



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 322**

51 Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01932626 .3**
96 Fecha de presentación : **25.04.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1283717**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.02.2003**

54 Título: **Vacuna recombinante de leucotoxina de *Fusobacterium necrophorum* y la preparación de la misma.**

30 Prioridad: **25.04.2000 US 558257**
24.04.2001 US 841786

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2011

73 Titular/es:
Kansas State University Research Foundation
2005 Research Park Circle, Suite 105
Manhattan, Kansas 66502, US

72 Inventor/es: **Nagaraja, T., G.;**
Chengappa, M., M.;
Narayanan, Sanjeev, K. y
Stewart, George, C.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 352 322 T3

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

**VACUNA RECOMBINANTE DE LEUCOTOXINA DE FUSOBACTERIUM
NECROPHORUM Y LA PREPARACIÓN DE LA MISMA**

DESCRIPCIÓN

5 LISTADO DE SECUENCIAS

Un Listado impreso de Secuencias acompaña esta solicitud, y también se ha presentado con contenidos idénticos en la forma de un archivo ASCII que puede ser leído por un ordenador sobre un disquete y un CD-ROM.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con métodos para clonación y expresión del gen de la leucotoxina de *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), la secuenciación y caracterización de la proteína leucotoxina expresada por este gen, el truncamiento del gen en una serie de secuencias de nucleótidos, la amplificación de estas secuencias, la expresión y recuperación de los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos, y al utilización de la proteína y los polipéptidos en vacunas recombinantes con el propósito de conferir inmunidad efectiva contra una infección causada por la producción de leucotoxina por el *F. necrophorum*. Más particularmente, está relacionada con la producción de una vacuna de leucotoxina recombinante inactivada generada por la amplificación de cinco fragmentos del gen de la leucotoxina y una región secuencia arriba a través de PCR, digiriendo las secuencias de nucleótidos codificadas por los fragmentos con enzimas de restricción, expresando las secuencias de polipéptidos codificadas por las secuencias de nucleótidos a través de un vector de expresión, recuperando estas proteínas como cinco proteínas truncadas de leucotoxina (o polipéptidos), purificando estas proteínas (o polipéptidos) hasta homogeneidad aparente, con o sin inactivación de las proteínas truncadas y de longitud completa, y combinando las leucotoxinas recombinantes inactivadas con adyuvantes.

25 Descripción del Estado del Arte

Los abscesos hepáticos en lotes de ganado de engorde son un serio problema económico, que provoca la confiscación de más de 3 millones de hígados y una pérdida estimada de \$15 millones anuales en los Estados Unidos. Esta estimación se basa fundamentalmente en la confiscación de hígado y otros órganos, y no incluye las pérdidas económicas derivadas de un consumo reducido de alimento, una menor eficiencia en la alimentación, un menor porcentaje de rendimiento en canal y una menor ganancia de peso. Una gran cantidad de estudios han confirmado que el ganado con hígados con abscesos ganan menos (4 - 5% en promedio) y tienen una menor eficiencia en la alimentación (7% en promedio) comparado con el ganado que tiene hígados sanos. La incidencia promedio de hígados con abscesos en el ganado alimentado con grano se aproxima al 25 - 30%. En menor medida, los abscesos en el hígado en ovejas y en cabras son también un problema económico.

El *F. necrophorum* es un organismo gram negativo, con forma de bastoncillo, no formador de esporas, no móvil, anaerobio estricto y pleomórfico. Morfológicamente, el organismo varía desde bastoncillos cortos hasta filamentosos con extremos puntiagudos y redondeados. La longitud de las células varía desde cuerpos con forma de cocos de 0,5 - 0,7 µm de diámetro hasta filamentos de más de 100 µm. Las colonias superficiales tienen 1 - 2 mm de diámetro, son circulares, desde transparentes hasta opacas, y algunas cepas producen hemólisis α o β. El organismo fermenta glucosa, fructosa y maltosa solo débilmente con un pH final alrededor de 5.0 - 6.3. Fermenta lactato hasta acetato, propionato, y butirato. El butirato es el principal producto de la fermentación de lactato. El indol se produce a partir de peptona. El *F. necrophorum* ha sido aislado a partir de la flora normal en la

cavidad oral, de la cavidad gastrointestinal, y del tracto genitourinario de humanos y de animales. También se sabe que el organismo sobrevive en el suelo.

El *F. necrophorum* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de animales y de humanos. Los factores de virulencia y los mecanismos patogénicos que contribuyen a la transición de este organismo de otro modo comensal a un patógeno no se conocen bien. Una leucotoxina, endotoxina, hemolisina, hemaglutinina, y diferentes enzimas tales como la desoxirribonucleasa y las proteasas han sido sugeridos como posibles factores de virulencia. Sin embargo, varios estudios implican a la leucotoxina, una proteína citotóxica para células polimorfonucleares de rumiantes, como el principal factor de virulencia. La importancia de la leucotoxina como un factor de virulencia en infecciones con *F. necrophorum* está indicada por medio de una correlación entre la producción de la toxina y la habilidad para inducir abscesos en animales de laboratorio, una inhabilidad de las cepas que no producen leucotoxina para inducir abscesos en las patas en el ganado después de inoculación intradérmica, y una relación entre títulos de anticuerpo antileucotoxina y de protección contra la infección en estudios experimentales de desafío.

El *F. necrophorum* es un patógeno oportunista que es el agente etiológico primario de abscesos hepáticos en animales rumiantes. [(Scanlan, y colaboradores, (1983); Bovine rumenitis-liver abscess complex: a bacteriological review. Cornell Vet. 73: 288 - 297; Nagaraja, T. G. y colaboradores, (1998); Liver abscesses in feedlot cattle: A review. J. Anim. Sci., 76: 287 - 298; y Tan, y colaboradores, (1996); Fusobacterium necrophorum infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. Vet. Res. Comm., 20: 113 - 140)]. El organismo ha sido reconocido como un patógeno en animales y humanos desde finales de 1800, y se asocia a un agente etiológico primario o secundario con numerosas condiciones de enfermedad necrótica en animales domésticos y salvajes. Además de los abscesos hepáticos, el organismo es también el agente etiológico primario de la necrosis de las patas, abscesos en las patas, difteria en los terneros, y es frecuentemente aislado de los casos de mastitis, metritis, y lesiones necróticas de la cavidad oral.

Los abscesos hepáticos en el ganado son parte de una enfermedad compleja donde la formación de abscesos es secundaria a los focos primarios de infección en el epitelio del rumen. La patogénesis se puede resumir de la siguiente manera: (1) las lesiones ruminales son inducidas por acidosis como consecuencia de un cambio repentino en la dieta, de alta en fibra a alta en granos, una alimentación prolongada con una dieta alta en granos, u ocasionalmente por la penetración de un cuerpo extraño en el epitelio del rumen; (2) bacterias presentes en el rumen invaden el epitelio y forman abscesos focal en la pared del rumen; y (3) entrada de bacterias en la circulación portal, y son llevadas al hígado donde se localizan en el parénquima con la consecuente formación de abscesos.

La habilidad del *F. necrophorum* para establecerse en el hígado es atribuida a la producción de una toxina que es una proteína secretada de alto peso molecular activa contra leucocitos de los rumiantes llamadas leucotoxina (o leucocidina). La toxina es una proteína extracelular soluble que es citotóxica para neutrófilos, macrófagos, hepatocitos, y células ruminales. La leucotoxina protege contra fagocitosis y se cree que ayuda en el establecimiento del *F. necrophorum* en el hígado alterando directamente el mecanismo normal de defensa e indirectamente por el daño provocado por productos citolíticos liberados por los neutrófilos y macrófagos a las células hepáticas. Por lo tanto, la leucotoxina elaborada por el *F. necrophorum* juega un papel crítico en la infección del hígado por parte del *F. necrophorum* y se cree que es el factor primario de virulencia en la patogénesis de los abscesos hepáticos (Tan y colaboradores, 1996).

Se han descrito cuatro biotipos (A, B, AB y C) de *F. necrophorum*. (Langworth, (1977); Fusobacterium necrophorum: its characteristics and role as an animal pathogen. Bacteriol. Rev. 41:

- 373 - 390). El biotipo A, más frecuente aislado de abscesos de hígado, es más patógeno que el biotipo B, que predomina en abscesos de la pared ruminal. Los biotipos AB y C son raramente aislados en los abscesos del hígado (Berg, y colaboradores, (1982); Studies of *Fusobacterium necrophorum* from bovine hepatic abscesses: Biotypes, quantitation, virulence, and antibiotic susceptibility. Am. J. Vet. Res. 43: 1580 - 1586), y el biotipo A tiene una patogenicidad intermedia que la de los biotipos A y B mientras que el biotipo C no es patógeno. (Shinjo, y colaboradores, (1990); Recognition of biovar C of *Fusobacterium necrophorum* (flugge) Moore and Holdeman as *Fusobacterium pseudonecrophorum* sp. nov., nom. rev. (ex prevot 1940) Int. J. Sys. Bacteriol. 41: 395 - 397). Los biotipos A y B, los tipos más frecuentemente encontrados en abscesos hepáticos, se les ha asignado el estado de subespecies: subespecie *necrophorum* y subespecie *funduliforme*, respectivamente (Shinjo y colaboradores, 1990). La subespecie *necrophorum* es más virulenta, produce más leucotoxina y hemaglutinina, y es más frecuentemente aislada de abscesos hepáticos del ganado que la subespecie *funduliforme*. Los factores de virulencia y los mecanismos patogénicos que contribuyen a la formación de abscesos hepáticos por *F. necrophorum* no se comprenden bien (Tan y colaboradores, 1996). Sin embargo, diferentes estudios implican a la leucotoxina como el principal factor de virulencia (Emery, y colaboradores, (1986); Generation of immunity against *Fusobacterium necrophorum* in mice inoculated with extracts containing leucotoxina. Vet. Microbiol. 12: 255 - 268; Tan y colaboradores, 1996). La importancia de la leucotoxina se evidencia por la correlación entre la producción de toxina y habilidad para inducir abscesos en animales de laboratorio (Coyle-Dennis, y colaboradores, (1979); Correlation between leukocidin production and virulence of two isolates of *Fusobacterium necrophorum*. Am. J. Vet. Res. 40: 274 - 276; Emery y Vaughn, 1986), la inhabilidad de las cepas no productoras de leucotoxina para inducir abscesos en las patas en el ganado después de inoculación intradérmica (Emery, y colaboradores, (1985); Culture characteristics and virulence of strains of *Fusobacterium necrophorum* isolated from feet of cattle and sheep. Australian Vet. J. 62: 43 - 46) y la relación entre títulos anticuerpo antileucotoxina y la protección en estudios de desafío experimental (Saginala, y colaboradores, (1996a); The serum neutralizing antibody response in cattle to *Fusobacterium necrophorum* leukotoxoid and possible protection against experimentally induced hepatic abscesses. Vet. Res. Comm., 20: 493 - 504; Saginala, y colaboradores, (1996b); The serum neutralizing antibody response and protection against experimentally induced liver abscesses in steers vaccinated with *Fusobacterium necrophorum*. Am. J. Vet Res., 57: 483 - 488; y Shinjo, y colaboradores, (1991); Proposal of two subspecies of *Fusobacterium necrophorum* (Flugge) Moore y Holdeman: *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* subsp. nov., nom. rev. (ex Flugge 1886), y *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* subsp. nov., nom. rev. (ex Hall 1898). Int. J. Sys. Bacteriol. 41: 395 - 397).
- 35 Varios investigadores han intentado inducir inmunidad protectora contra *F. necrophorum* por medio del uso de una variedad de componentes antigénicos. Los resultados de esos intentos han variado desde ineficaces hasta una protección significativa. Clark y colaboradores reportaron que el ganado inyectado con sobrenadante de cultivo de *F. necrophorum* que contiene leucotoxina tuvo una incidencia más baja de necrosis de las patas causada por *F. necrophorum*. (Clark, y colaboradores 40 (1986), Studies into immunization of cattle against interdigital necrobacillosis. Aust. Vet. J. 63: 107 - 110). El sobrenadante del cultivo libre de células de una cepa de *F. necrophorum* que produce gran cantidad de leucotoxina (Tan y colaboradores, (1992); Factors affecting leucotoxina activity of *F. necrophorum*. Vet. Microbiol. 33: 15 - 28), mezclado con un adyuvante, se ha demostrado que provoca un título alto de anticuerpo antileucotoxina cuando se inyecta en novillos y proporciona una 45 protección significativa para abscesos hepáticos experimentalmente inducidos (Saginala y

