAATGAAAT TTATTGTTTT TATTATGGTC TATATTATG TTTGTTTCAG TAGTCACAAG TATGTTTGT
 GAAATAAAT TTGAAAGATT ATTTGCAGAT TTTACTGCTC
 CCATAATTTG GATTATTGCA ATAATGTATT ATAATTTGTA TTCATTTATA AATATTGATT ATAAAAAAT
 AAAAAATAGT ATCTTTTTTA GTTTTTTAGT TTTATTAGT
 ATATCTGCAT TGTATATTAT TCAAATGGG AAAGATATTG TATTTTTAGA CAGACACCTT ATAGGACTAG
 ACTATCTTAT AACAGGCGTC AAAACAAGGT TGSTGGCTT
 TATGAACAT CCTACGTTAA ATACCCTAC AATTATAGTT TCAATTCGGT TAATCTTTCG ACTTATAAAA
 AATAAAATGC AACAAATTTT TTTCTTGTGT CTTCCTTTA

Fig. 4

TACCGATCTA TTTAAGTGGG TCGAGAATTG GTAGTTTATC GCTAGCAATA TTAATTATAT GCTTGTATTG
GAGATATATA GGTGGAAAAA TTGCTTGGAT AAAAAAGCTA
ATAGTAATAT TTGTAATACT ACTTATTAT TTAATACTG AATTGCTTTA CCATGAAATT TTGGCTGTTT
ATAATTCCTAG AGAATCAAGT AACGAAGCTA GATTTATTAT
TTATCAAGGA AGTATTGATA AAGTATTAGA AAACAATATT TTATTTGGAT ATGGAATATC CGAATATTCA
GTTACGGGAA CTTGGCTCGG AAGTCATTCA GGCTATATAT
CATTTTTTTA TAAATCAGGA ATAGTTGGGT TGATTTTACT GATGTTTTCT TTTTTTATG TTATAAAAAA
AAGTTATGGA GTTAATGGGG AAACAGCACT ATTTTATTTT
ACATCATTAG CCATATTTTT CATATATGAA ACAATAGATC CGATTATTAT TATATTAGTA CTATTCTTTT
CTTCAATAGG TATTTGGAAT AATATAAATT TTA AAAAGGA ACCAATTTAT AATGTCCAAG ATTATCTTGA
TATGGAGACA AAAAATGAAT GATTAATTT CAGTTATTGT
TAAATGTATT AACAGTATTA TTAACCAAAC ATATACTAAT
TTAGAGGTTA TTCTCGTAAA TGATGGAAGT ACTGATGATT CTGAGAAAAA TTGCTTAAAC TATATGAAGA
ACGATGGAAG AATTAAATAT TACAAGAAAA TTAATGGCGG
TCTAGCAGAT GCTCGAAATT TCGGACTAGA ACATGCAACA GGTAATATA TTGCTTTTGT CGATTCTGAT
GACTATATAG AAGTTGCAAT GTTCGAGAGA ATGCATGATA
ATATAACTGA GTATAATGCC GATATAGCAG AGATAGATT TTGTTTAGTA GACGAAAACG GGTATACAAA
GAAAAAAGA AATAGTAATT TTCATGTCTT AACGAGAGAA
GAGACTGTAA AAGAAATTTT STCAGGATCT AATATAGAAA ATAATGTTTGT GTGCAAGCTT TATTCCAGAG
ATATTATAAA AGATATAAAA TTCCAAATTA ATAATAGAA
TATTGGTGAG GATTTGCTTT TTAATTTGGA GGTCTTGAAC AATGTAACAC GTGTAGTAGT TGATACTAGA
GAATATTATT ATAATTATGT CATTGTAAC AGTTCGCTTA
TTAATCAGAA ATTCTCTATA AATAATATTG ATTTAGTCAC AAGATTGGAG AATTACCCCT TTAAGTTAAA
AAGAGAGTTT AGTCATTATT TTGATGCAAA AGTTATTAAA
GAGAAGGTTA AATGTTTAAA CAAAATGTAT TCAACAGATT GTTTGGATAA TGAGTCTTGT CCAATATTAG
AGTCTTATCG AAAAGAAATA CGTAGATATC CATTATATA
AGCGAAAAGA TATTTATCAA GAAAGCATTG AGTTACGTTG TATTTGATGA AATTTTCGCC TAAACTATAT
GTAATGTTAT ATAAGAAATT TCAAAAAGCAG TAGAGGTAAA
AATGGATAAA ATTAGTGTTA TTGTTCCAGT TTATAATGTA GATAAATATT TAAGTAGTTG TATAGAAAAGC
ATTATTAATC AAAATTATAA AAATATAGAA ATATTATTGA
TAGATGATGG CTCTGTAGAT GATTCTGCTA AAATATGCAA GGAATATGCA GAAAAAGATA AAAGAGTAAA
AATTTTTTTC ACTAATCATA GTGGAGTATC AAATGCTAGA
AATCATGGAA TAAAGCGGAG TACAGCTGAA TATATTATGT TTGTTGACTC TGATGATGTT GTTGATAGTA
GATTAGTAGA AAAATTATAT TTTAATATTA TAAAAAGTATG
AAGTGATTTA TCTGGTTGTT TGTACGCTAC TTTTTCAGAA AATATAAATA ATTTTGAAGT GAATAATCCA
AATATTGATT TTGAAGCAAT TAATACCGTG CAGGACATGG
GAGAAAAAAA TTTTATGAAT TTGTATATAA ATAATATTTT TTCTACTCCT GTTTGTAAAC TATATAAGAA
AAGATACATA ACAGATCTTT TTCAAGAGAA TCAATGGTTA
GGAGAAGATT TACTTTTTAA TCTGCATTAT TTAAGAATA TAGATAGAGT TAGTTATTGT ACTGAACATC
TTTATTTTTA TAGGAGAGGT ATACTAAGTA CAGTAAATTC
TTTTAAAGAA GGTGTGTTTT TGCAATTGGA AAATTTGCAA AAACAAGTGA TAGTATTGTT TAAGCAAATA
TATGGTGAGG ATTTTGACGT ATCAATTGTT AAAGATACTA
TACGTTGGCA AGTATTTTAT TATAGCTTAC TAATGTTTAA ATACGGAAAA CAGTCTATTT TTGACAAATT
TTAATTTTTT AGAAATCTTT ATAAAAATA TTATTTTAA
TTGTTAAAAG TATCTAACAA AAATTCCTTG TCTAAAAAT TTTGTATAAG AATTGTTTCG AACAAAGTTT
TTAAAAAAT ATTATGGTTA TAATAGGAAG ATATCATGGA
FACTATTAGT AAAATTCTA TAATTGTACC TATATATAAT GTAGAAAAAT ATTTATCTAA ATGTATAGAT
AGCATTGTAA ATCAGACCTA CAAACATATA GAGATTCCTC
TGGTGAATGA CGGTAGTACG GATAATTCGG AAGAATTTG TTTAGCATAT GCGAAGAAAG ATAGTCGCAT
TCGTTATTTT AAAAAAGAGA ACGGCGGGCT ATCAGATGCC
CGTAATTATG GCATAAGTCG CGCCAAGGTT GACTACTTAG CTTTTATAGA CTCAGATGAT TTTATTICATT
CGGAGTTTCA CCAACGTTTA CACGAAGCAA TTGAGAGAGA
GAATGCCCTT GTGGCAGTTG CTGGTTATGA TAGGGTAGAT GCTTCGGGGC ATTTCTTAAAC AGCAGAGCCG
CTTCTTACAA ATCAGGCTGT TCTGAGCGGC AGGAATGTTT
GTAAAAAGCT GCTAGAGGCG GATGGTCATC GCTTTGTTGGT GGCCTGTAAT AAATCTTATA AAAAGAAGCT
ATTTGAAGAT TTTGATTTG AAAAGGGTAA GATTCATGAA
GATGAATACT TCACTTATCG CTTGCTCTAT GAGTTAGAAA AAGTTGCAAT AGTTAAGGAG TGCTTGTACT
ATTATGTTGA CCGAGAAAAT AGTATCACAA CTTCTAGCAT
GACTGACCAT CGCTCCATT GCCTACTGGA ATTTCAAAAT GAACGAATGG ACTTCTATGA AAGTAGAGGA
GATAAAGAGC TCTTACTAGA GTGTTATCGT TCATTTTATG
CCTTTGCTGT TTTGTTTTTA GGCAAATATA ATCATTGGTT GAGCAAACAG CAAAAGAAGC TT

