(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 724 729**

(51) Int. CI.:

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 39/112 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2012 PCT/KR2012/003920**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12157989**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2012 E 12785922 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2710116**

(54) Título: **Cepas avirulentas modificadas de Salmonella Gallinarum y composición farmacéutica usando las mismas**

(30) Prioridad:

17.05.2011 US 201161487137 P
17.10.2011 US 201113274854

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2019

(73) Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR

(72) Inventor/es:

CHOI, HYANG;
SHIN, SOO AN;
YANG, SI YONG y
CHO, YOUNG WOOK

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

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

Cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* y composición farmacéutica usando las mismas

[Campo técnico]

La presente invención proporciona cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* y diversos usos de las mismas.

[Técnica antecedente]

Actualmente, más de 2.000 cepas de *Salmonella* se clasifican generalmente en serotipos específicos del huésped y serotipos no específicos del huésped patógenos tanto para animales como para seres humanos. Son representativos entre los patógenos adaptados a las aves *Salmonella Gallinarum* (SG) y *Salmonella Pullorum* (SP), que se sabe que causan tifosis aviar y pullorosis, respectivamente. Estas enfermedades aviares causadas por *Salmonella* se producen con poca frecuencia en los países avanzados, pero han causado un daño económico tremendo a la avicultura en los países en desarrollo.

Serológicamente, las cepas de *Salmonella Gallinarum* tienen las mismas estructuras de antígeno somático (antígeno O) y se clasifican como no móviles porque no tienen flagelos. Después de entrar en un animal huésped a través de pienso contaminado o un entorno contaminado, la *Salmonella* atraviesa el tracto gastrointestinal e invade las células epiteliales intestinales mediante la interacción con un micropliegue (M) de las células de Peyer y penetra en la membrana intestinal. La *Salmonella* se transporta por las células M a los macrófagos en las membranas intestinales adyacentes, y después la infección por *Salmonella* se convierte en una enfermedad sistémica.

El sistema de secreción de tipo III (TTSS) es un apéndice de proteínas que se encuentra en bacterias gramnegativas, que consiste en una estructura de complejo de proteínas de tipo aguja a través de la cual las proteínas efectoras de virulencia pasan del citoplasma bacteriano directamente al citoplasma huésped (Mota LJ *et al*., Ann Med. (2005);37(4):234-249). El sistema de secreción de tipo III es esencial para la administración de la patogenicidad de *Salmonella* (Schlumberger MC *et al*., Curr Opin Microbiol. (2006);9(1):46-54). La *Salmonella* de tipo silvestre aprovecha el TTSS cuando se adhiere e invade las células huésped, y después sobrevive durante la fagocitosis de los macrófagos y circula por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, causando una infección sistémica. Por lo tanto, la infección por *Salmonella* no puede continuar sin el funcionamiento normal del TTSS. La isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (en lo sucesivo en el presente documento denominada "SPI-1") es una región discreta del cromosoma de *Salmonella* que codifica el sistema de secreción de tipo III y las proteínas efectoras virulentas que son necesarias para la invasión de las células epiteliales intestinales en la fase temprana de la infección (Kimbrough TG *et al*., Microbes Infect, (2002);4(1):75-82). La isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 (en lo sucesivo en el presente documento, "SPI-2") es también una región discreta del cromosoma de *Salmonella* que codifica el sistema de secreción de tipo III y las proteínas efectoras que participan en la supervivencia y la proliferación durante la fagocitosis por macrófagos en órganos inmunes intestinales u órganos inmunes tales como el bazo y el hígado después de la translocación a través de las células epiteliales (Waterman SR *et al*., Cell Microbiol, (2003);5(8):501~511, Abrahams GL, Cell Microbiol, (2006);8(5):728-737). Los genes en la SPI-1 y la SPI-2 y sus funciones se resumen en la Tabla 1, a continuación.

[Tabla 1]

	Gen	Características
SPI-1	**avrA**	**supuesta proteína de membrana interna**
	sprB	**regulador transcripcional**
	hilC	**proteínas con hélice-giro-hélice reguladoras bacterianas, familia araC**
	orgA	**supuesta biosíntesis flagelar/proteína de la ruta secretora de tipo III**
	prgK	**proteína de invasión celular; lipoproteína, puede unir membranas internas y externas**
	prgJIH	**proteína de invasión celular**
	hilD	**proteínas con hélice-giro-hélice reguladoras, familia araC**
	hilA	**activador de la transcripción de genes de invasión**
	iagB	**proteína de invasión celular**
	sptP	**proteína tirosina fosfato**

	sicP	**chaperona, relacionada con la virulencia**
	iacP	**supuesta proteína portadora de acilo**
	sipADCB	**proteína de invasión celular**
	sicA	**presentación superficial de antígenos; proteínas secretoras**
	spaSRQPO	**presentación superficial de antígenos; proteínas secretoras**
	invJICB	**presentación superficial de antígenos; proteínas secretoras**
	invAEGFH	**proteína de invasión**
SPI-2	**ssaUTSRQPON VMLKJIHG**	**Aparato del sistema de secreción**
	sseGF	**Efector del sistema de secreción**
	sscB	**Chaperona del sistema de secreción**
	sseEDC	**Efector del sistema de secreción**
	sscA	**Chaperona del sistema de secreción**
	sseBA	**Efector del sistema de secreción**
	ssaE	**Efector del sistema de secreción**
	ssaDCB	**Aparato del sistema de secreción**
	ssrA	**Regulador del sistema de secreción: componente sensor**
	ssrB	**Regulador del sistema de secreción: activador transcripcional, homólogo con degU/uvrY/bvgA**

Además de estos sistemas de secreción de tipo III, el gen fimbrial (*faeHI*) (Edwards RA *et al*., PNAS (2000); 97(3):1258-1262) y el factor virulento (operón *spvRABCD*) presente en plásmidos virulentos de *Salmonella* están implicados en la virulencia de la *Salmonella* (Gulig PA *et al*., Mol Microbiol (1993);7(6):825-830).

Las enfermedades aviares causadas por *Salmonella* son difíciles de controlar porque se transmiten de diversas maneras, incluida la transmisión por huevos, y el pienso o la infección ambiental, y muestran altas tasas de reaparición incluso después del tratamiento posterior a la infección con antibióticos. Por lo tanto, es importante prevenir la aparición de la enfermedad mediante el uso de una vacuna, así como la desinfección de las granjas de cría y el pienso. En la industria avícola, se ha puesto mucho esfuerzo en el uso de vacunas vivas (cepas atenuadas de *Salmonella Gallinarum* - SG9S, SG9R) y vacunas muertas (vacunas en gel, vacunas a base de aceite, etc.) para prevenir la aparición de la tifosis aviar. Sin embargo, los efectos de la vacuna varían de acuerdo con la concentración de la vacuna utilizada, la afección de las aves vacunadas y el entorno de los gallineros. Se informa que la eficacia de estas vacunas es significativamente menor que la de las vacunas para otras enfermedades. El tratamiento con antibióticos, aunque reduce las lesiones resultantes, convierte las aves infectadas en portadores crónicos (véase: Incidence and Prevention of Hen Salmonellosis, the National Veterinary Research & Quarantine Service, Corea).

Por lo tanto, se están demandando nuevos enfoques de control de la *Salmonella* que sean mejores que las vacunas o antibióticos convencionales. Muchos científicos han prestado atención recientemente a los bacteriófagos, que infectan y lisan las bacterias específicamente y son seguros para los humanos, como una potente alternativa a los antibióticos. Hay muchos informes sobre el uso de bacteriófagos en la prevención o terapia de las enfermedades por *Salmonella* (Atterbury RJ *et al*., Appl Environ Microbiol, (2007);73(14):4543-4549) y como desinfectantes o detergentes para prevenir la putrefacción de alimentos (documentos PCT 1998-08944, PCT 1995-31562, EP 1990-202169, PCT 1990-03122), y sobre técnicas de visualización de fagos para el diagnóstico (Ripp S *et al*., J Appl Microbiol, (2006);100(3):488-499). Las vacunas de *Salmonella* preparadas eliminando o modificando uno o dos genes dentro del clúster del gen SPI-2 se han divulgado recientemente (documentos US 6923957, US7211264, US7887816).

La disertación de Mi Ah Kim con el título "Development of oral vaccine candidate using attenuated *Salmonella Gallinarum* (22 de febrero de 2010, Chonbuk National University, Disertación, páginas 69pp) divulga una cepa de *Salmonella Gallinarum* en la que el gen prgK-H se ha eliminado y una cepa de *Salmomello Gallinarum* adicional en la que se ha eliminado el gen sprP.

D.H.Shah (Microbiology, vol. 151, n.º 12, del 1 de diciembre de 2005) ha identificado genes de virulencia de *Salmonella Gallinarum* en un modelo de infección de pollo utilizando un sistema de mutagénesis etiquetada con firma basada en PCR.

I. Rychlik *et al*. (FEMS Microbiology letters, vol. 159, n.º 2, 15 de febrero de 1998) han identificado genes homólogos

a los genes faeH y faeI en el plásmido de virulencia de *Salmonella Gallinarum*.

Además, S. Barth y R. Bauerfeind (Berl. Münch. Tierärztl. Wschr, vol. 118, 1 de enero de 2005) divulgan una cepa de *Salmonella typhimurium* a partir de la cual se han identificado características y funciones de proteínas Spv específicas.

Para uso industrial, los bacteriófagos se producen separando las progenies de fagos de las células huésped que se lisan durante la proliferación de bacteriófagos que se han inoculado en las células huésped cultivadas de forma masiva. Sin embargo, en cuanto a los bacteriófagos específicos para bacterias patógenas, sus lisados pueden contener células huésped patógenas que no se eliminan, y/o materiales virulentos como tales proteínas patógenas del huésped. Esta probabilidad actúa como un gran factor de riesgo para la seguridad de los bacteriófagos producidos sobre la base de células huésped patógenas.

Muchas bacterias tienen fagos lisógenos en sus cromosomas; sin embargo, la mayoría de los fagos son crípticos y no pueden producir progenie debido a la acumulación de muchas mutaciones como remanentes ancestrales. Los fagos lisógenos, aunque inactivos, pueden ayudar a la capacidad de supervivencia de la *Salmonella* en la infección del huésped porque contienen los genes necesarios para el crecimiento lítico y lisógeno y algunos de los genes codifican factores patógenos. Sin embargo, es probable que estos genes experimenten una recombinación homóloga con el genoma viral de otros fagos similares que infectan de nuevo a los animales, produciendo de este modo fagos modificados genéticamente. En cuanto a la típica *Salmonella typhimurium*, tiene profagos fels-1, fels-2, gifsy-1 y gifsy-2 y dos fagos crípticos. En contraste, podría usarse *Salmonella Gallinarum* como un huésped productor de fagos, ya que *Salmonella Gallinarum* no tiene profagos ni fagos crípticos, y después los fagos producidos no se modifican genéticamente por recombinación (Edwards RA *et al*, Trends Microbiol, (2002); 10(2):94-99).

Con el fin de minimizar los restos tóxicos durante la producción de progenie y la oportunidad de mutación del fago, los presentes inventores diseñaron el concepto de que los grupos de genes de virulencia de *Salmonella Gallinarum* podrían inactivarse para producir bacteriófagos. No hay casos precedentes en los que bacterias avirulentas, que se hayan convertido a partir de bacterias virulentas mediante la inactivación de un clúster de genes de virulencia, se hayan utilizado como una célula huésped de bacteriófago.

Además de la producción de bacteriófagos, la *Salmonella* privada de virulencia mediante la inactivación de grupos de genes de virulencia se usa por sí misma para desarrollar vacunas vivas atenuadas para controlar la *Salmonella* o aplicarse a la bioindustria, lo que garantiza un valor añadido significativo.

En la presente invención, se utilizan cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* obtenidas al eliminar al menos uno del principal clúster de genes completo de virulencia de *Salmonella* seleccionado del siguiente punto (i) a (iv): (i) isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 (SPI-2), (ii) isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1) y SPI-2, (iii) *spvRABCD*, y (iv) SPI-1, SPI-2, *spvRABCD*, y *faeHI*, como una célula huésped productora de bacteriófagos y se aplican en diversos usos.

[Divulgación]

Con el objetivo de resolver los problemas con la modificación recombinante de los fagos de la progenie y los remanentes bacterianos tóxicos en el transcurso de la producción de bacteriófagos sobre la base de los hechos descritos anteriormente, los presentes inventores desarrollaron cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con Reivindicación 1 a utilizar como una célula huésped para la producción de bacteriófagos. Además, los presentes inventores confirmaron principalmente la reducción de la virulencia al medir la eficiencia de la invasión de *Salmonella Gallinarum* en las células epiteliales aviares, y se reconfirmaron al medir la mortalidad de las gallinas infectadas con cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum*. Por otro lado, los presentes inventores aprueban el uso de huéspedes productores de bacteriófagos, el uso de las composiciones farmacéuticas y aditivos para pienso para la prevención o el tratamiento de la salmonelosis aviar a través de la comparación de la productividad de los bacteriófagos entre las cepas de tipo silvestre y las avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la reivindicación 1 en la producción de bacteriófagos específicos de *Salmonella*, o un método para producir fagos utilizando la cepa o las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la reivindicación 1. Las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la

presente invención se pueden usar para la producción en masa de bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella* libres de toxicidad remanente y se aplican al desarrollo de un nuevo concepto de sustitutos de antibióticos que tienen un alto valor de utilidad y garantizan un valor añadido significativo.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona además una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 y 10, una vacuna de acuerdo con la reivindicación 11 y un aditivo para pienso de acuerdo con la reivindicación 12.

El clúster del gen SPI-1 codifica proteínas del sistema de secreción de tipo III que permanecen en las superficies celulares, actuando como un antígeno, mientras que el clúster del gen SPI-2 codifica proteínas que participan en la supervivencia en los fagosomas después del paso a través de las células epiteliales. Por lo tanto, la inactivación del clúster del gen SPI-2 en solitario, con el clúster del gen SPI-1 intacto, deja el antígeno necesario para la producción de un anticuerpo que induce una respuesta inmune, pero no permite que la *Salmonella* sobreviva durante la fagocitosis, por lo tanto, no da como resultado una enfermedad sistémica. Por lo tanto, la cepa de *Salmonella Gallinarum* inactivada por un clúster del gen SPI-2 podría usarse como una vacuna viva.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la reivindicación 1 con una reducción notable de la patogenicidad.

Como se usa en el presente documento, el término "clústeres de genes de virulencia de *Salmonella*" se refiere a los cuatro clústeres de genes implicados en la virulencia de *Salmonella Gallinarum*, incluida el operón de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (en lo sucesivo en el presente documento denominado "SPI-1") que codifica las proteínas estructurales y las proteínas efectoras tóxicas del sistema de secreción de tipo III, el operón de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 (en lo sucesivo en el presente documento denominado "SPI-2") que codifica las proteínas estructurales y las proteínas efectoras tóxicas del sistema de secreción de tipo III, el operón *spvRABCD* que codifica proteínas patógicamente activas en plásmidos virulentos específicos de *Salmonella* aviar, y el operón *faeHI* que codifica las fimbrias. Mientras funcione de forma funcional en *Salmonella Gallinarum*, se puede usar cualquier clúster de genes.

El término "clúster de genes", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de genes adyacentes en un cromosoma o un plásmido que son comúnmente responsables de los mismos productos. Los genes en un clúster están bajo la regulación de genes reguladores comunes.

La inactivación de genes en bacterias se puede lograr usando diversos métodos. Por ejemplo, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica, o también mediante la técnica de ARN antisentido conocida en la técnica sin excesiva experimentación. Las estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosomas, el codón de inicio y los terminadores, pero sin limitación (Jensen y Hammer, Biotechnology and Bioengineering 58:191195 (1998), Carrier y Keasling, Biotechnology Progress 15:5864 (1999), Franch y Gerdes, Current Opinion in Microbiology 3:159164 (2000), Knippers ("Molecular Genetics", 6ª edición, 1995) o los de Winnacker ("Genes y Clones", 1990), cuyo contenido de cada uno se incorpora en el presente documento por referencia).

Además, se puede usar un mecanismo de interferencia de ARN (ARN de interferencia: ARNi) que induce la degradación del ARNm del gen diana a través de la introducción de ARN bicatenario (ARNds) que consiste en la cadena de sentido que comprende el ARNm del gen diana y las secuencias homólogas del mismo, y la cadena antisentido que comprende la secuencia complementaria. Además, el método que utiliza transposón, que se puede mover a otra ubicación dentro del genoma de una sola célula, se puede usar para inactivar el gen a través de la mutación mediada por transposón para bloquear la función del gen diana. Las mutaciones que conducen a un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas de clústeres de genes se conocen de la técnica anterior (Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272:86118617 (1997)), Yano *et al*., (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95:5511 5515 (1998)), y Wente y Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266:2083320839 (1991)). Pueden encontrarse descripciones resumidas en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, los de Hagemann ("General Genetics", 1986).

Preferiblemente, la inactivación del clúster de genes se realiza utilizando un método seleccionado de los siguientes: modificación de uno o más nucleótidos en el gen, eliminación de uno o más genes, inserción de un gen exógeno en los genes, eliminación de todos de los clústeres de genes, inserción de secuencias supresoras en el promotor del clúster de genes, mutación del promotor, inserción de una expresión que suprime la secuencia de regulación del

clúster de genes, introducción del ARNi para uno o más nucleótidos en el grupo de genes, mutaciones mediadas por transposón, y una combinación de los mismos.

Los métodos descritos anteriormente pueden entenderse comúnmente por los expertos en la técnica y llevarse a cabo como se describe (Sambrook *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición (Cold SpringHarbor Press 2001)).

Por ejemplo, se pueden modificar uno o más nucleótidos de un sitio activo dentro de un gen para disminuir la actividad de la proteína expresada. Alternativamente, un gen resistente a los antibióticos u otro gen o genes pueden insertarse en el gen de interés para evitar la expresión de proteínas intactas. El método más preferible es eliminar la secuencia completa de un grupo de genes del genoma (Russell CB *et al*., J. Bacteriol. (1989); 171:2609-2613, Hamilton CM *et al*., J. Bacteriol. (1989); 171:4617-4622, Link AJ *et al*., J. Bacteriol. (1997); 179:6228-6237). En la presente invención, se elimina la secuencia completa del clúster de genes de interés para asegurar eficazmente la inactivación de los genes. Para esto, se puede emplear el método de deleción en un solo paso que utiliza lamda Red recombinasa, conocido como un método para eliminar clústeres de genes, desarrollado por (Datsenko KA *et al*., PNAS, (2000); 97(12):6640-6645).

Con respecto a la información de los genes de virulencia a eliminar, se obtuvieron secuencias de nucleótidos de SPI-1 y SPI-2 en referencia a las secuencias de genes de virulencia dentro del cromosoma de *Salmonella Gallinarum* (*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str.*287/91, NC 011274), divulgado por el NCBI. Para la secuencia del operón *faeHI*, se hizo referencia a la secuencia del gen del plásmido de virulencia de *Salmonella Gallinarum* (genes de la subunidad fimbrial menor del plásmido de virulencia de *Salmonella Gallinarum*, AF005899). Para el operón *spvRABCD*, se consultó la secuencia del mismo gen de *Salmonella Typhimurium LT2*, que es altamente homóloga con *Salmonella Gallinarum*, porque su secuencia no se divulga en el NCBI. La secuenciación del operón *spvRABCD* de *Salmonella Gallinarum* también se realizó con referencia a la secuencia del gen correspondiente de *Salmonella Typhimurium*.

Los ejemplos de los clústeres de genes de virulencia de *Salmonella* incluyen el clúster del gen SPI-1 (SEQ ID NO: 1), el clúster del gen SPI-2 (SEQ ID NO: 2), el operón *spvRABCD* (SEQ ID NO: 3), y el operón *faeHI* (SEQ ID NO: 4) de *Salmonella Gallinarum* 287/91.

Para preparar las cepas que se habían convertido en avirulentas, se eliminaron al menos un clúster de genes de virulencia.

La presente invención incluye una cepa de *Salmonella Gallinarum* en la que solo se elimina el clúster completo del gen SPI-2 (SG3-d2), una cepa de *Salmonella Gallinarum* en la que se eliminan integralmente los clústeres de genes tanto SPI-1 como SPI-2 (SG3-d1d2), y una cepa de *Salmonella Gallinarum* en la que los cuatro clústeres de genes de virulencia (SPI-1, SPI-2, *spvRABCD* y *faeHI*) se eliminan integralmente (SG3-d4). SG3-d2 se deposita con el N.º de acceso KCCM11009P, SG3-d1d2 con el N.º de acceso KCCM11010P, y SG3-d4 con el N.º de acceso KCCM11011P.

Se han publicado estudios sobre la eliminación independiente de genes individuales de los clústeres de genes (Hapfelmeier S *et al*., J Immunol, (2005); 174(3):1675-1685, Brumme S *et al*., Vet Microbiol, (2007); 124(3-4):274-285, Desin TS *et al*., Infect Immun, Jul (2009);2866-2875), pero las cepas avirulentas de *Salmonella* se desarrollaron mediante la inactivación integral de dos o más clústeres de genes completos que no se habían divulgado antes del estudio de los presentes inventores. La cepa de *Salmonella Gallinarum* se denominó *Salmonella Gallinarum* SG2293-d2 cuando solamente se eliminó la totalidad del clúster del gen SPI-2, y SG2293-d1d2 cuando tanto SPI-1 como SPI-2 se eliminaron integralmente. Además, se denominó SG2293-d4 tras la eliminación de la totalidad de SPI-1, SPI-2, *spvRABCD,* y *faeHI.* Los términos "SG2293-d2" y "SG3-d2", "SG2293-dld2" y "SG3-dld2", y "SG2293-d4" y "SG3-d4" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Para determinar la avirulencia de las mismas, se sometieron a ensayo analizando las cepas preparadas mediante la eliminación de clústeres completos de genes de virulencia de acuerdo con la presente invención para determinar la eficacia de la invasión en las células epiteliales aviares y el brote de la enfermedad y la mortalidad (%) tras la infección en aves de corral. Preferiblemente, se permitió que las cepas de *Salmonella Gallinarum* en las que se habían eliminado los clústeres de genes de virulencia invadieran las células epiteliales aviares, de manera que pudiera medirse la eficacia de la invasión. Además, las cepas se inyectaron en capas de huevo marrón para medir la mortalidad.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona una cepa avirulenta modificada de *Salmonella* de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la producción de bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella* y un método para producir fagos usando los mismos.

Se usó ΦCJ1 (documento US 20100135962), un fago específico de *Salmonella*, para examinar la productividad del bacteriófago de las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum*. El fago muestra una actividad bactericida específica contra *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella pullorum*, pertenece al grupo de morfotipos de la familia *Siphoviridae* B1, que se caracteriza por la cápside isométrica y la cola no contráctil larga, y tiene un tamaño de genoma total de 61 kb y proteínas estructurales mayores con un tamaño de 38 kDa y 49 kDa.

El método para producir un bacteriófago de acuerdo con la presente invención comprende cultivar las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la reivindicación 1 en un medio, inocular un bacteriófago en el medio, y recuperar el bacteriófago. A este respecto, el fago puede producirse brevemente usando una placa o de forma masiva utilizando caldo. En el caso de la producción utilizando una placa, un bacteriófago se inocula en una relación adecuada en bacterias cuando las bacterias entran en una fase logarítmica, se mezclan con agar superior, y se vierten en una placa. Cuando aparecen las placas de fago, las fracciones de agar superior se recogen y se centrifugan, seguido de filtrado del sobrenadante para proporcionar una reserva de fagos. Para la producción en masa como caldo, se prepara una mezcla de fagos y bacterias de la misma manera que en la producción de placas, y se incuba durante 5 horas en caldo fresco, en lugar de en agar superior.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la tifosis aviar, que comprende la cepa avirulenta de *Salmonella* de acuerdo con la reivindicación 1 como principio activo. De acuerdo con la invención, se proporciona además una vacuna de acuerdo con la reivindicación 11 para la prevención o el tratamiento de la tifosis aviar, formulada con la cepa avirulenta de *Salmonella*.