colaboradores, 1996a, b; 1997). Se utiliza la bacteria *F. necrophorum* como agente para inmunizar ganado y ovejas contra necrosis del hígado como se demuestra en la Solicitud EPO No. 460480 de Diciembre 11, 1991 (cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia). Específicamente, se inactivan aislados virulentos de *F. necrophorum* utilizando β -propiolactona, seguido por la adición de adyuvantes. Además, Abe y colaboradores, *Infection and Immunity*, 13: 1473 - 1478, 1976 cultivaron *F. necrophorum* durante 48 horas. Se obtuvieron las células por centrifugación, lavadas tres veces con solución salina, e inactivadas con formalina (0.4% en solución salina). Se inyectaron luego las células inactivadas en ratones para inducir inmunidad. Dos semanas después de la última inyección de refuerzo, cada ratón fue retado con células viables de *F. necrophorum*. Los ratones inmunizados con células muertas y retados con células vivas no tuvieron bacterias detectables en el hígado, pulmón o bazo hasta por 28 días. Se concluyó que la inmunización de ratones con *F. necrophorum* muertas con formalina confirieron protección contra la infección. García y colaboradores, (*Canadian J. Comp. Med.*, 38: 222 - 226, 1974), realizaron ensayos de campo para evaluar la eficacia de toxoides precipitados con alumbre de *F. necrophorum*. La preparación de la vacuna consistió en células lavadas (con un contenido poco probable de leucotoxina) que se rompieron por sonicación. El resultado más prometedor se logró con la inyección de 15.5 mg de proteína de toxoide citoplasmático. En este grupo, se redujeron los incidentes de abscesos hepáticos hasta un 10% desde un 35% en promedio en el grupo de control. Emery y colaboradores, *Vet. Microbiol.*, 12: 255 - 268, 1986, prepararon material por medio de filtración en gel de sobrenadante del cultivo de 18 horas de *F. necrophorum*. Esto provocó una inmunidad significativa contra el reto con *F. necrophorum* viable. La preparación inyectada contenía endotoxina y la mayoría de la actividad leucotóxica. La patente estadounidense No. 5.455.034 (cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia) de Nagaraja y colaboradores divulga que la prevención de la producción de leucotoxina (o la inhibición de su actividad) en animales inmunizados impide el establecimiento de infección con *F. necrophorum*. De este modo, la inmunización de los animales contra la leucotoxina de *F. necrophorum*, de tal manera que los glóbulos blancos de los animales o los macrófagos del tejido puedan fagocitar la bacterias, presento una forma para prevenir enfermedades asociadas con infección por *F. necrophorum*, por ejemplo, abscesos hepáticos en ganado y en ovejas, y necrosis de las patas del ganado. Con el propósito de producir tal vacuna leucotoxoide, se cultivaron bacterias *F. necrophorum* en una forma tal que se reforzara la elaboración de leucotoxina en el sobrenadante. Luego, se terminó el crecimiento de las bacterias y la elaboración de leucotoxina, y se preparó una vacuna por inactivación al menos del sobrenadante que contenía la leucotoxina. En forma más detallada, el método de elaboración de la leucotoxina de la patente 034 implicó primero la formación de un cultivo de bacterias *F. necrophorum* en medio de cultivo, y provocando después de eso el crecimiento de las bacterias en el cultivo y para elaborar simultáneamente leucotoxina en el sobrenadante. Al final de la etapa de cultivo, es decir, al final del tiempo seleccionado para el cultivo dentro del rango aproximado de 4 - 10 horas, se terminó el crecimiento bacteriano y la elaboración de leucotoxina, y se preparó la vacuna leucotoxoide. Esto implicó primero la separación del sobrenadante que contenía la leucotoxina de las bacterias, seguido por inactivación a través del uso de formalina, β -propiolactona, calor, radiación o cualquier otro método conocido de inactivación. Alternativamente, se puede inactivar el cultivo completo para formar la vacuna.

Actualmente, el control de los abscesos hepáticos se hace con el uso de aditivos antimicrobianos en el pienso. Los compuestos antimicrobianos reducen la incidencia de abscesos hepáticos pero no eliminan el problema (Nagaraja y colaboradores, 1998). Por lo tanto, una vacuna eficaz sería muy conveniente para la industria de engorde. El enfoque de la vacuna también podría

aliviar las preocupaciones de salud pública asociadas con el uso de niveles subterapéuticos de antibióticos en la alimentación. Ya que los estudios han indicado que la inmunidad antileucotoxina reduce la incidencia de abscesos hepáticos y la necrobacilosis interdigital (García y colaboradores, 1974; Clark y colaboradores, 1986; Saginala y colaboradores, 1996a, b; 1997), el desarrollo de una

5 vacuna recombinante de leucotoxina será de gran valor en el control de la necrobacilosis hepática e interdigital en el ganado.

RESUMEN DE LA INVENCION

Con el propósito de definir mejor la naturaleza molecular de la leucotoxina de *F. necrophorum*, y como primera etapa para determinar su papel específico en la virulencia de esta

10 bacteria, se aisló el gen de la leucotoxina, se determinó su secuencia de nucleótidos, y se expresó la leucotoxina recombinante en *E. coli*.

El marco de lectura abierta de la leucotoxina (*lktA*) es parte de un operón de múltiples genes que contiene 9.726 pb, y que codifica una proteína que contiene 3.241 aminoácidos con un peso molecular total de 335.956 daltons. La leucotoxina de *F. necrophorum* es muy inestable como se

15 evidencia por medio del análisis de transferencias tipo Western de leucotoxina nativa (purificada del sobrenadante del cultivo, por gel de Sefadex o por afinidad) (Fig. 1). En esta Figura, el carril 1 contiene lisado de células enteras de células de *E. coli* que expresan leucotoxina recombinante de longitud completa, el carril 2 contiene leucotoxina nativa purificada por inmunoafinidad, el carril 3 contiene leucotoxina purificada por gel de Sefadex, y el carril 4 contiene sobrenadante de cultivo de *F.*

20 *necrophorum* concentrado 60 veces. Las transferencias se probaron con antisuero policlonal promovido en conejos contra leucotoxina nativa purificada por afinidad. Debido a la aparente inestabilidad de la proteína leucotoxina recombinante de longitud completa, se truncó la proteína la proteína codificada por el gen en cinco polipéptidos recombinantes (o fragmentos de proteína, BSBSE, SX, GAS, SH y FINAL) que tienen regiones que se superponen por truncamiento del gen de

25 longitud completa en cinco secciones diferentes y amplificación, expresión en *E. coli*, y recuperación de la proteína o del polipéptido codificado por cada una de estas secciones. Estos polipéptidos junto con la proteína de longitud completa son luego analizados para determinar su inmunogenicidad e inmunidad protectora en comparación con la eficacia de la inmunización conferida por la leucotoxina nativa inactivada en sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum*.

30 Específicamente, se extrajo el ADN cromosómico de *F. necrophorum* y se lo digirió parcialmente por medio de endonucleasa de restricción antes de ser fraccionado en tamaño por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa. Se ligaron luego los fragmentos de 10 - 12 kb en un vector de expresión λ ZAP desfosforilado, digerido con *Bam*HI. Se infectaron fagos recombinantes en *Escherichia coli* y se los sembró en placa sobre palcas de agar. Se llevaron a cabo levantamientos de

35 placa (con antisuero policlonal promovido en conejos contra leucotoxina purificada por afinidad) utilizando un kit de inmunoselección. Se identificaron seis fagos recombinantes inmunoreactivos y se los denominó como los clones 816, 611, 513, 911, 101, y 103. Estos clones fueron purificados en placa tres veces para garantizar la pureza, se recuperaron los fagémidos, y se confirmó la inmunorreactividad antileucotoxina de las proteínas codificadas. Esta inmunorreactividad verificó que

40 los clones representaron la leucotoxina nativa de *F. necrophorum*.

La expresión de un polipéptido codificado por el extremo 5' de 3.5 kb de la *lktA* provocó la cesación inmediata del crecimiento y la lisis de las células huésped de *E. coli* sugiriendo que regiones de la leucotoxina podrían ser tóxicas para *E. coli*. Desde luego, el objetivo fue crear superposición de truncamientos del gen que se extienden sobre el ORF de la *lktA* completa de tal manera que los

45 productos polipeptídicos resultantes sean pequeños y relativamente estables en la expresión, pero que

sean lo suficientemente grandes para ser inmunogénicos. También, se investigó la efectividad de diferentes polipéptidos truncados de leucotoxina recombinante solos o en combinaciones como inmunógenos y la inmunidad protectora evaluada contra el reto con *F. necrophorum* en ratones. El uso de ratones como modelo experimental para infección con *F. necrophorum* en ganado está bien establecido (Abe y colaboradores, 1976; Conion y colaboradores, 1977; Smith y colaboradores, 1989; Garcia y McKay, 1978; Emery y Vaughan, 1986). La extensión de los patrones de inmunidad y la infección del ganado ha demostrado que los ratones pueden ser un modelo valioso para evaluar la inmunogenicidad y la protección suministrada por diferentes fracciones de *F. necrophorum* (Garcia y colaboradores, 1975; Garcia y McKay, 1978). Los estudios han indicado también que cepas de *F. necrophorum* que son patógenas en animales domésticos, frecuentemente son patógenas en ratones sugiriendo que la necrobacilosis como enfermedad es similar entre estas especies de animales (Smith y Thornton, 1993).

La secuencia de nucleótidos de la versión de longitud completa del gen se denomina como SEQ ID No. 8 y las secuencias de nucleótidos de los cinco truncamientos del gen de longitud completa son denominadas como BSBSE (SEQ ID No. 9), SX (SEQ ID No. 10), GAS (SEQ ID No. 11), SH (SEQ ID No. 12), y FINAL (SEQ ID No. 13). Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos de la región secuencia arriba del gen de longitud completa se denomina UPS (SEQ ID No. 14). La secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud completa codificada por el gen de *F. necrophorum* se denomina como SEQ ID No.1 y las secuencias de aminoácidos de los fragmentos truncados de proteína codificados respectivamente por BSBSE, SX, GAS, SH y FINAL se denominan como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, y SEQ ID No. 6. En el caso de UPS, el polipéptido o el fragmento truncado de proteína codificado por UPS se denomina como SEQ ID No. 7. Finalmente, la SEQ ID No. 15 es la secuencia de longitud completa del gen junto con las secuencias contiguas.

Se purificaron los polipéptidos recombinantes truncados por medio de cromatografía de afinidad de níquel, y se los inyectó en conejos para elevar el antisuero policlonal. Los anticuerpos surgidos contra dos de los cinco polipéptidos (BSBSE y GAS) neutralizaron la toxicidad de la leucotoxina de *F. necrophorum* contra neutrófilos de bovino. La efectividad de los polipéptidos truncados purificados para inducir una inmunidad protectora se determinó por medio de la inyección de los polipéptidos, en forma individual o en mezclas, homogenizados con adyuvante de Ribi en ratones, seguido por el reto experimental con *F. necrophorum*. Dos polipéptidos (BSBSE y SH) indujeron una protección significativa en ratones contra infección por *F. necrophorum* y el grado de la protección fue mayor que la leucotoxina nativa de longitud completa o el sobrenadante inactivado del cultivo. El estudio aportó mayor credibilidad a la importancia de la leucotoxina como el principal factor de virulencia de *F. necrophorum* y la proteína transporta un(os) dominio(s) o epítipo(s) que induce(n) inmunidad protectora contra infección experimental.

El ADN y las secuencias deducidas de aminoácidos fueron comparados con las secuencias en el GenBank pero no se encontraron similitudes significativas (no secuencias que tengan una identidad de secuencia superior al 22%). Por lo tanto, la leucotoxina de *F. necrophorum* parece ser distinta de todas las leucotoxinas conocidas y toxinas del tipo RTX. Cuando la secuencia deducida de aminoácidos de la región de *lktA* fue sometida al análisis de hidropatía de Kyte - Doolittle (Fig. 3), se encontraron 14 sitios de longitud suficiente y carácter hidrófobo para ser regiones potenciales que abarcan la membrana. Secuencia arriba de la ORF de la leucotoxina está un marco de lectura abierta de al menos 1.4 kb de longitud, que está en la misma orientación. Codifica una proteína que tiene una

significativa similitud de secuencia (21% ó 62 de 283 residuos) con la proteína para utilización de hemo-hemopexina (UxuB) de *Haemophilus influenzae*.

Las leucotoxinas bacterianas y citotoxinas generalmente tienen masas moleculares de menos de 200 kDa. Estas incluyen leucotoxinas caracterizadas de *Pasteurella hemolytica* (104.000 kDa; 10),
 5 *Staphylococcus aureus* (38.000 + 32.000 kDa; 20), o *Actinomyces actinomycetecomitans* (114.000 kDa; 15) u otras toxinas formadoras de poro de bacterias gram negativas (103.000 a 198.000 kDa; 30). Sin embargo, la leucotoxina secretada por *F. necrophorum* mostró que tenía un tamaño aproximadamente de 300 kDa con base en la purificación sobre una columna de Sefadex y análisis SDS-PAGE.