Fig. 4 cont.

```

RQTKLALFDM IAVAISAILT SHIPNADLNR SGIFIIMMVH YFAFFISRMP VEFEYRGNLI
EFEKTFNYSI IFAIFLTAVS FLENNFALS RRGAVYFTLI NEVLVYLFNV
IIKQFKDSFL FSTIYQKTI LITTAERWEN MQVLFESHKQ IQKNLVALVV LGTEIDKINL
SLPLYYSVEE AIEFSTREVV DHVFINLPSE FLOVKQFVSD FELLGIDVSV
DINSFGFTAL KNKKIQLLGD HSIVTFSTNF YKPSHIMMKR LLDILGAVVG LIICGIVSIL
LVPIIRRGGG PAIFAQKRVG QNGRIFTFYK FRSMYVDAEE RKKDLLSQNQ
MQGWVCFKMG KTILELLQLD ISYAKTSLDE LPQFYNVLIG DMSLVGTRPP TVDEFEKYTP
GQKRRLSFKP GITGLWQVSG RSNITDFDDV VRLDLAYIDN WTIWSDIKIL
LKTVKVLLR EGSK
    
```

Fig. 4 cont.

CPS1E

MKVCLVGSSG GHLTHLYLLK PFWKEEERFW VTFDKEDARS LLKNEKMYPY YFPTNRNLIN
LVKNTFLAFK ILRDEKPDVI ISSGAAVAVP FFYIGKLFGA KTIYIEVFDR
VNKSTLTGKL VYPVTDIFIV QWEEMKKVYP KSINLGSIF

Fig. 4 cont.

CPS1F

MIFVTVGTHE QQFNRLIKEI DLLKKNCSIT DEIFIQTGYS DYIPEYCKYK KFLSYKEMEQ
YINKSEVVIC HGGPATFMNS LSKGKKQLLF PRQKKGHEV NDHQVEFVRR
ILQDNNILFI ENIDDLFEKI IEVSKQTNFT SNNNFFCERL KQIVEKFNED QENE

Fig. 4 cont.

CPS1G

```

MFKLFKYDPE YFFKYFWLI IFIPEQKYVF LLIFMNLILF HIKFLKTKLI LKNEILLFLL
WSILCFVSVV TSMFVEINFE RLFADFTAPI IWIIAIMYYN LYSFINIDYK
KLKNSIFFSF LVLLGISALY IIQNGKDIVF LDRHLIGLDY LITGVKTRLV GFMNYPTLNT
TTIIVSIPLI FALIKNKMQQ FFFLCLAFIP IYLSGSRIGS LSPLAILIIC
LLWRYIGGKF AWIKKLIVIF VILLIILNTE LLYHEILAVY NSRESSNEAR FIIYQGSIDK
VLENNILFGY GISEYSVTGT WLGSHSGYIS FFYKSGIVGL ILLMFSFFYV
IKKSYGVNGE TALFYFTSLA IFFIYETIDP IIIILVLFFS SIGIWNNINF KKDMETKNE
    
```

Fig. 4 cont.

CPS1H

MNDLISVIVP IYVQDYLDK CINSIINQTY TNLEVILVND GSTDDSEKIC LNYMKNDGRI
KYYKINGGL ADARNFGLH ATGKYIAFVD SDDYIEVAMF ERMHDNITEY
NADIAEIDFC LVDENGYTKK KRNSNFHVLV REETVKEFLS GSNIENNVWC KLYSRDIIKD
IKFQINRSI GEDLLFNLEV LNVTRVVVD TREYYNYVI RNSSLINQKF
SINNIDLVTR LENYPFKLKR EFSHYFDKV IKEKVKCLNK MYSTDCLDNE FLPILESYRK
EIRRYPFKA KRYLSRKHLV TLYLMKFSPK LYVMLYKFKQ KQ

Fig. 4 cont.

CPS1I

MDKISVIVPV YNVDKYLSSC IESIINQNYK NIEILLIDDG SVDDSAKICK EYEKDKRVKI
FFTNHSGVSN ARNHGIKRST AEYIMFVDS DVVDSRLVEK LYFNIIKSRS
DLGCLYATF SENINNFEVN NPNIDFEAIN TVQDMGEKNF MNLXXNNIFS TPVCXLYQKR
YITDLFQENQ WLGEDLLFNL HYLKNIDRVS YLTEHLYFYR RGILSTVNSF
KEGVFLQLEN LQKQVIVLFK QIYGEDFDVS IVKDTIRWQV FYYSLLMFKY GKQSIFDKFL
IFRNLYKYY FNLLKVSNN SLSKNFCIRI VSNKVFKKIL WL

Fig. 4 cont.

CPS1J

MDTISKISII VPIYNVEKYL SKCIDSIVNQ TYKHIEILLV NDGSTDNSEE ICLAYAKKDS
RIRYFKKENG GLSDARNYGI SRAKGDYLAF IDSDDFIHSE FIQLHEAIE
RENALVAVAG YDRVDASGHF LTAEPLPTNQ AVLSGRNVCK KLEADGHRF VVACNKLYKK
ELFEDFRFEK GKIHEDEYFT YRLLYELEKV AIVKECLYYY VDRENSITTS
SMTDHRFHCL LEFQNERMDF YESRGDKELL LECYRSFLAF AVLFLGKYNH WLSKQOKK

Fig. 4 cont.