La composición o vacuna puede comprender opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo o diluyente que no deteriora la actividad biológica ni la propiedad del principio activo y que no irrita al sujeto. Las preparaciones destinadas a la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos, gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes, elixires, etc. En lo que respecta a las formas orales tales como comprimidos y cápsulas, el principio activo puede formularse en combinación con un aglutinante tal como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, conjugado tal como celulosa o gelatina, un excipiente tal como fosfato dicálcico, un disgregante tal como almidón de maíz o almidón de batata, o un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearilfumarato de sodio o cera de polietilenglicol. En cuanto a las cápsulas, pueden comprender además un vehículo líquido tal como aceite graso.

La composición de la presente invención se puede formular en preparaciones para administración no oral, tales como inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas o inyecciones intradérmicas. Para esto, la composición de la presente invención se puede mezclar con un estabilizador o tampón en agua para preparar una solución o una suspensión que después se formula en dosis unitarias tales como ampollas o viales.

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una preparación biológica que mejora la inmunidad a una enfermedad particular al inducir la formación de un anticuerpo tras la inyección en el cuerpo, una preparación que contiene un antígeno, por ejemplo, formas muertas o atenuadas de un microorganismo causante de enfermedad. Las vacunas pueden prepararse a partir de patógenos muertos. También existen vacunas vivas, pero con virulencia atenuada de las mismas. Las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la presente invención tienen las mismas proteínas antigénicas que las del tipo silvestre, pero tienen una virulencia mucho menor en comparación con el tipo silvestre, por lo que pueden usarse como vacunas profilácticas vivas de la tifosis aviar.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona adicionalmente un aditivo para pienso que comprende la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la reivindicación 1. Cuando se aplica a aves de corral, el aditivo para pienso de la presente invención sirve como una vacuna viva que previene la tifosis aviar.

El pienso de la presente invención se puede preparar mezclando el pienso con la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* tal como está o en forma de un aditivo para pienso. En el pienso, la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* puede estar en estado líquido o seco. El estado seco se puede lograr mediante diversos métodos de secado incluyendo, pero sin limitación, el secado neumático, el secado espontáneo, el secado por pulverización y la liofilización. Además de la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* de

la presente invención, el pienso de la presente invención puede comprender además un aditivo típico útil para mejorar la conservación del pienso.

El pienso que comprende la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* de la presente invención puede ser materia vegetal tal como un cereal, nuez, un subproducto del procesamiento de alimentos, mijo, fibra, subproducto farmacéutico, un aceite vegetal, almidón, harinas de semillas oleaginosas y restos de cereales, o materia animal tales como proteínas, minerales, grasas, aceites minerales, proteínas unicelulares, plancton de animales y restos de alimentos, etc.

Los ejemplos del aditivo para pienso que comprende la cepa avirulenta modificada de *Salmonella Gallinarum* de la presente invención incluyen, pero sin limitación, diversos agentes para prevenir el deterioro de la calidad y mejorar la utilidad, tales como aglutinantes, emulsionantes, conservantes, aminoácidos, vitaminas, enzimas, probióticos, agentes saporíferos, compuestos nitrogenados no proteicos, silicatos, tampones, colorantes, extractos, oligosacáridos, etc. Además, un agente de mezcla puede estar dentro del alcance del aditivo para pienso.

La composición de la presente invención se puede administrar a animales en forma de una preparación farmacéutica para animales, o mezclando con pienso o agua. Preferiblemente, se mezcla en forma de un aditivo para pienso con el pienso antes de la administración.

Siempre que permita que la composición de la presente invención alcance tejidos o células de interés, puede tomarse cualquier vía de administración, tal como vía no oral, intraarterial, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral o intranasal.

Será evidente para los expertos en la materia que la dosis diaria total adecuada puede ser determinada por un médico tratante dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular puede variar dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo el tipo y grado de reacción deseada, la composición específica, incluido el uso de cualquier otro agente de acuerdo con el uso previsto, la edad del paciente, el peso, salud general, género y dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción de la composición; la duración del tratamiento, otros fármacos utilizados en combinación o a la vez con la composición específica; y factores similares ya conocidos en las técnicas médicas. Típicamente, la composición puede administrarse a una dosis diaria de 10^4 a 10^8 UFC una vez o a modo de dosificación dividida.

[Efectos ventajosos]

Las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con la presente invención, preparadas mediante la eliminación de un clúster o clústeres de genes de virulencia completos, son útiles como células huésped para producir de manera eficaz bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella* a escala industrial con la ventaja de ahorrar coste. Las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* simplifican el proceso de purificación utilizado para eliminar la toxicidad después de la producción de bacteriófagos, lo que reduce considerablemente el coste de producción y resuelve el problema de seguridad de los productos. Además, las cepas modificadas pueden usarse como vacunas vivas, que garantizan mayores efectos inmunológicos y seguridad que las vacunas convencionales.

[Descripción de los dibujos]

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra los genes de virulencia de *Salmonella* aviar (isla de patogenicidad de *Salmonella* 1, isla de patogenicidad de *Salmonella* 2, *spvRABCD* y *faeHI*) y los sitios correspondientes a los cebadores para inactivar los genes de virulencia; y

La Figura 2 es un gráfico que muestra la eficacia de la invasión *in vitro* en células epiteliales aviares de las cepas de *Salmonella Gallinarum* inactivadas por el gen de virulencia (SG3-d1, SG3-d2, SG3-dld2 y SG3-d4), junto con controles de tipo silvestre de *Salmonella Gallinarum* SG2293), vacuna viva de *Salmonella Gallinarum* (SG9R) y *E. coli* no patógena (MG1655). La eficiencia de invasión se expresa como un porcentaje del recuento de microorganismos dentro de las células dividido con el recuento de microorganismos dentro de un medio de cultivo. Los microorganismos se usaron a una concentración de $8{,}0 \times 10^7$ ufc por pocillo.

[Mejor modo]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende limitarse por estos ejemplos.

[Modo de la invención]

EJEMPLO 1: Cribado de genes diana a inactivar mediante la comparación de genes de virulencia de *Salmonella Gallinarum*

La primera etapa de la preparación de cepas avirulentas de *Salmonella* aviar fue el cribado de los genes de virulencia diana a inactivar. La isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1), y la isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 (SPI-2), que son ambos clústeres de genes del sistema de secreción tipo tres esenciales para la administración de la patogenicidad de *Salmonella*, y *spvRABCD* y *faeHI*, ambos de los cuales son genes en plásmidos de virulencia, se determinaron como genes diana, y en la base de datos del NCBI se buscaron las secuencias de nucleótidos de los genes diana (*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str.* 287/91, NC 011274). Como la secuencia de nucleótidos de *spvRABCD* de *Salmonella Gallinarum* aún no se había divulgado, los cebadores se sintetizaron con referencia a la secuencia de nucleótidos del mismo nombre gen de *Salmonella typhimurium* (plásmido de *Salmonella typhimurium* LT2 pSLT, NC 003277), que tiene una alta homología de nucleótidos con *Salmonella Gallinarum*. En cuanto al operón *faeHI*, la información de su secuencia de nucleótidos se obtuvo a partir de los genes de la subunidad fimbrial menor del plásmido de virulencia de *Salmonella Gallinarum* (AF005899).

EJEMPLO 2: Preparación de cepas modificadas avirulentas mediante la inactivación de los genes de virulencia de *Salmonella Gallinarum* y por la integración de los sitios inactivados

2-1. Inactivación de los genes de virulencia de *Salmonella Gallinarum*

Para eliminar los genes de virulencia relacionados con el TTSS de *Salmonella Gallinarum* de tipo silvestre (SGSC N.º 2293) como se determinó en el Ejemplo 1, se empleó el método de deleción en un solo paso usando lamda Red recombinasa, desarrollado por Datsenko KA *et al.,* (Datsenko KA *et al*, PNAS, (2000);97(12):6640-6645).

Se usó un gen resistente a cloranfenicol de pKD3 como marcador de antibiótico para identificar la inserción en un sitio diana de un cromosoma. Usando un par de los cebadores SPI-1-P1 (SEQ ID NO: 5) y SPI-1-P2 (SEQ ID NO: 6) de la Tabla 2, que corresponden a 50 pb de la región flanqueante 5 de *avrA* y 50 pb de la región flanqueante 3 del gen *invH*, en los que SPI-1 que comprende de *avrA* a *invH* es el objetivo para la eliminación, y una parte del gen resistente a cloranfenicol de pKD3, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento denominada "PCR") [Sambrook *et al*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories], con pKD3 como plantilla. El producto de PCR obtenido era un fragmento de gen de aproximadamente 1100 pb de longitud.

A este respecto, se usó un kit de premezcla de PCR HL (BIONEER) y se llevaron a cabo 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 s y alargamiento a 72°C durante 1 minuto. El producto de la PCR se separó en gel de agarosa al 0,8% mediante electroforesis y se eluyó en un tamaño de banda deseado.

De acuerdo con el método de Datsenko KA *et al*., el fragmento del gen de 1100 pb de longitud se introdujo en *Salmonella Gallinarum* de tipo silvestre competente, transformada en pKD46, que después se extendió sobre placas LB que contenían cloranfenicol (30 mg/l). En cuanto al transformante resultante, su gen se examinó mediante PCR utilizando un par de cebadores SPI-1-P3 (SEQ ID NO: 7) y SPI-1-P4 (SEQ ID NO: 8), que corresponden a regiones de aproximadamente 1 kb de distancia de ambos extremos del gen diana de eliminación. El producto de PCR obtenido de este modo era de 3100 pb de longitud, lo que indicaba que el clúster del gen SPI-1 estaba inactivado.

La cepa resultante se cultivó a 37°C, una condición para eliminar el vector pKD46, para seleccionar una cepa que no pudiera crecer en una placa LB que contenía ampicilina (100 mg/l).

Posteriormente, el marcador de antibiótico insertado en el clúster de genes inactivados se eliminó mediante

transformación con pCP20. La eliminación del marcador de antibiótico se identificó mediante PCR utilizando los cebadores SPI-1-P3 y SPI-1-P4. El producto de PCR resultante tenía una longitud de 2000 pb, lo que también indica la inactivación.

Posteriormente, la cepa que ahora estaba libre del marcador de antibiótico se cultivó a 42°C (una condición para eliminar el pCP20) para seleccionar una cepa que no podía crecer en una placa LB que contenía ampicilina. La cepa inactivada por clúster del gen SPI-1 obtenida de este modo se denominó SG3-d1 (SG2293::ΔSPI-1 de *Salmonella Gallinarum*). La cepa SG3-d1 se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms, YuRim B/D Hongje-dong, Seodamun-gu, Seúl, Corea el 2 de julio de 2009 con el N.º de acceso KCCM11009P.

Los clústeres del gen SPI-2, *spvRABCD* y *faeHI* también se inactivaron de la misma manera que en el clúster del gen SPI-1. Las cepas inactivadas por clúster de genes resultantes se denominaron SG3-d2 *(Salmonella Gallinarum* SG2293::ΔSPI-2, acceso N.º KCCM11009P), SG3-ds (*Salmonella Gallinarum* SG2293::Δspv), y SG3-df (*Salmonella Gallinarum* SG2293::Δfae), respectivamente. Los cebadores utilizados para eliminar genes y para identificar la eliminación de genes se resumen en la Tabla 2, a continuación.

[Tabla 2]

Cebadores para la eliminación del gen SPI-1 del cromosoma	
SPI-1-P1 (SEQ ID NO: 5)	TTATGGCGCTGGAAGGATTTCCTCTGGCAGGCAACCT TATAATTTCATTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI-1-P2 (SEQ ID NO: 6)	ATGCAAAATATGGTCTTAATTATATCATGATGAGTTC AGCCAACGGTGATCATATGAATATCCTCCTTAG
Cebadores para la eliminación del gen SPI-2 del cromosoma	
SPI-2-P1 (SEQ ID NO: 9)	ACCCTCTTAACCTTCGCAGTGGCCTGAAGAAGCATAC CAAAAGCATTTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI-2-P2 (SEQ ID NO: 10)	ACTGCGTGGCGTAAGGCTCATCAAAATATGACCAATG CTTAATACCATCGCATATGAATATCCTCCTTAG
Cebadores para la eliminación del gen *spvRABCD* del plásmido de virulencia	
spv-P1 (SEQ ID NO: 13)	GTGCAAAAACAGGTCACCGCCATCCTGTTTTTGCACA TCAAA ACATTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
spv-P2 (SEQ ID NO: 14)	TTACCCCAACAGCTTGCCGTGTTTGCGCTTGAACATA GGGAT GCGGGCTTCATATGAATATCCTCCTTAG
Cebadores para la eliminación del gen *faeHI* del plásmido de virulencia	
fae-P1 (SEQ ID NO: 17)	TTACCGATATTCAATGCTCACCGCCAGGGAGGTATGC CAGCG GGACGGTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT C
fae-P2 (SEQ ID NO: 18)	ATGAAAATAACGCATCATTATAAATCTATTATTTCCG CC CTGGCCGCGCTCATATGAATATCCTCCTTAG
Cebadores para la identificación de la eliminación del gen SPI-1 del cromosoma	
SPI-1-P3 (SEQ ID NO: 7)	ATGTTCTTAACAACGTTACTG
SPI-1-P4 (SEQ ID NO: 8)	AGGTAGTACGTTACTGACCAC
Cebadores para la identificación de la eliminación del SPI-2 del cromosoma	
SPI-2-P3 (SEQ ID NO: 11)	TGTTCGTACTGCCGATGTCGC
SPI-2-P4 (SEQ ID NO: 12)	AGTACGACGACTGACGCCAAT

Cebadores para la eliminación del gen *spvRABCD* del plásmido de virulencia	
spv-P3 (SEQ ID NO: 15)	GACCATATCTGCCTGCCTCAG
spv-P4 (SEQ ID NO: 16)	CAGAGCCCGTTCTCTACCGAC
Cebadores para la deleción del gen *faeHI* del plásmido de virulencia	
fae-P3 (SEQ ID NO: 19)	CAGGCTCCCCTGCCACCGGCT
fae-P4 (SEQ ID NO: 20)	CAGGCCAACTATCTTTCCCTA

2-2. Integración de la inactivación de los genes de virulencia relacionada con el sistema de secreción de tipo III

Para inactivar integralmente los clústeres de genes en una cepa, la cepa SG3-d1 se sometió secuencialmente a la inactivación de los clústeres de los genes SPI-2, *spvRABCD* y *faeHI*, utilizando un método similar al del Ejemplo 2-1.

Para comenzar, se realizó la PCR utilizando los cebadores SPI-2-P1 (SEQ ID NO: 9) y SPI-2-P2 (SEQ ID NO: 10) con el fin de inactivar el clúster del gen SPI-2, sirviendo pKD4 como plantilla, dando como resultado un fragmento del gen de 1600 pb. Este producto de PCR se introdujo en la cepa SG3-d1 en la que permaneció el vector pKD46 (Ejemplo 1-2), seguido de la propagación de las bacterias sobre una placa LB que contenía kanamicina (50 mg/l). En cuanto al transformante resultante, su gen se examinó mediante PCR utilizando un par de cebadores SPI-2-P3 (SEQ ID NO: 11) y SPI-2-P4 (SEQ ID NO: 12), que corresponden a ambas regiones flanqueantes del gen diana de eliminación. El producto de PCR obtenido de este modo era de 3600 pb de longitud, lo que indicaba que el clúster del gen SPI-2 estaba inactivado.

La cepa resultante se cultivó a 37°C, una condición para eliminar el vector pKD46, para seleccionar una cepa que no pudiera crecer en una placa LB que contenía ampicilina (100 mg/l).

Posteriormente, el marcador de antibiótico insertado en el clúster de genes inactivados se eliminó mediante transformación con pCP20. La eliminación del marcador de antibiótico se identificó por PCR usando los cebadores SPI-1-P3 y SPI-1-P4 en el caso de SPI-1 y los cebadores SPI-2-P3 y SPI-2-P4 en el caso de SPI-2. El producto de PCR resultante tenía una longitud de 2000 pb, lo que también indica que se había producido la inactivación.

Posteriormente, la cepa libre del marcador de antibiótico se cultivó a 42°C (una condición para eliminar el pCP20) para seleccionar una cepa que no podía crecer en una placa LB que contenía ampicilina. La cepa inactivada por clústeres de los genes SPI-1 y SPI-2 obtenida de este modo se denominó SG3-d1d2 (SG2293::ΔSPI-1ΔSPI-2 de *Salmonella Gallinarum*, N.º de acceso KCCM11010P). La cepa SG3-d1d2 se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms, YuRim B/D Hongje-dong, Seodamun-gu, Seúl, Corea el 2 de julio de 2009 con el N.º de acceso KCCM1 1010P.

En la cepa SG-dld2, los clústeres de los genes *spvRABCD* y *faeHI* se inactivaron adicionalmente. Para este fin, el clúster del gen *spvRABCD* (el gen resistente a kanamicina de pKD4 se usó como marcador de antibiótico) se inactivó de la misma manera que en la inactivación de SPI-1 en el Ejemplo 1-2, mientras que la inactivación del clúster del gen *faeHI* (el gen resistente a cloranfenicol de pKD3 se usó como marcador de antibiótico) se realizó de la misma manera que en la inactivación de SPI-2 en la cepa inactivada de SPI-1. En cuanto a los transformantes resultantes, sus genes se examinaron mediante PCR utilizando el conjunto de cebadores spv-P3 (SEQ ID NO: 15) y spv-P4 (SEQ ID NO: 16) para la eliminación de *spvRABCD*, y el conjunto de cebadores fae-P3 (SEQ ID NO: 19) y fae-P4 (SEQ ID NO: 20) para la eliminación de *faeHI*, que corresponden a las regiones de aproximadamente 1 kb de distancia de ambos extremos de los genes diana de eliminación respectivos. Los productos de la PCR obtenidos de este modo eran de 3600 pb, 3100 pb de largo respectivamente, lo que indicaba que los clústeres de los genes *spvRABCD* y *faeHI* estaban inactivados. La cepa resultante se cultivó a 37°C, una condición para eliminar el vector pKD46, para seleccionar una cepa que no pudiera crecer en una placa LB que contenía ampicilina (100 mg/l). La cepa de *Salmonella Gallinarum* en la que todos los cuatro clústeres de los genes SPI-1, SPI-2, *spvRABCD* y *faeHI* se inactivaron integralmente se denominó SG3-d4 (SG2293::ΔSPI-1 ΔSPI-2Δ*spv*R*ABCD*Δ*faeHI* de *Salmonella Gallinarum*) y se depositaron con el N.º de acceso KCCM11011P en el Korean Culture Center of Microorganisms, YuRim B/D Hongje-dong, Seodamun-gu, Seul, Corea el 2 de julio de 2009.

2-3. Secuenciación del operón *spvRABCD* de *Salmonella Gallinarum*

En ninguna parte se ha divulgado aún la información genética sobre *spvRABCD* de *Salmonella Gallinarum* (SGSC N.º 2293). Su secuencia de nucleótidos se analizó en la presente invención. Para ello, los cebadores se sintetizaron como se resume en la Tabla 3, a continuación.

[Tabla 3]

spv-S1 (SEQ ID NO: 21)	GGTCAATTAAATCCACTCAGAA
spv-S2 (SEQ ID NO: 22)	ACGGGAGACACCAGATTATC
spv-S3 (SEQ ID NO: 23)	TTCAGTAAAGTGGCGTGAGC
spv-S4 (SEQ ID NO: 24)	CCAGGTGGAGTTATCTCTGC
spv-S5 (SEQ ID NO: 25)	ACTGTCGGGCAAAGGTATTC
spv-S6 (SEQ ID NO: 26)	TTTCTGGTTACTGCATGACAG
spv-S7 (SEQ ID NO: 27)	TCCAGAGGTACAGATCGGC
spv-S8 (SEQ ID NO: 28)	GAAGGAATACACTACTATAGG
spv-S9 (SEQ ID NO: 29)	GTGTCAGCAGTTGCATCATC
spv-S10 (SEQ ID NO: 30)	AGTGACCGATATGGAGAAGG
spv-S11 (SEQ ID NO: 31)	AAGCCTGTCTCTGCATTTCG
spv-S12 (SEQ ID NO: 32)	AACCGTTATGACATTAAGAGG
spv-S13 (SEQ ID NO: 33)	TAAGGCTCTCTATTAACTTAC
spv-S14 (SEQ ID NO: 34)	AACCGCTTCTGGCTGTAGC
spv-S15 (SEQ ID NO: 35)	CCGTAACAATGACATTATCCTC

El resultado del análisis se proporciona en la SEQ ID NO: 3.

EJEMPLO 3: Ensayo de *Salmonella Gallinarum* inactivada por clústeres de genes de virulencia SG3-d4 para determinar la avirulencia mediante la medición de la eficiencia de la invasión en una célula epitelial aviar

Salmonella Gallinarum y *Salmonella pullorum,* que son especies únicas de *Salmonella* debido a la falta de flagelos móviles, infectan específicamente a las células aviares y pueden invadir otras células animales, pero con una eficacia muy baja. En este ejemplo, se realizó un ensayo de invasión celular *in vitro* (Henderson SC *et al*, Infect Immun, (1999); 67(7):3580-3586) en la línea de células epiteliales aviares (tumor abdominal de periquito), proporcionada por el Dr. Lee, Georgia University. Se esperaba que las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* SG3-d1d2 y SG3-d4, desarrolladas por el método de eliminación génica descrito anteriormente, invadieran la célula huésped con una eficacia muy baja en función del nivel reducido de proteína relacionada con TTSS. Una revisión reciente de la investigación sobre los mecanismos de infección de los microorganismos patógenos indica que incluso cuando solo se elimina un gen específico de SPI-1, la cepa de *Salmonella* muestra una disminución en la eficiencia de invasión de las células epiteliales (Lostroh CP *et al*, Microbes Infect, (2001); 3(14-15):1281-1291).

En la presente invención, se comprobó que la eliminación de genes relacionados con TTSS conducía a una disminución de la virulencia al medir la eficacia de la invasión de las cepas modificadas de *Salmonella* aviar en la línea celular epitelial aviar BAT.

La eficacia de la invasión en células epiteliales aviares se midió en placas de 24 pocillos por triplicado, y se proporcionaron los valores medios de tres mediciones. La línea celular BAT se cultivó a 37°C en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 1 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina bajo la condición de un 5 % de CO_2. La línea celular BAT se sembró a una densidad de 2,5 x 10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubó a 37 ºC durante 1-2 días en una incubadora con el 5 % de CO_2 para formar monocapas de células. Después de la distribución de la célula y la incubación durante un día, se cambió el medio de cultivo por DMEM sin antibiótico. Para la comparación de la eficacia de la invasión, se emplearon *Salmonella Gallinarum* de tipo silvestre SG3 (SGSC N.º: 2293), las cepas de *Salmonella Gallinarum* inactivadas por los clústeres de los genes de virulencia SG3-d1, SG3-d2, SG3-dId2 y SG3-d4, y SG9R, que es una vacuna viva disponible comercialmente, sirviendo MG1655 de *E. coli* no patógeno como control.

Después de cultivarse principalmente en semilla, todas las bacterias de ensayo se incubaron vigorosamente durante 4-5 horas en un medio LB principal, y los cultivos se diluyeron a una DO_{600} = 1,0. A 200 µl de las células animales incubadas en el medio sin antibiótico, se le añadieron 200 µl de cada uno de los cultivos diluidos para que las bacterias se dividieran en alícuotas a una concentración de 2,0 x 10^8 UFC/ml por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante una hora en una atmósfera de CO_2 al 5 % para permitir que las bacterias penetraran en las células epiteliales. Posteriormente, el medio se eliminó por aspiración y las placas se lavaron con IX PBS para eliminar los microorganismos restantes. Después, las células epiteliales se incubaron a 37°C durante 2 horas en presencia de 50 µg/ml de gentamicina en una incubadora de CO_2 al 5 % para eliminar los microorganismos que quedaron fuera de las células. El antibiótico se eliminó por lavado con IX PBS. Para examinar los microorganismos que lograron

penetrar en las células epiteliales, las células animales se lisaron durante 15-30 minutos en 500 µl de Triton X-100 al 0,1 %. Los lisados celulares se extendieron sobre placas LB y se incubaron durante una noche a 37°C para poder contar los microorganismos que habían crecido. Para calcular la eficacia de la invasión, también se incubaron 200 µl del cultivo de microorganismos con una DO_{600} = 1,0.