10 Como se las utiliza aquí, se aplicarán las siguientes definiciones: "Identidad de Secuencia" como se la conoce en el arte, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, es decir, una secuencia de referencia y una secuencia dada que es comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina por
 15 comparación de la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias han sido óptimamente alineadas para producir el grado más alto de similitud de las secuencias, como se determina por medio del emparejamiento entre las cadenas de tales secuencias. Después de tal alineación, se determina la identidad de la secuencia con base en una comparación posición por
 20 posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición, los nucleótidos o los residuos de aminoácidos son idénticos. El número total de tales posiciones idénticas se divide luego por el número total de nucleótidos o de residuos en la secuencia de referencia para obtener el % de identidad de la secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente por
 25 medio de métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer
 30 Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y colaboradores, eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo, H., y colaboradores, Applied Math., 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como
 35 referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para producir la mayor correspondencia posible éntrelas secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas de ordenador que se encuentran públicamente disponibles que determinan la identidad de secuencia entre secuencia dadas. Los ejemplos de tales
 40 programas incluyen, pero no se limitan al paquete del programa GCG (Devereux, J., y colaboradores, Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. y colaboradores, J. Molec. Biol., 215: 403 - 410 (1990). El programa BLASTX se encuentra públicamente disponible en NCBI y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. y colaboradores, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. y colaboradores, J. Molec. Biol., 215: 403 -
 45 410 (1990), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia). Estos programas alinean secuencias en forma óptima utilizando pesos predeterminados de huecos con el propósito de producir el nivel más alto de identidad de secuencia entre la secuencia dada y la de referencia. Como ilustración, por medio de un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia dada de polinucleótidos puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en

un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede ser suprimida o sustituida con otros nucleótidos, o un número de nucleótidos hasta del 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede ser insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre aquellas posiciones terminales, intercaladas de forma individual entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En forma análoga, por medio de un polipéptido que tiene una secuencia dada de aminoácidos que tiene al menos, por ejemplo, 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende que la secuencia dada de aminoácidos del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia dada del polipéptido puede incluir hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia dada de un polipéptido que tenga al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede ser suprimida o sustituida con otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta del 5% del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede ser insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones terminales amino o carboxilo de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre aquellas posiciones terminales, intercaladas de forma individual entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservadoras no son incluidas como una correspondencia cuando se determina la identidad de secuencia.

En forma similar, "homología de secuencia", como se la utiliza aquí, también se refiere a un método para determinar la relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, se alinean en forma óptima dos o más secuencias como se describió anteriormente, y se introducen huecos si fuera necesario. Sin embargo, en contraste con la "identidad de secuencia", las sustituciones conservadoras de aminoácidos se cuentan como un correspondencia cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tenga 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, 95% de los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en la secuencia de referencia deben coincidir o incluir una sustitución conservadora con otro aminoácido o nucleótido, o se pueden insertar un número de aminoácidos o de nucleótidos hasta el 5% de los residuos aminoácidos totales o nucleótidos, sin incluir sustituciones conservadoras, en la secuencia de referencia en la secuencia de referencia.

Una "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de residuos de aminoácidos o de nucleótidos con otro residuo de aminoácido o de nucleótido que tenga características similares o propiedades incluido el tamaño, la carga, hidrofobicidad, etc., de tal manera que la funcionalidad total no cambie significativamente.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" a partir de su estado natural, es decir, si esto se presenta en la naturaleza, ha sido cambiado o removido de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido naturalmente presente en un organismo viviente no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", como se emplea el término aquí. Finalmente, todas las referencias y

enseñanzas citadas aquí que no han sido expresamente incorporadas como referencia, se incorporan por este medio como referencia.

Preferiblemente, las secuencias que tienen aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia o aproximadamente al menos 60% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID Nos. 1 - 15 se utilizan para propósitos de la presente invención. Más preferiblemente, las secuencias que tienen aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia o aproximadamente al menos 70% de identidad de secuencia se utilizan para propósitos de la presente invención. Aún más preferiblemente, las secuencias que tienen aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia o aproximadamente al menos 85% de identidad de secuencia se utilizan para los propósitos de la presente invención. Incluso más preferiblemente, las secuencias que tienen aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia o aproximadamente al menos 92% de identidad de secuencia se utilizan para los propósitos de la presente invención. Lo más preferible, las secuencias que tienen aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia o aproximadamente al menos 98% de identidad de secuencia se utilizan para los propósitos de la presente invención. Debido a que tales secuencias son efectivas en el establecimiento de inmunidad protectora en animales propensos a infección con *F. necrophorum*, la presente invención será útil en el tratamiento y la prevención de abscesos hepáticos, necrosis de las patas, abscesos en las patas, y difteria de terneros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un ensayo de transferencia tipo Western de leucotoxinas nativas y recombinantes;
 La Fig. 2 es una ilustración del gen de longitud completa de *F. necrophorum* y un mapa de las regiones truncadas de los genes y de los clones de expresión codificados por las regiones truncadas;
 La Fig. 3 es una gráfica de una hidropatía de Kyte-Doolittle de la leucotoxina de *F. necrophorum*;
 La Fig. 4 es una ilustración del patrón de Hibridación tipo Southern del ADN cromosómico de *F. necrophorum* con insertos de los clones 513, 611, 816, 911, y 101;
 La Fig. 5 son gráficas de hidropatía de Kyte-Doolittle de secuencias deducidas de aminoácidos del gen de leucotoxina de *F. necrophorum* en donde las líneas por encima de la gráfica corresponden a las regiones de los cinco polipéptidos truncados de LktA (BSHSE, SX, GAS, SH, y FINAL);
 La Fig. 6 es una ilustración del locus de la leucotoxina de *F. necrophorum*;
 La Fig. 7a es un análisis de transferencias tipo Western de formas truncadas de proteína purificada de leucotoxina recombinante probada con antisuero antileucotoxina policlonal;
 La Fig. 7b es un análisis de transferencias tipo Western de formas truncadas de proteína purificada de leucotoxina recombinante probada con anticuerpo monoclonal F7B10;
 La Fig. 7c es una transferencia tipo Western de lisados celulares completos de clones de *E. coli* que expresan leucotoxina recombinante de longitud completa probada con el anticuerpo antileucotoxina monoclonal;
 La Fig. 8 es una gráfica que ilustra la evaluación de la actividad leucotóxica por medio de citometría de flujo;
 La Fig. 9 es una gráfica que ilustra la toxicidad de la leucotoxina recombinante y de los polipéptidos truncados por medio de citometría de flujo;
 La Fig. 10 es una ilustración de los patrones de hibridación de *lktA* marcada en forma radioactiva con fragmentos de restricción digeridos con HaeIII de transferencias tipo Southern de los ADN genómicos de *F. necrophorum* subespecie *necrophorum* aislados de abscesos hepáticos; y
 La Fig. 11 es una ilustración de los clones de expresión para las proteínas truncadas denominadas UPS, BSBSE, SX, GAS, SH, y FINAL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

Los siguientes ejemplos exponen modalidades preferidas de la presente invención. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan a manera de ilustración y que nada en ellos debe tomarse como una limitación sobre el alcance global de la invención.

5 EJEMPLO 1

Clonación del Gen de *F. necrophorum* que Codifica Leucotoxina

El ADN cromosómico, extraído de la cepa A25 de la subespecie *necrophorum* de *Fusobacterium necrophorum* (Hull y colaboradores, 1981, Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. Infect. Immun. 33: 933 - 938.), fue parcialmente digerido con la endonucleasa de restricción *Sau3AI*, y fraccionada por tamaños por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa (Baxter - Gabbard, 1972, A simple method for the large scale preparation of sucrose gradients. FEBS. Lett. 20117 - 119). Los fragmentos de ADN de 10 - 12 kb fueron ligados en un vector Express λ ZAP desfosforilado, digerido con *Bam*HI, empacados en la cabeza de un fago lambda y se infectaron los componentes de la cola de la proteína (Stratagene, La Jolla, CA), y se infectaron los fagos recombinantes en MRF XL1-Blue de *Escherichia coli* y sembrados en placa sobre placas de agar. Se llevaron a cabo levantamientos de placa (con antisuero policlonal promovido en conejos contra leucotoxina purificada por afinidad) utilizando el kit de inmunoselección Pico-blue (Stratagene, La Jolla, CA). Se identificaron seis fagos recombinantes inmunoreactivos (816, 611, 513, 911, 101; y 103; Fig. 2). Estos clones fueron purificados en placa tres veces para garantizar la pureza, y se confirmó la inmunorreactividad antileucotoxina de las proteínas.

Caracterización del gen de la leucotoxina**Excisión del inserto clonado de ADN en un vector fagémido**

El vector Express λ ZAP está compuesto de un plásmido, denominado pBK-CMV, que flaquea el ADN insertado clonado y que puede ser fácilmente extirpado con el propósito de obtener un fagémido que contenga al ADN insertado clonado. Por lo tanto, se obtuvo un fagémido recombinante que contiene el inserto de ADN clonado de *F. necrophorum* infectando simultáneamente XL0LR de *E. coli* con el fago auxiliar ExAssist y el fago recombinante (que contiene el ADN clonado de *F. necrophorum*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). Una vez se recuperó el plásmido recombinante, se confirmó la presencia del inserto de ADN por medio de digestión con endonucleasa de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

Mapeo físico de los insertos de ADN de *F. necrophorum*

Se llevó a cabo la digestión con enzima de restricción y el mapeo del fagémido recombinante (Sambrook y colaboradores, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Se utilizaron combinaciones de las enzimas de restricción *Sac*I, *Sal*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Dra*I, *Xba*I, *Hae*III, *Bgl*II, *Sma*I, y *Kpn*I para el mapeo con enzima de restricción ya que existen sitios únicos para estas enzimas en el sitio de clonación múltiple de pBK-CMV. El inserto de ADN de todos los seis clones inmunoreactivos clones contenía sitios *Eco*RI, *Pst*I, *Hind*III, *Dra*I, *Hae*III y *Bgl*II pero no sitios para *Sac*I, *Sma*I, *Sal*I, *Xba*I, *Kpn*I o *Bam*HI.

Hibridación de los fragmentos Clonados de ADN con**ADN cromosómico de *F. necrophorum***

Se llevaron a cabo experimentos de hibridación tipo Southern (Southern, 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503) para confirmar que el ADN clonado que codifica al gen putativo de leucotoxina originado a partir de

la cepa A25 de *F. necrophorum*. Se separaron los insertos de los clones 513, 611, 816 y 911 de la secuencia del vector por medio de electroforesis en gel de agarosa del ADN digerido con enzimas de restricción *SalI* y *XbaI*. Se utiliza el inserto de ADN como sonda para hibridar con ADN cromosómico de *F. necrophorum* digerido con *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, y *HindIII*. Se digirió un control negativo, ADN DH5a de *E. coli*, con *EcoRV*. Los patrones de hibridación tipo Southern incluyeron fragmentos de ADN común indicando que los seis clones portaban insertos de superposición (Fig. 4). La Fig. 2 ilustra la superposición de cada uno de los seis clones inmunoreactivos denominados 816, 611, 513, 911, 101, y 103. Los clones de expresión para péptidos truncados se denominan UPS, BSBSE, SX, GAS, SH, y FINAL mientras que los números entre paréntesis indican el tamaño en kilo bases de cada inserto. Las superposiciones ilustradas en la Fig. 2 fueron confirmadas adicionalmente por medio de análisis de secuencia.

Análisis de la Secuencia de ADN de los Insertos de ADN de *F. necrophorum*

Se construyeron subclones de los ADN insertados clonados con base en el mapa de la enzima de restricción del inserto clonado. Se aisló el ADN del plásmido de los subclones resultantes (Birnboim y Doly, 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids Res. 7: 1513) y se lo sometió a un análisis de secuencia del ADN utilizando el método didesoxi de terminación de cadena de Sanger (Sanger y colaboradores, 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463 - 5467) utilizando iniciadores con base en el vector. Se obtuvieron datos adicionales de la secuencia creando clones de supresión utilizando los sitios de la endonucleasa de restricción descubiertos en la secuenciación preliminar o por secuenciación utilizando iniciadores derivados a partir del ADN secuenciado.

Se clonó y secuenció un total de 9.3 kb de la región Cromosómica de la leucotoxina. Un solo gran marco de lectura abierta (denominado *lktA*) es común a cada uno de los clones inmunoreactivos. El ORF está precedido por un sitio de enlazamiento de una secuencia de (AAGGGGGT) ribosoma (RBS). Ocho pares de bases después de la secuencia del RBS es un codón de inicio (el noveno par de bases) para el marco de lectura abierta, que tiene una longitud aproximada de 8 kb. El codón de detención de *lktA* no se encontraba en esta región. Por lo tanto, se extendieron las secuencias secuencia abajo por medio de amplificación inversa por PCR, seguido por la clonación y secuenciación de la región amplificada.

Extensión del Marco de Lectura Abierta de *lktA* Utilizando PCR Inversa

Se digirió el ADN cromosómico de la cepa A25 de *F. necrophorum* con las endonucleasas de restricción *TaqI*, *EcoRI*, *DdeI*, o *Sau3AI* en forma individual. Después de la digestión completa del ADN cromosómico con cualquiera de estas enzimas, se extrajeron los productos con fenol y cloroformo, y precipitaron en etanol. Bajo condiciones diluidas (volumen final de 100 µl) se ligaron por si mismos 200 ng de ADN digerido utilizando T4 ADN ligasa a 16° C durante la noche (Ochman y colaboradores, 1990, Amplification of flanking sequences by inverse PCR. En, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White (eds); PCR protocols; A guide to methods and applications. Acad. Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, publishers, San Diego, 219 - 227). El ADN ligado se extrajo con fenol y cloroformo, precipitó en etanol y se reconstituyó en 10 µl de agua libre de nucleasa. Se utilizaron dos microlitros del ADN ligado como molde para la reacción PCR con iniciadores hacia adelante y hacia atrás diseñados con base en la secuencia ya conocida por nosotros a partir de reacciones previas de secuenciación. Se clonaron los productos amplificados en el vector plásmido pCR 2.1 (Invitrogen) y se secuenció utilizando secuencias específicas del vector. La secuenciación de seis productos consecutivos de PCR inversa nos permitió identificar el codón de detención para el gen de leucotoxina y la presencia de otro ORF secuencia debajo de *lktA*.