CPS1K

AAGCTTATCG TCAAGGTGTT CGCTATATCG TGGCGACATC TCATAGACGA AAAGGGATGT
 TTGAAACACC AGAAAAAGTT ATCATGACTA ACTTTCTTCA ATTTAAAGAC
 GCAGTAGCAG AAGTTTATCC TGAATACGA TTGTGCTATG GTGCTGAATT GTATTATAGT
 AAAGATATAT TAAGCAAAC TGAAAAAAAG AAAGTACCCA CACTTAATGG
 CTCGCGCTAT ATCTTTTGG AGTTCAGTAG TGATACTCCT TGGAAAGAGA TTCAAGAAGC
 AGTGAACGAA GTGACGCTAC TTGGGCTAAC TCCCGTACTT GCCCATATAG
 AACGATATGA CGCCCTAGCG TTTTCATGCAG AGAGAGTAGA AGAGTTAATT GACAAGGGAT
 GCTATACTCA GGTAAATAGT AATCATGTGC TGAAGCCAC TTTAATTGGT
 GATCGAGCAA AAGAATTTAA AAAACGTA CTGGTATTTT TAGAGCAGGA TTTAGTACAT
 TGTGTTGCTA GCGATATGCA TAATTTATCT AGTAGACCTC CGTTTATGAG
 GGAGGCTTAT AAGTTGCTAA CAGAGGAATT TGGCAAAGAT AAAGCGAAAG CGTTGCTAAA
 AAAGAATCCT CTTATGCTAT TAAAAACCA GCGGATTTAA ACTGGTTACT
 CTAGATTGTG GAGAGAAAAA TGGATTTAGG AACTGTTACT GATAAACTGT TAGAACGCAA
 CAGTAAACGA TTGATACTCG TGTGCATGGA TACGTGCTT CTTATAGTTT
 CCATGATTTT GAGCAGACTG TTTTGGATG TTATTATTGA CATAACAGAT GAACGCTTCA
 TTCTTGAGT TTTATCGTA TCAATTTTAT ATTTGATTCT ATCGTTTAGA
 TTAAGTCT TTTCAATTAAT TACGCGTTAC ACAGGGTATC AGAGTTATGT AAAAATAGGA
 CTTAGTTTAA TATCTGCGCA TTCATTGTTT TTAATATCT CAATGGTGT
 GTGGCAGGCT TTTAGTTATC GTTTCATCTT AGTATCCTTA TTTTGTGCGT ATGTAATGCT
 CATTACTCCG AGGATGTTT GGAAGTCTT ACATGAGACG AGAAAAATG
 CTATCCGTAA GAAGGATAGC CCACTAAGAA TCTTAGTAGT AGGTGCTGGA GATGGTGGTA
 ATATTTTAT CAATACTGTC AAAGATCGAA AATTGAATTT TGAATTTGTC
 GGTATCGTTG ATCGTGATCC AAATAAATTT GGAACATTTA TCCGTACGGC TAAAGTTTAA
 GGAACCGTA ATGATATTCC ACGACTGGTA GAGGAATTAG CTGTTGACCA
 AGTGACGATT GCCATCCCTT CTTTAAATGG TAAGGAGCGA GAGAAGATTG TTGAAATCTG
 TAACACTACA GGAGTGACCG TCAATAATAT GCCGAGTATT GAAGACATTA
 TGGCGGGGAA CATGCTGTC AGTGCCCTTC AGGAAATTGA CGTAGCAGAC CTTCTTGGTC
 GACCAGAGGT TGTGTTGGAT CAGGATGAAT TGAATCAGTT TTTCCAAGGG
 AAAACAATCC TTGTACACAG AGCAGGTGGC TCTATCGGTT CAGAGCTATG TCGTCAAATT
 GCTAAGTTTAA CGCCTAACC CTTGTTGTTG CTTGGACATG GAGAAATTC
 AATCTATCTC ATTCATCGAG AGTTACTGGA AAAGTACCAA GGTAAAGATT AGTTGGTCCC
 TCTCATTGCA GATATCAAG ATAGAGAATT GATTTTAGC ATATGGCTG
 AATATCAACC CGATGTTGT TATCATGCTG CAGCACATAA GCATGTTCTT TTGATGGAAT
 ATAATCCACA TGAAGCAGTG AAGAATAATA TTTTGGAAAC GAAGAATGTG
 GCTGAGGCGG CTAAAACTGC AAAGGTTGCC AAATTTGTTA TGTTTCAAC AGATAAAGCT
 GTTAATCCAC CAAATGTCAT GGGAGCGACT AAACGTGTTG CAGAAATGAT
 TGTACAGGT TTAACGAGC CAGGTCAGAC TCAATTTGCG GCAGTCCGGT TTGGGAATGT
 TCTAGTAGT CGTGGAAAGT TGTTCOGCT ATTCAAAGAG CAAATTAGAA
 AAGGTGGACC TGTACGGTT ACCGACTTTA GGATGACTCG TTATTTCTATG ACGATTCTCG
 AGGCAAGTCG TTTGGTTATC CAAGCTGGAC ATTTGGCAAA AGGTGGAGAA
 ATATTTGTCT TGGATATGGG CGAGCCAGTA CAAATCCTGG AATTGGCAAG AAAAGTTATC
 TTGTTAAGTG GACACACAGA GGAAGAAATC GGGATTGTAG AATCTGGAA
 CAGACCAGGC GAGAACTCT ACGAGGAATT ATATCAACA GAAGAACGTG TCAGCGAACA
 GATTATGAA AAAATATTG TGGGTCGCGT TACAAATAAG CAGTCGGACA
 TTGTCAATC ATTTATCAAT GGATTACTCC AAAAAGATAG AAATGAATTA AAAAATATGT
 TGATTGAATT TGCAAAACAA GAATAAGAAA GTAAAAATA TTTTACTTT
 CCTAGAGTT AAACGATGT TAAGTTCTAG GAAGTTTAGA ATACCTAATT AACACAATA
 TTACTATTTA TTAAGAGTCA GATAATAGCA ACTAAGTGCT ACAAACATC
 TTTATAATAA GTATATTGG TCAAAAGGGA GATGTGAAAT GTATCCAATT TGTAACGTA
 TTTTAGCAAT TATTATCTCA GGGATTGCTA TTGTTGTTCT GAGTCCAATT ATTTAAACAA
 TTATTATTGA TTGCATTGGC AATTAATTA GATTTCTAAG GTCCGGTATT ATTTAAACAA
 AAGCGGGTTG GTAAAAACAA GTCATACTTT ATGATTTATA AATTCCGTTT
 TATGTACGTT GACGCACCAA GTGATATGCC GACTCATCTA TTAAGGATC CTAAGCGAT
 GATTACCAAG GTGGGCGCGT TTCTCAGAAA AACAAAGTTA GATGAACCTG
 CACAGCTTTT TAATATTTT AAAGGTGAAA TGGCGATTGT TGGTCCACGC CCAGCCTTAT
 GGAATCAATA TGACTTAATT GAAGAGCGAG ATAAATATGG TGCAATATGAT
 ATTCGTCCTG GACTAACCGG TTGGGCTCAA ATTAATGGTC GTGATGAATT GGAATGAT
 GAAAAGTCAA AATTAGATGG ATATTATGTT CAAAATATGA GTCTAGGTTT
 GGATATTAAT TGTTCCTTAG GTACATTCCT CAGTGTAGCC AGAAGCGAAG GTGTTGTTGA
 AGGTGGAACA GGCAGAAAAG GAAAAGGATG AAATTTTTCG TATTAATGTC
 GGTCTATGAG AAAGAAAAAC CAGAGTTTCT TAGGGAATCT TTGGAAGCA TCCTTGTCAA
 TCAACAATG ATTCRAACGG AGGTTGTCTT GGTAGAGGAT GGGCCACTCA
 ATCAGAGCTT ATATAGTATT TTAGAAGAA TTAAGAGTCG ATTTTCATTT TTTAAACGA
 TAGCCTTGGG AAAGAATTCC GGTTAGGAA TTGCACTGAA TGAAGGTTG
 AAACATTGTA ATTATGAGTG GGTGTCACG AAATGGATTC TGATGATGTT GCATATACAT
 ACACGTTTTG AAAAGCAAGT TAACTTTATA AAACAAAACC CGACTATAGA