Eficiencia de la invasión (%) = Recuento de microorganismos que han invadido la célula/recuento de microorganismos en el medio de cultivo (DO_{600} = 1,0) x 100

Se calcularon las eficiencias de invasión celular BAT de las cuatro cepas de *Salmonella Gallinarum* transformadas preparadas por la inactivación de clústeres de genes de virulencia. De ellas, la cepa modificada en la que solo se inactivó el clúster del gen SPI-1, responsable del mecanismo de invasión celular, disminuyó la eficiencia de la invasión en un 84 % en comparación con el tipo silvestre. Se encontró que la cepa modificada SG3-dId2 con la eliminación tanto de SPI-1 como de SPI-2 y la cepa modificada SG3-d4 con la eliminación de los cuatro clústeres de genes disminuyen la eficiencia de invasión celular en aproximadamente el 89 % y el 91 %, respectivamente, en comparación con *Salmonella Gallinarum* (SG3) de tipo silvestre. Las cepas modificadas de la presente invención también tenían una capacidad de invasión notablemente reducida, en comparación con la de la vacuna viva disponible comercialmente Nobilis SG9R. Estos datos demostraron que la inactivación de los clústeres de genes relacionados con TTSS disminuye la virulencia de *Salmonella Gallinarum* (véase la Tabla 4 y la Figura 2).

[Tabla 4]

	Cepa	Propiedad	Genotipo	Índice de internalización (%)
Grupo de control	MG1655	*E. coli* avirulenta	Tipo silvestre	2%
	SG3	*Salmonella Gallinarum* virulenta (tipo silvestre, SGSC N.º 2293)	Tipo silvestre	100%
	Nobilis SG9R	Vacuna viva contra *Salmonella Gallinarum* (disponible comercialmente)	SG:: Δ*recA*	67%
Grupo de ensayo (*Salmonella Gallinarum* avirulenta)	SG3-d1	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-1	16%
	SG3-d2	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-2	34%
	SG3-d1d2	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-1/ΔSPI-2	11%
	SG3-d4	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-1/ΔSPI-2/ Δspv/Δfae	9%
(SG3 100% = 0,36% de eficiencia de invasión en la práctica)				

La avirulencia de la cepa modificada de *Salmonella Gallinarum* SG3-d4 se confirmó por una prueba *in vitro* que muestra una eficiencia de invasión extremadamente baja en las células epiteliales aviares, y se reconfirmó en pruebas en animales, y los resultados se dan en el Ejemplo 4.

EJEMPLO 4: Ensayo de SG3-d4 de *Salmonella Gallinarum* para determinar la avirulencia mediante la medición de la mortalidad de los pollos

Se encomendó este ensayo al Research Institute of Veterinary Science, Seoul National University. Las capas de huevo marrón de una semana de edad (pollo Hy-Line) se dividieron en muchos grupos de 10 que se separaron en los respectivos gallineros antes de la infección con patógenos. No se usaron programas de vacunas en los animales experimentales después de la eclosión.

Se emplearon en el ensayo *in vivo* cinco cepas de *Salmonella* aviar que incluían la *Salmonella Gallinarum* de tipo silvestre SG3 (SGSC N.º: 2293), la *Salmonella Gallinarum* inactivada por clúster de genes virulentos SG3-d2 y SG3-d4 (identificada para disminuir en virulencia por ensayo de invasión *in vitro*), la vacuna viva disponible comercialmente, Nobilis SG9R, y la MG1655 de *E. coli* no patógena.

Después de cultivarse principalmente en semilla, las cinco cepas se incubaron vigorosamente durante 4-5 horas a

una DO_{600} = 1,0 en un medio LB principal, y la concentración de cada uno de los cultivos celulares se ajustó a 1,0 x 10^8 UFC/ml. Las bacterias se inyectaron por vía subcutánea a los pollos a una dosis ajustada que después se controló durante dos semanas para determinar la mortalidad. Posteriormente, se realizó una autopsia de los pollos que estaban vivos para examinar las lesiones y aislar las bacterias.

Durante las dos semanas posteriores a la infección artificial de los patógenos (1,0 x 10^8 UFC/ml), los pollos infectados con *Salmonella Gallinarum* modificada (SG3) se observaron y mostraron síndromes externos típicos tales como baja motilidad, diarrea azul y baja ingesta de pienso, y parecían estar muriendo. La mortalidad no fue alta, pero la autopsia reveló lesiones en casi todos los pollos.

En contraste, se observó que el grupo de pollos infectados con la cepa modificada de *Salmonella Gallinarum* (SG3-d4) se movía activamente y no moría, aunque algunos de ellos tuvieron diarrea durante las dos semanas. Además, se encontró que casi no tenían lesiones en la autopsia. Por lo tanto, se demostró de nuevo que la cepa modificada de *Salmonella Gallinarum* de la presente invención tenía una virulencia muy reducida. Se observó que los grupos de pollos infectados con la cepa modificada SG3-d2 en la que el gen responsable de la invasión primaria en las células huésped permanece intacto, mientras que el gen SPI-2 involucrado en la infección sistémica y la supervivencia sobre la fagocitosis está inactivado, o con la cepa modificada SG3-ds en la que el gen spv, que se sabe que participa en la patogenicidad, está inactivado, tenían una mortalidad baja o nula (%). Por lo tanto, incluso la inactivación de clústeres de genes únicos tuvo una gran influencia en la reducción de la patogenicidad (véase la Tabla 5).

[Tabla 5]

	Cepa	Propiedad	Genotipo	Mortalidad (%)	Frecuencia de las lesiones en aves vivas (%)
Grupo de control	MG1655	*E. coli* avirulenta	Tipo silvestre	0%	20% (2/10)
	SG3	*Salmonella Gallinarum* virulenta (tipo silvestre, SGSC N.º 2293)	Tipo silvestre	20%	88% (7/8)
	Nobilis SG9R	Vacuna viva contra *Salmonella Gallinarum* (disponible comercialmente)	SG:: Δ*recA*	0%	40% (4/10)
Grupo de ensayo (*Salmonella Gallinarum* avirulenta)	SG3-d1	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-1	40%	17% (1/6)
	SG3-d2	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-2	10%	0% (0/9)
	SG3-ds	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: Δspv	0%	20% (2/10)
	SG3-d4	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG:: ΔSPI-1/ΔSPI-2/Δspv/Δfae	0%	10% (1/10)

De acuerdo con los hallazgos de la autopsia, el hígado y el bazo estaban hinchados y debilitados, con la frecuencia significativa de lesiones hepáticas de color marrón verdoso o verde azulado, en el grupo de pollos infectados con *Salmonella Gallinarum* (SG3) de tipo silvestre. Al igual que la vacuna viva Nobilis SG9R disponible comercialmente o la MG1655 de *E. coli* no patógena, sin embargo, se descubrió que las cepas inactivadas por clústeres de genes virulentos de la presente invención (SG3-d1d2 y SG3-d4) casi no tenían lesiones, y demostraron ser inofensivas para los pollos.

EJEMPLO 5: Comparación de la productividad del bacteriófago ΦCJ1 específico para las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum*

En última instancia, el desarrollo de cepas avirulentas de *Salmonella* se debe aplicar a la producción de bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella*. Se demostró que las cepas modificadas de *Salmonella* preparadas en el Ejemplo 2 tienen una virulencia muy atenuada en los Ejemplos 3 y 4. Finalmente, se utilizó ΦCJ1 (Solicitud de

Patente Coreana N.º 10-2008-121500/documento US 20100135962), que infecta específicamente con *Salmonella* aviar, para examinar una diferencia en la productividad de bacteriófagos entre las cepas de *Salmonella Gallinarum* de tipo silvestre y las modificadas.

El bacteriófago aviar específico ΦCJ1 se cultivó a gran escala, sirviendo la cepa de *Salmonella Gallinarum* (SG3) de tipo silvestre o la cepa modificada como célula huésped. Para ello, cada cepa bacteriana se cultivó a una DO_{600} de 0,5 (2,5 x 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC)) en 50 ml de caldo LB en un matraz con agitación. Se inoculó ΦCJ1 a 1,25 x 10^9 UFP (unidades formadoras de placas) para formar una MOI (multiplicidad de infección) de 0,05, y se dejó en reposo durante 20 min a 37°C, seguido de una incubación adicional a 37°C durante 4 horas. Se añadió cloroformo en una cantidad del 2% del volumen final y se agitó durante 20 min. Después del paso del sobrenadante a través de un filtro de 0,2 μm, se contó el título de ΦCJ1.

Se produjo ΦCJ1 a un título de 6 x 10^{11} UFP/ml de la cepa de tipo silvestre (SG3) y a un título de 8 x 10^{10} UFP/ml de la cepa modificada de *Salmonella Gallinarum* (SG3-d4). Estos datos demostraron que las cepas modificadas preparadas mediante la inactivación de clústeres de genes de virulencia no tienen problemas con la infección con bacteriófagos, y pueden usarse como células huésped para producir bacteriófagos (véase la Tabla 6). Además, ΦCJ2 (documento US 20100158870) y ΦCJ3 (documento US 20100166709), ambos desarrollados por el mismo solicitante, se produjeron utilizando la cepa modificada como una célula huésped. Se encontró que la célula huésped permite la producción de ΦCJ2 a un título de aproximadamente 2 x 10^{10} UFP/ml y ΦCJ3 a un título de aproximadamente 5 x 10^9 UFP/ml. Al igual que ΦCJ1, ΦCJ2 y ΦCJ3 se produjeron a partir de la cepa modificada de la presente invención, sin diferencias significativas con respecto al tipo silvestre.

[Tabla 6]

	Cepa	Propiedad	Genotipo	Título de producción de ΦCJ1 (UFP/ml)
Grupo de control	SG3	*Salmonella Gallinarum* virulenta (tipo silvestre, SGSC N.º 2293)	Tipo silvestre	6 x 10^{11}
Grupo de ensayo (*Salmonella Gallinarum* avirulenta)	SG3-d4	*Salmonella Gallinarum* con gen de virulencia eliminado	SG3:: ASPI-1/ASPI-2/Δspv/Δfae	8 x 10^{10}

Como se ha descrito hasta ahora, las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum*, preparadas mediante la inactivación de los genes de virulencia, de acuerdo con la presente invención, son útiles como células huésped para producir eficazmente bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella* a escala industrial con la ventaja de ahorrar costes. Las cepas avirulentas modificadas de *Salmonella Gallinarum* simplifican el proceso de purificación utilizado para eliminar la toxicidad después de la producción de bacteriófagos, lo que reduce considerablemente el coste de producción y resuelve el problema de seguridad de los productos. Además, las cepas avirulentas modificadas pueden usarse como vacunas vivas, que garantizan mayores efectos inmunológicos y seguridad que las vacunas convencionales.

Aunque las formas de realización preferidas de la presente invención se han divulgado con fines ilustrativos, los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> CEPAS AVIRULENTAS MODIFICADAS DE SALMONELLA GALLINARUM Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA USANDO LAS MISMAS

<130> OPA09048PCT

<150> US61/487.137
<151> 17/05/2011

<150> US13/274.854
<151> 17/10/2011

<160> 35

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 34934
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1

<400> 1

```
ttacgattta agtaaagact tatattcagc tatccttttt ttatgagcgg atatagagag          60

ttttttatcg tttagcataa cggcattgtt atcgaatcgc tcataaagcg tttcattctt         120

tttgtttact atactgcttc ccgccgccgg attggcctcc acatattcat ttaatcgttg         180

tacgccttga gtatgtttgt aaaaactcac cggcagataa cggtctgctt tatcggacgg         240

gagaaaaggt tcttcaccac acagacgttc acaaatatta tcttcatgaa tttttactaa         300

gttcataaat tcaagctgaa gttttttggc gagcgccagg ctaaaaatac cgcattcaga         360

agagcttcgt tgaatgtcca gctcgaccat agcaaaataa caatcaggca gttgttcacg         420

ttcaagagct gctttggtcc tcaacgccag taaagcaggt ccaaaagcgc tacacgctgc         480

tggttcgaac aaaatcaccg atgtctttcc gtccataact ctaaaatcga cgactgaaat         540

atggatacct gaacttccca tatttacgag aaatcgggca gattcaacgc cttccattct         600

ggtctccttt atagaggaaa caagctcatg gactgacata acaaatttaa gatttaactc         660

tggatacttc ttattggcct gtgcaacaag aaaaggcatc atttcgagat cggtttcctc         720

gtaactgata tgaatccagc tgccatctat aatttcactt tccagacgct caacaataca         780

ggtcaatgct tcggtgttta gctccccgct gacgtcaggc tgaggcgata aactcgcccc         840

catattacga gtcgtaggac ttagcatact tttccctcca catgatagct cctgcaccga         900

aaatatcatc tttaactttt cagattcaat atattgcctg caaaaatatg cctcaatgat         960

tgagccaggc taccaaccac ctccggatga ttatatataa gaattactac tcaaaaaatc        1020

ttttttataa taaaagctca acacatggtc ataaatgata aaaaatattt taattcattc        1080
```