Se amplificó el gen entero de la leucotoxina utilizando ADN polimerasa termoestable (ExTaq) como dos fragmentos utilizando el ADN cromosómico de la cepa A25 de *F. necrophorum* como molde. El 5' de 4.3 kb del marco de lectura abierta de *lktA* que codifica la mitad del terminal N de la leucotoxina, y el 3' de 5.4 kb que representa la mitad de terminal C de la proteína leucotoxina.

- 5 Haciendo uso del único sitio Nhe I presente en esta posición (4.3 kb a partir del codón de inicio), el gen de la leucotoxina se reunió todo junto para producir el ORF gigante de 9.726 kb. Se clonó el gen completo de la leucotoxina en la variante modificada (con la secuencia de codificación para seis residuos de histidina en el terminal N de la proteína expresada) del vector de expresión pET 14b (Novagen Corp. Madison, WI). Este sistema con base en T7 polimerasa debe mejorar la expresión de
- 10 proteína tóxicas, sin daño para la célula huésped de *E. coli*.

EJEMPLO 2

Preparación de Antisero Antileucotoxina Policlonal

- Se purificó la leucotoxina de la cepa A25 subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum* utilizando una columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpo monoclonal antileucotoxina, F7B
- 15 10 (Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, J. J. Staats. 1994. Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 42: 121 - 133). Se homogenizó la leucotoxina nativa purificada por afinidad (0.5 mg) en 100 µl de PBS con un volumen igual de adyuvante completo de Freund y se la inyectó en forma intramuscular en conejos. Se suministró una dosis de refuerzo el día 21 con 0.5 mg de toxina nativa en 100 µl de PBS
- 20 homogenizado con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund. Se recogieron muestras de suero el día 42. Se removieron los anticuerpos de conejo de ocurrencia natural que reaccionan con proteínas de *E. coli* de los antisueros de la siguiente manera. Se sonicaron precipitados celulares de células huésped de MRF XL1-Blue de *E. coli* que crecieron durante la noche en caldo Luria en PBS y se centrifugó para remover restos celulares, y se incubó el sobrenadante con membranas de
- 25 nitrocelulosa de 100 mm de diámetro a 37°C durante 3 horas. Se lavaron luego dos veces las membranas de nitrocelulosa en PBS-T (Tween 20 al 0.05% en PBS [pH 7.2]), se bloqueó en BSA al 2%, y se lavó nuevamente tres veces en PBS-T. Se diluyeron dos ml de antisuero policlonal antileucotoxina de conejo 10 veces en PBS-T que contenía BSA al 0.2% y se expuso a 10 cambios de membranas de nitrocelulosa tratadas con lisado de *E. coli* durante 30 minutos de duración cada vez a
- 30 37°C. Los antisueros policlonales resultantes tuvieron reactividad mínima contra proteínas de *E. coli*. La actividad neutralizadora del suero, como se determinó por medio del ensayo de neutralización con colorante MTT y el título de ELISA indirecto, fueron medidos como se describió previamente (Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa. 1992. Factors affecting leucotoxina activity of *Fusobacterium necrophorum*. *Vet. Microbiol.*; 33: 15 - 28; Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, y J. S. Smith. 1994. Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina. *Am. J. Vet Res.*; 55: 515 - 519; Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, J. J. Staats. 1994. Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 42: 121 - 133).

Extracción de ADN Genómico de *F. necrophorum* y de *E. Coli*

- 40 Se extrajo ADN cromosómico de la subespecie *necrophorum* altamente virulenta de *F. necrophorum*, cepa A25 (18) y de DH5α de *E. coli* (F λ- φ80 Δ [lacZYA-argF] endA1 recA1 hsdR17deoR thi-1 supE44 gyrA96relA1), utilizando una modificación del método descrito por Hull y colaboradores (Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, y S. Falkow. 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract
- 45 infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.*; 33: 933 - 938). Se cultivó *E. coli* en caldo Luria con

agitación bajo condiciones aeróbicas a 37°C y se cultivó durante la noche *F. necrophorum* en un caldo en infusión de corazón y cerebro esterilizado en forma anaeróbica y previamente reducida en botellas de suero bajo condiciones anaeróbicas a 39°C. Se resuspendieron los precipitados celulares en amortiguador TES (sacarosa al 25%, Tris-HCl 50 mM [pH 7.5] y EDTA 1 mM); se los convirtió en
 5 esferoplastos con lisozima a temperatura ambiente durante 30 min; y se lisó utilizando sarcosilo en presencia de proteinasa K a 60°C durante 1 hora. Se extrajo el producto con fenol y cloroformo saturados con amortiguador, y se precipitó el ADN en 2.5 volúmenes de etanol enfriado en hielo. Se resuspendió el precipitado de ADN en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0] y EDTA 1 mM) y se lo sometió a ultra centrifugación en un gradiente en etapas de cloruro de cesio (43.5% a 60%) que
 10 contenía bromuro de etidio (volumen final de 0.4 mg/ml). Se extrajo la banda de ADN cromosómico con amortiguador TE e isopropanol saturado con CsCl para remover el bromuro de etidio y se dializó contra agua bidestilada. Se revisaron la concentración de ADN y la pureza en forma espectrofotométrica.

Biblioteca Genómica y Selección

15 Se digirió el ADN genómico de la cepa A25 de *F. necrophorum* parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3AI*, y se fraccionaron por tamaño los fragmentos en un gradiente de sacarosa. Se clonaron fragmentos de 10 a 12 kb en el vector Lambda zap Express tratado con fosfatasa alcalina y digeridos con *Bam*HI (Stratagene Corp. La Jolla, Calif.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se empacó ADN lambda recombinante (Gigapack gold; Stratagene) y se lo utilizó para
 20 infectar células huésped de MRF XL1Blue (Stratagene). Se levantaron placas sobre membrana de nitrocelulosa y se seleccionó con antisuero policlonal antileucotoxina utilizando un kit de inmunoselección Picoblue de acuerdo con el protocolo del fabricante (Stratagene). Los clones inmunoreactivos fueron purificados en placa tres veces utilizando el antisuero policlonal. Se rescató el ADN recombinante a partir de los clones inmunoreactivos como clones fagémidos (pBKCMV)
 25 utilizando al fago auxiliar Exassist en la cepa XL0LR de *E. coli* de acuerdo con el protocolo del fabricante (Stratagene).

Análisis de Secuenciación del ADN

Los fagémidos de clones inmunoreactivos, los productos PCR purificados, y los subclones de plásmido fueron secuenciados utilizando un vector específico o iniciadores internos con un
 30 secuenciador automatizado de ADN modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, Calif). Se alinearon y analizaron las secuencias de ADN utilizando Sequencher (versión 3.1.1, Gene Codes Corp., Ann Arbor, Mich) y DNA Strider (Versión 1.2).

PCR Inverso y Extensión de la Secuencia

Se digirió el ADN cromosómico de la cepa A25 de *F. necrophorum* únicamente con
 35 endonucleasa de restricción *Taq*I, *Eco*RI, *Dde*I, o *Sau*3AI. Después de la digestión completa del ADN cromosómico con cualquiera de estas enzimas, se extrajeron los productos con fenol y cloroformo, y se precipitó con etanol. Bajo condiciones diluidas (200 ng de ADN digerido en un volumen total de 100 µl), el ADN se ligó por sí mismo utilizando T4 ADN ligasa a 16°C durante la noche. Se extrajo el ADN ligado con fenol y cloroformo, se precipitó con etanol y se reconstituyó en 10 ml de agua libre
 40 de nucleasa. Se utilizaron dos microlitros del ADN ligado como moldes para 100 ml de reacciones PCR con iniciadores hacia adelante y hacia atrás diseñados con base en la secuencia obtenida a partir de reacciones previas de secuenciación. Se clonaron los productos de la PCR inversa en vectores de clonación pCR TOPO (TA, Blunt2 o Blunt4) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corp. San Diego, Calif.), y se secuenció directamente o después de subclonación,

utilizando iniciadores específicos del vector. Se llevaron a cabo seis PCR inversos sucesivos hasta alcanzar el extremo 3' del gen de leucotoxina.

Creación de Truncamientos Génicos

- Se utilizó reacción en cadena de la polimerasa usando polimerasa termoestable (EXTaq; Takara Corporation, Madison, Wis.) para amplificar cinco regiones de superposición del gen de leucotoxina en el rango de tamaño de 1.1 kb a 2.8 kb. Se utilizó ADN cromosómico de la cepa A25 de *F. necrophorum* como molde. Se diseñaron iniciadores hacia adelante para contener un sitio *SacI*, y los iniciadores hacia atrás tenían un sitio *XmaI*, para inserción en el marco en el vector de expresión etiquetado con His pQE30 (Qiagen Inc. Valencia, Calif.). Cada producto génico truncado se superpone con un producto adyacente al menos en 100 pb. Se amplificó y clonó un kb de ADN del extremo 3' del marco de lectura abierta secuencia arriba (*ups*) en el vector pQE30 como se describió anteriormente. Se transformaron plásmidos recombinantes en la cepa huésped M15 de *E. coli* para expresión inducible de proteínas codificadas por genes clonados bajo el control del promotor *lac*. Se purificaron los cinco polipéptidos truncados de leucotoxina y el terminal C del polipéptido secuencia arriba utilizando cromatografía de quelación de níquel bajo condiciones de desnaturalización hasta homogeneidad aparente como se indica por medio de los geles de SDS-PAGE tenidos con plata (datos no mostrados).

Preparación de Antisero Policlonal Contra los Polipéptidos Truncados de Leucotoxina

- Se inyectaron conejos Blancos de Nueva Zelanda en forma intramuscular con los cinco polipéptidos truncados de leucotoxina o el polipéptido secuencia arriba (0.5 mg/animal) precipitado con hidróxido de aluminio. Se suministró una dosis de refuerzo el día 21 (0.5 mg /animal). Se recolectaron muestras de suero los días 21 y 42 y se determinaron los títulos antileucotoxina por medio de ELISA indirecto utilizando leucotoxina nativa purificada por afinidad (Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, J. J. Staats. 1994. Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*; 42: 121 - 133.). Se determinaron las actividades de neutralización de leucotoxina de las muestras de suero del día 42 por medio de ensayo de neutralización con colorante MTT utilizando 200 unidades de toxina (*id.*).

Análisis de Inmunotransferencias

- La leucotoxina nativa purificada por afinidad, los polipéptidos truncados de leucotoxina y el polipéptido secuencia arriba purificado sobre columnas de níquel, lisados de células enteras de clones bacterianos que transportan plásmidos de expresión recombinante, y sobrenadantes concentrados de cultivos fueron resueltos por SDS-PAGE (acrilamida al 6 ó al 10%) y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (electroforesis en minigel II de BioRad y unidad de transferencia). Se utilizaron anticuerpo monoclonal contra leucotoxina nativa (F7B10) o antisueros policlonales surgidos contra leucotoxina nativa, diferentes leucotoxinas truncadas o polipéptidos secuencia arriba para probar las proteínas transferidas tipo Western. Se utilizó IgG anticonejo o antiratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Stigma Chemical Company, St. Louis, MO) como el anticuerpo secundario, y se detectaron las proteínas inmunorreactivas utilizando nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato como sustratos.

Clonación y Expresión de ORF de Leucotoxina de Longitud Completa

- Se amplificó un fragmento de ADN de 4.3 kb que contenía el extremo 5' del marco de lectura abierta de *lktA* hasta el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción interna *NheI* del ADN cromosómico de A25. Se clonó este fragmento en el vector que codifica la resistencia a la kanamicina pCR Blut II TOPO. Un fragmento de ADN de 5.4 kb que se extiende desde el sitio *NheI* hasta el extremo 3' del marco de lectura abierta de *lktA* fue amplificado por PCR y clonado en la

copia baja, plásmido de resistencia a la espectinomicina pCL1921 (Lerner, C.G., and M. Inouye. 1990. Low copy number plasmids for regulated low level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. Nucl. Acid. Res. 18: 4631 - 4633.). Los dos clones plásmidos resultantes fueron ligados juntos haciendo uso del sitio único *NheI* presente en el ORF de *lktA*, y los transformantes se seleccionaron sobre medio que contenía espectinomicina (100 µg/ml) y kanamicina (21 µg/ml). Se removieron luego secuencias específicas del vector pCR Blunt II por digestión del plásmido resultante con *SacI* seguido por ligación bajo condiciones diluidas y selección sobre agar L que contenía 100 µg/ml de espectinomicina. Por lo tanto se clonaron 9.726 pares de bases del ORF de leucotoxina en un plásmido de bajo número de copias pCL1921 para producir pSN1999. Haciendo uso del sitio único *XmaI* introducido en el extremo 3' del marco de lectura abierta y el sitio *SacI* introducido en el extremo 5' del marco de lectura, se clonó la secuencia de codificación entera de *lktA* en el marco en el plásmido de expresión pQE30 para producir pSN2000.