ADN Serotipo 9

```

TATTGAGATA GATGAGTTCT TAAATTCTAC TAGTGAAATA GTTTCCTATA AAAATGTTCC
AATCCAGCAC GATGAAATAT TAAAGATGGC AAGGCGGGAG AAATCCATGT
GCCACATGAC TGTAATGTTT AAAAAAGAAA GTGTCGAGAG AGCAGGGGGG TATCAAACAC
TTCCGTACGT AGAAGATTAT TTCCTTTGGG TGCGCATGAT TGCTTCAGGA
TCGAAATTTG CAAACATTGA TGAAACACTA GTTCTTGACAC GTGTTGGAAA TGGGATGTTT
AATAGGAGGG GGAACAGAGA ACAAATTAAC AGTTGGACAT TACTAATTGA
ATTTATGTTA GCTCAAGGAA TTGTTACACC ACTAGATGTA TTTATTAATC AAATTTACAT
TAGGGTCTTT GTTTATATGC CAACTTGGAT AAAGAACTC ATTTATGGAA
AAATCTTAAG GAAATAGTAT GATTACAGTA TTGATGGCTA CATATAATGG AAGCCCATTT
ATAATAAAAC AGTTAGATTC AATTCGAAAT CAAAGTGTAT CAGCAGACAA
AGTTATTATT TGGGATGATT GCTCGACAGA TGATACAATA AAAATAATAA AAGATTATAT
AAAAAAATAT TCTTTGGATT CATGGGTTGT CTCTCAAAAT AAATCTAATC
AGGGGCATTA TCAAACATTT ATAAATTTGA CAAAGTTAGT TCAGGAAGGA ATAGTCTTTT
TTTCAGATCA AGATGATATT TGGGACTGTC ATAAAATTGA GACAATGCTT
CCAATCTTTG ACAGAGAAAA TGTATCAATG GTGTTTTGCA AATCCAGATT GATTGATGAA
AACGGAATA TTATCAGTAG CCCAGATACT TCGGATAGAA TCAATACGTA
CTCTCTAGA

```

Fig. 5 cont.

AYRQGVRYIV ATSHRRKGMF ETPEKVIMTN FLQFKDAVAE VYPEIRLCYG AELYYSKDIL
SKLEKKKVPT LNGSRYILLE FSSDTPWKEI QEAVNEVTLL GLTPVLAHIE
RYDALAFHAE RVEELIDKGC YTQVNSNHVL KPTLIGDRAK EFKKRTRYFL EQDLVHCVAS
DMHNLSSRPP FMREAYKLLT EEF GKDKAKA LLKKNPLMLL KNQAI

Fig. 5 cont.

CPS9D

```

MDLGTVTDKL LERNKRLLIL VCMDTCLLIV SMILSRFLD VIIDIPDERF ILAVLFVSIL
YLILSFRLKV FSLITRYTGY QSYVKIGLSL ISAHSLFLII SMVLWQAFSY
RFILVSLFSL YVMLITPRIV WKVLHETRKN AIRKKDSPLR ILVVGAGDGG NIFINTVKDR
KLNFEIVGIV DRDPNKLGTG IRTAKVLGNR NDIPRLVEEL AVDQVTIAIP
SLNGKEREKI VEICNTTGVT VNNMPSIEDI MAGNMSVSAF QEIDVADLLG RPEVVLDQDE
LNQFFQGKTI LVTGAGGSIG SELCRQIAKF TPKRLLLLGH GENSIYLIHR
ELLEKYQGKI ELVPLIADIQ DRELIFSIMA EYQPDVYHA AAHKHVPLME YNPHEAVKNN
IFGTKNVAEA AKTAKVAKFV MVSTDKAVNP PNVMGATKRV AEMIVTGLNE
PGQTQFAAVR FGNVLGSRGS VVPLFKEQIR KGGPVTVDF RMTRYFMTIP EASRLVIQAG
HLAKGGEIFV LDMGEPVQIL ELARKVILLS GHTEEEIGIV ESGIRPGEKL
YEELLSTEER VSEQIHEKIF VGRVTNKQSD IVNSFINGLL QKDRNELKNM LIEFAKQE
    
```

Fig. 5 cont.

CPS9E

MYPICKRILA IIISGIAIVV LSPILLIAL AIKLSKGPV LFKQKRVGKN KSYFMIYKFR
SMYVDAPSDM PTHLLKDPKA MITKVGAFRL KTSLELPQL FNIFKGEMAI
VGPRPALWNQ YDLIEERDKY GANDIRPGLT GWAQINGRDE LEIDEKSKLD GYYVQNMSLG
LDIKCFLGTF LSVARSEGTV EGGTGQKGGK

Fig. 5 cont.

CPS9F

MKFSVLMSVY EKEKPEFLRE SLESILVNQT MIPTEVVLVE DGPLNQSLYS ILEEFKSRFS
FFKTIALEKN SGLGIALNEG LKHCNYEWC TKWILMMLHI HTRFEKQVNF
IKQNPTIDIE IDEFLNSTSE IVSHKNVPTQ HDEILKMARR EKSMCHMTVM FKKKSVERAG
GYQTLPYVED YFLWVRMIAS GSKFANIDET LVLARVGNGM FNRRGNREQI
NSWTLLEIFM LAQGIVTPLD VFINQIYIRV FVYMPTWIKK LIYGKILRK

Fig. 5 cont.