ctaccgcaat cggtaacgcg caattatcgt caggtacagc agggttatgt gcaaaagcag 1140

tgcgctgtaa atgcgcgtct agtttcagtc cccggaacag cgatagcggt gaagagtcca 1200

tccccaaacg atacataacc ttcttacgat aaatactgac ggtttttgtt cccagaccaa 1260

atttttcgc cagttcaatt gccggatgtc cggaggataa taatatcagc agcgcatatt 1320

tcgcctgcgt gacaccggga ggtagattcc accaggcgta ttgattgata ttaaacaata 1380

cctcttccgg cgtctcgccg gcattaaaag catacgtagc agccacggtt ttcttttgtg 1440

gcctgtggca gaaacgcagc caggcttccg gaagacggag cttctctcgc tccgagcgga 1500

tagcgcagga tagttcgtct tttaaaacat aatccataac gccaaaatat tgcagcacac 1560

agcgatcgat ataatacaag cgatctgcca ctaccaaaac tttacggttc tgcaaccgcg 1620

tcagcaacgc atgaaaaaga taaacatgct catgcgggtt caaagctaaa atcagcccgg 1680

cgtccggcat atcggataga gaatgcaaaa gtgcggttaa tgagttacac gttttaacgc 1740

acttttccgg atatttttgc ttaaaaatag actgaagggc ataacaatta gtccagttaa 1800

taccgtatat aattacattt ctcatttatt tatccttttt tgaaaactga ccacagcttc 1860

ggtaatgatt tttcttcctg ggcgactact gcgcaagtag ataacgcctt cttactacaa 1920

aggtaataag accagatacg ttattacatg cgcaatgtcg ttaccgaaat gaattccttt 1980

tacaaatctg ataatgatta aatttactgt tttactttac tgtaatctct tagagtacaa 2040

cgattgcccg gcgcctggtg gccatgtatg tctgacaatg aacgctttcg attccctttc 2100

attaactaca tatcactggt gtagcgatac tgaaatatac actacgatta aaaaaatatt 2160

tggtatctgt aacgcaaaca gatagtaacg tttaaaataa tttcacaaat caatggttca 2220

tcgtacgcat aaagctaagc ggtgtaatct taaaatgccg tttaaaaata gcgataaaat 2280

aagaaggcgt atcatagcca cacatcgtcg cgacttgtga aatatttcca gcccccatac 2340

gtaataattt tatagcctga ttcatacgag catctaggta tattttgcta aaactcacct 2400

cttcagcggc cagttttcgc ttcagacttg atacgctcat aaacagcttt cccgccacct 2460

cagcctgtga ccatttgcgg gtgagatcgc tgataataat gttataaact ttctcttttg 2520

tcgtaatttt tattgctcgc tcaaggaaat caaacccacc gggcttacgt acaaatgccg 2580

atataagata catcaatgag aaatatgaat aatcatgatc atcaatactc acattactac 2640

aaacccgtgg acatgccaca ccatgcaaaa tagagtcaaa agtatcactc atccctggca 2700

acaagtccgc atgaaaaaaa tactttggtt tcgtttttaa tgatagctct cgatcattat 2760

agtttcttgt actgtaaaaa actttgtaga atttttgcat taagtcatag gaaacttcca 2820

gtgaagaaaa atcaatatgc ccttctattt cgctcatact aagcgtgatt gtttgatctt 2880

tttccaataa aaataaacac ggcgcagatt gttcgatgaa ctccccaaat tcgttttcaa 2940

ttcgcaaact gcctttatta agtttaaaca ataagcagtt tgcgacataa tagtctctta 3000

cgtcagctaa tccatttatt aatggaaatt tgttcggctg ttgaaggtga ttattgctaa 3060

tggcctcaac tgatttattc attgaaggca ataccatatt ttatcctgtg tgctataagg 3120

aactcaaaat cgttatattc ttataaacaa ataattaaaa ctcacagaga tgatttaaat 3180

ccgatttttt tattattata gccaataatt acattccaac gcgcgttcat ttcgtcacaa 3240

aaagataccc ttacaaactt tatgcacaat tttgtaatga aagcttacaa tattaatata 3300

atcatttcag aataaaacgg ctggcagaca tcttaataat ccatatacat caataagata 3360

gacacactgg catggtgcat tttctgcatt atttgctgat atatacacca taccttatca 3420

caaatcgcca gcaatggggg ttcaccagtc aattgcctct ttgttttccc cgcccgataa 3480

aataatctcc tgcatccagg aggtcatttg tgactgtgcg ttcattgtac caactaatac 3540

cccgtttaaa gcctcatata aatgggtgcc cggttcaact tttgctaaca tgttttgtag 3600

catagccgtt tgctgctcaa aagaaacaaa agccgaatca ccactgttag gatctttgaa 3660

ggcattcatc tcttgataaa tgctatcttt aagcgtttca gaagaggctg actcaggaag 3720

cgccagaagt cgttggtaga atgcatcata aagatcaacg tcgccgccat tgcttaaagg 3780

cgcgctatcc acattattca gcatagcggc cctggcactc aacgaaacca cacccgtcgc 3840

ttcagtatct gctgtcggga ccaaataaga agtcggaatc gtacccggta tcaccttata 3900

acctccgctt gcgtttttgt cttccattca tcaataagtg cgttaatggc gttatcagaa 3960

attgtccggc agtcttgtgg aagttcatca agatgatgct taatgacgcc tactgccgtt 4020

tcaacaaatt gttcaggtga aaattctgcg atctgatcgc cgcaactcat gataaagcgc 4080

tgttcctgat gatatttaag attaaaagtg cctggccagt tctccataag caacaccatc 4140

agtttttggt gatctttttt cgcattaact ggcagtgtta aaaaaagttg cccctcaggc 4200

ttatcgaaat cccttagcca ctcatccagg acggttaaaa gcgtttcggg atggtcgacc 4260

gcagctgaaa ataactcgcg ggcataaatc tgtatttttt ccatccactt ccaggccatt 4320

gtctgattat cagtaagata agcggcgacc tgctgtaacg cgtctatcat tccctgctcg 4380

taaccttcct gataggcgta catccgcaag gtctttgcct cttcttccgc ctctcgcaaa 4440

atacgcttag cccgttgatg cgcctgctgt tctaatcttt caatagagaa ataacgttcc 4500

agcgttttac gctttatcag tatcccctca acaggcgaaa gcggggacgg tattgggata 4560

tttttgagca tattgtaagg ccagtagcaa aattgacatt tctacagcat cctgcttcaa 4620

tgcctcctca ataaatggag gaaaaagcaa aggaaaacgc tgtgctaaag attcaggtaa 4680

aaattcattt agggcattta actgtgcata cccgacgcta agtaaaaacc ggtgattcgg 4740

cgccttattg cagacagata aacttgttcc ctgatgcatt gccaaaaatg cttgcgccca 4800

atccggcagg ccaagcaagg ctccctgcct tgccagatcg gctctcagtt tatggcaacc 4860

gagtaaatac gctacctgcg gcagtcggcg ccactgacgc agccacagct gcgtcagtga 4920

gttttgaata cactcctttt ctccgttctt aagccgccat gccgccagta ttaactcatt 4980

tgccgccgcc ctggcggcgg gtctgacaat catttccggc gctatctgca accgctgagg 5040

atggatatac gataacggat caaaaatgat tctttgccag ataatgggta atggctgcct 5100

attcatttga cgatttcgcc ttatcatcag ccgttatgcc tttcttattg cgggcataat 5160

ggtttttgta ataccagacg ccaaagcctg ctgacatcac ggataacaaa ataatcaaca 5220

caatccaact ggttgcaaaa gaattacgtt ttactggtgt gccgggagcc tgtaattggg 5280

catcagaacg ttctgacaac acaacagaaa tgttgtcata atccacatcg gcaaaactat 5340

tctttaagaa acgcttgata tcgctgatct gatgcgcaag cggcgaacct cgttcatata 5400

cggctaatgc cgacagatga acaggttttg gcggacggcc attttcacca gcatcaatat 5460

cataactaat atggaccctg gcggagagca cgccctccat cgtctgtaat gactgttcca 5520

gtcgctgttc aatagccgaa tataacctgg ccttttcagc tcgcggagac gataccagcg 5580

aatccgccgg gaacatctgc gctatttcca cccgtggccg gggaggaagc tgataagttt 5640

taatccagta caccgcagcg gtaaaatcag gctcagcaac ggtaatgcta tagcccaatt 5700

ttccgctatc aattttattc gcctctatat tgtgcatttg cagaacggca atgacctcat 5760

tagcctgttc ctggtccagt ccttttaaaa gatccttatc cttacagccg gcaagggtca 5820

ttaccagcag aaaggtatat agatatcgac gaatcatgag cgtaatagcg tttcaacagc 5880

cccgactcct ttacgagtaa gggtacttac catagaaaca tacaggttat aatctgaaat 5940

catctcttgc gaaatagcca gctctttagg atccgtcacc agattagggt cctcaatcct 6000

gttggtaatc gtctgtttat ccacagccgt ggcaatcgcc gaaccagaaa aagcctggag 6060

tagccggtca tccagcgaga caatgtccgt ctccatagac ctgatattga ccgcctgccc 6120

tataacggca ttctctggga caatagttgc aatcgacata atccacctta taactgatta 6180

acggaagttc tgaataatgg cagcatcaat atccttaaag acttttaccg tgttcgattg 6240

cgcgttacgg tacaagttat attccgagag cttactctga tacgccgcca gtagcgccgg 6300

atcggagggt tttgctgcta atttatccag cgcctctgtt acctgcgttt gtagattatc 6360

aacgcccgta tcaaattttg ctgagacgtc atccagatag cctgaccaag gtgttgccat 6420

aatgacttcc ttatttacgt taaattaaag tgggcttggg aaataccaat ggcctgggct 6480

cattttgata taaccttccg ccccgtactg aaatgagcgc cccttgagcc agtcatcttt 6540

taattcgatc gcaaactgca catagcgtcc tccccatgtg cggtaatagc tatcgacaaa 6600

ttgacgggct ctgagtattt ctacatcatc gagcgccccc tgaataacaa acgttacgcc 6660

ccccttatga ttcctgcggg aataaggtaa cgcctgctgt tttagccccg cttccgcctg 6720

gcctgctgcg gtaacatcgt ccatcaacgt gatgttaacc gaatccgcgt aaggcattag 6780

cgctctcagc ttttgactta acatctcgag ctctttcttg ctcatcgtgt ttcgctggcg 6840

gcttagccag aaaacgggtt tacgcggctc atcgaaatga atccgataat aagccagctg 6900

cggataatag gtatccagcc agatagagat acgcttattt tcttcgtttt cgttaatcac 6960

tcgcgcattt ttatcataat cgcccctcgc taaaacctga cgagcccaca gcgtatctct 7020

ttcattttgc gcagcgacat agagcatttt gtcccggcct ggcaacacct gaaaacgctc 7080

cttctcctgc cccaataacg aatcgagctc tgcggcctgc cgctgcggcg agttaagtat 7140

ccataacgtc cccacagtcc caattcccaa tataaaaaac ccggccagtg ctgctacaat 7200

tccgttttta aaacgcggct cgttcttttt tgcagacgtt tctaacttct caggctgctc 7260

gggcacccac ggctcgcttt ccgggcgaat caggataagc aattcaccga cctgtattgg 7320

cgtatttaat tgcaccgaac gagattcaga atttccttct ttcagctcat ggagtataat 7380

ttcggtcgta tccgtatcca cctggatttc aaaatttact ccgccatggt ccagcgggat 7440

aaaaaagcta tcggcaggta tatcagggag ttggcctgaa gcagtgagcg catcactctg 7500

acctaccaca aagagtgttc ggcctgtcag caatggaaac tcacagccgt tcagtgagct 7560

gttaagtaat cgaactatgt atggcccagg gcttgttatc gtcttctctt ttgatgtttc 7620

catatatact gttagcgatg tctgtcgttc tcgatagcag cagattaccg cacaggacac 7680

agggattcct gatgaaaata gaatgaaaag tgagaaataa aatcaattta ttctgtataa 7740

tgcgtctcaa cacatattaa aagaaccatc atccccattg gggcttaaac tactgtagat 7800

aaattaccca aatttgggtt cttttggtgt aacaatcaga ccattgccaa cacacgctaa 7860

taaagagcat ttacaactca gatttttca gtaggatacc agtaaggaac attaaaataa 7920

catcaacaaa gggataatat ggaaaatgta acctttgtaa gtaatagtca tcagcgtcct 7980

gccgcagata acttacagaa attaaaatca cttttgacaa atacccggca gcaaattaaa 8040

agtcagactc agcaggttac catcaaaaat ctttatgtaa gcagtttcac tttagtttgc 8100

tttcggagcg gtaaactgac gattagcaat aatcacgata cgatttactg tgacgaacct 8160

gggatgttgg tgctcaaaaa agagcaggta gttaacgtga cgcttgaaga ggtcaatggc 8220

cacatggatt tcgatatact cgagataccg acgcaacgac ttggtgctct ctatgcactt 8280

atcccaaacg agcagcaaac caaaatggcg gtacccacag agaaagcgca gaaaatcttc 8340

tatacgcctg actttcctgc cagaagagag gtatttgaac atctgaaaac ggcgttctcc 8400

tgtacgaagg atacaagcaa aggttgcagt aactgtaaca acaaaagttg tattgaaaat 8460

gaagagttaa ttccttattt tctgctgttc ctgcttactg cttttctccg actcccggag 8520

agttatgaga tcatccttag ctcggctcag ataacgttaa aggagcgcgt ttacaacatt 8580

atatcttcgt cacccagtag acagtggaag cttacggatg ttgccgatca tatatttatg 8640

agtacgtcaa cgctcaaacg gaaacttgca gaagaaggta ccagctttag cgacatctac 8700

ttatcggcaa gaatgaatca ggcagcaaaa cttttacgca taggcaacca taatgttaat 8760

gctgtagcat taaaatgtgg ttatgatagc acgtcctact tcattcaatg tttcaaaaaa 8820

tattttaaaa ctacgccatc gacattcata aaaatggcga accattaaca ttttttgtat 8880

ctgtcactta agtaaagatt tttattaaaa ttgtaataat ttaaaattca gactgcgcat 8940

taacacgctc tatcaggatg ggaggctatt caatatcatt gttctgtccg gaagacagct 9000

tatactgata tctctggtaa tttaaagtaa ggctgattat ataacacgat ttttgtgaac 9060

ttgtcatcgc tatgatgact ggtaaaacga tattgcctta ttcacagcgt aagaattcgt 9120

ccagatgaca ctatctcctt ccggctttaa ccctgtggat taaggccggc attttattca 9180

tatttataca tcatccgttc cctctgagaa ctatttgcct gaacggttta taccgaaaca 9240

gtcacgcttg ttagctttct gccaggcata cctcctctct tcctcctgat atcgatataa 9300

tgcctggggc cagcctgagg atgatactgc tcataaaccc cctgcctttt tgacgctata 9360

actgaaggga gtaaagaaaa gacgatatca ttattttgca aaaaaatata aaaataagcg 9420

caccattaaa aacagtcttt catttatatt ttggaaccta agacaaatta cactcttaaa 9480

ctttcaacga atggtcattt agtggaaatc ttcgagaaaa atggttctga tggtgtaatt 9540

atcagaccat taaccatgaa gatataataa gcagcattta caccccaaaa aaatgcagta 9600

agatagctac aaaactaatc tctattgcaa tgaggccaag ttaaatatgt aaatatttag 9660

atgccaggcg ctgactctct ctgcaccagg atatacggca gcgtccattc gataatcacg 9720

gttagttata acaatattat taccaacatg tcagttattt aaagcacagg cataagctaa 9780

ataatcaaat gttaaaaaca tataaacccg agcccgtaga atatgacatt aagctcataa 9840

taaaagctca acctgaccgt tagtactaac agcagaatta ctgaaacagt agattctatc 9900

ctaacgactt gtattagtta ttataacttt tcaccctgta agagaataca ctattatcat 9960

gccacatttt aatcctgttc ctgtatcgaa taaaaaattc gtctttgatg atttcatact 10020

caacatggac ggctccctgc tacgctcaga aaagaaagtc aatattccgc caaaagaata 10080

tgccgttctg gtcatcctgc tcgaagccgc cggcgagatt gtgagtaaaa acaccttact 10140

ggaccaggta tggggcgacg cggaagttaa cgaagaatct cttacccgct gtatttatgc 10200

cttacgacgt attctgtcgg aagataaaga gcatcgttac attgaaacac tgtacggaca 10260

gggctatcgg tttaatcgtc cggtcgtagt ggtgtctccg ccagcgccgc aacctacgac 10320

tcatacattg gcgatacttc cttttcagat gcaggatcag gttcaatccg agagtctgca 10380

ttactctatc gtgaagggat tatcgcagta tgcgcccttt ggcctgagcg tgctgccggt 10440

gaccattacg aagaactgcc gcagtgttaa ggatattctt gagctcatgg atcaattacg 10500

ccccgattat tatatctccg ggcagatgat acccgatggt aatgataata ttgtacagat 10560

tgagatagtt cgggttaaag gttatcacct gctgcaccag gaaagcatta agttgataga 10620

acaccaaccc gcttctctct tgcaaaacaa aattgcgaat cttttgctca gatgtattcc 10680

cggacttcgc tgggacacaa agcagattag cgagctaaat tcgattgaca gtactatggt 10740

ttacttacgc ggtaagcatg agttaaatca atacaccccc tatagcttac agcaagcgct 10800

taaattgctg actcaatgcg ttaacatgtc gccaaacagc attgcgcctt actgtgcgct 10860

ggcagaatgc tacctcagca tggcgcaaat ggggattttt gataaacaaa acgctatgat 10920

caaagctaaa gaacatgcga ttaaggcgac agagctggac cacaataatc cacaagcttt 10980

aggattactg gggctaatta atacgattca ctcagaatac atcgtcggga gtttgctatt 11040

caaacaagct aacttacttt cgcccatttc tgcagatatt aaatattatt atggctggaa 11100

tcttttcatg gctggtcagt tggaggaggc cttacaaacg attaacgagt gtttaaaatt 11160

ggacccaacg cgcgcagccg cagggatcac taagctgtgg attacctatt atcataccgg 11220

tattgatgat gctatacgtt taggcgatga attacgctca caacacctgc aggataatcc 11280

aatattatta agtatgcagg ttatgtttct ttcgcttaaa ggtaaacatg aactggcacg 11340

aaaattaact aaagaaatat ccacgcagga aataacagga cttattgctg ttaatcttct 11400

ttacgctgaa tattgtcaga atagtgagcg tgccttaccg acgataagag aatttctgga 11460

aagtgaacag cgtatagata ataatccggg attattaccg ttagtgctgg ttgcccacgg 11520

cgaagctatt gccgagaaaa tgtggaataa atttaaaaac gaagacaata tttggttcaa 11580

aagatggaaa caggatcccc gcttgattaa attacggtaa aatctgagag aggagatatg 11640

cattattttt ttatcatcgt aatctggttg cttagcataa atacggcatg ggctgattgc 11700

tggcttcagg ctgaaaaaat gttcaatatt gaatccgaac tactttacgc tatcgcccag 11760

caggaatcgg cgatgaaacc tggcgccatt ggtcataacc gagatggttc aaccgatctt 11820

ggcctgatgc aaattaacag cttccatatg aaaaggctga aaaaaatggg gattagtgaa 11880

aaacagttgt tacaggaccc ctgcatttct gtcattgtgg gcgcttccat tttatcagat 11940

atgatgaaaa tctacggtta tagctgggag gccgttggcg cttataatgc cgggacgtcg 12000

ccgaaacgat cggatataag gaaacgttat gctaaaaaaa tttgggagaa ttacagaaaa 12060

ttaaaaggaa tgtcagcaga agagaaaaac aaaagacttt ctatcgcgtc aaacaaataa 12120

ttatacagaa atagcttact ttcagatagt tctaaaagta agctatgttt ttatcagcgt 12180

gccgtcgtca taagcaactg ggcttgcatt gcttttagtt gtacaaactg tgaggcgtct 12240

tccagcattc tattgttccg tgaattccgg aaatctgcac gtacctgctc cagattacta 12300

tgaggattat ccttaagtac aagggccgcc gccatcgttc cggttctccc cactccgccc 12360

agacaatgaa tcatcggtaa atgcttatct gatgaactac gccccggcgc gccattttgg 12420

ttactatttt tcaccctatc cgccaggtat tctaactgat ccgtagacgg taacggctgg 12480

tgatctggcc aatttttcac atgcaatacc gggattgtat accgctttc cccgcaggac 12540

agttgcatat tgtattggtc tatcgcttct ccctgactgg ctgagctcac tttttggctg 12600

ttggtatgca cctcgccaaa ggtgtagctc cctctgaaat agggtggtaa ttgttttgcc 12660

tgcatctgat cttccgacgt taacaccacc aggcatgagc attctttttc aagaagcatt 12720

ttcatatgcg ctgccagcgc atccggcgta ttttttgggt acgaaccggc taatgccaca 12780

ggcttaccgt caaaagttaa cgtattcact ggcacaggca ttccatcgct cagtttcacc 12840

tgggtttgct gattaattgg aatgctgctg accgcaaacc gtgccaggcc cagtgtcggt 12900

ccgctcatcg tctgtggcat tggcgcgccg gcttctattt tctcaagttc agctgtaaca 12960

tttttcagtt ctttagcaat aacgtgaatt ttttttacag cctgggttaa ttcatgagta 13020

gaggctttat caacccacct ctcaacctct cctccacagg ttccccattg tgagaaccgg 13080

gctacaccga cctgaatatt tgttaacgtt gtaacataat cattaagttg tttagcctct 13140

ggaattttat ttaaattctg taaattcgtc attaatgaac gcagcgggcc gttacctgaa 13200

gccatctcct ggaagttttc tcgcaggcta tttccatcca tttgttccag ttgcggtaat 13260

gttcttttaa gtccctttag cgcgatatcg agtaaaggtt gcttactttc tgctccaaca 13320

tcgttatttt tttctgccac ttttgtatcg ccgccttta tgactaaagc ggcattcctg 13380

acaccaacat tatccttgct cttaataagg tttataaacc cttcgtcagc agcttttaca 13440

cactccgtga tctgcactgc taaacgttgg gtaaggggtt tgttcatatt tatacgggac 13500

attaacagtg cgtcattaac cgctgtttcc ccatattttt ccgttagtgc atggagaaat 13560

gtctgtaaaa tcttttggtc ctgtactctg atattttccg tatgtttttg caccacttca 13620

gtgtttttaa ataacggcat ttttccaagc caggttaata cttttgacga aaatttttca 13680

ggcgcaacat atgccttatc agtattttcc ttagcaatat aaagtcgggc atcattcgac 13740

acaccaactt ttgaaaacga agacaacgtt aaattattca attttctctc ctcatacttt 13800

agcatattcc tgcagtatgt ttttgagcgc ttcctgctga ttcacaaatg actcaagctg 13860

cgatataata tggtaagtat ttgtcagatc ggtaattgca tgtataagca acaacgtctc 13920

tgcggcatca atatacgcta acgtaccttc attattcgca gccagttcac cattaatcac 13980

cataatctgc cgccagatag aatcgccaca aacaggcgat aacggtataa tcataccgtt 14040

caataaccag atatcatctt tagcttcaat agacgtaaaa atatcgctat cgagtaataa 14100

taagcactga ttgttgtcgt caaaagtgag cggtaaaccc aatttctcac caatattagc 14160

gataatatcc tggtgtgctt gcaatttact ttcctcttga attatatctt ttataagatt 14220

gcttcttcaa atttaatctg gttacacaat gtcttgatac tttttcgcgc ccatcgccgg 14280

gcgcaatatt tctctccttt aatccagtag aatagccatt cactacgcat cggaacacat 14340

atcagcagct ccttcggatc attttcaaca tgacgtaact tgcctttaat aacaaaacgc 14400

gaactgtcag caatatcatc atatattgca gccatacctg aaccgggtac tacatgtgtg 14460

atgattttca taacaattaa tcttattcaa ttgttgtcaa gcgagagaaa aatactacac 14520

cctggactca agacttttt taacaacacg gcatatatcc gcaaaggtcg tcatatcagg 14580

aagatcgttt tcattgcaac taatgtcaaa ctcctcacta agaccaaata caatatcaat 14640

taaatccaat gagtcagcgt aaagatcctc aaccagattg gtctgaccat tgatactatc 14700

aacatcaacg gcaatacagg aggtgatcac ttttttgact cttgcttcaa tatccatatt 14760

catcgcatct ttcccggtta attaacgctg catgtgcaag ccatcaacgg tagtaataac 14820

ccgatccacg ccaggtttat tcaggtatga ctcgtaagcc gggccagctc gccagctacc 14880

gtctccgata aggccgtcca gcacattact taacacatag tcagtttccc cttttagcct 14940

ggtcagcccc gcctctctgg caaactgcag tgcaatctca gccagttttt ctttttgtgg 15000

atgatgagta atgacctctt tgagagtctc cattttcgct ttcaattctg ggtgcttgtc 15060

aatatcgcta cattgcgctt tcaacgctgc actctttatc gtgtcattgg gtaatatttc 15120

cgcacgcaag ccgtcaaacg ctctgcgtac agggaacggt gtggaggtat ctggctccag 15180

ggctttacgt atcacaccca aaaacgtctc acgggcgtcg aaatgcattg aatgcatatt 15240

cgtaacgctc ggtactgttg agaggaaact attttgctta aacttcaaac cagaaaatgg 15300

gccagtctta tctgtctgac tattatcatt atcggtcgta ccggctttat tacctgtaat 15360

taccgtcgtg tctgattgta aggtatcggt tttaacattc tcgacgccag ccagttgact 15420

ggcaagcggc ttcacattca caatctctgc cgtctggctt tgctgtttat tatcatcaac 15480

gccgtgcacc gtggcctgta ccggcttgcc gataatgctc ttgctggtta cgccatcgac 15540

ttcatcaaaa gaggttgttt cacccatagt gccctttct gacgtgacca cctttccatc 15600

tttactttcg gatgaagcgt tggtcacagc ctctgccgtc gcatgagccg tgacgtcaat 15660

tttacccgcg atgccatggt caattgcccc tgtgctggcg ctgtgtgccg tctccgtttg 15720

atgcatagtc gaatccacac gcgaatgact atgacttacg ttgctgctgt tagtcgaatg 15780

gtgtgactcg ccattgcgtt ggctgttatc aataaatgtt cggctattat caatcgtctt 15840

ccggctatta tcatggttgc tattatcgat atggcgctgg ctattatcga catggcttcg 15900

gctattgtta atatgcttac tgttatccac gctatggtta ctgctatcaa tattaatatt 15960

gatattaata cccgtaggtt ctgctttttt cccaccatca ggtactggtc cagccgcagg 16020

ctccggaatt ttagggtcag gcagtttatc tgcaggaatt tttgcaaaaa cattacgtag 16080

cagcaggggt atcaacgttt gcatttcaag gtgccgggct tcccgtccta cgctggtacc 16140

ctgctcttgc gttaattttt ggtggcacat atcaagcgcc tcaaccgcct tcgccgccgc 16200

tttgtcaaca aggtgcgtaa gattgctgcg ggttaacgga tctaacgtac agccaaagtt 16260

atgttcaatg cagctggcaa tatagggcat cacctcctgc ataacaagat tcgtcgataa 16320

tttacttaat tcaccaccag tgttattttt gataatatct aacagctgct tttccaggtt 16380

ttccagcttc gcttccgctt tctttgtttc tggcagccat ggcccaaaag ctgacttttc 16440

tttcaggcca tcttttatga tttgctcggt atactctgcc cccaccttca tcagtagcgt 16500

cttcgcctca ggagaatcac tggtggcgtt gagcgctgaa cgaaagagcc cggcaaactc 16560

cattatcgct ttcttaccgg cgacattatt tgaattggta aaaacttctt ttaacgcctc 16620

agcgtctttc ccgcatttaa acaatgcatc cagactcgcc tgtttgatca gcgcgggaaa 16680

atcttccagt tgcgggcctt taatttcccc tgacagcgtc gttgtggcac tttctctgac 16740

tgcggaaaga ttcgccgcaa gattcgtggc ctgcgttttg atctcggtct gcatacctgg 16800

tattatgacg gggggctgag tccttacact tgtaaccatt attaatatcc tcttctgtta 16860

tccttgcagg aagcttttgg cggtttccag gctgctactt atcgtactgc tcagcacttt 16920

taccaggttg tcgtacaatg aattggcatt gctatatttt tgcgtcagcg tctgtaatgt 16980

ggttttcata ttttcttcct gcgctttaaa acccgactgc caggcttgat atttggcgtt 17040

atccatttcg agttttgagt cttttcccgg cgcgcctaaa ccatcaatat cctgaaccat 17100

tttttgtaat ggcgtcagat caacggtgac gacataaccg gatccataag atttcaggca 17160

gctattcggt aaattcaatt cactgagcca ctgtctcgct tccgcttcag tggctacttt 17220

aacgccgctg cctgactgag ctggaaataa aacggtatta ctgtttattt gattatattt 17280

attgactaaa ctgtttaaat cattttgag tgaggtaaca tctagcttaa cggtattacc 17340

gtccttacct ggtaataacc agcctcccat tttggaaaga atatcactga aggcctgata 17400

aaaatcggta tagactgcga caacgttttc ataaacgccc agatagctgt cacctatcgc 17460

cgatatattt tgggaaacca tatcccaaat ctcagcatca gaaatggttg ttctcggctg 17520

cgccataggc gaagcgctaa ataaggccga cgtcggcgca gaaaacgcgc tccgcaggtt 17580

ctcattttgt tctgcggata atgacacgcc agacttcgcc agagcattca ggctgctggt 17640

caactgctgg cgcgccagcg tgcgctcgtc attattctct tcagagatcg gtggcgttga 17700

ctgcagcgtc tgctgtgcct gctggatttt agtagccgcc tgcgataatg aaatgatatc 17760

tgtaccgcga tgttctgtgg tagacggtac cacggcagtc tcgacgtgct cgctcgccga 17820

gggagtctgc ggccgttcgg caacgatccc cggatgagga gaagcggaat aattttgaat 17880

attaagcata atatccccag ttcgccatca ggagcgcgat taaatcacac ccatgatggc 17940

gtatagatga cctttcagat taagcgcgaa tattgcctgc gatagcagca agtgcggatg 18000

ctttcgactg gttaatgctc tccattgttt tcagcatttc ctgaatcagg ctggtcgatt 18060

tacgtgaact ttcacgggct tcgtccgatg cggtgctggc aacacggtta ttcacctggc 18120