Análisis de Citométrico de Flujo de la Actividad Biológica de Leucotoxina

Se aislaron leucocitos polimorfonucleares periféricos de bovino como se describió previamente (Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa 1992. Factors affecting leucotoxina activity of *Fusobacterium necrophorum*. Vet. Microbiol.; 33: 15 - 28; Tan, Z. L., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, y J. S. Smith. 1994. Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina. Am. J. Vet. Res.; 55: 515 - 519). Las células no tratadas (control negativo) o aquellas tratadas ya sea con 200 unidades de leucotoxina nativa de *F. necrophorum* (control positivo) o con lisados de células enteras a partir de clones que expresan leucotoxina recombinante de longitud completa fueron analizadas con respecto a la viabilidad por medio de citometría de flujo (Facstar, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). En resumen, se incubó 1 ml de los PMN periféricos de bovino (9×10^6 células/ml) con diferentes preparaciones de toxina durante 45 min a 37°C en una cámara que contenía 5% de CO₂. Se lavaron luego las células dos veces en 2 ml de HBSS (pH 7.2) y se resuspendió en 300 µl de HBSS. Estas células fueron tratadas durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente con 10 µl de 5 mg/ml de yoduro de propidio (PI). La fluorescencia roja (FL-2 [585/42]) es proporcional al número de células que han perdido integridad de la membrana y, por lo tanto, no excluye al yoduro de propidio. Las subpoblaciones de leucocitos se muestran en un gráfico de puntos y cerrada de acuerdo al tamaño con base en la dispersión hacia delante (FSC) y granulosidad o 90 grados de dispersión de la luz (SSC). Se colocó una región alrededor de los granulocitos, células de mayor tamaño y la granulosidad y por lo tanto excluyendo los monocitos, y se recolectaron los datos sobre 10.000 células cerradas. La identidad de las células cerradas como granulocitos se indicó por medio de inmunofluorescencia indirecta marcando con anticuerpo monoclonal DH59B (VMRD Inc., Pullman, Washington) que reacciona con el receptor de granulocito-monocito-1. Las señales de fluorescencia mostradas como un gráfico de puntos fueron utilizadas para determinar el porcentaje de células positivas por medio de estadísticas de cuadrante.

Análisis de Transferencia tipo Southern

Se extrajo el ADN genómico a partir de diferentes cepas de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum* y la subespecie *funduliforme* aislada de los contenidos ruminales o de abscesos hepáticos. Se digirió el ADN cromosómico en forma completa con *HaeIII* que escinde una vez el ORF de leucotoxina. Se sometió a electroforesis el ADN digerido en un gel de agarosa al 1% y se lo transfirió como transferencia tipo Southern sobre una membrana de nitrocelulosa. El ORF de *lktA* de longitud completa clonado en pQE30 (pSN2000) fue liberado por medio de digestión con *SacI* y *XmaI*, y se purificó el ADN del inserto en gel, marcado en forma radioactiva con [α -³²S]dATP, y se hibridó.

Número de Acceso de la Secuencia de Nucleótidos

A la secuencia de nucleótidos de *lktA* de la cepa A25 de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum* se le ha asignado el número de acceso AF312861 en el GenBank.

Clonación y Secuencia de Nucleótidos del Determinante de la Leucotoxina de *F. necrophorum*

- 5 Se seleccionó una biblioteca genómica generada por Sau3A del ADN de la cepa A25 de *F. necrophorum* utilizando antisuero policlonal de conejo producido contra la leucotoxina nativa purificada por inmunoafinidad y se identificaron clones inmunoreactivos. Los clones portaban insertos de aproximadamente 4.6, 5.5, y 6.3 kb de longitud. Los clones inmunoreactivos que contenían el marco de lectura abierta de leucotoxina (denominada *lktA*) son descritos en la Fig. 1. Se utilizó PCR
- 10 inversa para extender la región clonada para permitir la terminación de la secuencia del marco de lectura abierta de *lktA*. La secuencia de 11.130 pb del ADN de *F. necrophorum* contenía un ORF completo y dos ORF parciales. El ORF parcial secuencia arriba (*orfB*) incluye los primeros 1.018 pb. El ORF de *lktA* inicia 16 pb secuencia abajo del codón ocre de *lktB*. Un sitio de enlazamiento del ribosoma putativo (RBS) con la secuencia AAGGGGGT precede al ORF de *lktA*. Las primeras dos
- 15 bases del RBS eran las dos últimas bases del codón de detención de *lktB*. El determinante de leucotoxina es de 9.726 pb y codifica una proteína de 3.241 aminoácidos con un peso molecular total de 335.956. La secuencia deducida de la proteína es inusual ya que carece de residuos de cisteína. La proteína tiene un carácter sustancialmente hidrófobo (Fig. 5) y posee 14 regiones con suficiente carácter hidrófobo y longitud para extenderse sobre las membranas. Sin embargo, esta es una toxina
- 20 secretada en *F. necrophorum*. Los dominios transmembrana potenciales pueden suministrar una pista sobre el modo de acción de la leucotoxina sobre los neutrófilos objetivo.

- Una búsqueda en BLAST de la basa de datos de proteínas con la leucotoxina deducida no indicó una significativa similitud de secuencia con ninguna de las citoquinas bacterianas. Se encontró alguna similitud de secuencia, generalmente 17 - 20% de identidad de aminoácidos sobre una ventana
- 25 de 1.500 a 2.000 residuos, para ciertas proteínas de la superficie de la célula de alto peso molecular. Estas incluyen a la proteína SrpA rica en serina de *Streptococcus cristatus* (número de acceso U96166), la hemaglutinina de *Streptococcus gordonii* (AB029393), una proteína de superficie de *Xylella fastidiosa* (AE003982), la proteína A del exterior de la membrana de *Rickensia australis* (AF149108), el precursor del antígeno de superficie de 190 kDa de *R. rickettsii* (A41477), y el antígeno de alto peso
- 30 molecular (HmwA) de *Haemophilus influenzae* (AF 180944). Dado el tamaño molecular de la proteína leucotoxina, que es mayor que cualquier exotoxina bacteriana conocida, su carencia de residuos de cisteína, y su carencia de similitud de secuencia con otras leucotoxinas bacterianas, la proteína *LktA* de *F. necrophorum* parece ser una nueva leucotoxina.

- La secuencia deducida de aminoácidos del terminal carboxilo de la proteína *OrfB* tiene
- 35 alguna identidad de secuencia con la proteína para utilización de hemo-hemopexina (*HxuB*) de *Haemophilus influenzae* (21% de identidad de secuencia sobre una ventana de 283 residuos). El marco de lectura abierta putativo secuencia arriba del determinante de leucotoxina codifica un producto proteico. La secuencia de 1 kb que codifica el terminal carboxilo de este ORF fue clonada dentro de pQE30, y el polipéptido se expresó con la etiqueta de seis histidinas en su terminal N. Se purificó la
- 40 proteína por medio de cromatografía de quelación de níquel, y se elevó el antisuero contra esta proteína en conejos. El análisis de transferencias tipo Western reveló que este antisuero reconoció una proteína de 60 kDa en lisados de células enteras de *F. necrophorum* (datos no mostrados). Esta proteína no estaba presente en sobrenadantes de cultivo o en membranas externas purificadas de *F. necrophorum*.

Secuencia abajo de *lktA* está otro marco aparente de lectura abierta, que se extiende hasta el extremo de las secuencias clonadas (375 pb). El codón de inicio putativo ATG traslapa al codón de detención ópalo de *lktA*. El nucleótido y las secuencias deducidas de aminoácidos no muestran una similitud significativa de secuencia con ninguna de las secuencias actualmente en el GenBank.

5 Creación del Polipéptido Truncado de Leucotoxina y

Características de los Antisueros Policlonales Producidos Contra Ellos

Se amplificó una secuencia de 3.5 kb del extremo 5' del gen de *lktA* por medio de PCR y se la clonó en el marco en el vector de expresión pQE30. La expresión inducida de esta versión truncada de la proteína leucotoxina con IPTG resultó en la cesación inmediata del crecimiento y la lisis de las células huésped de *E. coli*. Con el propósito de obtener mejor expresión de proteína recombinante y menos toxicidad para células huésped de *E. coli*, se construyeron truncamientos más pequeños del gen de la leucotoxina. Los polipéptidos truncados fueron llamados BSHSE, SX, GAS, SH, y FINAL partiendo del terminal N y terminando en el terminal C de la proteína leucotoxina (Fig. 6). En esta Figura, las cajas representan al marco de lectura abierta de leucotoxina (*lktA*) y sus marcos putativos de lectura abierta de flanco. Las líneas por encima de las cajas representan los clones fagémidos (816, 101, y 611) obtenidos de las placas inmunorreactivas en los experimentos de clonación. La región designada iPCR representa la secuencia obtenida a partir de la secuenciación de una serie de clones de PCR inversa. El plásmido pSN2000 contiene al marco de lectura abierta de *lktA* entera. Por debajo de las cajas están los clones que expresan los polipéptidos truncados de leucotoxina. Los números se refieren a las posiciones de los nucleótidos de los límites de cada truncamiento con relación a la secuencia de 11.130 pb depositada en el GenBank.

Cada polipéptido tenía un solapamiento de al menos 21 aminoácidos con su polipéptido adyacente. El polipéptido truncado en el terminal C de la proteína secuencia arriba y el antisuero policlonal producido contra él, sirvió como control negativo en nuestros estudios de toxicidad y neutralización de toxinas. Se analizaron luego la leucotoxina truncada purificada y los polipéptidos secuencia arriba por medio de transferencias tipo Western, por su reactividad contra antisueros policlonales y monoclonales producidos contra la leucotoxina nativa purificada por afinidad, utilizando análisis de transferencias tipo Western. Los antisueros policlonales antileucotoxina reaccionaron fuertemente con polipéptidos BSBSE, SX, y FINAL y débilmente con polipéptidos GAS y SH (Fig. 7a). El anticuerpo antileucotoxina monoclonal reaccionó con el polipéptido del terminal N, BSBSE, pero con ningún otro de los polipéptidos truncados de leucotoxina (Fig. 7b). Como se esperaba, el polipéptido UPS no reaccionó con anticuerpos antileucotoxina monoclonales o policlonales. Los antisueros policlonales producidos en conejos contra cada uno de los polipéptidos truncados de leucotoxina reaccionaron fuertemente con el polipéptido correspondiente y también la leucotoxina nativa. Estos resultados aparecen más abajo en la Tabla 1. Los anticuerpos producidos contra truncamientos individuales reaccionaron débilmente con sus polipéptidos adyacentes debido a la presencia de las secuencias de aminoácidos que se superponen entre ellas (datos no mostrados). El anticuerpo producido contra UPS (desde el ORF secuencia arriba) no pudo reconocer la leucotoxina.

Tabla 1. Neutralización de Leucotoxina de *F. necrophorum* por Antisueros Policlonales de Conejo Producidos Contra los Polipéptidos Truncados Recombinantes.

Inmunógeno	Título del ELISA		Título de la Neutralización
	El polipéptido mismo	Leucotoxina Nativa	
UPS	9.600 ± 1.693	19 ± 17	<5
BSBSE	10.420 ± 1.142	10.680 ± 1.653	1.460 ± 71

(continuación)

Inmunógeno	Título del ELISA		Título de la Neutralización
	El polipéptido mismo	Leucotoxina Nativa	
SX	8.754 ± 983	7.480 ± 1.593	<5
GAS	8.748 ± 865	8.100 ± 1.297	1.280 ± 89
SH	10.180 ± 1.789	8.220 ± 1.301	<5
FINAL	9.750 ± 1.343	9.440 ± 1.262	<5
Los títulos del ELISA se presentan como el promedio de tres determinaciones expresadas como el recíproco de la dilución más alta dando una reacción positiva ($\pm$ desviación estándar). El título de la neutralización es el recíproco de la dilución mayor del antisuero capaz de neutralizar la actividad de 200 unidades de leucotoxina nativa en un ensayo con MTT.			

Los antisueros producidos contra los polipéptidos individuales fueron analizados por la actividad de neutralización contra la leucotoxina nativa de *F. necrophorum*. Se utilizó un ensayo de ELISA para medir la reactividad de cada antisuero contra la leucotoxina. Se utilizó entonces un ensayo de reducción del colorante MTT para determinar si el antisuero podría neutralizar los efectos tóxicos de la leucotoxina contra leucocitos periféricos de bovino. Como se muestra en la Tabla 1, dos de los antisueros podrían neutralizar la leucotoxina. Se produjeron los antisueros activos contra el polipéptido N terminal (BSBSE) y el polipéptido del medio (GAS). Los otros tres antisueros no tuvieron actividad neutralizadora en este ensayo, aunque los datos del ELISA indicaron que cada antisuero reconoció la leucotoxina de *F. necrophorum*.