CPS9G

MITVLMATYN GSPFIIKQLD SIRNQSVSAD KVIIWDDCST DDTIKIIKDY IKKYSLDSWV
VSQNKSNQGH YQTFINLTKL VQEGIVFFSD QDDIWDCHKI ETMLPIFDRE
NVSMVFCKSR LIDENGNIIS SPDTSDRINT YSL

Fig. 5 cont.

CPS9H

CTGCAGCACA TAAGCATGTT CCATTGATGG AATATAATCC ACATGAAGCA GTGAAGAATA
 ATATTTTTGG AACGAAGAAT GTGGCTGAGG CCGCTAAAAC TGCAAAGGTT
 GCCAAATTTG TTATGGTTTC AACAGATAAA GCTGTTAATC CGCCAAATGT CATGGGAGCG
 ACTAAACGTG TTGCAGAAAT GATTGTAACA GGTTAAACG AGCCAGGTCA
 GACTCAATTT CCGGCAGTCC GTTTTGGGAA TGTTCTAGGT AGTCGTGGAA GTGTTGTTC
 GCTATTCAAA GAGCAAATTA GAAAAGGTGG ACCTGTTACG GTTACCGACT
 TTAGGATGAC TCGTTATTTT ATGACGATTC CTGAGGCAAG TCGTTTGGIT ATCCAAGCTG
 GACATTTGGC AAAAGGTGGA GAAATCTTTG TCTTGGATAT GGGTGAGCCA
 GTACAAATCC TGGAAATGGC AAGAAAAGTT ATCTTGTTAA GCGGACATAC AGAGGAAGAA
 ATCGGGATTG TAGAATCTGG AATCAGACCA GCGGAGAAAC TCTACGAGGA
 ATTGTTATCA ACAGAAGAAC GTGTGAGCGA ACAGATTCAT GAAAAAATAT TTGTGGGTCC
 CGTTACAAAT AAGCASTCGG ACATTGTCAA TTCATTTATC AATGGATTAC
 TCCAAAAAGA TAGAAATGAA TTAAAAGATA TGTTGATTGA ATTTGCAAAA CAAGAATAAG
 AAAGTAAAAA ATATTTTTAC TTCTCTAGAG TTTAAACGAT GTTTAAGTTC
 TAGGAAGGTT GGAATTGCTT TCGTGGAGGT GATAGATAGA AACCTATATA TTTGTAGAAG
 AAAGGATATT AAACATAAGG TGAATCGGAA CATAAAGTTT AGATAGAGTT
 GGTATTTAAT GCCAAACAGG TGAATGCAAC CTCTCGCTCG TTAATAAGCA GGAGATAGTA
 AAGTTGCTTG AAAGAGAGTT TGTTAATCAG TATAAGTAGG CTAAGGTGAG
 AATATATATC TATTATTATC GGTAATGATA CTATTATTGA GAATTATTGT AGTGGGGATA
 AAAATAATTT TTGGTGATTT TATCGTCCGA CTTAAAGGTG GGTTAAAAAA
 GTAATTATAT TCTTTTAGAA TTGATGAAAA ATATGGGGGA ATATAATATT TATAGGAGAT
 ACGATGACTA GAGTAGAGTT GATTACTAGA GAATTTTTTA AGAAGAATGA
 AGCAACCAGT AAATATTTTC AGAAGATAGA ATCAAGAAGA GGTGAATTAT TTATTAATTT
 CTTTATGGAT AAGTTACTTG CGCTTATCCT ATTATTGCTA TTATCCCCAG
 TAATCAATTA ATTAGCTATT TGGATAAAAT TAGATAGTAA GGGGCCAATT TTTTATCGCC
 AAGAACGTGT TACGAGATAT GGTCTGAATT TTAGAAATTT TAAGTTTAGA
 ACAATGATTT CTGATGCGGA TAAAGTGGGA AGTCTTGTC AAGTCGGTCA AGATAATCGT
 ATTACGAAAG TCGGTCACAT TATCAGAAAA TATCGGGTGG ACGAAGTGCC
 CCAACTTTTT AATGTTTTAA TGGGGGATAT GAGCTTGTGA GGTGTAAGAC CAGAAGTACA
 AAAATATGTA AATCAGTATA CTGATGAAAT GTTTGCGACG TTACTTTTAC
 CTGCAGGAAT TACTTCACCA GCGAGTATTG CATATAAGGA TGAAGATATT GTTTTAGAAG
 AATATTGTTT TCAAGGCTAT AGTCCTGATG AAGCATATGT TCAAAAAGTA
 TTACCAGAAA AAATGAAGTA CAATTTGGAA TATATCAGAA ACTTTGGAAT TATTTCTGAT
 TTTAAAGTAA TGATTGATAC AGTAATTAAT GTAATAAAAT AGGAGATTAA
 AATGACAAAA AGACAAAATA TTCCATTTTC ACCACCAGAT ATTACCCAAG CTGAAATTGA
 TGAAGTTATT GACACACTAA AATCTGGTTG GATTACAACA GAACCAAAGA
 CAAAAGAGCT AGAACGTCGG CTATCAGTAT TTACAGGAAC CAATAAAACT GTGTGTTTTAA
 ATTCTGCTAC TGCAGGATTG GAACFAGTCT TACGAATFCT TGGTGTTGGA
 CCCGGAGATG AAGTTATTGT TCCTGCTATG ACCTATACTG CCTCATGATG TGTCAATTA
 CATGTAGGAG CAACTCCTGT GATGGTTGAT ATTCAAAAAA ACAGCTTTGA
 GATGGAATAT GATGCTTTGG AAAAAGCGAT TACTCCGAAA ACAAAAAGTTA TCATTCCTGT
 TGATCTAGCT GGTATTCCTT GTGATTATGA TAAGATTAT ACCATCGTAG
 AAAACAACCG CTCTTTGTAT GTTGCTTCTG ATAATAAATG GCAGAAACTT TTTGGGCGAG
 TTATTATCCT ATCTGATAGT GCACACTCAC TAGGTGCTAG TTATAAGGGA
 AAACCAAGCG GTTCCCTAGC AGATTTTACC TCATTTTCTT TCCATGCGAT TAAGAATTTT
 ACAACTGCTG AAGGAGGTAG TGTGACATGG AGATCACATC CTGATTTGGA
 TGACGAAGAG ATGTATAAAG AGTTTCAGAT TTACTCTCTT CATGGTCAGA CAAAGGATGC
 ATTAGCTAAG ACACAATTAG GGTGATGGGA ATATGACATT GTTATTCCTG
 GTTACAAGTG TAATATGACA GATATTATGG CAGGTATCGG TCTTGTGCAA TTAGAACGTT
 ACCCATCTTT GTTGAATCGT CGCAGAGAAA TCATTGAGAA ATACAATGCT
 GGCTTTGAGG GGAATTCGAT TAAGCCGTTG GTACACCTGA CGGAAGATAA ACAATCGTCT
 ATGCACTTGT ATATCACGCA TCTACAAGGC TATACTTTAG AACCAACGAAA
 TGAAGTCATT CAAAAATGG CTGAAGCAGG TATTGCGTGC AATGTTCACT ACAAAACATT
 ACCTCTTCTC ACAGCCTACA AGAATCTTGG TTTTGAATG AAAGATTTTC
 CGAATGCCTA TCAGTATTTT GAAAATGAAG TTACTACTGCT TCTTCATACC AACTTGAGTG
 ATGAAGATGT GGAGTATGTG ATAGAAATGT TTTTAAAAAT TGTTAGTAGA
 GATTAGTTAT TTTGGAAGGA GATATGGTGG AAAGAGATAT GGTGGAAAGA GACACGTTGG
 TATCTATAAT AATGCCCTCG TGGAATACAG CTAAGTATAT ATCTGAATCA
 ATCCAGTCAG TGTGGACCA AACACACCAA AATTGGGAAC TTATAATCGT TGATGATTGT
 TCTAATGACG AAACGTAAAA AGTTGTTTCG CATTTCAAAG ATTTCAAGAAT