taatttgctg ctcggaacgt tcctgagtag cggcgtactg cccggacgcc cctgcaatac 18180

caccgaccgt gaccgagttc ttcataatca gatcgcccgt catctgcatc ttgcgcgcat 18240

caattcgggt catatccatg gtattctgct caagacgaat atcggattcg acagactcaa 18300

gacgtttcga cagaatagcc tgatgttcag gggagatttg tttattactg tctttaatac 18360

ccagactttc cgtggcgctg gttccggcat tagatttaag cgtcgcatca ttaagatttt 18420

ttgtcgcatc ggtaccggtt ttcttcatat ttaacgattt cagagaatcg acgccttcag 18480

caccgagttt gacgctattc tgcccgttca gcacgttttt aatactgtgg ctttcagtgg 18540

tcagtttatc gatcttcgcg gcattatgtt taagcgcgcc tctttcattc tgcagcccct 18600

tatattccag tttggcgccc acgccagtga tccccaactg aagcgcgctc tgggaaatac 18660

taccggacaa cgcattcatc ccttcgcgca tcatggagct tgctgtcgtt ttagctgcat 18720

caaagctgac taatgacaac ttaccagaca gtttgctatc agcctggttc aacgtcagca 18780

ttaacgtatt cgcggcagcc aacagcgcaa cggcactgga agacattccg ctaatatcaa 18840

aaaactttcc gacttctgcc tgctgctcgc gtaactgggt ttgcacaacc tcattcgctt 18900

tagtcgtgac attatttgcc agagcattca aatcctgatt catgtcggta ttttgaatac 18960

tggcttttaa aaaggacgtg atcgttccgg gggtttgcgt taataccgct ggcgcaggcg 19020

cgctcagtgt aggactcaac cccaggtcac tgactttact gctgctaata ccaatactat 19080

tcagaatatc tttagcgcta acggattgcg aagctgtctg tgaactattc tcaacagaat 19140

gattatttaa ataagcggcg ggatttattc ccacattact aattaacata tttttctccc 19200

tttattttgg cagtttttat gcgcgactct ggcgcagaat aaaacgcgaa gcatccgcat 19260

tttgctgtac cgcagaagac atggcttttt gcagttccgc cgttaccttc tggttttcac 19320

caaatatttc tacggattgt ttaagccact gctgaatctg atccatggca aaacgggcga 19380

gcataaaatc agcaagcgcc tcgctggcat ttttaataaa tacgccctcg gcaacaccac 19440

cggctgactg ggctgcggta ttcgtgactt ccatgcccaa cgccacttta tttagggtat 19500

tacctaccag ctctttactt aaggcattcg tttgcaggcc catcttgcta cctacattac 19560

ccagaccgct agtaatacgt tgcatcccct gggtaaagag tttgctgccg ttttgcgcca 19620

actgtttcag cacgttaggc accaacttct taatcgtttc gcccatcatt ttgctcagcg 19680

cgttacccag tttcgccgcc gcgcctttcc cgacaactgc gaccaccaca atgaccgcca 19740

ccatggcaat agcggcgaca atcgcaccaa caatgctgcc ggccatctct gccgttttct 19800

tatcgatgcc taatccttcc agcgctttgg taatcgcctt gccaatcagc tccattaacg 19860

gcttcagcac atgctccata atcgggttta gcgcctgctg aataaacgac acccccgtcg 19920

ccgccttcac aatttcatcg gccaccatta ccgcaagtcc caccgcagcc agcgccagac 19980

tcgccccacc ggtaaaaaca gcggccacaa cgctgacaat ggttagcagc gcgccgagga 20040

ctttcccgat acatcccata atgcggttcg tttcctcggc tttgcgcgtc tcttcctgga 20100

attcagccga tttcttttcc atctccgcct gacgcccttc ctgcaaggcg ttgaaaagcg 20160

caagatcgtt ttgcaggctt tcttccgtat ttttgcccac aatctcaata aacatggcca 20220

tgagcatagt gaggcgggcg acatttgaca gattatcctg ctcaccctgg gaaacctgat 20280

tctgagaggc ggcattagcc gttccctgga atttggtcag aatgttatcc gctttctcgg 20340

ctttcgcttt ggcgtctgtg cctgctttaa ccgtcgcatc cgtggcctta tctaaggcct 20400

ctttcgcctc tgtcgcttct tttccggcct gttctaccgc ggcttcagct tgtgcatagc 20460

cggggtcagc cgggtccagc gattgcaatt tattttgcgc ctgcgtcagt tttttggtcg 20520

cagcgtcata aacactcttg gcggtatccg tctttttgat actggcttca tagagatccg 20580

tcgcctcctg agcctctccc agagccgtct ggaattcttt cgatacctga atccccatct 20640

ctttttgtga ctcaatcatc gcctgccata ccgccagacg agactccagt tgagacagcg 20700

aaacatcacc cagtagcgtc attaacttgc caagcagtaa tgtcaattgc ccttcgctgg 20760

agagtttttc ccgggcggcg tccgtaggcg gcttcagacc caccgtatta atagcgctct 20820

cgccggactt tgttccggct ttaaggtcgc ccgctttcgt tgccaccaca tctttaaaag 20880

ctttatccgc cgcttttaaa aagtccgtgt tcttacgaac gccttcaaaa gccgcctcag 20940

cgaggcgcgg attttgggta tatccgctac ggctaatgct acttgcgtca tttaccataa 21000

ttattccttt tcttgttcac tgtgctgctc tgtctccgcc gtttttagcg cctccagata 21060

gaccaacgct tttgcccgca gagactcatc ttcagtacgt tcattgacaa gttcaaaaca 21120

ctgtctggct tttgctgcct tacgcattaa taattgacac tgcccggtaa aaaaaacggg 21180

gcgataatca tttttaagta acgtaaacgc tactgcataa aggtcacatg ctttctgaaa 21240

ttgtttttttc agttggcata ccgccgccag tcccatggtg taatcgggat tgtaaaaatc 21300

ataaatgcat aagaaacgaa agaatgtctc agcttcatcc agtcgtccct ggttataaaa 21360

ctcataagca tgagcatata aaccgtccat catatcttga gggatcccat gaacgtcttt 21420

tagcgtggcg ccttcactaa cggcatccca aatcatttcc gcaacacgtt cttcgctgac 21480

attattttga taatccatta cttactcctg ttatctgtca ccgactttgt agaacttaac 21540

gactgcgttt atctgatgca gttattaaac cccgacggtg gttagtgaac attcaaaaaa 21600

cgcccaatga atacatcgct actgctttac gcggctcaat gccgtacctc gttttcttgt 21660

ggctgaataa cgtctttgcc cgcgttttct acctcttcca gccaaaccag aagacgtaaa 21720

acttcatcaa tttcttccag actcaccaga tcataacggc gatgggtttt gaaaagactg 21780

cgcgccagtt tgatatcgac gatcacaggt acgccaacct tctccgcata ggcgcggacg 21840

gccagtgcgc gctgattcgt ttcatacacc gagatcatcg gaatcggcat caattcgggt 21900

ttaaaataaa tcccgatcgt aatatgcgtg gggttggcaa caatcaggcg tgagttttca 21960

atatcagatt tcacctgttc agacagaatt tccatatgaa cttcacgtct tttagattta 22020

acctctgggt tcccttcctg ctccttcatt tcacgcttca cttcttcctt atccattttc 22080

atatctttca tggtcaggaa atattccgca atagcatcca ataataagac aatcaatgcg 22140

caagcaaggc aagttaatac caatgcgagg agaagttcac gccaaatgac ggcaatacct 22200

acaatattgc catttagctg agaaaagatt tcaaccttat atttcttcca gcaaatgatg 22260

gcggccacca caaaggatga gagatacagt agggttttga ccgtatcttt aaccgtgcgc 22320

atactaaaaa gttttttgc cccttctacc gggtttaacg ccgataaatt aggctttaat 22380

gcttctgtcg ccagcacaaa accggcctgt aataacgccg gtaatgcgga acacactaag 22440

cagagcagca taaatggaat cagatatttt aaccctatcc caaaaacggc caaactgtag 22500

tcagccatgc tctgatcaaa attatccgca ataatgatct taattatccc cataaactca 22560

ttaaatgagc catacgacac cagataggca attcctccca gcgtcaggca ggcgataatg 22620

agatctttac ttttaaatga ctggcctttt ttagcggagt cttccagccg ttttttagtc 22680

ggtttttctg ttttattcga ggacatgcgt cgcccctcgc tcgtaaaacc aactgcttaa 22740

ccctgtggcc tggaaagaga gtcgcagtac attgtccggt agtaccggag agaaataaag 22800

cagcataatt aaaacggcaa taccgctttt taccgtcagt gaaatcgcaa aagcgttcat 22860

ttgcggagca aagcgcgaca ataaacccag gaatacttct gacagcaaca gcactaatac 22920

caccggactg gccagaacca aggcgttttg agccacctga ttaataaacg ttaatagcgg 22980

cggtaatgaa ggcgtgcact cgttcatcgg atcgcatagc tgatagcttt tatttaacac 23040

gtcaaccatc gtgaccagac cgccgttttg taaataaacg acagcggcaa acatattcag 23100

gaaattagcc atttccgagg tatcaatacc gtttgccgga tcgatactgc tacttagcgt 23160

tgcccctcgc tggttatcga taatacaacc cagcgcatgc ataacccaaa aaggccatga 23220

tagcagacag cccagcatga cgcctaccgc cgcttcttgc agaactaacg ggatcatcgc 23280

caccgataaa aacggcggcg cctcgttcaa tgcatgcggc catactccca atgccaccag 23340

gatgataatg gcgtttctcg gcgcgccgct taataccccg ctattcaaaa acggcaggaa 23400

gaaaaaaatc ggcgctacgc gagcaaaccc tagtgccgca gacgcaacca ggtgatgaat 23460

ttcaaagtac aacgcgtaaa gcatttttta ccccttagcc aacgccagga atatcacctg 23520

acgcccgtaa gagagtaaaa cttcgccata ccagccagac agtaaaaaca agcataaaca 23580

cacgccaagt aatttaatgc caaaaggcag cgtctgttcc tgtaattgcg ttaccgtctg 23640

gaataaccct accaggaggc cgataatcgt tgcgacaatc gtcggccacc ctgacaggat 23700

caaaacaaga tagagcgcct tattacctgc aaacactaaa tcatccattt aactatcccg 23760

tctcgtaatg atgtcatgtt gcaatgtcca tatactgtaa tatcaatccc ttagacagta 23820

aggtccagcc atcaagcgcg acaaaaagca ccaacttaat aggtgtagat atcgtcaccg 23880

gactcatcat catcatcccc agcgccagta gcacgctgga taccaccagg tcgacgacaa 23940

caaagggcaa atagagataa aaaccaattt taaacgcgct ttttatttcg ctcagcgcat 24000

aagcaggtaa taacgcaaat attgatggtt tttcaatttc atctttgtca cgctttaccg 24060

tctcggtctc ttctccatac tgacgcttca gttgcgcgtt ttcaaaaaac tgaactaact 24120

cgcgatctga atatttgatc agataatcgc gataaccatc cagaccttca tcaacgtgtt 24180

tacttaatga cgaaatatca ttaaaggtga catcttcgtc ctcaaaatag acgtaggcat 24240

catgcattat tggccacata acaaacatag aaagcagcaa tgcgacgccg ttaagcgtca 24300

tatttgaagg tatctgctgc aatcccaggg cgttacgcac catgacaaat acaatagaaa 24360

atttaacgaa acaggttcct gacgcaataa taaatggcaa cagggtggaa aatgccagta 24420

aggcaattaa tgagatatca ttccccatta ccagactcgc tcagccattc atggatctca 24480

acgcctaagg tgtcattcat ctgtaccagt tcgccattac ccagcaaaac accattcgcc 24540

ataatttcaa cgttaagttc agcattggtc ggcagtgata atagctgttg ctgccccatg 24600

gcttcgagtt cggcgagggt aacgttctta cgatacaaaa caaattccag tttgacgggc 24660

aattgattca agccaggcag agtttctgca gtttcagttg tattattttc ttcttcgata 24720

tgttgaatat ctaacgtttc cacaataatt ccccccttcaa cacggttgaa atgacctaac 24780

tttttcgcgt agcaataaac ttccgcacgg gaagtacgaa tcaggagtac atctccgatc 24840

ccgattcggc ccagcaacga acgctgcgta tcactgctac cgattacaaa gcgcaacggc 24900

caacgcagca ttttcggcct gccgcccccg actgcaggca gttcaggaag atattcaaac 24960

cacaggccgc cccgatcgct cataatgtgc aacaatttcc cttccggcag cgcgcttccc 25020

ggcacggggt tctctacgca taaacgccga caggacaaat gcggcacggg caactcaaac 25080

ggtcgctctg tcgcagcaag ccagggaacg accaggtgct cagcgccagc agaaaccgcc 25140

gcccccgcca gagcgggaga gacatgctca agccagtccc caggttgaat ccacgccgac 25200

caccgttttt ctgcatcgct caaccgaacc cacattcctt gtcgcgtcgg atattccagc 25260

gtagcttcct ggccatggcg ctggcattct gtcgcggttt gcgccaatag ccattcgcga 25320

cgatcaatct gtctcacacg caatgacatc aggcgtcatc ctcctcgcca gattgctgtc 25380

tgtgctgttg ctgctgcgga ttttgttgat cgtctcgcgt caggtgccag cgctggggat 25440

taccgttttg ccattgatca tgcaaacgat gttcaacctg cgtatttgac ggtattaacg 25500

aaaactcccc tgcttgccgc gcctgaatat tgacggaata gtcatttccc cagcgctgaa 25560

aacggtaagt cagcgagcta tcctctcctt tcacgccatc ggcagtcgga aaaatagtca 25620

tcatcggctt tgattgcgcc gctaaaggca ttttttcatc gccgccggtt aattggctaa 25680

gatcggcgat agtggttggt tgcagcggaa gctgagaaac atctttaacc tttttatgat 25740

ctttatcgtc aggcttaccg gtattggctg cggccattcg ggcaggtgcg acatcccgcg 25800

ccagcggcgc gccctcttta cgaacgcctt cgcccgcgat ggctttatta tccccaggca 25860

atgccttgat attatcgtca gagattcccg tggcgttatc ggctacttca ctaacggact 25920

ccacggcttt taaatcagca gataattttt taccgcttac gctttctaac ggcctatttt 25980

tagacgatag caacgctgcg gatttatcta ctttggcctc cgcagaaatc aaaccgacag 26040

atttttcagc agtgactttc aacagttttt cagcaatcct gagttcgcct tttccgttat 26100

gatgcagacc agaaacgttg ccattgtgat gttctgattt cgctggcgcg ccatgtcgcc 26160

atgccgccag taataccggt aaagccgttt ctttatgcat tacgaaagca tcgccatagt 26220

cgcgatcttt tttatcaccg gaatattctg tcttatgttt ttccaccgct ttttttaatg 26280

cttctgataa accgccaacc tcatcctgct gcggcagtaa aatgttcccg gatgaactga 26340

cagctgacac atcgcccatt aaattatctc ctctgactcg gcctcttcct gctgtatctc 26400

tcgctggata tagaatcttt tctgacggat tatccagcgt tgatagttcc cttctttgcg 26460

caaccaatat ttacttttttt tctgaaactc ttccctttc ttttccagct cgctccgttt 26520

ttcctgaatt tgtataatct ggagttctaa atcttttatc tgccggcgaa caatagactg 26580

cttacgtaat aacgtataaa tttcctcacg actgagctgt ctgttttctg cacgcagcgt 26640

atctaataac aatttcagac ccgctatttg ttcaaggatc gcctcctcct cggcctgcag 26700

cccgcggtcc tcatcctgat agcgaagtaa tatcgactca cactgtgaat gaaataccgt 26760

acagcgccgc tgcaatactt taattctggt cagcgaatgc attcataccg ctcaacgtgt 26820

catcaaagga tgaatactgc gctaccggct ggcataacca ggctttcagg ctatcccgca 26880

tctgcatcgc ccgatcgtta tcgatatttt cgccaggacg atattctccc aagtcaatga 26940

aaagctggag ctcttccaaa cgcgtcatta atttacgcac ggcagatgcc tgttcagcat 27000

gtgtcggcgt cgtgacttgt ccaaaaacgc ggcttacgct tttcagtaca tcgattgccg 27060

ggtaatgtcc ctgcccggcc agctttctgc tcagatacag gtgaccgtca aggatagagc 27120

gaatttcatc cgccatcggg tccgcctctt cctcgctttc cagcagtacc gtataaaagg 27180

cagtaatgct tccctcgctg gtcgcccctg ggcgttccag caagcggggc aaattatcga 27240

atacggaggc gggataacct cgacgggccg gacgctctcc cgacgccagt gccacgtctc 27300

gcaaagcacg cgcataacgg gtcatggaat cgataaaaag cacgacccgt tttccctggt 27360

cgcgaaaata ttccgctacg gttgtcgcca gttgcgccgc attgcagcga tcgaccgagg 27420

ggaaatcgga agtggcaaaa accagcacgc atttttcttt cttatgcgaa gcgcgcaaca 27480

tatccacgaa ttcagtgacc tcacggcctc gttcaccgat aagaccgata acaaagacat 27540

ccgcctccgt ttgctcgatc agcatatgca tcagcatggt cttaccgcat cctgcggagg 27600

caaaaatgcc cattcgctgg cctacgccac aggtcaataa cccgtcaatc gcgcgcacac 27660

cggtaatcag cggttcacgg acgccaacgc gtgaagcgta agacggcggt gcgacatcaa 27720

taacgcgttc ttcgctaatc ggcgccactt caggggtaaa acgctcaacg attttccctg 27780

tcggatccaa caccgcgcct aataccgagt atcccaccca cgccgataac gcacgtccag 27840

tgggataaag cacgacatcg cggctcagcc cctgggcatt gccgataagg ctcagcacgg 27900

tgcgttcccg ctgtaagcca accacctgcg cacgtgcaac aacctgtttt tggtgccagc 27960

cacggcgtat ttcacacagt tcgccaatgg ccacatcgcg caattccgcc tcaataattg 28020

ggccggttat tttttgtggg taggccagat attgcagtaa acgaggtgtt ttcatctcat 28080

tagcgaccga ctaaaaactt ccagatagtt gtaaaaccca ttcaaggcag tagagaactt 28140

ttcaccgtca gataaaaaat ccggatgcac taaggcttta agcattagct ccccattctg 28200

ctcccccagt agtaattgcc cgccgcgggc aaaatggcat ccttccatga tggtcattaa 28260

gatttcataa gcccgctgtt gtaataccac catgctgtca gcacccaatt gcgcccagat 28320

ccatacatca tcgtccttga cgctgataca gatacttggc aatgcaaata aatccagaac 28380

aattgttgaa tggctatcta ttcctccgat gagtgaagga tcgcaaccac ttacttccag 28440

tgcggaacga actaattcag cgatatccaa atgttgcata gatcttttcc ttaattaagc 28500

ccttatattg tttttataac attcactgac ttgctatctg ctatctcacc gaaagataaa 28560

acctccagat ccggaaaacg accttcaatc attttcttaa taaatcgacg gacatcgaca 28620

gacgtaagga ggacaagatc tttatgtgca atcaataaat catccaactt aagtgtaatg 28680

agatccatca aattagcgga ggcttccggg tcaaggctga ggaaggtact gccagaggtc 28740

tgacggatcc ctttgcgaat aacatcctca acttcagcag ataccattac tgctcgtaat 28800

tcgccgccat tggcgaattt atgacaaata taacgcgcca ttgctccacg aatatgctct 28860

acaaggttaa tgacatcttt ttctcttggc gcccacaatg cgagcgcttc cataattaat 28920

ttcatattac gcacggaaac acgttcgctt aataaacgct gcaaaacttc agatatacgt 28980

tgtaccgtgg catgtctgag cacttcttta agtaaatcag gaaatttcgc ttccagttgg 29040

tccagcatat gttttgtttc ctgaataccg aaatattcat tgacgttgcg cgccagcgtc 29100

accgccagac agtggtaaag ctcatcaagc gcgttccgca acacatagcc aagctcccgg 29160

agtttctccc cctcttcatg cgttacccag aaatactgac tgctaccttg ctgatggatt 29220

gttggattaa taccaaagga cacgacttca tcggaataat ttaccactcg catcaaatca 29280

aaatagaccg taaattgttc aacacggatc tcattaatca acaatacgat gctgttatcg 29340

tccaggccct cgccatcgcg taacaatact tccggcaggc gcacgccata atcaataaag 29400

aactgactac gtagacgctc cgcaagttga gctttttcca gatcttcacg ccggctcttc 29460

ggcacaagta atatcaacgg tacggtctct gtagagactt tatcgagatc gccaatcagt 29520

cccaacgacg ccccttcttt ttcctcaata ctaagcggct gctcgccttt gctggtttta 29580

ggtttggcgg cgctacgttt tgcttcacgg aatttaaaat agaagagtac gcttaaaacc 29640

accgataaaa taacaaatac cggcagcggg aatcccggca gagttcccat tgaaatggtc 29700

aaaatagccg taacaaccaa tacaaatggg ttgttcaaca gctgcgtcat gatattccgc 29760

cccatattat cgctatcgcc atttacgcga gtcacgataa aaccggcact aatcgcaatc 29820

aacaatgcgg ggatctgggc gacaagacca tcaccaatgg tcagcatggt ataagtagac 29880

agagcggagg acaaatccat accatggcgg gtcatcccca ccgaaatacc gccaataaag 29940

ttcacaaaga taataatgat gccggcaata gcgtcacctt tgataaactt catcgcaccg 30000

tcaaaggaac cgtaaagctg gctttccctt tccagtacgc ttcgccgttc gcgcgcagca 30060

tccgcatcaa taataccggc cttcaaatcg gcatcaatac tcatctgttt accgggcata 30120

ccatccagag aaaatcgggc cgcgacttcc gcgacgcgtt ctgaaccttt ggtaataacg 30180

ataaactgga ccacggtgac aatagagaag acaacaaaac ccaccgccag gctatcgcca 30240

ataacgaatt gcccgaacgt ggcgataatt tcaccggcat cggcttcaat caagataaga 30300

cggctggtac tgatcgataa tgccagacga aagagcgtgg taattaacag taccgcagga 30360

aacgttgaaa aactgaggat tctgtcaatg tagaacgacc ccataaacac caatatcgcc 30420

agtacgatat tcagtgcgat caggaaatca accagatagg taggtaatgg aatgacgaac 30480

atagaaatga tcatcaccat tagtaccaga atcagtaatt caggtcgtaa acgagcactg 30540

ttaagtagag aaagcagcac tataggtatc ctgttaatat taaattaaga cagcttttca 30600

atagtacgac gctgttctgc catttcatgc ttgtaggcaa tatcggtcat actacgtaac 30660

gccattaaca attcttcctg ccaatattct tcataaaaga gtgaagaggg tatggcttta 30720

catacttgat aaaatatctg caaaaaggat gcatgttctt tatgactaag caataacgca 30780

ttcaaaccta taatatcggc taacagcgaa tccacttcat gtggctgttg caatagcgaa 30840

agcatcagta gtagccacga cgactcctcc gcattaaacg ctttggtaaa cgaatacgac 30900

aacaatgtac tcacaaacag taggtcagcg gagcgcaaca ttttaagttg cgtcaggcgt 30960

cgtaaaagct ggccaaactc caggcgcgaa caactggcgt cattcgcgtc aatatcggtt 31020

aatagcgaac cctcaataaa atccagtacc accagtcgac gttgatagcc ataactggct 31080

atccagtcag agtaaatctc cacttcatgt gattcactct ggataaattg ccgatagctg 31140

gcgcgcaata agcctggttt taacgataat gttttcccaa aaagccgggc cttcaacgca 31200

caattaatcc ctgccttgag ggtcttcgga tcggtttgct cttcaacgtg cttaagtaac 31260

gactccagct ttttccgcac gatctcttcc aggtctttac gacgaagcaa ttcgcgtaac 31320

acaaggacta aatcactggg gtcaggaaat aagctacgcg cctgacgtaa aaaatcttct 31380

aacgcgccgc catgtacgct aattagcttt aagatttgct tcgccttcgg taaagcctca 31440

tcttccagca cgcgttcaaa actgttagat aaattactgg attttttttc ataatcgcga 31500

cggttacgaa attgcgccag cgccgctgac atttcgtccg tcgactggac aaatttttgt 31560

acttccgccc ctggagacga atcctctgcg gcctgttgta tttccgcctg ttgcgcatca 31620

gtatgctggg tcgcatcctg atgagatgtc tgccgggaca atattctgga aaatgaaata 31680

ccggaggttg agccaggaat catttaattg cctcctgacc tctatccaga taaacacgaa 31740

cccatttctg taacttatcg tccccactcc aggcaccgct ttgcttcaga atattgttta 31800

ccgattcgct ggcatccggc gttaacgggt cgacaatttc ttttggttca atcatgaaca 31860

cacgaacaac attacttta ttcttactgg aatagcggaa caggctacca ataagcggta 31920

atttgcctaa aaacggaata ctttggacag tatcggtatt tgcatcccgt gtataaccac 31980

cgaccagcaa actttttccg tgcggcactc tcgcaatagt gctaattaac gttcgcccga 32040

cttcgggtaa cgcatctacg gaggtggtag tatcggattg cggcgtctta tcgttgccat 32100

cttcaatgtc cagcgacatt tctatctgac catctgcgga aaaacggggc agcactcgga 32160

tcattgttcc gtatgttaca tgctcaagcg ccacattacg ttccccaatc agcttggtgt 32220

aaaacgttct gttgttatca aaaatagcgg gaacattttc ctgggtcagt aataccgggc 32280

gtgaaaccac cgtcgcctgt ttcttctctt ctaacgcatt gaccgcggcg atgaatcgac 32340

tgccatcgag ggtacttatt gaagactggt ttaatgacac gccaagtttg tccccaatag 32400

taatgctgcc gctccatgaa gtgcccaaac gctccagatc gcttttatta agatcgacaa 32460

tccacaggga taattctacg tgacgtttgg cgacatccag cgctttaacc agcatttcga 32520

taaaattcac ctgctcagcc gttcccttta ctaacaaact gttggtatcc ggataggcca 32580

cgattttaat attgcccgcc gcggcatttt gctttaaagc ttcctgcaga ctcatgccac 32640

cggcataatt tgctgcttta ccttttttctc cattcgctga aaacgctggc atcgccgggg 32700

gttcgctact gacaatatta cctaaaggtt gctcttctcc ctgcaacaac ctttcaatgg 32760

ccgtggcaat accggggata accattttct gatcgcgcag attataggta cgatcgccca 32820

cgaaggtatt gttcagacgc atcaccccta ttttctgacg tcccagctca ataccatcgt 32880

tttgcttgtc catcatggtg gcggcgttga ccaccatatc aacatagacg ggtggccctg 32940

aaacatagaa tgttccttta cggttatcgc cacgtagcgg gtaatttttg ttatataaac 33000

ctgagcgttt tagaaaattg ttgaactcat tgagtgagac gttgcgtaaa gaaaccacgg 33060

cattgcgcat ttcactggcg tcataaatat agatagcctg cccatcgaaa taccaaatca 33120

gccccagttg tagggaaagc ttctccagta atgcgttagg atcgtgaaac tcaaagttgc 33180

ccgtaatttt ttttcgtgcc gccattttgc taacaatgac aggctccttt agctgtagcg 33240

ccatggcatc gaaaaatgtc cgcaggctat cgtctttcgc aacaaaccca cttcccgtta 33300

caggtatttt ttcactagaa taaccaggtg taaccagaac aagcgcggca catgccagca 33360

ctctggccaa aagaatatgt gtcttcattt gtctgccaat tgaataatat ttgataattt 33420

ccgcggcgaa acgccgatca gctctttgat ctcactagaa aaatgtgaag gcgatgagta 33480

accatgatta acggctaatt gggtgatgtt ctcgtggcct tctacactat tcagcagcga 33540

ttgcgccata cgccagtttc gtaattcact cttcgctttt ccgcccaacg ctctgctgca 33600

caaacgacga aaatgggtat aagaaacgcc atagtcttct cccagcattc tcatcgtgtt 33660

gccgctggtt gactgagcga gtaaatagcc aaccaaccag taactctcgc tttttcgtaa 33720

cagagccagt accttattga aggccggaga aggtgtaata atttgctgca aaaaccagta 33780

ctcgcagcgt ttacgatctt gccaaatagc gcgaaactca ggactcagca aaacccattt 33840

atcggattca gcatatgtcg tgtccactaa tcctgcgcca tcgataaatg ccagtaattt 33900

gctgagtact tcaattttta acggtcgaaa aaccaggtct cctgatactg gtgcgacaac 33960

ggcctgctcg caaaaaagca gcgcgccttc ctgaatcagg caattttcat tgtgtcggct 34020

ttcagaaaat gacatatgca gcttttgcgc ggaacacgtc tgtataaacc atgcttccgg 34080

gctgcggatt ttccgcttct ctccttcttt aagtacttcc tgcgtattta gcatagttgt 34140

cagcaccagt taaaaatcat tttaatatgt aaacaatacc gggagcgggt ggcaaaatcc 34200

tgatgcaatc attatgaaac tgatgccgcc cgctaattaa attggccaac ttgcacagtg 34260

cttgctgatt taaaatagaa aattagctca tagtgtataa attctggctt attgttctgc 34320

agcagcaaaa attcagatat tgtcatctgg atggagaatt aattatttat atcaggagtt 34380

ttttttgcta gcattcctga aacgcattcg cctcttatca ctattgtcag ataacattct 34440

gacggttgtg taaaaacatt gcgcctcatt cttctgtagt tggagttaat atgaaaaaat 34500

tttatagctg tcttcctgtc tttttactga tcggctgtgc ccaggtgccc ctcccttcct 34560

ccgtgagcaa accggtacag caacctggcg ctcagaaaga gcaactggcc aacgcaaata 34620

gtattgatga gtgtcagtct cttccgtatg tgccgtcaga ccttgcgaag aataaatcat 34680

tatcaaacca gaacgctgat aattccgcat caaaaaatag cgcaatcagc tcaagcattt 34740

tttgcgaaaa atataaacaa accaaagagc aggcgctcac cttcttccag gaacatccac 34800

aatacatgcg ttcgaaagag gatgaagagc aactcatgac cgaatttaaa aaagttcttc 34860

ttgaacccgg aagtaagaat ttaagcatat atcagacgtt acttgctgcc catgaaagac 34920

ttcaagcctt ataa 34934

<210> 2
<211> 25262
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Isla de patogenicidad de *Salmonella* 2