Creación de Leucotoxina Recombinante de longitud completa y su Toxicidad para Células Polimorfonucleares de Sangre Periférica de Bovino

Se clonó el gen completo de la leucotoxina (9.726 pb) en el vector de expresión pQE30. A diferencia de algunas versiones truncadas de la proteína leucotoxina, la leucotoxina recombinante de longitud completa después de expresión no era tóxica para células huésped de *E. coli*. Cuando se sometieron los lisados de células enteras de clones que expresan leucotoxina de longitud completa a ensayos de transferencias tipo Western, tanto los anticuerpos antileucotoxina monoclonales como los policlonales (no mostrados) reaccionaron con especies proteicas de alto peso molecular (>220 kDa) (Fig. 7c). En esta Figura, MW son los marcadores de peso molecular; Lkt, es leucotoxina purificada por afinidad de *F. necrophorum*; FL-I y FL-UI son clones de longitud completa inducidos o no inducidos con IPTG; Súper es sobrenadante concentrado del cultivo A25 de *F. necrophorum*. Adicionalmente, las flechas denotan las posiciones de la banda reactiva de BSBSE en la Fig. 7b y la leucotoxina de longitud completa en la Fig. 7c. La cantidad de leucotoxina de longitud completa en el sobrenadante del cultivo en el panel C fue insuficiente para ser visualizada como una banda diferente en esta transferencia. La proteína era altamente inestable, como se evidencia por la presencia de numerosas especies de peso molecular menor, que presumiblemente representan productos del rompimiento. Esta inestabilidad fue observada también con leucotoxina nativa que fue purificado por afinidad a partir de sobrenadantes del cultivo de *F. necrophorum*. Los antisueros producidos contra todos los polipéptidos truncados de leucotoxina, incluido el polipéptido FINAL del terminal C, reaccionaron con leucotoxina recombinante sugiriendo que la proteína puede ser expresada en toda su longitud (datos no mostrados). Como se esperaba, el anticuerpo producido contra el polipéptido secuencia arriba no pudo reaccionar con la leucotoxina recombinante de longitud completa.

Los leucocitos polimorfonucleares periféricos de bovino expuestos a lisados de células enteras de longitud completa o a clones recombinantes truncados (12 mg/ml de proteína) antes o después de la inducción con IPTG fueron analizados por la integridad de la membrana utilizando

exclusión de yoduro de propidio y citometría de flujo. Las células de control no tratadas con leucotoxina dieron un valor de línea base de células teñidas con de 5.4% (Fig. 8). En esta Figura, se evaluó el daño de la membrana por medio de la coloración de las células con yoduro de propidio. Se muestran los valores obtenidos después del recuento de 10.000 PMN (barras punteadas) o la fracción de linfocitos (barras sombreadas). Las células fueron no tratadas (control), tratadas con 200 unidades de leucotoxina purificada por afinidad de *F. necrophorum* (leucotoxina Fn) o lisados de *E. coli* que albergan plásmidos de expresión que portan al polipéptido secuencia arriba (pSN100) o al marco de lectura abierta *lktA* de longitud completa (pSN2000). Las designaciones "U" e "I" se refieren a lisados de cultivos no inducidos y a cultivos inducidos con IPTG 1 mM, respectivamente. Los lisados inducidos fueron también analizados después de 1:5, 1:25, y 1:125 diluciones en PBS. Los resultados mostrados son los promedios de tres experimentos y se indica la desviación estándar.

La adición de 200 unidades de MTT de leucotoxina nativa purificada por afinidad resultó en 75.4% de los PMN que absorbieron el colorante. Una unidad de MTT de la toxina se define como el recíproco de la dilución que causa una disminución del 10% en la actividad de reducción del colorante MTT. La preparación de la leucotoxina purificada por afinidad utilizada en este estudio tenía una actividad de 2×10^5 unidades/ml. Los lisados del clon que expresa al polipéptido secuencia arriba (SN 100) no incrementaron el porcentaje de células que se tiñen con PI, indicando que la forma truncada de esta proteína carecía de actividad nociva para la membrana. Los lisados de células enteras de *E. coli* que transportan al gen recombinante de leucotoxina de longitud completa (SN2000), no inducido con IPTG, dio lugar a 9.6% de PMN de bovino que se tiñen con PI, mientras que los lisados de clones inducidos produjeron 27.3% de los PMN que se tiñen. El bajo porcentaje de células dañadas de los lisados no inducidos resultó de la expresión defectuosa de la toxina con este vector, consistente con los resultados obtenidos por medio de los análisis de transferencias tipo Western (no mostrados). La actividad perjudicial para la membrana en el lisado inducido se perdió proporcionalmente cuando se diluyeron las muestras en solución salina amortiguada con fosfato. Los datos indican que la leucotoxina recombinante de longitud completa es tóxica para neutrófilos de bovino.

Las preparaciones de los PMN tenían células residuales contaminantes de menor tamaño y granularidad, que se encontró que eran predominantemente linfocitos por medio de inmunofenotipado con anticuerpo monoclonal específico anti-CD3 y anti-IgM. Se cerraron estas células, y se midieron los efectos de diferentes preparaciones de leucotoxina sobre la viabilidad de estas células como se describe para los PMN. Los linfocitos de control no tratados produjeron un valor de línea base de 13.6% de células teñidas, mientras que la inclusión de 200 unidades de leucotoxina nativa purificada por afinidad resultó en 31.3% de los linfocitos que absorbieron el PI (Fig. 8). La sensibilidad aparentemente menor de los linfocitos comparada con los PMN es característica de la leucotoxina de *F. necrophorum*. Además, la toxina recombinante mostró el mismo grado de actividad contra linfocitos como lo hizo la leucotoxina nativa. Entre los linfocitos tratados con lisados de *E. coli* que portan *lktA* recombinante no inducido de longitud completa, 12.8% fueron positivos para PI comparado con el 19.2% obtenido con lisados de clones inducidos. Por lo tanto, la leucotoxina recombinante expresada tenía propiedades toxicológicas similares a aquella de la leucotoxina nativa purificada del sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum*. Los lisados de *E. coli* con expresión inducida por IPTG de los polipéptidos truncados de leucotoxina o el polipéptido secuencia arriba no mostró actividad nociva para la membrana ya sea contra los PMN de bovino o la población que contiene linfocitos (Fig. 9). En esta Figura, se evaluó el daño a la membrana por medio de coloración de las células con yoduro de propidio. Se muestran los valores obtenidos después del recuento de 10.000 PMN (barras punteadas) o la fracción de linfocitos (barras sombreadas). Las células fueron no

tratadas (control), tratadas con 200 unidades de leucotoxina purificada por afinidad de *F. necrophorum* (toxina nativa), lisados de cultivos inducidos con IPTG de clones que expresan los polipéptidos truncados (ups, BSBSE, SX, GAS, SH, y Final) o la leucotoxina recombinante entera (toxina entera). Los resultados mostrados son los promedios de tres experimentos y se indica la desviación estándar.

Presencia del Determinante de Leucotoxina en Aislados de *F. necrophorum*

Se clonó y secuenció el gen de leucotoxina a partir de la subespecie *necrophorum* A25 de *F. necrophorum*, una cepa originalmente aislada de abscesos hepáticos de bovino. Se llevó a cabo una hibridación de transferencias tipo Southern del ADN cromosómico extraído de diferentes cepas de *F. necrophorum* de ambas subespecies aisladas de contenidos ruminales o abscesos hepáticos utilizando el ORF de leucotoxina como sonda (Fig. 10). En esta Figura, las subespecies *necrophorum* de *F. necrophorum* de abscesos hepáticos están en el carril 1 que es una cepa A21; en el carril 2 que es A25; y en el carril 3 que es A39. Las subespecies *necrophorum* de *F. necrophorum* de contenidos ruminales están en el carril 7 que es RA13; en el carril 8 que es RA15; en el carril 9 que es RA16; en el carril 10 que es RA18; en el carril 11 que es RA26; en el carril 12 que es RA28; y en el carril 13 que es RA29. Los aislados de la subespecie *funduliforme* de *F. necrophorum* de abscesos hepáticos están en el carril 4 que es B17; en el carril 5 que es B29; en el carril 6 que es B35 o contenidos ruminales que están en el carril 14 que es RB33; y en el carril 15 que es RB37. Se describen cepas en la referencia 24. M, marcadores de peso molecular de ADN. Se utilizó la endonucleasa de restricción *HaeIII* para digerir el ADN cromosómico de aislados de *F. necrophorum*. Un único sitio de reconocimiento para esta enzima se presenta 5.933 pb desde el codón de inicio en el ORF de *lktA*. Por lo tanto, deben estar presentes dos fragmentos de hibridación en cepas que portan este gen. Todas las cepas de la subespecie *funduliforme* de *F. necrophorum* aisladas de abscesos hepáticos (B17, B29, y B35) o contenidos ruminales (RB33 y RB37) eran idénticas en sus patrones de hibridación que muestran dos bandas aproximadamente en 7 y 8 kb cada una. También, todos los aislados de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*, excepto A39, aislado de abscesos hepáticos (A21 y A25) y aquellos aislados de contenidos ruminales (RA13, RA15, RA16, RA18, RA26, RA28, y RA29) tenían idénticos patrones de hibridación que muestran dos bandas de aproximadamente 10 y 11 kb cada uno. Una banda única de aproximadamente 10.5 kb, presumiblemente un doblete, hibridó con el gen de la leucotoxina en ADN cromosómico de la cepa A39 (Fig. 10, carril 4). Esto sugiere que puede estar presente alguna heterogeneidad en las secuencias del locus de la leucotoxina entre cepas de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*. Sin embargo, el patrón de hibridación no parece ser un buen indicador para determinación de subespecies.

EJEMPLO 3

35 Construcción de Formas Truncadas de la Leucotoxina

Se amplificó una secuencia de 3.5 kb del extremo 5' del gen de *lktA* por PCR y se la clonó en el marco en el vector de expresión pQE 30 (Qiagen Corporation). La expresión inducida de esta versión truncada de la proteína leucotoxina con IPTG resultó en la cesación inmediata del crecimiento y provocó la lisis de las células huésped *E. coli*. Con el propósito de obtener una mejor expresión de proteína recombinante, se construyeron truncamientos menores del gen de la leucotoxina. Se utilizó reacción en cadena de la polimerasa usando polimerasa termoestable con prueba de la capacidad de lectura (EXTaq; Takara Corp.) para amplificar cinco regiones de solapamiento del gen de la leucotoxina. Se diseñaron los iniciadores hacia adelante para contener un sitio *SacI*, y los isómeros hacia atrás tenían un sitio *XmaI*. Se utilizó ADN cromosómico de A25 de *F. necrophorum* como molde, y se digirieron los productos amplificados con enzimas de restricción *SacI* y *XmaI*, y se lo

clonó en el marco en el vector de expresión de etiqueta His, pQE 30. Se purificaron cinco proteínas truncadas de leucotoxina y el terminal C de la proteína secuencia arriba utilizando cromatografía de quelación de níquel hasta homogeneidad aparente como se indica por medio de los geles de SDS-PAGE teñidos de plata. Se analizaron luego las proteínas por su reactividad con antisue-
 5 policlonales producidos en conejos contra leucotoxina nativa purificada por afinidad utilizando análisis de transferencia tipo Western. Se inyectaron las proteínas purificadas en conejos para producir antisue-
 10 ros policlonales, que a su vez fueron utilizados para llevar a cabo los análisis de transferencias tipo Western y análisis de neutralización (Tabla 2). Los antisue-
 10 ros producidos contra cada proteína reconocieron leucotoxina nativa de *F. necrophorum*. Los antisue-
 10 ros dirigidos contra los polipéptidos BSBSE9 y GAS fueron capaces de neutralizar la actividad de leucotoxina nativa. Por lo tanto, el ORF clonado en efecto representa a la leucotoxina de *F. necrophorum*.

Proteínas Truncadas de Leucotoxina (terminales N a C)	Número de Aminoácidos	Tamaño (en Daltons)	Reconocidas por Anticuerpos Antileucotoxina Nativa	Antisue- ros Producidos Contra Proteínas Truncadas Reconocieron Leucotoxina Nativa	Antisue- ros Neutralizan la Actividad de Leucotoxina Contra los PMN
UPS 9	339	38324	-	-	-
BSBSE 9	377	40810	+	+	+
SX7	926	97453	+	+	-
GAS 15	713	71949	-	+	+
SH 12	628	63457	-	+	-
FINAL 2	774	80590	+	+	-

Producción de una Vacuna Inactivada de Leucotoxina Recombinante

La inmunogenicidad y la inmunidad protectora de las proteínas truncadas de leucotoxina recombinantes de longitud completa se determinaron en ratones y se las comparó con la eficacia de la
 15 inmunización con leucotoxina nativa inactivada en sobrenadante de cultivo de *F. necrophorum*. La utilidad del modelo de ratón en el estudio experimental de infecciones por *Fusobacterium* ha sido bien documentado (Abe y colaboradores, 1986, Emery y Vaughn, 1986).