ADN Serotipo 7

```

AAAGTTTTTT AAAAATTCGA ATAATTTAGG GGCAGCTCTA ACACGAAATA AGGCACTAAG
AAAAGCTAGA GGTAGGTGGA TTGCGTTCTT GGATTCAGAT GATTTATGGC
ACCCGAGTAA GCTAGAAAAA CAGCTTGAAT TTATGAAAAA TAATGGATAT TCATTTACTT
ATCACAATTT TGAAAAGATT GATGAATCTA GTCAGTCTTT ACGTGTCCCTG
GTGTCAGGAC CAGCAATTGT GACTAGAAAA ATGATGTACA ATTACGGCTA TCCAGGGTGT
TTGACTTTCA TGTATGATGC AGACAAAATG GGTTTAATTC AGATAAAAGA
TATAAAGAAA AATAACGATT ATGCGATATT ACTTCAATTG TGTAGAAGT ATGACTGTTA
TCTTTTAAAT GAAAGTTTAG CTTCGTATCG AATTAGAAAA AA
    
```

Fig. 6 cont.

AAHKHVPLME YNPHEAVKNN IFGTKNVAEA AKTAKVAKFV MVSTDKAVNP PNVMGATKRV
AEMIVTGLNE PGQTQFAAVR FGNVLGSRGS VVPLFKEQIR KGGPVTVDF
RMTRYFMTIP EASRLVIQAG HLAGGGEIFV LDMGEPVQIL ELARKVILLS GHTEEEIGIV
ESGIRPGEKL YEELLSTEER VSEQIHEKIF VGRVTNKQSD IVNSFINGLL
QKDRNELKDM LIEFAKQE

Fig. 6 cont.

CPS7E

MTRVELITRE FFKKNEATSK YFQKIESRRG ELFIKFFMDK LLALILLLLL SPVIIILAIW
IKLDSKGPIF YRQERVTRYG RIFRIFKFRT MISDADKVG LVTVGQDNRI
TKVGHIIIRKY RLDEVPQLFN VLMGDMSEVGR VRPEVQKYVN QYTDEMFATL LLPAGITSPA
SIAYKDEDIV LEEYCSQGYS PDEAYVQKVL PEKMKYNLEY IRNFGIISDF
KVMIDTVIKV IK

Fig. 6 cont.

CPS7F

MTKRQNI PFS PPDITQAEID EVIDTLKSGW ITTGPKTKEL ERRLSVFTGT NKTVCLNSAT
 AGLELVLRL GVGPGDEVIV PAMTYTASCS VITHVGATPV MVDIQKNSFE
 MEYDALEKAI TPKTKVIIPV DLAGIPCDYD KIYTIVENKR SLYVASDNKW QKLFGRVIL
 SDSAHS LGAS YKGK PAGSLA DFTSFSFHAV KNFTTAEGGS VTWRSHPDLD
 DEEMYKEFQI YSLHGQTKDA LAKTQLGSWE YDIVIPGYKC NMTDIMAGIG LVQLERYPSL
 LNRRREIIEK YNAGFEGTSI KPLVHLTEDK QSSMHLYITH LQGYTLEQRN
 EVIQKMAEAG IACNVHYKPL PLLTAYKNLG FEMKDFPNAY QYFENEVTLF LHTNLSDEDV
 EYVIEMFLKI VSRD

Fig. 6 cont.

CPS7G

MVERDMVERD TLVSIIMPSW NTAKYISESI QSVLDQTHQN WELIIVDDCS NDETEKVVSH
FKDSRIKFFK NSNNLGAALT RNKALRKARG RWIAFLDSDD LWHPSKLEKQ
LEFMKNGYS FTYHNFEKID ESSQSLRVLV SGPAIVTRKM MYNYGYPGCL TFMVDADKMG
LIQIKDIKKN NDYAILLQLC KKYDCYLLNE SLASYRIRK

Fig. 6 cont.

CPS7H

Cps2J	MEKVSIIVPI	FNTEKYLREC	LDSIISQSYT	NLEILLIDG	SSDSSTOICL	EYAEQDGRIK	60
Cps2K	MINISIIVPI	YNVEQYLSKC	INSIVNQTYK	HIEILLVNDG	STDNSEEICL	AYAKKDSRIR	60
Cps2J	LPRLPNGGVS	NARNYGIKNS	TANYIMFVDS	DDIVDGNIVE	SLYTCLKEND	SDLSGGLLAT	120
Cps2K	YFKKENGGLS	DARNYGISRA	KGDYLAFIDS	DDFIHSEFIQ	RL_HEAIERE	NAL__VAVAG	117