<400> 2

```
ttatggtgtt tcggtagaat gcgcataatc tatcttcatc accatacgta acaaggctgc        60
aacgggttca aataacgttt caggaatttt atctccgcgt tccacttcaa aaaataatga       120
gcgggccagc tcaacatttt caacaacggg gatgcagttg cgttcagcga tgttaacaat       180
atagttagct tgagcatcac tgccttttc caggacgcgt ggtattggca tatcggtggg        240
atgatagcca agacaaaccg caatatgcgt tggattacgc actaccgcaa cagattgttt       300
aacagattga gctaaactcc cactttgtat ttcactctgc atttcccgac gccgtgtctt       360
catttgagga tcgccctcca gatctttatg ctcctgtttt acgtcatctt tactcatttt       420
tagatctttt ctaatcttat aatattgaaa agaatagtcc agtatgccaa cgacgatata       480
aaaagccatc accccaaccc ataaccattt tattaaagaa gaaaccacaa gcaggccaca       540
ggctaaccca cagtacggta gcgcccgaaa agtactggca taataataaa agaaaaaagc       600
aaagataaga gatagcatga taactttcag gctggattta cataattcta ctacgctatg       660
taaagagaat atctgcttaa aattacttac cggatttata tgctcgcttt taaaacctat       720
ggccttgctg gcaataacca cccccacctg aagaaacacg ctacccacag tagcaactat       780
taccccagcg cccagaaaca gcagtgcaga agtcagtgac tctattaaag catgactcaa       840
ttgcgttaat gcataagaaa atggtttatt tactaattgt aatgtgaaag ttattgactc       900
aatcagtatc aaaatcatct tttcagtaaa gaaatgaaaa tacaaataaa gcgcaatcag       960
ctgaaataat gatgttattt caatactttt gacaacctgc ccttccttac ggccatcacg      1020
taatttcttt tctgtaggct gttctgtttt ctcgctcata cagatggaaa ccagtctttt      1080
agataaatat aaaatttatc gctttcaacc aaatagtgat gaagagcata agggaatgag      1140
atcaggagcg tcagtagaac cgatatactt ttgagcggca ttgagaggaa aaacacattc      1200
aattgttgtg ccgaccgatt taaaagacct aaagccagat cggctaatac catacatatt      1260
atggcaggaa gagagaagct gatacataat tgataaagcg ttctccactc tgcctggata      1320
tattttaaaa attgctggtc aaataataaa gtacgccctg gtggtaaata ttgatatgac      1380
tcatacagaa tgtttaatat aaactccatg ccgccgctta taaagaaaat aacacacaag      1440
aactggctga aaagcaagcc aaaaagtgag gtttcagctt ctattgtaga attgaatatc      1500
gtacccattg tcgcgccacg taaagtatca agcagaaacc ccgccatatc aacggcccaa      1560
aagggaaccg ccgcacaaaa cccaattaaa aaaccaataa tcacctctcc ggtgactaac      1620
cctaaccagc tgtaatcttt accaatatgc atcataatct tctgctggta aatgattggt      1680
```