Preparaciones de Vacunas

Las leucotoxinas recombinantes purificadas (descritas anteriormente) incluida la proteína de
 20 longitud completa se inactivan por medio de la adición de formalina (concentración final del 0.3%) y homogenizadas con Ribi u otros adyuvantes adecuados (10% vol/vol; Ribi Immunochem, Hamilton, MT). La vacuna leucotoxide nativa se prepara con sobrenadante de cultivo de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*, cepa A25 cultivada en caldo PRAS-BHI (Saginala y colaboradores, 1997). Las actividades leucotóxicas de la leucotoxina recombinante y el sobrenadante del cultivo,
 25 antes y después de la inactivación con formalina, son analizadas luego por medio del ensayo de reducción con colorante MTT utilizando leucocitos polimorfonucleares bovinos (PMN) como células objetivo (Tan y colaboradores, 1992). La cantidad de leucotoxina nativa es luego analizada utilizando un ELISA tipo sándwich usando anticuerpo monoclonal purificado (Tan y colaboradores, 1994b).

Inmunogenicidad de la Leucotoxina Recombinante Inactivada en Ratones

30 La inmunogenicidad y los efectos protectores de las leucotoxinas recombinantes inactivadas de longitud completa, y las truncadas se evalúan en comparación con la leucotoxina nativa (sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum*, cepa A25). Se purifican cinco truncamientos que se superponen y la leucotoxina recombinante de longitud completa utilizando las columnas de afinidad

de níquel. Los grupos de tratamiento incluyen control (0.2 ml PBS), leucotoxina nativa, leucotoxinas truncada y recombinante de longitud completa, en forma individual o en combinación (todos los cinco truncamientos en forma individual, y una mezcla de todas las cinco proteínas truncadas en proporción equimolar). Adicionalmente, se analiza una mezcla de las dos proteínas truncadas BSBSE y GAS en concentraciones equimolares por la inmunogenicidad, ya que los antisueros policlonales producidos contra estas dos proteínas neutralizan la actividad de la leucotoxina nativa contra neutrófilos de bovino. Cada preparación de leucotoxina se analiza con dosis de 10 y 50 µg (concentración total de proteína), se administra en forma subcutánea los días 0 y 21. Se utilizan seis ratones (BALB/c de 7 - 8 semanas de edad) en cada grupo de tratamiento. Se recolectan muestras de sangre los días 0, 14, 21, 35, y 42. Se almacena suero a -70°C hasta que sea analizado el anticuerpo antileucotoxina. Después de la última toma de muestra de sangre (el día 42), se retan los ratones en forma intraperitoneal con 0.4 ml de cultivo de la cepa A25 de *F. necrophorum* en fase logarítmica tardía (cultivo de 6 - 7 horas en caldo PRAS-BHI con una absorbancia de 0.65 a 600 nm y con una concentración de células de aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^8$ CFU/ml). El número de bacterias utilizadas para inoculación se enumera por medio de recuentos viables en placas de agar sangre en una Caja anaeróbica de guante (Forma Scientific, Marietta, OH). Se observan los ratones durante 4 días después del reto para registrar la mortalidad y los signos clínicos, y aquellos que sobreviven el reto se les aplica la eutanasia. Se le practica la necropsia a los ratones y se realiza un examen general de los abscesos hepáticos. Adicionalmente, se cultivarán otros órganos y tejido hepático para aislamiento de bacterias anaeróbicas.

A raíz de este estudio, se selecciona la dosis eficaz y la preparación de leucotoxina recombinante y se lleva a cabo un estudio más de inmunización y reto en ratones para confirmar el efecto protector de la leucotoxina recombinante. Se utilizan grupos de ratones BALB/c de 7 - 8 semanas de edad (10 por grupo) y cada grupo recibe una de las siguientes preparaciones de leucotoxina: la mayor parte de proteína leucotoxina recombinante inmunogénica, combinación (dos o más) de la mayoría de las proteínas leucotoxina recombinantes inmunogénicas, y leucotoxina nativa (sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum*). Las proteínas leucotoxina se inactivan con formalina al 0,3%, se mezclan con Ribí o cualquier otro adyuvante adecuado y emulsionado con un homogenizador y se administran en forma subcutánea los días 0 y 21. Se recolectan muestras de sangre los días 0, 14, 21, 35 y 42. Se analizan muestras de suero por el anticuerpo antileucotoxina. Después de la última toma de muestra de sangre (el día 42), se retan los ratones como se describió anteriormente. Se identifican las variantes de superposición de polipéptidos efectivos (los fragmentos truncados de proteína) y se constriñen con el propósito de identificar las secuencias de polipéptido que son más efectivas para conferir protección.

35 Determinación de Anticuerpo Antileucotoxina Inducido por Inmunización

Se analiza suero de ratón por el anticuerpo antileucotoxina por medio de dos métodos. Primero, se analizan muestras de suero por el anticuerpo para neutralización de leucotoxina probando su habilidad para neutralizar la toxina utilizando el ensayo de reducción del colorante MTT con los PMN de ratón mouse y de bovino como las células objetivo (Saginala, y colaboradores, 1996b; Tan y colaboradores, 1994a). Segundo, se analizan muestras de suero por los anticuerpos IgG antileucotoxina por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando leucotoxina purificada por afinidad como el antígeno de recubrimiento. Se lleva a cabo la purificación por afinidad de la leucotoxina utilizando anticuerpo monoclonal MAbF7B 10 (Tan y colaboradores, 1994b).

45 EJEMPLO 4

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Se aisló ADN cromosómico de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*, cepa A25. En resumen, se cultivó durante la noche *F. necrophorum* en caldo PRAS-BHI en botellas de suero a 39°C. Se resuspendieron los precipitados celulares en amortiguador TES (sacarosa al 25%, Tris-HCl 50 mM [pH 7.5] y EDTA 1 mM), se los convirtió en esferoplastos con lisozima a temperatura ambiente durante 30 min, y se lisó utilizando sarcosilo en presencia de proteinasa K a 60°C durante 1 hora. Se extrajo el ADN con fenol y cloroformo saturados con amortiguador, y se precipitó en 2.5 volúmenes de etanol enfriado en hielo y 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5.2). Se resuspendió el precipitado de ADN en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0] y EDTA 1 mM) y se lo corrió durante 20 horas en un gradiente de cloruro de cesio (60% a 43.5%) que contenía bromuro de etidio (volumen final de 0.4 mg/ml). Se extrajo la banda de ADN cromosómico con isopropanol saturado con cloruro de cesio para remover el bromuro de etidio y se dializó contra agua bidestilada. Se revisaron la concentración de ADN y la pureza en forma espectrofotométrica.

Se diseñaron los iniciadores para amplificar el gen de leucotoxina como cinco truncamientos de superposición (Tabla 3). Se escogieron los sitios para apareamiento de los iniciadores, de tal manera que exista un solapamiento de aproximadamente 100 pb con el producto del gen truncado adyacente de leucotoxina. Se diseñó cada iniciador hacia adelante para contener un sitio *SacI* y los iniciadores hacia atrás portaban un sitio *XmaI* (Tabla 3). Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR bajo las siguientes condiciones utilizando una ADN polimerasa termoestable con una función para corrección de pruebas ExTaq (Takara Corp., Madison, Wisconsin): desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min; 36 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, 59°C durante 45 sec, 67°C durante 30 sec, y 72°C durante 1 a 3 min (en min por kb), y una extensión final a 72°C durante 4 min.

Tabla 3. Iniciadores para PCR utilizados para amplificación de segmentos del gen truncado de leucotoxina.

Segmento truncado	Localización en el gen de <i>lktA</i> (pb)	Designación	Secuencia del Iniciador ^a
bsbse	1 - 22	BS-START	tccgagctcATGAGCGGCATCAAAAATAACG
	1130 - 1112	BS-END	tcgccccgggATAGGAGAAATAGAACCTG
sx	919 - 940	SX-START	tccgagctcGGGAGATTTATAAAGAAAGAAG
	3698 - 3679	SX-END	tcgccccgggGATCCGCCCCATGCTCCAAC
gas	3553 - 3572	GAS-START	tccgagctcGGAGCTTCTGGAAGTGTTC
	5693 - 5674	GAS-END	tcgccccgggGTACTATTTTTTATATGTGC
sh	5623 - 5641	SH-START	tccgagctcGCTGCAGTAOGAGCTGGAG
	7510 - 7492	SH-END	tcgccccgggCTGCAGTTCCCAAACCACC
final	7405 - 7425	FIN-START	tccgagctcGGAATTAAAGCCATTGTGAAG
	9726 - 9706	FIN-END	tcgccccgggTCATTTTTTTCCCTTTTTCTCC

^aLas letras minúsculas en las secuencias del iniciador representan bases extras añadidas para incorporar sitios de restricción.

Clonación direccional en un vector de expresión

Los productos génicos amplificados que son truncamientos de superposición que se extienden desde el extremo 5' hasta el extremo 3' del gen de la leucotoxina (*lktA*), fueron llamados BSBSE, SX, GAS, SH, y FINAL (Fig. 11). En esta Figura los números entre paréntesis indican el tamaño en kilobases de cada inserto. Fueron extraídos con fenol y cloroformo y precipitados con etanol como se describió anteriormente. Los productos génicos amplificados de *lktA* y el vector de expresión pQE30 (Qiagen Corp., Valencia, California) fueron digeridos con endonucleasas de

restricción *SacI* y *XmaI* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Después de la digestión, se extrajeron el vector y el ADN del inserto con fenol y cloroformo, se precipitó con etanol, y se ligó durante la noche a 16°C utilizando T4 ADN ligasa (Promega Corp., Madison, Wisconsin). Se digirió el ADN ligado con enzima de restricción

5 *KpnI* antes de transformar químicamente células M15 competentes de *E. coli* según los procedimientos estándar. Los sitios de restricción para *KpnI* están ausentes en el gen entero de *lktA* y están presentes en un sitio único entre los sitios *SacI* y *XmaI* en pQE 30. El vector de expresión pQE 30 carece de selección azul/blanco, por lo tanto la manipulación anterior nos ayudó a enriquecer clones que portan productos del gen truncado de leucotoxina. Se sembraron en placa los

10 transformantes sobre placas de agar Luria que contenían ampicilina (100 ug/ml) y kanamicina (20 ug/ml) para seleccionar clones que contenían los plásmidos pQE30 y pRep4.

Expression of truncated leucotoxina polypeptides

Se purificó el ADN del plásmido de los transformantes utilizando columnas miniprep Wizard SV (Promega), y se revisó la orientación del inserto por medio de secuenciación con un iniciador

15 5'QE específico del vector que se aparea secuencia arriba con el MCS utilizando un secuenciador automatizado Applied Biosystems 373A. Se indujeron clones positivos para la expresión de polipéptidos con IPTG, se compararon los lisados de células enteras de inducidas y no inducidas para polipéptidos inmunoreactivos en una transferencia tipo Western utilizando antisueros policlonales producidos en conejos contra leucotoxina nativa purificada por afinidad (Tan y colaboradores, 1994d).

Preparación de antígeno

Debido a la presencia de sus codones en la secuencia, secuencia arriba de los MCS en el vector pQE 30, se añaden seis residuos de histidina en el terminal N de los polipéptidos expresados. Se purificaron los polipéptidos expresados utilizando columnas de afinidad de níquel bajo condiciones desnaturalizantes utilizando clorhidrato de guanidinio, de acuerdo con las instrucciones del fabricante

25 (Qiagen). Los polipéptidos purificados en columna fueron dializados durante 48 horas a 4°C contra solución salina estéril amortiguada con fosfato (0.1 M, pH 7.2) para remover cualquier traza de urea, y se concentró en filtros Ultrafree-Biomax 30 (Millipore Corp. Bedford, Massachusetts), que retiene moléculas de tamaños por encima de 30 kDa. Se analizaron las concentraciones de proteína utilizando el ensayo BCA (Pierce, Rockfort, Illinois) y se revisó la pureza con análisis SDS-PAGE seguido por

30 coloración con plata. Se purificó leucotoxina nativa del sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum* utilizando columnas de inmuoafinidad con anticuerpo monoclonal antileucotoxina (F7B10) como se describió previamente. También, se elaboró vacuna leucotoxoide (sobrenadante del cultivo de 12 horas inactivado con formaldehído al 0.3%) como se describió previamente (Saginala y colaboradores, 1997).

Preparación de antisuero policlonal contra polipéptidos truncados

Se inyectaron cinco ratones Blancos Nueva Zelanda en forma intramuscular con los cinco polipéptidos truncados de leucotoxina (0.5 mg/animal) precipitados con hidróxido de aluminio. Se suministró una dosis de refuerzo el día 21 (0.5 mg /animal). Se recolectaron muestras de suero los días 21 y 42 y se determinaron los títulos de antileucotoxina por medio de ELISA indirecto utilizando

40 leucotoxina nativa purificada por afinidad. Se determinó la actividad de neutralización de leucotoxina de muestras de suero del día 42 por medio del ensayo de neutralización del colorante MIT. Se calculó la relación de neutralización, que fue la dilución del antisuero que provocó la neutralización dividida por su título de ELISA, para cada polipéptido truncado.