Fig. 7

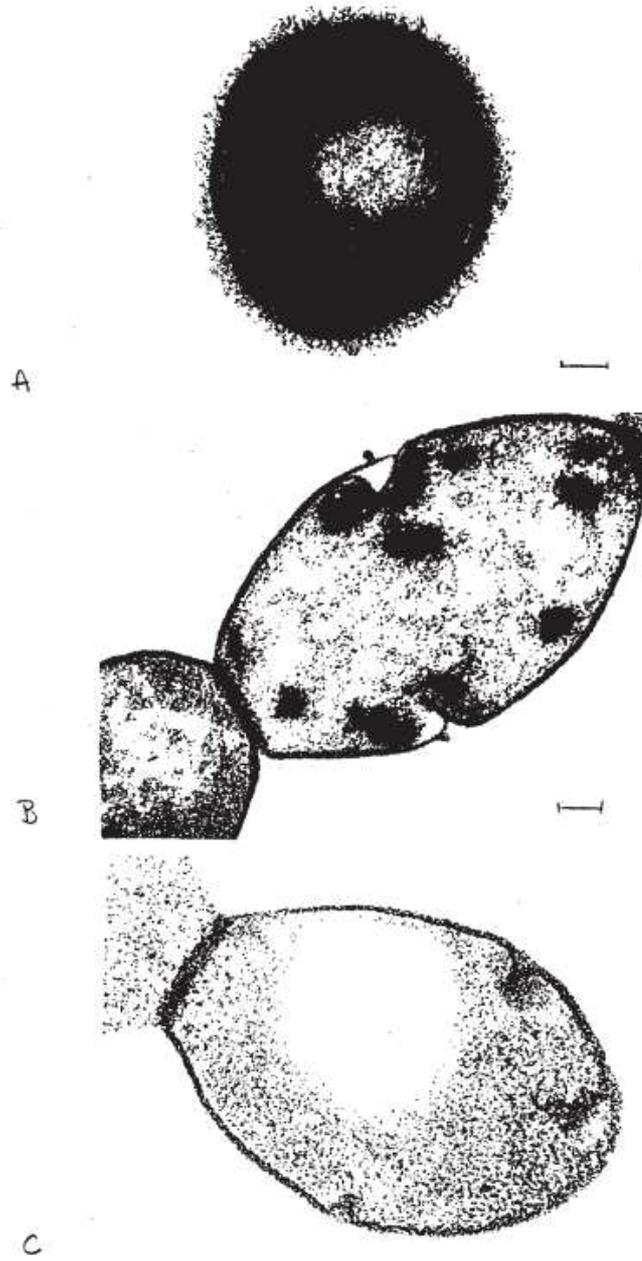


Fig. 8

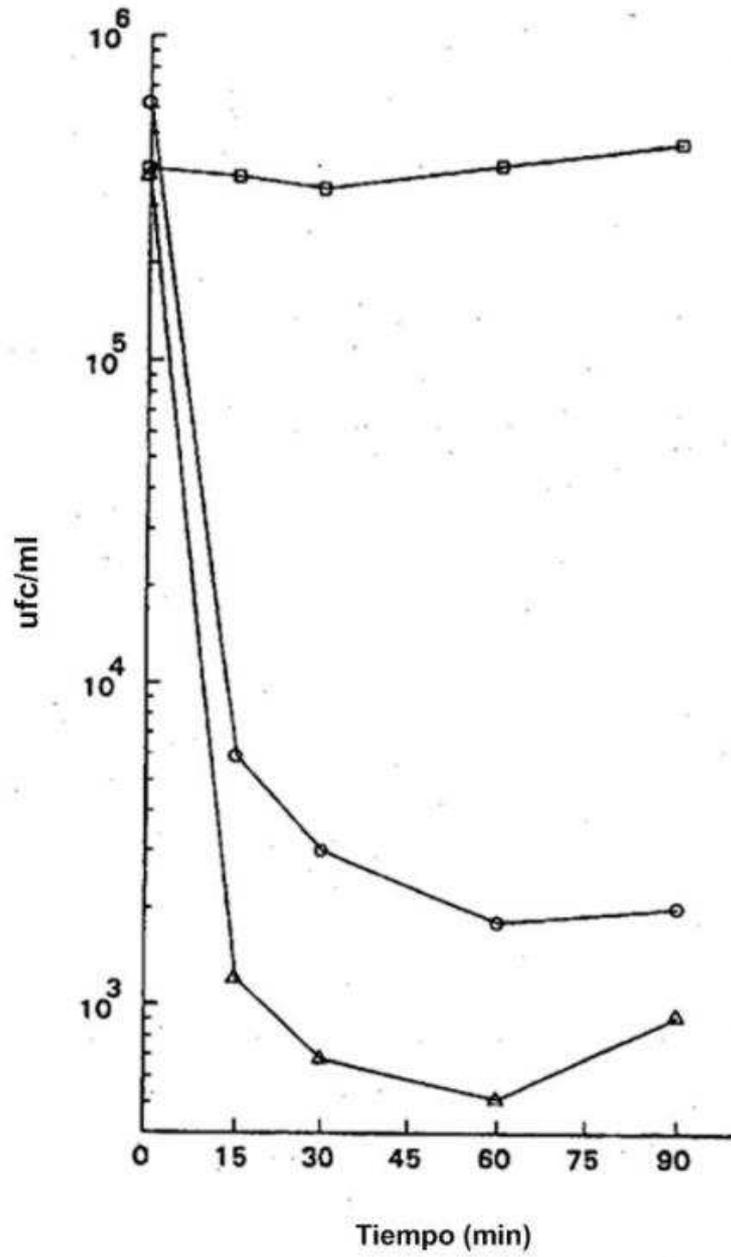


Figura. 9A

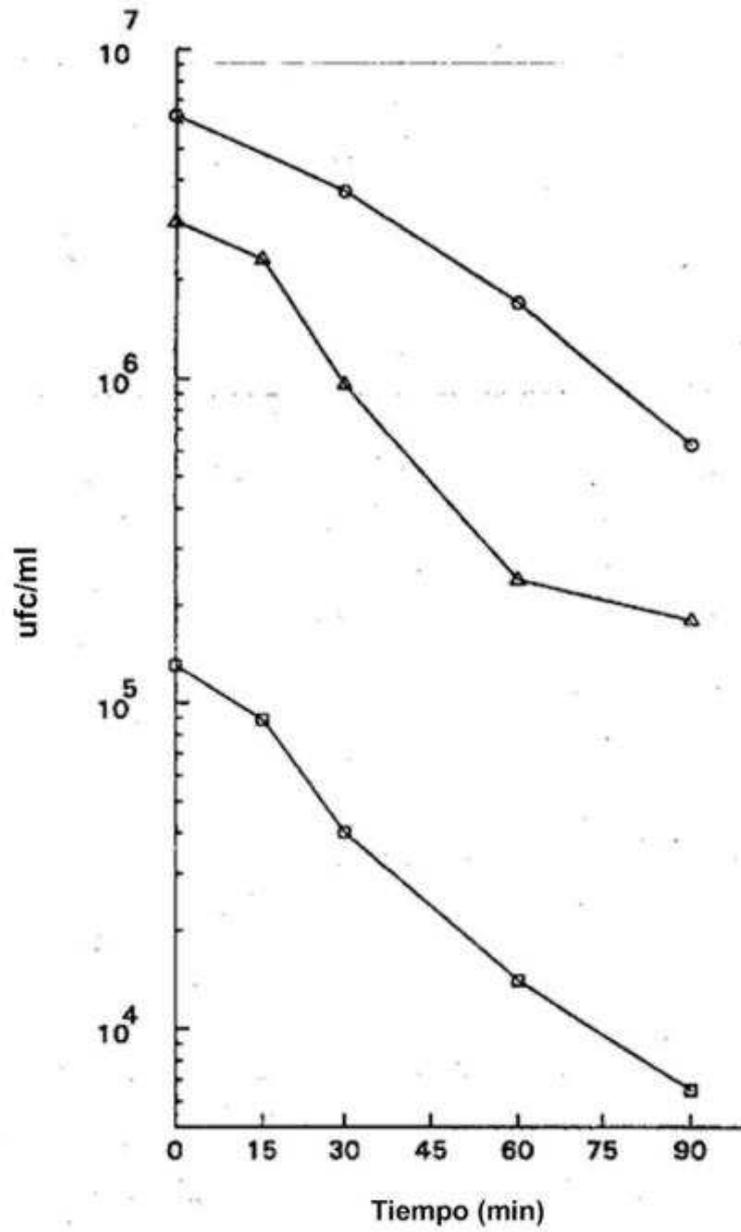


Figura. 9B

```
(1) 10508 AAGGGCNCCT CTATAACTC CCAAAATTGC GAATTGGAG TTACGAAAGC CTTGTTAAAT CAA-CATTTA AATTTAGAA AATTAGTTT TAGAGTCCC 10507
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