aatatgggaa aggtaagtga cataagcacg ccattacgta aaatcgcgga ccctaaactg 1740

ccacttttta ataggggaag taataaagag aggctcaatg gtcgaataaa agccacagcc 1800

aatgcaataa gccactcatt tacctgttgt gccattcaac catgctctcc aactcgtaac 1860

attatctgcc gggtataatt caacaggata ccgctaagcc atgggtagct gaccattaag 1920

gttattgcaa ttgccaataa tttaatcatg aactgtagcg tttggtcctg tatttgagtc 1980

aaggcctgaa caaggcttac gatgacacca actaccgatg ccaccaacac caccggcata 2040

gacgtaaaaa ggacgatcca taaaagttgc gttacaaatt gcgtcaattc agaatcattc 2100

atgaaaagct ctgtaccaat tgcgccagtg tcagatccca accgcctgcc agtaaaaata 2160

ttagcagctt aaacggtaat gaaatggtca ttggcgatac catcatcatc cccatagcca 2220

gcagtatatt tgaaataagc aggtcaatag ccagaaaggg aagataaata agtaatccaa 2280

tccgaaatgc ctgcgtcaac tgactcaccg taaatgccgg aattaatatg agcaaagaat 2340

caggttttat ctttcttttt atgtcttcag gccaggttcg ttttatcaaa ctccgaaaat 2400

aattggcttc cttctcttca gagtttttt gcaaaaactg tcgataaggc gctaatgctt 2460

tactgtccca ctcagacgtc cagaaaggag cgccagcgac ctgaaccgga tgccagcgct 2520

cttttacagc taatagcgtc ggccccataa tgaataagga aagtacaagc gcgaggccat 2580

acagtgcgat atttgggggа acttgttgaa tacccagagc atttcgtaaa atcgaaaata 2640

ccaccgccag tttaaggaaa gaggttccca tgacgataat gagaggcagt attgaaagca 2700

gaaacaatat accaatcagt tgcaaaggcg aatcgggtaa agacatactg tatctctcat 2760

gacacgacct agaacgctat tatattgttc gcatattatt tttcttatca ggtttacgct 2820

gtatttttgc aaagatacca acgtgtaata cgcaccataa attcattgcc acaggcaatc 2880

aactcacctt gcccaataat acggtcattt actcttatcg tcacctctgg cgcaaaacat 2940

ccacctacag gcaaaacgtc ccccgtttta agttgtcgta attgtccaat ttccagactc 3000

gcacgtccga tctcaaagag cacctgttgt ggtatctgct caagttctac tgaagatgtt 3060

ccgtcactct ttgacattgg actccctgac gcaagtagcg tttcgatatc ctggactaat 3120

tcatcaaatt tcatcgtgtt atcctctgtc agcaacaccc tcgcgtagat ccccccaggt 3180

agttgaatag caaaaaaacc gagtctgatg tcgccaaagc aatgaatccg aacgcccatg 3240

ccgatttcga tagactcaag ttcaattaac gtaagctggc accagcctaa atatacaggg 3300

actactacag gaggggcagg ataaatctgt tgtcgcgcag cagaaagctc tccgactata 3360

ttgcgcaaaa aacccgttgg ccatgtaaaa ataatgctat ggaactcatg ttcttcaact 3420

gtccatttaa tatgcaacgc tagctgatgt ggtagattac tgcaggatgt tggcggttcg 3480

ttctgacaga gggttgcatc actggcttgc aataacggcg ccagccccca ttcagctatt 3540

ccatatagca attcaggatc gatagccgat cgattagcgg tgccaattaa cccttcacac 3600

cagcgctgcc agcattcttc tgcaatccac accctaccca gctcattatg ataatttatg 3660

gtaaataatg tcccttgctg tactggatat tgttgcatac tcaatgtcag ctcaccaatg 3720

gtagcgcctt gcgttggaag catctccatc cacggacgct cttcattcgc tattcttaac 3780

atagaatatc tccagggaaa ttatataccc catatgcagc aactgagact ccagccactg 3840

ctttagcgct ttcatcgaac ggtaaatttc atgatgaggg acattgattc ttaactgaat 3900

tagcccccct gattcacaga cttcacactc tacaccgtca agataaccgc cactaacacg 3960

ataacgttgc gtaaaaacca cgttcttatt caatgctgca ggaggattat tctcaccaat 4020

gggtaatgcc tggtgcatga gttgttcaaa gtccatacgt tccgcctccg cctcgttatc 4080

atcctgataa gactggcatg gcaacccaag acttccctca actttggtaa tacgcatcgc 4140

ttaataccat agtaattttt tctttctttt tcataagcgc attaaaattc ttctgtaatt 4200

cgcttcgccg ggagacaagc tgctgatact gattctctaa ctgctgccgt tgcgtcaaaa 4260

agctctgcgc ctgagtgaat aacccggcca tttgttgttt cttatccaac aataaatgac 4320

aagataacgt accttgccag cccattaatt ctttcagtct ggtagacact gctaaagcgc 4380

gcgtctggca aatctgctgt tccgtaataa tcgcctgttg ctgctgatca agtacggtaa 4440

gcttgccgcg taattgcttt tcacgccgcg cgattatctc cagcaaagtt tccatgatca 4500

ctcggtgagt atttggtgta atttttctat aagtagctcg ggtccgcata cttcatcctt 4560

actttgtcgc aaaaatgtgc aaatatccgg ataggtatca atggctttgt cagtatcagt 4620

atcaactcct cgctggtatt ccccaatgcg tattaacagt tcaacctcct ggtaaagcgc 4680

caggcgccgc cgcaatatcg ccgccagttg acgatgctca tggctggtaa cgactggaaa 4740

aacgcggctg agcgttgcca gcacgtcaat ggcaggataa tgccccctct ctgcaagccg 4800

ccgggatagc acaatatgtc catcaagtag tgaacggact tcatccgcca acggctcatt 4860

catatcatcg ccttccacca gtaccgtata aaatgcggta atactgcctt tttcccccat 4920

tcctgtacgt tctaaaagtc gtggcaatgc actaaatacg cctggcggat attctccaga 4980

aactgcggtc tctccggcgg ccagagcgat ttctcgtgcg gccctggcat aacgcgtcag 5040

tgagtcggca agcaagacga ctcgctttcc attatcgcga aaaaattctg ctatcgtggt 5100

agccacaaac agcgccctca cgcgctctaa ggcgggtctg tcagaggttg cgacaacaat 5160

gacacagcgt tttcgggtct cttcagacag tgtaaaatcg atgaattcgc ggacttctcg 5220

tccacgttca ccaattaaca ccagaacatt gctgtctgcg tctggcgcat tacacagcat 5280

cgccagaagc gtgcttttcc ccacgccagg agcagaaaaa atacccactc gttgcccttc 5340

gccacaggtt gcaacgctat caatagcgcg aatccccgtc attaatggtt gagtgatagg 5400

ctgtcgaacc attgcgggag gaggcattgc atcatagtct ttccagcaga cgtcgggcag 5460

ttcgcggcca tcaaggggac gaccaaaacc atcaatgact cgccctaata acgcttcgcc 5520

cacgggaacc tgatggcttc gccttaaggc catcacttgc tgcccgcagt gaagtccgat 5580

tgtactcgta aaaggagata gcaaagcttt gctgccatta atccccacga cttcagcaag 5640

ttcttctcca ggctttatac agcacaactc acccataaat accccaggca accacgcatt 5700

taacaacgtt gcgctgacat cctgaattcg gccccatcga caataaccat cgggggggcgg 5760

atatttcagc ctcagacgtt gcatcaattc attcttcatt gtccgccaac tcctcttcgc 5820

taaggtcaat actttctacc acttgtataa ggctctcctc tcctaattcc tgccatgaca 5880

aaatcggtac gtcgaacaag gtggcttctg taatttttcg caagaaacgt cgggtgtcga 5940

cagaagtgac aatgaataat ttggctgact gcttcagcgc ctgctcgata agttgcagga 6000

tctgcgtctt atgacgagac gacagcgcag tataggtccc cattaccgtc tggcgaatgg 6060

attcacgcac gaggttctca ataccttcgc cgatccgcaa aatcggcagc ggttttcctt 6120

ccggattaag acgacgcaga atatgacggc gaagcgcgat acggacatat tctgtcaaca 6180

tcaggacatc tttttcacgt ggcgcccagt caattaaggt gccgaaaata agacgtaaat 6240

ctctaataga aacccgttct gatacaagcc gttgcaaagt ttcagcgatt ttattaatgg 6300

gtaactggcg ttgaagctct ttcaccagct cagagtagtt tttttccatc gcattcatta 6360

gataacgcgt ttcctgaaca ccaataaact ctcccatatg ccgaagcagg acacatttta 6420

ataaggcaga gatacgttgg ctgcccgcga aaacgtccag tccaaaacct tgcgccttat 6480

gggccatgtc ttttgtaagc caacagatct gccccatccc gttcggtaac gtctggctgt 6540

cacccaccac actagcgtcc gcgcctatca ataaataatc cgcctgagcg ggaatagata 6600

aactaaatac gggttcctga tatagcagta ccgtcaattt ttcggtgggt tcaggcaaaa 6660

cctcaatatt cacctcaggg agagggacgc cggtatcctc aaataaaaac catctcatgg 6720

cgtcaatatc acgaatcagg tcggcagaat gtaacgtcgg gctaagacgt aagattagag 6780

gacatgcgcc gggaaccata ctatcttttt ccggtgcttc gacgccattt gcggaaacca 6840

cagacttttt gcggcgaatg aggataattg gcaatgctaa caacgctgaa aagaaagcga 6900

gagtgataaa aggaaagcca ggaattaaag cgaggagcat taaaaccaca gcggttaata 6960

tgagcgactg aggttgtctg gcaatttgag aactcaactc tgtcgccagg ttctggcgtt 7020

tctcacccgg gacacgggtg acaataattc ccgcgctaag ggaaatcagc agcgatggaa 7080

tttgcccaca taaaccatct ccgattgaca gtacgctata agtgtgaaca gcctcactca 7140

tcgacatatc atattgtacg atagcgataa tgataccgcc gataatgttc accagaacaa 7200

caataatacc ggcaatcgta tcgcctttaa caaatttcat cgcaccgtcc atcgcaccga 7260

gaaagcggct ttcctgctgg acatgctgtc ttaatgtacg ggcatggtct gcatcgataa 7320

ctccggcacg caaatcgcca tcgatactca tttgtttgcc tggcatccca tcaagcgaga 7380

aacgtgcgct aacttccgcc accctctcga taccttttgt aatgacaata aattgcacga 7440

tagtaatgat ggtaaatacg accaacccaa cggtgagatt tcctcctacg acaaacttac 7500

cgaaagcatc cacaatatta ccggcattat gttgtaacag taccagccgt gatgtgctga 7560

ttgtgagtga caaacgatat aatgtagtaa taagtaataa agacggaaat accgataaat 7620

cgagagggtc actaagataa atagcaatta agagcaggat cactgaaaac ataaggttga 7680

tagtaatcag gatatcaacc atccaggtcg gcaaaggtaa cagcatcatc acaatagcga 7740

ttaataacac cgtcgccaga accatatcct gccgacccgc gcatacactg agccactgtt 7800

gcgccctgac tccctcacct aaccatgaac gcattgcgac tccagaaatt ttatttgtcg 7860

atgatgtaat cgtaaccaga gctcggcgga gctggaaaga ggtggagaac aactcattgc 7920

aagcccatcg cgcaacaaaa ataatcgttg aggaataccc tggaacgctg cgggtttcca 7980

gttagccaac gctttaaaaa gcagttcttc gtctaagaag gtttgcttga gtatctgaca 8040

taagtgaata cgacagttat gatagtttag ataggtttca tattgtcctt gccgccagaa 8100

catattggtc gctaaaggcc gttcagctaa tcctgctaat tgaataaaaa gctgaatatt 8160

acgttcagta atgagatccc aatccatcct gacgcctcat gatgagccag aaagccaatt 8220

tacctaaata ttgaaagcca ggtatcagaa taaaacctga tttatcttta cttcacgaag 8280

cgtttcgaga atttgttcac gttgatcttc gtcgttaaaa cagttatcgg gtatcagcat 8340

aaactgcgca tcaagttgtt ggagtaaccg attgaacatc ttcgatgaag aaactatagc 8400

ggtaagtcta tcaagcaacc aatcactgaa aagccagcgc tcacaaataa tatcgagtag 8460

tagcggcagt aatgtattag gcggcaactg gcaaatccac tcctcacgct ggcactcttt 8520

ttcaaggcca aggaataaca gcaaacgacg caaacgtact aatgctgcgg ccaaacgact 8580

ttgctccgag ggttcgatgc atatgctaag ttcaaaggct attgctctta gcaaaatacg 8640

gacccgttca cagcgatccg gccagtctgc cacgcgtctg aaccactgcg ataagggcat 8700

ttcatcgttg tctatcgcct gttgcataaa acgcttcagc gaggacagcg tagcggtatc 8760

cacttcgcca agttccagta aactaaaaac ggcaagttcc catccctcct ccgctgtaag 8820

cgtatccagt tgcgattgca aatcgcgttt tttctttttt gacaacccgc cggcagtaag 8880

cgccattgca agagcgataa tttgatacgc attctgtaaa tcaggatcac tattctcttc 8940

ggtaagcgga cgcaacgctg ccccattatc ctcctgtatt tgttttatca aacgcagcaa 9000

agcctgctgc ctgcgctcca gtttctcagc atcagtgaat ttattacttt cgcgcagttt 9060

accactcagc gccattccta tttcttccat cgtctcatag agcgctgccc ccgtcgtttc 9120

ctgtaactcc tggagagcta acattgaagg cgaaataacc tcttgttcct ctataacctg 9180

gccaggggta aatgctgtag ggggcgtcat ttttatctca ttaattttaa tattcatcgc 9240

tacctctttt atcttcacca ttacgtaacc atttcagtaa cgcgttgaaa tgacgagaaa 9300

gtgaaaactc aacggcatat cgtgttgagg aaagttcagc ctgatcggga gagaaaccag 9360

gctcgataat caacgtaaac cgcttgccaa aagtttcacg catcaatgcc tctttttcag 9420

gatgaatacg caaataaagc gctccctctt ccgccatagc cgtggcctgg cgtgccagac 9480

gatggcacat aacactgtct accgactgtt ggtcgaacca ggccaacaga acctgttcta 9540

tactattttt aatatgatgc gctgcgtgat cgaccaatga acgaaattga ttttcatctt 9600

cttgtaaatg ttttacatgc tgttccagcc attccacttc catttttcc agcgtatttt 9660

tacgcaagca cgctagttct tgttgctgct caactttctg ttcacgctga taacgatagg 9720

cgtctcggat gatttttca gccttacggt aagcggagct cacaatagca tgtgaaactc 9780

tcttagcttg ttgctcttgc gcaaataaag ttaattgtaa tgttatccac tgtgactcaa 9840

taatatttcg agcgggtagc ttatggttaa tttccgtcag aggaagtgaa gtaaaactca 9900

tagcaaatgc tccatgaaga taatctcggt aagagaagtc ttcggccaaa gtatacgctg 9960

cggaggggt aataatacta atagcgcatg taaaaccgca tcgtcatgcg cttcccgatt 10020

aagaatggcg gtaccgatct gcaatgcagt ttgttgcatc acttgcggag gaagtatttt 10080

gccatctctt tgccccaacc aaccatatag ctgccagatc tcatcctcgc taaaccactg 10140

tagaagcaat tgccgatact ctggtagcat aaaatagtca ctacacctga gtttgaataa 10200

tcccagccca aaggcaaatg ccgatatacg cggcgcaaga cgaacctgcc gcttttgcct 10260

gtcatttaaa caggctggaa taacagagct tcctcttagt ctatttaacg ctctgtcaag 10320

aagacgatcc aactcgggcc gatcgccata acgccagcag tttgaaagat gaaagcccag 10380

cttatccagc cattccggta cagcgtaacg agcaggttgc cagaaataac gataaagttg 10440

caacacctcg ggatcaggtc ggctcaaaaa cggcgtctca ggcaaaaata gccgatcagg 10500

atgcccactc ctaataacag tcctgtcaac gataacatca actgataagg gtatttcatc 10560

aaccacttca ccaccttccc tttattggcg ttgataacgt ccataatcca gaatgtttgt 10620

ctcgcgggta cgtcagctac cattctgaat tcagcaggct gcatcaagag actaatctta 10680

ctgtattgca acccagggat tgacatctct attaaatcct taatttttac ccgaaaggcc 10740

tccatattga cctgtggtga atattttata aatacggcaa ctgagctcgg agaagcgtta 10800

cttccctcat cataagtcgg tagcgcaatg gtcacttttg cattaatcac gccctccatc 10860

tgactcagca ttccttcaat tctttgttct tttaaaaaat taatcttctg ctgttcttcc 10920

tggggtgata ccactaactg attagccgga aacatcttat ccgccgttgt aaactgacga 10980

tgcggataac cgttaagtct aagtagctca accgcattaa taaactgcga ctgctcgaca 11040

cgtaaggtaa caccgtcctc ttcctgtttt ttttccgcat caatatgatg ctgcataagt 11100

aatgccagca tttgattcgc ctcatcctct ggcaatgagc gataaagatc cacatcacat 11160

gccgtaagaa agaacgtaag gacagtaaga aatactatac gatgagcctt catgccatgt 11220

tatccagctt attaagcgct tgcgatgctg cgcctgatat tctggcaaga taatcgacgc 11280

ctaccgttaa ctgcatataa tccatttgtc tggtcaacat aacctgcggt aataaagcac 11340

tggcgttact ggtggatgct tcatctttca gcaattgttc aaaaaaatta atttgctcct 11400

ggctcggttc tgcagaggac tttacataag attgagtgct tacaggcact acgctcatat 11460

cagaaatatt caattttcaa acccctcatt tggtgcagga aataacagac gcagcgccat 11520

agcctctggc aaatctatat ccgataaaat tttcgcggct tttagcggct catttaaacc 11580

cgccaacaat aatgccagac ataccaactg taatttttta tccggaacaa taaccgttag 11640

cgctggtaac atcgcatgta cctgggaaat caggctatgg ttaacgcccg caaacatgat 11700

ttccagcagc aaccgtcgaa catcgtcgct aataacttca gattttagca atgattccac 11760

taagcatatc cttgatcatt ttgatcagtg aactttcgta attaataaat gtagaatact 11820

gctgtaaggc aaattgcgct ttaatcatcg attctgggtt gagcaaatca ttaccattca 11880

ttttgtcatt aatggcctgg cctgcctggt gcgccatgtg ggagagcata tccactaatt 11940

gtgcaatatc cataatgctt ttccttaaaa taaatacatc gtaaggatac tggcaacata 12000

gcaaaattta gaaagcaatg aacatccggt atatacctga aaacgattac tccggcgcac 12060

gttgttctgg cgttacctga gccagcaaac gatataatgg gctgctgacc tgcataccgg 12120

tcattgccat cccatccata ccgaagcgag taaaactcat tagtccatag gtaatatcat 12180

taagacgctc taataaatga ggctgtagtc ccaaactacc actccagtat gaatgcgtca 12240

ttaccgtcgc ggttaaggct aatctaccgc ccagggagac ggctttagca atcgccatac 12300

ttttgcgttg attggcgaaa caattagcaa tataaaaaac ggcattgcct atactgtcgt 12360

gagccatagg caaatgatgt ttatgatggt agataagaca ggcgacatcc gcgatggcaa 12420

tagcaaggcc aatccctgcc agggctacga gcggcgcgcc tccaccactt agcactgtta 12480

atgctattcc agcggaacag cataaaatct gtccgcccaa aataaccgtt tgccaactaa 12540

aaatttcttt tggaaaacac tctatcactc gtttcgcaag tccggccaat aaccgctctt 12600

ttccttgttg aggacctatt ctaccactct ccatattggt ttccggatgt ggcaatgagg 12660

gacatggagg tgattcctca ggcgcgttaa caggacgttg ccctcctacc tgagcatttg 12720

ggctaacagg tttcatggtt ctccccgaga tgtatgacca gaactgtcca ttaatgcagg 12780

tgcagtagca gattgacaga gcgctgccat ttgttccgcc aataacgcac tgggatcggc 12840

ataaagttca tcaacagaat tttcctgatc gtcgccagag gggcgggcaa ggcaataatc 12900

cagtaccgca cctatcgccg tcaggctaac ggaggtaatt acactcccca tgtccaaaga 12960

ggccgcaata ttttcagccg cgggcagtgg aaactgtagg ggtaaaacca acatagaaat 13020

agcgattcct gaacgtatta ataaagaaag acaattagca agggtgttag cgcagttaag 13080

acttgcccca cattttaagg ccagcgcact gaccacaaga gcaacgctat cactggcggt 13140

ttgtaatggc tccttttgct gacatatcga ttgataatta tgatacgcac agcaagcatc 13200

cccaatagca atcacgagcg ccgcccccgc aagaatagca atgggtaatc ctgccccgcc 13260

agaaattacc gctgcagcaa ccgataaccc aaacacgact gtcgcaccca gcgcacgaat 13320

agtgtattgc ataaaatgta tagcataatc cctctgctgc cttatttgtt caggcgtaag 13380

cagcacaggg gctgcggggg taccaggcgc tggaatttca gggggaggaa acgatacctc 13440

cttcgcttgt atatcggaag gaggactatt accatcgact atattacttg ccgctgacgg 13500

aatatgaatt ttcatatttc gttctgttat ttaagcaata agagtatcaa ccattatttg 13560

cgcattctgg cgaatctcac tccatgaggc atccgcataa ctcatcttga ttgcggtttg 13620

aaaagcctct ctcgccaacc cgggttcccc catcattttg agacagacgc ccgtttggta 13680

aaccggttct ggatggctgg catccagcat caaggcatgt ccatagaaat taatggccgt 13740

tgtgtattct ttaagcatca tccaggtgcc agccaatgca atatgggcac gccaactcca 13800

tggctgggcc atcaccagcc aactaaaatc gattacggcg cgcgaataat ccccctcctg 13860

ccatgaggcg taaccactgg cataaacggt ttccggatca acggataata gctgtttcag 13920

aatgtcttcg ggtattttat ttttctgatc ttctttcatc atcataccta ttgattgtta 13980

ttttcacgtg ataatgattt acgttaggaa ggtcatttaa aaacgtcgct ggataagatg 14040

ctcggcggat aaaactgtcc agttatcgcc atcaagctgt gtaaaggtcg ctcccattac 14100

tgtcaggatg cgcaataatt tcctgcgtag catggctttt ttttcatcca gaacgtcggt 14160

gattatcaac atctttaaac atgttaactg cgggtgatgc acaaatatcc cgcgtaaaag 14220

tcccagtaag tgaaacaatt gctgtggtcg aggttgcccg ggcgtcaggc gcctgaactc 14280

acaaataatc atttcttttg cctcaatacg atagatcacc aggtaaggcg ataatataaa 14340

ctgctgccca agtaatatgg cggtctcccc taaatatgca ggctcagtaa acacctgatg 14400

ccgacgcaac cattgctcta tttcttgcac catgtttacc tcgttaatgc ccggagtatt 14460

tcagcaagaa ccgtgaccag tgacgacccc acgccgatga tttgctgcat aatttcagtt 14520

gctttctccg taatttccgt cagggattta ttataagatt gggccccatt ttgttgcagg 14580

tcggcaatcg ctttatcttg atcactttga cgttgcgcta caccagcccc caggcccatg 14640

acgcccccag ctgtgtggcc tacggcttga cccgctataa gaccggtttc cccgcctacg 14700

gcccctaatc ctatcgtcag tacacccgac aacattgcgc cacccgcagt aatcattgat 14760

gctctaaacg cttcatcaat tgttttcatt tgcgtctgta aaacattgac ttgcagttcc 14820

caggccagcc gttgtttttc tacgttatag ctgcgcatga tatcgcgcag ctttttggca 14880

agctccatta gcttcatcca gatatcatca aataacagaa gcattgattc agtacccatt 14940

ccctccccgg agggagatgg agtggaagaa ggtgttaaca aggaaggcgc tggtaatacc 15000

agtgctacgt tactcgcttc catattttta tcctcagatt aagcgcgata gccagctatt 15060

ctcgcctgaa cgctactata gtgatcaatg gtatctaata catctctaag cgcggcaccg 15120

ctccccttat aaagcttctc taagcgtttt tgttctatct ttttctggtt ttctgtttgt 15180

tgcattatga aatccagaaa ccgttgctga gttattaatt gctctatttt cttttcgatc 15240

ttcgcttttt ctgtgttaac catgccagta ttcatctgac tggcgccctc ggttgcacat 15300

ctgatagcct gtaagccttt aaatgaacaa tccctcagta aggcatacag gatttttttg 15360

aacatattga agagaacttt attacggaat ttttttaaca ggaactttcc accttcttgc 15420

acacattttt ccagggcttc ttttgccgct tcttttgcca tggctttcac cccctctttc 15480

gtaaagcttt ttcccgcgct tcgcgtcata ttattttcta cgttacgaga aaactcggca 15540

gcctcctctg ccatctcatt cgccatagcc atttcacgtt caagcggctc aaattgtttg 15600

gaaaaacttt cgctcacttc ttcgccaaac ttttcagcca actcctctat ttctgcttcc 15660

cctgcaccta ccatacgctc aaccacttcc tcgccaaaac cggagtcaag cacttttgca 15720

gctgcgccag ataaacctct cgtcgccata aaagcacggc caatctggaa aacatccagt 15780

gccagcgcga cggcttcaca accaaattga atcttacttg tcacgtcaat aattgcctga 15840

caggtatcgt ggtcagcacc gcacatcatt gccgtttcgg ctccggcttt aaccattcct 15900

gcacaaccta cggctatata agctacgccg ctagccattt ctgcgggatt accggacaga 15960

aacccctcca caacttttaa ggagccaatc acagtttcaa atatgccggt aatccagtca 16020

aaaatagcgc caaaaatgcc cgctttacgc gctttatcct cctgctctat cgctttctgg 16080

atctgctcct gatactcctt tacctgctta tcacgtaatg cattttgcac ctcagttgcc 16140

cgctcaagct gttggcataa cgattgagcg ttattaccaa aaacgctgag tattaatgtc 16200

gtcatcaaca ttgataaaac cgcgggattg gtctgcaaaa agtcaggcaa tgatagacgc 16260

ttatgatttc cgggtacggc atcaagcagt tgcttcaacg cattgcttgc ctcctgaaga 16320

ctaattttcc ctgataacag gcacgcggcg ttgccatcgc caaaagtaga attcacacga 16380

tgccggcgct ttcccagcga acccgaggaa acgcaactga cattgcttaa gtgatgatgt 16440

gttaaggcgg ttactcctgc ggtgctgtcg ctattactgt gaattcgatt cattttagc 16500

tcctgtcaga aagttgctgt aacatctttt ctgcacgctg tcggagaatt tgatgttcac 16560

tgacctcgcc gcaaatacgc accacggcct ttaacgcttt gattgcataa cagacgttat 16620

cacacgcgag atagcattcc gctgcggccc atggcgcctg cggcgcatca atcttaattt 16680

gtgccgcgcg tccataagcg tatatcgctt ccccccaatg tttttgagcc tggcagcatt 16740

cccctaacct aaaccagtag tcaaatgacc aggcatcata tatcgtcaac aattgaaaaa 16800

gtcgcgctgc gccggcgaac tcttttacct ccataagctg catggcatag cgatacagag 16860

tattaagcgg ctgtgtaaca tcgtcatcca acaacatacg cagcgagccg ccacgccgga 16920

aaaaccgcat cgtgtcatgt gcctgttgta gggtcgggtc ttttttcatg agtacgtttt 16980

ctgcgctatc atactggaaa tttcccccca cttactgata agccctgtca gttgggtaag 17040

gacagcgtta agctcctgag acatttttg aattgttatc tgcccctgac tcataagatc 17100

ggtattccgg ttggcgtcat tatccaaagc cgctttgatc gcctgtaggc caccttttatc 17160

cagcttccca tgatcgccat atttagccat ataatcatca atggtcatac catcgatgag 17220

aataccatta tcacgcatgt atttaattac atcctcaggc acctcctctt tggttttagc 17280

atccccttg gctgctttag caatcacctc atccatctca tttgactttt cctgggtatt 17340

tctggcacgt tcagcgttct tctggacttc aataaattta ttatttgcga tatcctgaat 17400

aaccataagg agaataagca aaacaccata cccttcggca aacggatttt gctgggataa 17460

gtcatcctgg ctcccggtat cagcgttgct gacgccgaag ctatttttaa acacaatagg 17520

gttttgactt ccccataaga tgtttcctga agacattatg ctttaccttt ttgtttttcc 17580

tgacggtatc tccaccgggg cttgagcatt aagttgtttc agtcgtactt caagttgttt 17640

aaacaaactt actattttct ttaaatcctt ctcggcctcc tggttaaccc cggcaacgcc 17700

ttgtggaaat aggttttgaa gaatactctc tgtctctctg ctcttttgg ggctctctgc 17760

cctttcagca agctgttgac tcaccttagc ccggatttgg tgaaattttt taagacagtg 17820

atttagctgc atgtaacttt gctctaaatc acgatattca ctaaacgcag ccttttttctt 17880

tatcattatt cccctccata tacacgatag ataattaacg tgctaactaa gagcctatcc 17940

cattagggct attttacttg ccattttgaa cctgggcagt gctcaaaatc ctcacgtact 18000

acgtgtacgc tccggttttt gcgcgctatc cgtgtccaaa ctggctgcgc caattaacgc 18060

ctggtgggat aggctctaag atatttttac tttactcttg ctcactcact acaagtgcgc 18120

tgttatggta acgataataa ataatgttga tgatattttc ggcctgctcg atcgcttcaa 18180

gcaataaggt gttttgctga tattgctgcg gatcctgtaa cttgccgttg ttctctccta 18240

actgtttccg ggcagccctt aattgtaaaa ttatgccttt ggcctcttca cgcgaatgaa 18300

gcagcaaatc ttctaaccgg gtcaaagttg tcattttcca ctcacttaaa atctaatgga 18360

tagttaatca aagtatcata atgtttaatc gttaccacat cggcactcag atggacaatt 18420

tctcccccat tgggtaacaa tgcccctaca cgtaaacgct ctttattcgt cagtaataag 18480

taattaccat ggcgactctg tacaaagcca gccactggcg caggcagata cttgctttca 18540

tcatgggaag gcgcaatatc ctgataaatt aaagaaagag cgggatcctt tttctttaat 18600

gctgctaacg tttcttgcaa aatgcgttga tgagattcat ccagtacacc actgataaca 18660

aaagagcgcc gcattggcgt aacattgaca agccccacta aaccgttctc tattatcgca 18720

gaaataatat catctccctg agactgatga gagtgactaa tctgccagtg caataacccg 18780

ggaatatctg caagtaatgg ttgaacctta cgccattgct gatccatttg tatatcatca 18840

tgaattaaca cgctccccgg cccttcgctg gatacttcag catgcgggta acccattttt 18900

atcaaaacat cctgcacttc tcgtaccaat aagtcatcac agattacacc atcccgatac 18960

atgacccccc atgattcgag agtcgctctc acctttgca tctgttcgct tgacgagcaa 19020

taaccggaca actgcaggct gccatcttct ttccattgcg cccgcacata atgaatattg 19080

cttttgtcta ataaaaactt aacccgcaaa ggtaagtcat ttaccgtttc aggctgacca 19140

ctaatactta acaggacacc cattccaccg atgaaaatca agaatacgcc agccaaccac 19200

cagtaccctg atctggaaac gggtatttga taatcagcaa gttcacaatc ctgtttacca 19260

aacgcgatag ccactcccgc aacctgcaaa accccactgg atggtagcgg cttatttgga 19320

ttaaatctgc ggccattaac tctaactctg gctttcccgg catcaacaaa taaattatct 19380

gcctgttctc tcagaataat tttttcattt atagtaagcg gaatacaaat atcgcatcct 19440

ttctccccca gtgacaggtt accttcattc agccatactt cccggccttg taaaacgtga 19500

cctaaaaaac gtattttcca ggaactcttt ggattaacca tgagatatgc cattatttac 19560

tactgaggct ttaatcaaaa aaagcctgat tacactatgt acttgagtcg tatcattgcg 19620

aaacaaatgg cctacgacag gaatatcgcc caataaagga attttatttt gcgagtggat 19680

ttgtttacct tgtttaaatc ctcccagcaa tagactttgc ccggccaata atgtggcctg 19740

cgaagcaatt tcagaatttt gcacttcggg cagcgggtct gtttcgcttt gcgtatcact 19800

ttgttgtcca tcctgaatat taagatcaag cattattttt tgcgtgccat tatcatttaa 19860

caagcgaggt gtaacgcgca acaaagaacc cgtagtgatg gattcaagtt tagccacttt 19920

ttctccctgc agtttggtat agaaagtaat atttttatcc agcacagcct ggatattatt 19980

taaagtcacc acagatggct gggaaagtac ataagcctga gagctttttt ccagggcatt 20040

caaacgcacc ataaagtttg aggtatcgct gattaccgtt gaaaaaccgc tagcaccacc 20100

gtcattcaaa cctgtattga acgcaatttt cttgccaccc agcgacactg ccgttcccca 20160

gtcgatgcct aactggttaa tatctccagc attaacatcg ataattttca ccgaaatctc 20220

tatcatctgc tggcgttgat ctaattctgt gataagtttc cgatacccgg ccatattgga 20280

cgcataatca cgaacgatca ctgcattctg gcgtgggtcg gcagcaaaca tgggcaatgc 20340

ctgtgtagcg ggtgaaccat tgttcgtcga tgacgccggt acgctggttt tactcatctc 20400

acgcaataca ctcacgaccc ctggaaccac gacggactga tcgcgatatt ggtattgggt 20460

atccatcgca gtggcatact taagcgtgta tatacttaca ctcaccgcac tgtcttttcg 20520

tttgattaac gcattatcca gcactgaagc taattgacta atacgagtca ggcagctggg 20580

aacaccgctc acctccacag ctttggtacc ggtaatttct ttaacctcgc atcccggtga 20640
tgaaagaata ttctggctgc gtaagtaatg aatgaaccgt ccagtagata aaatattgaa 20700
agtgataacc tgatgtttta ataacgatgc aggatataca tataacatgc tgccatcaaa 20760
ccaggtaagc aaatcatatt gtgctgccag gttattcaaa atatcgaccg gtggtccagg 20820
cggaattttt ccactaaatg tagctgttat caatgggcta atagtaatag ccgtatcata 20880
gttctctgag agcagatgta aaacctctgc taatggcatt tgtctggcat aaagggtgaa 20940
gtcattacct ttccatgata actcatcact ctttgctgta ttgagtataa atagtaaaat 21000
taagattaaa cgtttattta ctaccatttt ataccccacc cgaataaagt ttatggtgat 21060
tgcgtattac atttttaaa atgcaagtta aagccaggtg tttttctatc tcaatagcaa 21120
taagctcaga gctactactt gtggtataat aaccgtttaa ccatccccca tccgctgtga 21180
gctgtatagc ataatcatgg acgtccgggt gtgctgcaag cagtagtgtc acataggcaa 21240
gacaaggctt aggtaagctt tccaggtcat ttaagaacaa agaaatagaa aatgcttctg 21300
agaaaatttc tcctctggca ggatgcccat caatagtcat tatccaggat cggctattac 21360
cttcggcctt gatatcctga attaatggaa tgccttttaa aactgccagc atgaatccct 21420
cctcagacat aaatgggagt ttctatcaaa ttcgctcaca accacatccg taaaaagcct 21480
gattcacatt tatttcgact atacttttct tgtacaatat caggatgctg tctacatata 21540
ccttgtcaca ggcgattcta tcattcggat tttccgataa attcacaatt acattttcag 21600
cactgacata aaaacttaca atttgaaaaa tcatttatta aatgaactgt tacgatgttt 21660
ttacatcgcc atcttattaa aaagtaattg tagtcatcga ctgggttata tatgaagaaa 21720
tttatcttcc taatgataac accatcgatt aatcttctga tgaaactata tgtactgcga 21780
tagtgatcaa gtgccaaaga ttttgcaaca ggcaactgga gggaagcatt atgaatttgc 21840
tcaatctcaa gaatacgctg caaacatctt tagtaatcag gctaactttt ttatttttat 21900
taacaacaat aattatttgg ctgctatctg tgcttaccgc agcttatata tcaatggttc 21960
agaaacggca gcatataata gaggatttat ccgttctatc cgagatgaat attgtactaa 22020
gcaatcaacg gtttgaagaa gctgaacgtg acgctaaaaa tttaatgtat caatgctcat 22080
tagcgactga gattcatcat aacgatattt tccctgaggt gagccggcat ctatctgtcg 22140
gtccttcaaa ttgcacgccg acgctaaacg gagagaagca ccgtctcttt ctgcagtcct 22200
ctgatatcga tgaaaatagc tttcgtcgcg atagttttat tcttaatcat aaaaatgaga 22260
tttcgttatt atctactgat aacccttcag attattcaac tctacagcct ttaacgcgaa 22320
aaagctttcc tttataccca acccatgccg ggttttactg gagtgaacca gaatacataa 22380
acggcaaagg atggcacgct tccgttgcgg ttgccgatca gcaaggcgta ttttttgggg 22440
tgacggttaa acttcccgat ctcattacta agagccacct gccattagat gatagtattc 22500

gagtatggct ggatcaaaac aaccacttat tgccgttttc atacatcccg caaaaaatac 22560

gtacacagtt agaaaatgta acgctgcatg atggatggca gcaaattccc ggatttctga 22620

tattacgcac aaccttgcat ggccccggat ggagtctggt tacgctgtac ccatacggta 22680

atctacataa tcgcatctta aaaattatcc ttcaacaaat ccccttaca ttaacagcat 22740

tggtgttgat gacgtcggct ttttgctggt tactacatcg ctcactggcc aaaccgttat 22800

ggcattttgt cgatgtcatt aataaaaccg caactgcacc gctgagcaca cgtttaccag 22860

cacaacgact ggatgaatta gatagtattg ccggtgcttt taaccaactg cttgatactc 22920

tacaagtcca atacgacaat ctggaaaaca aagtcgcaga gcgcacccag gcgctaaatg 22980

aagcaaaaaa acgcgctgag cgagctaaca aacgtaaaag cattcatctt acggtaataa 23040

gtcatgagtt acgtactccg atgaatggcg tactcggtgc gattgaatta ttacaaacca 23100

ccccttaaa catagagcag caaggattag ctgataccgc cagaaattgt acactgtctt 23160

tgttagctat tattaataat ctgctggatt tttcatgcat cgagtctggt catttcacat 23220

tacatatgga agaaacagcg ttactgccgt tactggacca ggcaatgcaa accatccagg 23280

ggccagcgca aagcaaaaaa ctgtcattac gtacttttgt cggtcaacat gtccctctct 23340

attttcatac cgacagtatc cgtttacggc aaattttggt taatttactc gggaatgcgg 23400

taaaatttac cgaaaccgga gggatacgtc tgacggtcaa gcgtcatgag gaacaattaa 23460

tatttctggt tagcgatagc ggtaaaggga ttgaaataca gcagcagtct caaatcttta 23520

ctgcttttta tcaagcagac acaaattcgc aaggtacagg aattggactg actattgcgt 23580

caagcctggc taaaatgatg ggcggtaatc tgacactaaa aagtgtcccc ggggttggaa 23640

cctgtgtctc gctagtatta cccttacaag aataccagcc gcctcaacca attaaaggga 23700

cactatcagc gccgttctgc ctgcatcgcc aactggcttg ctggggaata cgcggcgaac 23760

caccccacca gcaaaatgcg cttctcaacg cagagctttt gtatttcccc ggaaaactct 23820

acgacctggc gcaacagtta atattgtgta caccaaatat accagtaata aataatttgt 23880

taccccctg gcagttgcag attcttttgg ttgatgatgc cgatattaat cgggatatca 23940

tcggcaaaat gcttgtcagc ctgggacaac acgtcactgt tgccgccagt agtaacgagg 24000

ctctgacttt atcacaacag cagcgattcg atttagtact gattgacatt agaatgccag 24060

aaatagatgg tattgaatgt gtacaattat ggcacgatga gccgaataat ttagatcctg 24120

actgcatgtt tgtggcgcta tccgctagcg tagcgacaga agatattcat cgttgtaaaa 24180

aaaatgggat tcatcattac attaccaaac cagtgacatt ggctacctta gctcgctata 24240

tcagtattgc cgcagaatat caacttttgc gaaatataga gctacaggag caggatccga 24300

gtcgctgctc agcgttactg gcgacagatg atatggtcat taatagcaag attttccaat 24360

cactggacct cttgctggct gatattgaaa atgctgtatc ggctggacaa aaaatcgatc 24420

agttaattca cacattaaaa ggctgtttag gtcaaatagg gcagactgaa ttggtatgct 24480

atgtcataga cattgagaat cgcgtaaaaa tggggaaaat catcgcgctg gaggaactaa 24540

ccgacttacg ccagaaaata cgtatgatct tcaaaaacta caccattact taatattatc 24600

ttaattttcg cgagggcagc aaaatgaaag aatataagat cttattagta gacgatcatg 24660

aaatcatcat taacggcatt atgaatgcct tattaccctg gcctcatttt aaaattgtag 24720

agcatgttaa aaatggtctt gaggtttata atgcctgttg cgcatacgag cctgacatac 24780

ttatccttga tcttagctta cctggcatca atggcctgga tatcattcct caattacatc 24840

agcgttggcc agcaatgaat attctggttt acacagcata ccaacaagag tatatgacca 24900

ttaaaacttt agccgcaggt gctaatggct atgttttaaa aagcagtagt cagcaagttc 24960

tgttagcggc attgcaaaca gtagcagtaa acaagcgtta cattgaccca acgttgaatc 25020

gggaagctat cctggctgaa ttaaacgctg acacgaccaa tcatcaactg cttactttgc 25080

gcgagcgtca ggttcttaaa cttattgacg aggggtatac caatcatggg atcagcgaaa 25140

agctacatat cagtataaaa accgtcgaaa cacaccggat gaatatgatg agaaagctac 25200

aggttcataa agtgacagag ttacttaact gtgcccgaag aatgaggtta atagagtatt 25260

aa 25262

<210> 3
<211> 6053
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Operón *spvRABCD*