(2) 16985 GGGGCNCCT CTATAACTC CCAAAATTGC GAATTGGAG TTACGAAAGC CTTGTTAAAT CAA-CATTTA AATTTAGAA AATTAGTTT TAGAGTCCC 17084
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
(3) 19803 AAGGGCNCCT CTATAACTC CCAAAATTGC GAATTGGAG TTACGAAAGC CTTGTTAAAT CAA-CATTTA AATTTAGAA AATTAGTTT TAGAGTCCC 19903
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
```

Fig. 10

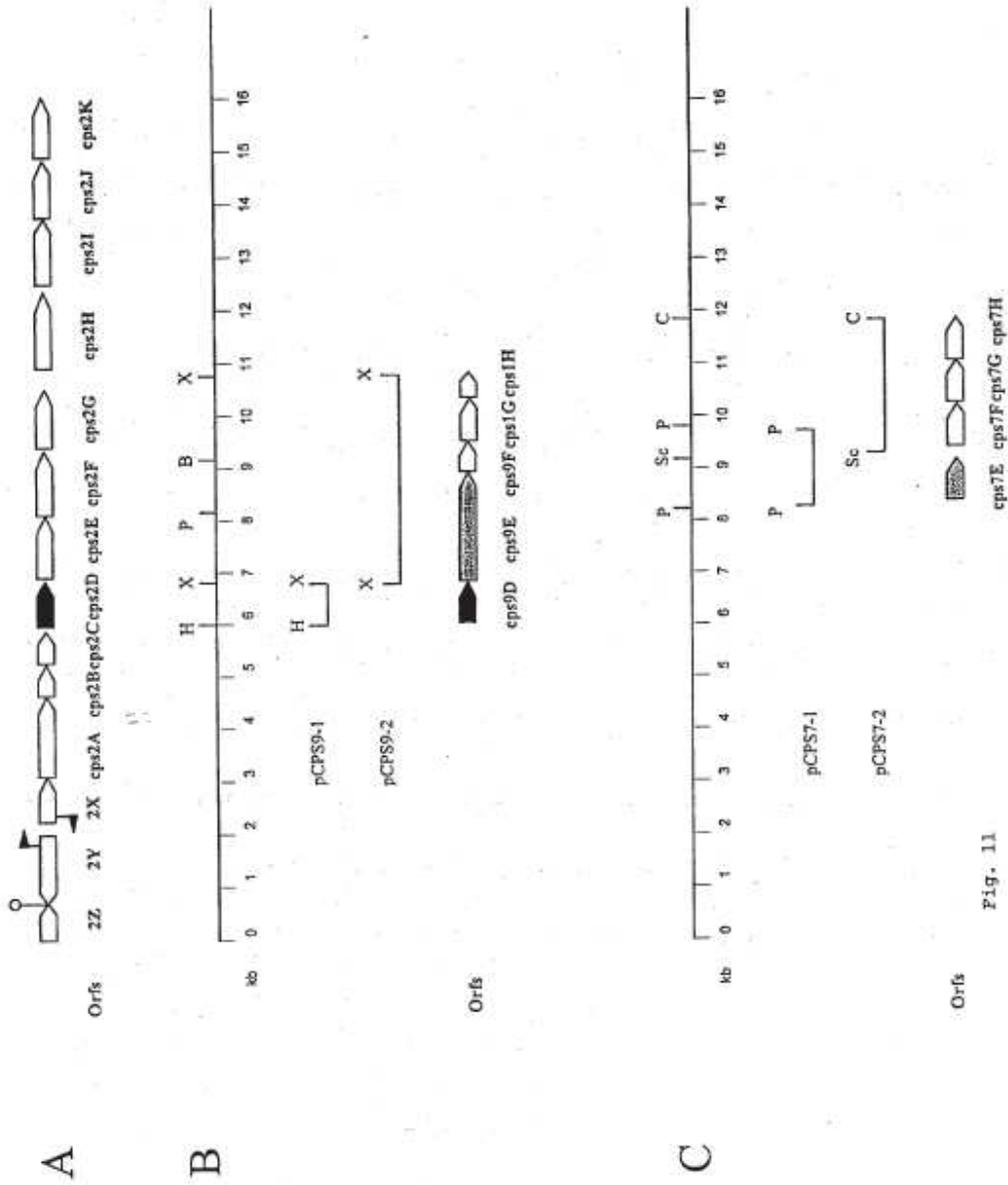


Fig. 11

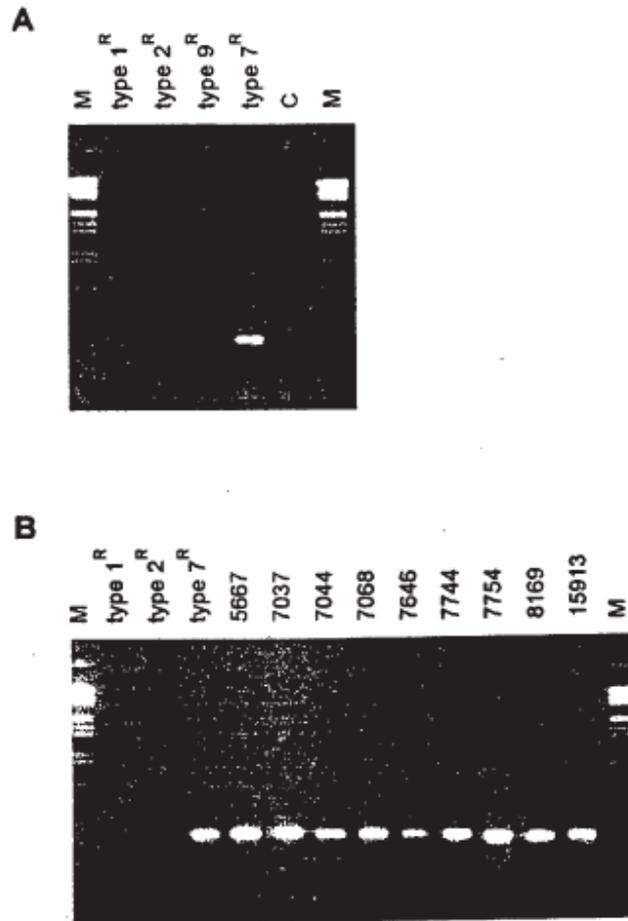


Fig. 12