<400> 3
atggatttct tgattaataa aaaattaaaa attttcataa cactgatgga aacaggttcc 60

ttcagtatcg caacatcagt actgtatatc acccgaaccc cgctgagcag ggttatttca 120

gacctggaaa gagagctgaa acaaagactc tttatacgga agaatggcac tcttatccca 180

accgaatttg cacaaactat ttatcgaaaa gtaaaatccc attatatttt cttacatgca 240

ctggagcagg aaatcggacc tacgggtaaa acgaaacaac tagaaataat atttgacgaa 300

atttatccgg aaagtttaaa aaatctgatc atttcagcac tgaccatttc cggccaaaaa 360

acaaatataa tggggagagc cgttaacagc caaataatag aagaactgtg tcagacaaac 420

aactgcattg ttatttctgc cagaaattat tttcatcggg aatcgcttgt ctgccggaca 480

tcagtggagg gtggggtcat gttatttatt cctaaaaaat tctttctctg cggcaaacct 540

gatatcaaca ggctggccgg aacacctgta ctttttcatg agggggctaa aaattttaat 600

ctggacacca tataccattt ttttaaacag acactaggta ttaccaaccc tgcattcagt 660

tttgataacg tcgatttgtt cagttcactg taccggttac aacaagggct ggcgatgtta 720

ctcatccccg tcagagtctg tcgggctctg ggattatcaa cagatcacgc actgcacatc 780

aaaggcgtag cgctctgtac ctccttgtat tacccgacca agaaacggga gacaccagat 840

tatcgtaaag ctataaaact gatacagcag gaactgaaac agtccacctt ctgaccttat 900

gcagcgtaag ggccgcaaca cctgtattca cggcatttgc cagattcaga ttgtcagcaa 960

tccccatcct ccatagcggt agttcaccgc ggagcatgga gtaaaccggc tggtcgccgt 1020

caatctgaca cagaatcagt ttgatgctct ggtggattac ctaaaacatg ggcattaacg 1080

cgctggctca cgccacttta ctgaagaaac tgaataacgg tgactatgac ggcgcagcga 1140

atgaattcct gaaatgggac cacgccagcg gtcaggttgt tcccggcctg acccgacgcc 1200

ggagcgctga acgttgttta ttcctgagtt aatttgttgt gccatctttg cacaccggga 1260

accgcgattc cgcacagcag aaaaatagca cataaataaa ctcaatataa gccactcatt 1320

ttctggcaat acaaaataat tcccctgcag acattatcag tcttcaggat ttcattctgt 1380

ttattttcag gagtcatcat tatttatgaa tatgaatcag accaccagtc cggcactttc 1440

acaggtcgaa accgccatcc gggtcccggc agggaatttt gcaaaatata attattattc 1500

cgtgtttgat attgtccgtc agacccgtaa acagtttatt aacgccaata tgtcatggcc 1560

gggatcccgc ggaggtaaag cctgggacct ggcgatgggc caggcgcagt atatccgctg 1620

catgttccga gaaaatcaat tgacccgcag agttcggggg accttgcagc agacaccgga 1680

caatggcacg aacctgagca gttccgctgt cggcggtatt cagggacagg cagagcgtcg 1740

gccggacctg gccaccctga tggtggttaa tgatgccatt aaccagcaaa taccgaccct 1800

gctgccgtat cattttccac acgaccaggt ggagttatct ctgctgaata ccgatgtgtc 1860

gctggaagat attatcagcg agagcagcat tgactggccg tggttcctga gcaactcgct 1920

gaccggcgat aacagtaact atgccatgga gctcgccagc cggctgtcac cagagcagca 1980

gacactgccg accgagccgg acaacagtac cgccactgac ctgacctctt tttaccagac 2040

caatctgggg ctgaaaaccg ccgactatac gccatttgaa gcactgaata cctttgcccg 2100

acagttagcg attaccgttc ccccaggtgg aacagttgat tgcgggtact ctgcgtgcca 2160

gccggcagtt tagcttcccg cgctaccaga gtagtgagca gcagaccatt ctgcagaatc 2220

tgagcgacgt cattgttcag gtgcattcta ccgcgctgta cggcggcagc acttttgaac 2280

aggccgtaga gcagacgctg taagcagaaa atatacctgt ccatcgtcag acggccagtt 2340

tcaggagata gtgtatgttg atactaaatg gtttttcatc tgccacttta gcgctgatca 2400

ctccccctttt cctgccaaaa gggggcaagg cgctgagtca gtcaggccct gacggcctag 2460

ccagtataac gctgtctctg cccatcagcg ccgaacgcgg ctttgcgcct gcgctggcgc 2520

tgcactacag cagcggtggc ggcaatggcc ccttcggcgt gggctggtcc tgcgcgacaa 2580

tgagcattgc ccgccgcacc agccatggcg tgccgcagta taacgacagc gatgagtttc 2640

tggggccgga cggagaagtg ctggttcaaa cgctcagcac cggtgatgcc cccaatcccg 2700

tcacctgctt cgcgtacggt gacgtatcgt tcccgcaaag ctacacggtg acccgctatc 2760

agccccgcac ggagagcagt ttttatcgcc tggagtactg ggtgggcaac agcaacggcg 2820

atgatttctg gttactgcat gacagtaacg gcatcctgca cctgctgggg aaaaccgccg 2880

cagcacgcct cagcgatccg caggccgcct ctcatacggc gcaatggctg gttgaggagt 2940

cggtgacccc tgccggcgag catatctatt actcctactt ggcggagaac ggtgacaatg 3000

tggacctcaa tggggacgag gccggacgcg atcgcagcgc catgcgctat ctcagcaagg 3060

tacagtatgg caacgcgacc cccgccgccg atctgtacct ctggactagc gccacacccg 3120

cggtacagtg gctgttcacc ctagtgtttg actacggcga acgtggtgta gatccacagg 3180

taccgcctgc attcactgct cagaacagct ggctcgcccg ccaggatccc ttctccctgt 3240

ataactacgg ctttgagatc cgcctccatc gcctgtgccg ccaagtcctg atgttccacc 3300

actttcctga tgaactgggt gaagccgata cgctggtttc ccgtctgctg ctggagtatg 3360

acgaaaatcc gatactgaca cagctttgcg ctgctcggac gctggcctat gaaggcgacg 3420

gttatagaag agctcctgtc aacaatatga tgccaccgcc accgccaccg cctcctccga 3480

tgatgggagg taattcatct cgaccaaaat caaaatgggc gattgtagag gaatcaaagc 3540

agattcaagc tctgaggtac tattcagctc aagggtacag tgtgattaat aaatatttac 3600

gtggggatga ttatcctgaa acacaggcaa aagaaactct gctctccaga gactatcttt 3660

ccacaaatga acccagtgat gaggagttta aaaatgccat gtcagtttat ataaatgata 3720

ttgtggaggg attaagttca cttcccgaaa cagatcacag agtcgtatac cggggcctga 3780

agcttgataa gcccgcatta tcggatgtgc tgaaggaata cactactata ggtaatataa 3840

taatagataa agcttttatg agtacatcgc cagataaggc atggataaat gacactattc 3900

tcaacatata cctagaaaaa ggacataaag gtagaatact cggagatgtt gcacatttta 3960

agggagaggc agagatgctt ttccctccaa atactaaact caaaatcgaa agcattgtaa 4020

attgtggatc ccaagacttt gcaagccagc ttagtaagct gagattaagt gatgatgcaa 4080

ctgctgacac aaacaggata aaaagaataa taaacatgag ggtactcaac tcatagatac 4140

taagaatcta ttccagaagt ggtatgagcg gcctagctct ataaggggtt atactccgga 4200

accccagatt tttccgtcac cctaggcccg caaagtagtg catctaaact tttgccatta 4260

cccttcttta actttctgct cggaacggac cgaaatatca ttttttcgcc tgataaaaaa 4320

tgaggttttc tggataacta atcgttttat taaaaaaaac tgagaattta tatctaataa 4380

```
tatggcgata tatccatatc gcaaaggaga tttcccatgc ccataaatag gcctaatcta       4440
aatctaaaca tccctccttt gaatattgta gctgcttatg atggggcgga aataccatct       4500
acaagtaagc acctgaaaaa taatttcaac tccttgcaca accaaatgcg gaagatgccg       4560
gtatcccact ttaaagaggc gctggatgtg cctgactatt cagggatgcg ccagagtggt       4620
ttctttgcta tgagccaagg ttttcagctg aataaccatg gttacgatgt tttcatccat       4680
gctcgtcgag aatcacctca gtctcagggc aaatttgccg gtgacaagtt ccacatcagt       4740
gtgctcaggg atatggtgcc acaagcattt caagcgctgt ccggattgct gttttcagag       4800
gacagtccgg tagataagtg gaaagtgacc gatatggaga aggtcgctca acaagaccgt       4860
gttagcctgg gcgctcagtt cacgttgtat ataaaaccag accaggaaaa ttcgcagtac       4920
agtgcgtcgt ttctccacaa gacacggcaa tttatagagt gtctggaatc cagactatcc       4980
gaaaatgggg ttatttcagg acagtgtcct gagtcagacg ttcatcctga aaattggaaa       5040
tatctcagtt atcgtaatga actacgaagt gggcgtgatg gtggcgaaat gcagagacag       5100
gctttacgtg aggaaccgtt ttatcgtttg atgacagagt aagtatgggt ttggggagca       5160
acggaacagt aaacgccgtt aaacaactat tttaaatgct cattaattta ttaatcaata       5220
aattacaaat tttcattgaa ggctcccccc ttactgacga attccggcac cgtaaaggaa       5280
taacgctcat gcatattgat gtgtccgcac tgtaatggtg aaaattacat aagcaagagc       5340
gtttttttgaa aaatattata tttaatgttt tgtaatatgc attttattga ggtagtgtaa       5400
ctatgagagt ttctggtagt gcgtcatccc aagatataat atcacgtata aattcaaaaa       5460
atatcaataa taatgattca aatgaagtca agagaattaa agatgcgctt tgtattgaat       5520
caaaagagag aattttgtat ccaaaaaatt tgagtctaga taatttaaaa caaatggcta       5580
gatatgtaaa taatacatac atccattact ctgggaactg cgttttatta tcagcgtgtt       5640
tacattataa catacatcac cgacaggata tattaagttc gaagaacact gcctctccta       5700
cagtgggatt agacagcgcc attgttgata aaatcatttt tggtcatgag cttaaccaat       5760
catattgttt aaattccatc gatgaggtgg aaaaagaaat attaaaccgt tatgacatta       5820
agagggaaag ttcttttatc attagcgcag agaactacat agctccaata attggcgaat       5880
gtagacatga tttcaacgct gtggttatct gtgaatatga taaaaaacca tatgtacaat       5940
tcattgattc ttggaaaaca tccaacatac ttcctagctt acaagaaata aaaaaacact       6000
tctcatcatc aggggaattt tatgtcaggg cttatgatga aaaacacgat tga              6053
```

<210> 4
<211> 1590
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Operón *faeHI*

<400> 4
atgaaaataa cgcatcatta taaatctatt atttccgccc tggccgcgct ggccctgttt 60

tattccgcag caccccgggg ccgaattctt gacggcgggg aaatacagtt tcaccgtctg 120

gtcactgacg aggctccgaa atggacctgg caggtgggct cccctgacca gacatgggcg 180

gtggataccg ctgatgcccg tacagcgaac ggacaactgg tttttgattt acgcggcaag 240

ggctccctgc cgtttctgga aggccatctg tatgaggtgg cagagcgcgg tggtcccggc 300

ttcacccctt ttatctcctc cagcagtaac gggcagccgt tttccgtgac ggatggcggc 360

acgacgacgg cgcaacactt ccgcgcctct gtcccggtac gtaacccgga gaacggtcac 420

gtggcgggac agctttcttt cacccttgac cagggaatgg ccgtcagcgc cggacaccag 480

gaagacgggg cggttctacc ggcagcgatg tcgctcgtaa acgggcagag cgtgacgggt 540

gtgcaggccg gcaccctgcc gcagtggctc aaaaaccgtc tgccttccct gctgatgctg 600

aaccggggct tcggtaacgg aatgagcacg gcagataacg gtcaggttat cagtcagggc 660

gtgctggctg acggccgggt gacccggctg gcggcggcct atgcgtccgc cgtctcggat 720

tttgagctga cgctgccggc agaaaacacg ccggtgcagt ggcaggccgg gctgagtgtg 780

acggtgacgg tccagtaaag aacgggcagg gagaggaaga acacaatgaa acgaatgacg 840

attttactgc tggccgccag tctgctgccg tcctgtgtgc tggcgtggaa cacgccgggg 900

gaagacttca gcggagagct gaagctgggc gggccggtga ccagcacccg taatccctgg 960

gtctggaagg tcggggaagg gaacacacag ataaacacga aagctgtctc tgtcctgcgc 1020

agtggggagg aggtaatacc ggttcccctg ccggccatga cggtcctgct gggaaaaact 1080

atcctgacca cccgggccgg ccgggagggg cttgcgccgc aggtgacgta cggtaaggac 1140

acagagggtt ttgcactgac gtggacggca ccgggtatgg catcggtgac actgccggtg 1200

acgggggagg gaaatgtccg taccgggaca ttcaccttcc ggatgcaggc ggcgggtgtg 1260

ctgcgccatg tcctggggaa ccgggcggag tatgccgggc tgtatggcga cctgcagggc 1320

aacggcttgc cgccacagac gcaggtgatg ccggcagggc agacgccggg tgtgctgcag 1380

accctgtttg acagtgaagg cccggtctgg ctccgggaga tgacggtcag cagcgtgtcc 1440

ggactgagcc ggttcagtga cgccgccctg cgccaggttg acggggtata cggcgcacag 1500

acggtggcgg acagcggtga gctgcgtttt aaggggggcgg taccgtcccg ctggcatacc 1560

tccctggcgg tgagcattga atatcggtaa 1590

<210> 5
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-1-P1

<400> 5
ttatggcgct ggaaggattt cctctggcag gcaaccttat aatttcatta gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 6
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-1-P2

<400> 6
atgcaaaata tggtcttaat tatatcatga tgagttcagc caacggtgat catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-1-P3

<400> 7
atgttcttaa caacgttact g 21

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-1-P4

<400> 8
aggtagtacg ttactgacca c 21

<210> 9
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-2-P1

<400> 9
accctcttaa ccttcgcagt ggcctgaaga agcataccaa aagcatttat gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 10
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-2-P2

<400> 10
actgcgtggc gtaaggctca tcaaaatatg accaatgctt aataccatcg catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-2-P3

<400> 11
tgttcgtact gccgatgtcg c 21

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador SPI-2-P4

<400> 12
agtacgacga ctgacgccaa t 21

<210> 13
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-P1

<400> 13
gtgcaaaaac aggtcaccgc catcctgttt ttgcacatca aaacattttt gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 14
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-P2

<400> 14
ttaccccaac agcttgccgt gtttgcgctt gaacataggg atgcgggctt catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador spv-P3

<400> 15
gaccatatct gcctgcctca g 21

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-P4

<400> 16
cagagcccgt tctctaccga c 21

<210> 17
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador fae-P1

<400> 17
ttaccgatat tcaatgctca ccgccaggga ggtatgccag cgggacggta gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 18
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador fae-P2

<400> 18
atgaaaataa cgcatcatta taaatctatt atttccgccc tggccgcgct catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador fae-P3

<400> 19
caggctcccc tgccaccggc t 21

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador fae-P4

<400> 20
caggccaact atctttccct a 21

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S1

<400> 21
ggtcaattaa atccactcag aa 22

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S2

<400> 22
acgggagaca ccagattatc 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S3

<400> 23
ttcagtaaag tggcgtgagc 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S4

<400> 24
ccaggtggag ttatctctgc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S5

<400> 25
actgtcgggc aaaggtattc 20

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S6

<400> 26
tttctggtta ctgcatgaca g 21

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S7

<400> 27
tccagaggta cagatcggc 19

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S8

<400> 28
gaaggaatac actactatag g 21

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S9

<400> 29
gtgtcagcag ttgcatcatc 20

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S10

<400> 30
agtgaccgat atggagaagg 20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S11

<400> 31
aagcctgtct ctgcatttcg 20

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S12

<400> 32
aaccgttatg acattaagag g 21

<210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S13

<400> 33
taaggctctc tattaactta c 21

<210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S14

<400> 34
aaccgcttct ggctgtagc 19

<210> 35
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador spv-S15

<400> 35
ccgtaacaat gacattatcc tc 22

REIVINDICACIONES

1. Cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum*, que comprenden la eliminación de al menos un clúster de genes completo seleccionado de los siguientes puntos (i) a (iv):

(i) Isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 (SPI-2),
(ii) Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1) y SPI-2,
(iii) *spvRABCD,* y
(iv) SPI-1, SPI-2, *spvRABCD*, y *faeHI.*

2. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1, en las que un clúster de genes completo de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 de SEQ ID NO: 2 se elimina (SG3-d2).

3. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 2, se depositan con el N.º de acceso KCCM1 1009P.

4. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1, en las que ambos grupos de genes de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 de SEQ ID NO: 1 y la isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 de SEQ ID NO: 2 se eliminan (SG3-d1d2).

5. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 4, se depositan con el N.º de acceso KCCM11010P.

6. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1, en las que todos los grupos de genes de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 de SEQ ID NO: 1, la isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 de SEQ ID NO: 2, *spvRABCD* de SEQ ID NO: 3, y *faeHI* de SEQ ID NO: 4 se han eliminado (SG3-d4).

7. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 6, se depositan con el N.º de acceso KCCM11011P.

8. Uso de las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de acuerdo con las reivindicaciones anteriores para producir un bacteriófago lítico específico de *Salmonella*.

9. Una composición farmacéutica que comprende las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 como un ingrediente eficaz.

10. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de tifosis aviar, que comprende las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 como un ingrediente eficaz.

11. Una vacuna que comprende las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 como un ingrediente eficaz.

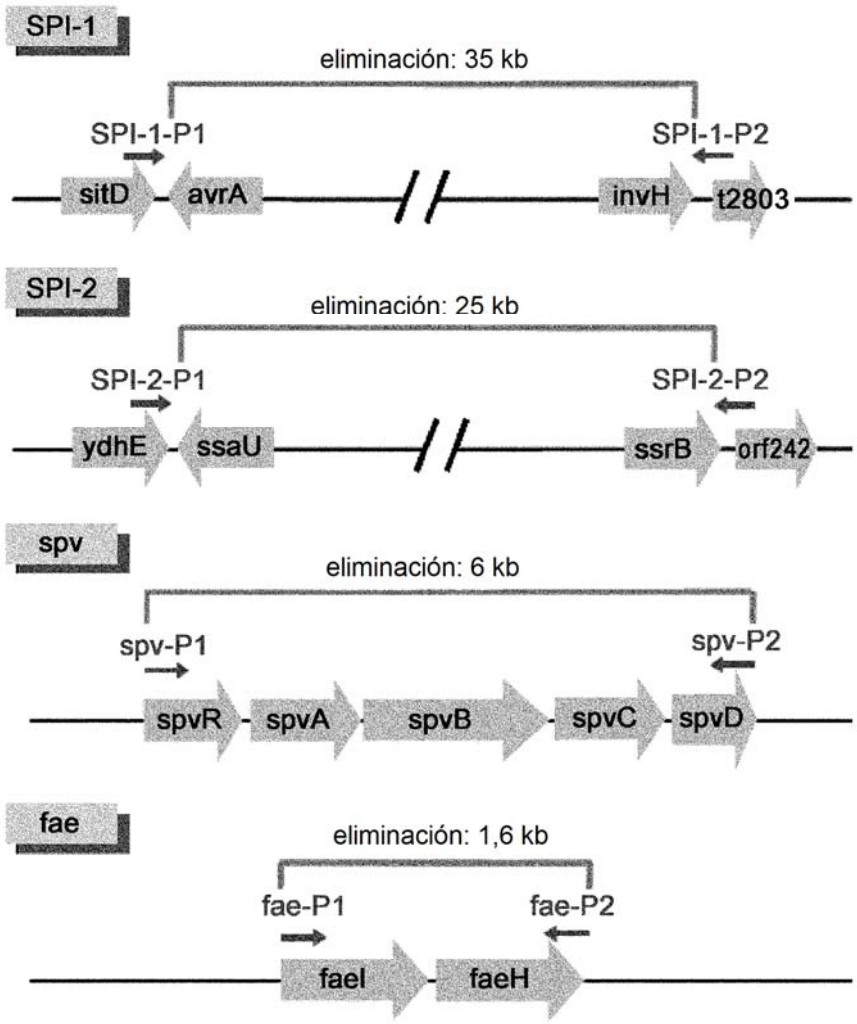
12. Un aditivo para pienso, que comprende las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 como un ingrediente eficaz.

13. Las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 para su uso en un método para la prevención o tratamiento de animales.

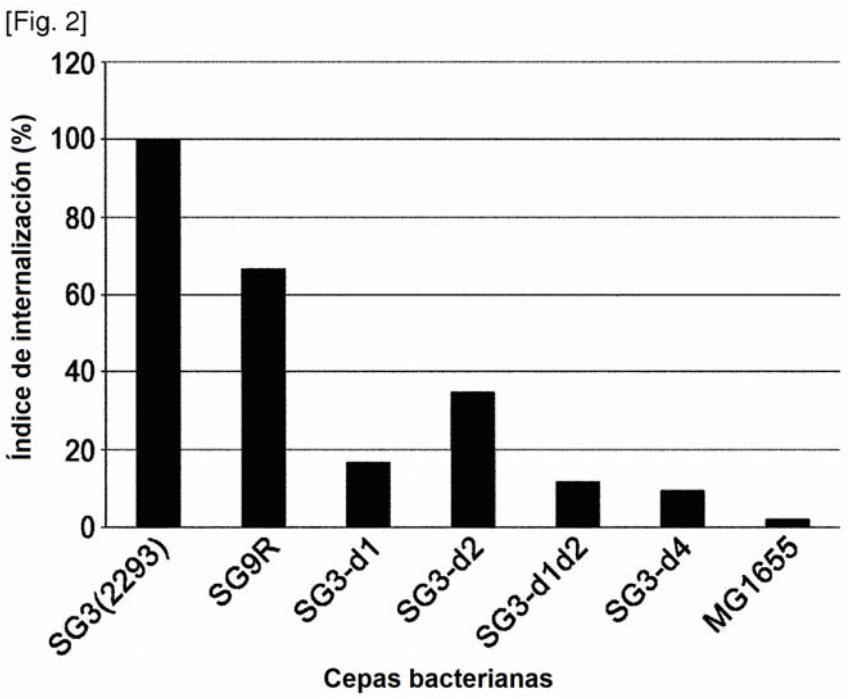
14. Un método para producir un bacteriófago, que comprende:

cultivar las cepas modificadas de *Salmonella Gallinarum* de la reivindicación 1 en un medio;
inocular el bacteriófago en el medio; y
recuperar la progenie de bacteriófagos del medio.

[Fig. 1]


SPI-1
eliminación: 35 kb
SPI-1-P1
SPI-1-P2
sitD
avrA
invH
t2803
SPI-2
eliminación: 25 kb
SPI-2-P1
SPI-2-P2
ydhE
ssaU
ssrB
orf242
spv
eliminación: 6 kb
spv-P1
spv-P2
spvR
spvA
spvB
spvC
spvD
fae
eliminación: 1,6 kb
fae-P1
fae-P2
faeI
faeH

[Fig. 2]


120
100
80
60
40
20
0
Índice de internalización (%)
SG3(2293)
SG9R
SG3-d1
SG3-d2
SG3-d1d2
SG3-d4
MG1655
Cepas bacterianas