EJEMPLO 5

45 Vacuna e Inmunización

Cien ratones (100) de 8 a 10 semanas de edad, identificados por medio de etiquetas en sus orejas, fueron divididos aleatoriamente en 10 grupos de 10 ratones cada uno. Los grupos recibieron cinco polipéptidos truncados de leucotoxina (BSBSE, SX, GAS, SH, y FINAL) individualmente, una mezcla de BSBSE y GAS, una mezcla de todos los cinco polipéptidos truncados, leucotoxina nativa purificada por afinidad, sobrenadante del cultivo inactivado, o PBS emulsionado con adyuvante Ribi. Cada ratón fue inyectado en forma subcutánea (en dos sitios cada uno con 100 µl entre los omóplatos) el día 0 y el día 21 con 200 µl de una de las preparaciones anteriores. La cantidad total de antígeno en cada inyección (excepto con el sobrenadante del cultivo o PBS) fue de 10 µg por animal. Se utilizó el sobrenadante de cultivo inactivado (concentración de 12 mg/ml de proteína) sin dilución para reconstituir el adyuvante Ribi (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) y se inyectó cada ratón con 200 µl (2.4 mg de proteína) de la preparación emulsionada. El grupo de control negativo recibió 200 µl de PBS emulsionado con el adyuvante Ribi.

EJEMPLO 6

Determinación de anticuerpos antileucotoxina inducidos por inmunización

Se recolectó sangre para separación del suero de la vena safena derecha de cada ratón los días 0, 21 y 42, y directamente del corazón después de la eutanasia. Se analizaron los títulos del anticuerpo antileucotoxina por medio de ELISA indirecto como se describió previamente con ligeras modificaciones. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pozos (placas para ensayo Falcon Probind, Beckton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey) con 50 µl (2 µg/ml) por pozo de leucotoxina nativa purificada por afinidad a 37°C durante 2 horas. Se bloquearon los pozos con albúmina de suero bovino al 3% (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) en PBS a 37°C durante 2 horas. Se añadieron 50 µl de una dilución 1 en 25 de muestras de suero en PHS-T (Tween 20 al 0.05% en PBS) por duplicado y se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora. Después de 6 lavadas con PHS-T, se añadieron 100 µl de inmunoglobulina antiratón biotinilada de cabra (Accurate Chemicals and Scientific Corp., Westbury, New York) a cada pozo y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se lavaron las placas 6 veces con PBS-T y se añadieron 50 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano a cada pozo, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de lavar los pozos 6 veces con PBS-T, se añadieron 100 µl de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico]; Sigma) y H₂O₂ en amortiguador de fosfato-citrato (pH 4.0) a cada pozo, y se incubaron las placas durante 30 min, o hasta el desarrollo de color, a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en forma colorimétrica a 410 nm en un lector de placas de 96 pozos (Molecular Devices, California).

EJEMPLO 7

Reto experimental con *Fusobacterium necrophorum*

Se cultivó la subespecie *necrophorum* de *Fusobacterium necrophorum*, cepa A25 con una OD₆₀₀ de 0.7 en caldo PRAS-BHI y se inyectaron 0.4 ml de este cultivo en fase logarítmica tardía en forma intraperitoneal en los ratones. Se incubó el inóculo que tenía una concentración bacteriana de 4.7×10^8 CFU/ml como se determinó por medio de siembra en palca por propagación sobre placas de agar sangre (Remel, Lenexa, Kansas) en una caja anaeróbica de guante (Forma Scientific, Marietta, Ohio). Se observaron los ratones durante 4 días después del reto para registrar los signos clínicos y la mortalidad. Los ratones que sobrevivieron durante 4 días después del reto se les practicó la eutanasia, se le hizo necropsia y fueron examinados por la presencia de abscesos hepáticos y otros órganos internos.

EJEMPLO 8

Enumeración de la cantidad de *Fusobacterium necrophorum* en el hígado

Se recolectaron los hígados de los ratones en la necropsia, se pesaron y homogenizaron en un homogenizador de tejidos durante 1 min en caldo PRAS-BHI. Se hizo una dilución de 10 veces del homogenato dentro de una caja anaeróbica de Guante para procesamiento posterior. Se dispensaron 200 µl de medio lactato modificado en cada pozo de la placa de cultivo de tejidos de 96 pozos (Falcon, Beckton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey). Se transfirieron 50 µl de una dilución 1 en 10 de hígado homogenizado a los pozos sobre el primer carril (8 pozos) y se hizo una dilución serial (cinco veces) hasta el onceavo pozo. Los pozos en el doceavo carril eran controles negativos. Se incubaron las placas en una caja de Guante a 39°C durante 48 horas. Se añadió reactivo de Kovac (20 µl a cada uno) a cada pozo para detectar la producción de indol, presuntivo de *F. necrophorum*. Se enumeró la carga bacteriana de *F. necrophorum* en el hígado por medio del análisis del número más probable (MPN) (Rowe, R., Todd, R., y Waide, J. 1977. Microtechnique for most-probable-number analysis. Appl. Environ. Microbiol. 33: 675 - 680.). Se sembraron también muestras homogenizadas de tejido hepático en placas de agar sangre y se identificaron las colonias utilizando el sistema Rapid ANAII (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Georgia).

EJEMPLO 9

Análisis Estadísticos

Se analizaron las mediciones de ELISA en suero (valores de absorbancia por ml de suero) utilizando el procedimiento Proc Mixed de SAS (SAS systems, Cary, North Carolina). Se analizaron el peso de los hígados y los recuentos bacterianos, transformados por logaritmos, utilizando el programa PROC GLM de SAS. Los valores P menores a 0.01 fueron considerados significativos.

Resultados

Clonación y expresión de truncamientos del gen de leucotoxina

La clonación en marco de los truncamientos amplificados por PCR del gen de la leucotoxina (*lktA*) en el plásmido pQE 30 se llevó a cabo como se describió anteriormente por medio de la incorporación de sitios de restricción para *SacI* y *XmaI* en los iniciadores hacia adelante y hacia atrás respectivamente. La inducción de los clones que transportan diferentes truncamientos no produjo cuerpos de inclusión en las células huésped de *E. coli*. Sin embargo, la purificación de los polipéptidos expresados bajo condiciones nativas no tuvo éxito. Por lo tanto, se purificaron los polipéptidos utilizando columnas de afinidad de níquel después de la desnaturalización con isocianato de guanidinio. Los polipéptidos truncados desnaturalizados, después de diálisis contra PBS, carecían de toxicidad para los PMN.

Títulos de anticuerpo antileucotoxina en conejos

Los títulos de anticuerpo antileucotoxina en conejos inyectados con polipéptidos truncados se muestran más abajo en la Tabla 4. Los antisueros producidos contra polipéptidos truncados de leucotoxina, BSBSE y GAS, neutralizaron la toxicidad de la leucotoxina nativa purificada por afinidad contra los PMN periféricos de bovino. La actividad de neutralización para antisueros policlonales producidos contra BSBSE y GAS era similar como se evidencia a partir de sus relaciones idénticas de neutralización (0.146).

Tabla 4. Títulos de anticuerpo antileucotoxina en conejos inyectados con proteínas truncadas de leucotoxina

Proteínas truncadas	Tamaño (en Daltons)	Título LISA el día 21	Título LISA el día 42 (b)	Título de neutralización el día 42 (a)	Relación de neutralización (a/b)
BSBSE	40810	1250	10000	1460	0.146
SX	97453	1000	8750	0	0

Proteínas truncadas	Tamaño (en Daltons)	Título LISA el día 21	Título LISA el día 42 (b)	Título de neutralización el día 42 (a)	Relación de neutralización (a/b)
GAS	71949	1150	8750	1280	0.146
SH	63457	1000	10000	0	0
FINAL	80590	875	9750	0	0

Respuesta del anticuerpo antileucotoxina en ratones

Las absorbancias promedio por ml de suero, determinadas por ELISA de ratones vacunados con diferentes polipéptidos leucotoxina se muestran en la Tabla 5.

- 5 **Tabla 5.** Respuesta del anticuerpo antileucotoxina en ratones inyectados con diferentes preparaciones de leucotoxina.

Preparaciones de la vacuna	D 0	D 21	D 42	D 46 (post- mortem)
PBS	63.6 ^a	65.3 ^a	66.9 ^a	126.3 ^d
BSBSE	52.9 ^a	90.2 ^b	179.4 ^c	129.1 ^d
SX	54.1 ^a	77.6 ^{ab}	186.4 ^{c*}	144.5 ^d
GAS	61.0 ^a	77.6 ^{ab}	97.1b ^{c*}	109.6 ^{cd}
SH	60.95 ^a	101 ^{b*}	163.8 ^{c*}	130.0 ^d
FINAL	63.9 ^a	66.2 ^{ab}	95.7b ^{c*}	121.7 ^{cd}
BSBSE + GAS	79.7 ^a	82.5 ^a	161.1 ^{c*}	172.7 ^{cd*}
TODOS LOS CINCO	66.1 ^a	98.9 ^{b*}	189 ^{c*}	219 ^{d*}
Leucotoxina Nativa	59.6 ^a	101.3 ^{b*}	235.5 ^{c*}	205.2 ^{d*}
Sobrenadante del Cultivo	76.4 ^a	105.1 ^{b*}	205.4 ^{c*}	230.1 ^{cd*}

Los números con los mismos superíndices no fueron significativamente diferentes de los valores por ELISA de los ratones que pertenecen al mismo grupo en diferentes períodos de muestreo. *Significativamente diferente del control negativo (PBS).

- 10 El día 21, los ratones vacunados con leucotoxina nativa purificada por afinidad, truncamientos BSBSE o SH, mezcla de los cinco, o sobrenadante del cultivo tenían niveles más altos de anticuerpo antileucotoxina comparado con el día 0. El suero recolectado el día 21 de los grupos vacunados con polipéptido truncado SH, la mezcla de los cinco truncamientos, la leucotoxina nativa purificada por afinidad o sobrenadante del cultivo, tenían niveles significativamente superiores de anticuerpo antileucotoxina comparado con el grupo de control (PBS) ($p < 0.01$). No hubo un aumento significativo en los niveles de anticuerpo el día 21 entre ratones vacunados con polipéptidos truncados SX, GAS, FINAL, una combinación de BSBSE y GAS o PBS. Los ratones pertenecientes al grupo que fue vacunado con sobrenadante del cultivo, tenían títulos de anticuerpo significativamente superiores ($P < 0.01$) de leucotoxina que los ratones en otros grupos.

- 20 El día 42, hubo un incremento significativo en la respuesta de anticuerpo comparado con el día 21 entre ratones vacunados con todas las preparaciones de leucotoxina excepto GAS ($P < 0.01$). Los niveles de anticuerpo antileucotoxina en suero de ratones vacunados con diferentes polipéptidos leucotoxina (incluido GAS) fueron significativamente superiores comparado con el control. La respuesta de anticuerpos a una mezcla de BSBSE + GAS fue similar a la de BSBSE solo pero superior a la del polipéptido GAS. La respuesta de anticuerpos a la mezcla de todos los cinco fue similar a BSBSE, SX, SH pero superior a la de los polipéptidos GAS o FINAL. Los ratones vacunados con leucotoxina nativa purificada por afinidad tenían los niveles más altos de anticuerpo antileucotoxina el
- 25 día 42, seguido por aquellos vacunados con el sobrenadante del cultivo y una mezcla de todos los

cinco truncamientos que se superponen. El polipéptido truncado GAS falló en producir niveles de anticuerpo antileucotoxina en forma significativa después de la segunda vacunación comparado con el día 21.

- El día 46, 4 días después del reto con *F. necrophorum* (post-mortem), las muestras de suero de ratones vacunados con polipéptidos leucotoxina, BSBSE, SX, y SH, y leucotoxina nativa purificada por afinidad tenían títulos menores de anticuerpo antileucotoxina comparado con el día 42. Los niveles de anticuerpo antileucotoxina en ratones vacunados con GAS, FINAL, mezcla de polipéptidos truncados o sobrenadante del cultivo tenían mayores niveles de anticuerpo comparado con el día 42. También, los niveles de anticuerpo antileucotoxina en ratones en el grupo de control (vacunados con PBS) el día 46 mostraron un incremento significativo con relación al suero recolectado antes del reto (día 42). Sin embargo, los niveles de anticuerpo en ratones inyectados con BSBSE + GAS, mezcla de todos los cinco, leucotoxina nativa y sobrenadante del cultivo fueron superiores a aquellos del grupo de control.

Infección experimental

- Después del reto con *F. necrophorum*, los ratones en todos los grupos exhibieron choque agudo en el lapso de 24 horas quizás inducido por LPS. Los ratones en el control o en el grupo vacunado con el sobrenadante del cultivo inactivado parecían ser los más afectados. Los ratones estaban apáticos, recostados y no parecían consumir alimento o agua. Los ratones vacunados con diferentes preparaciones de leucotoxina se recuperaron después de 2 días después del reto. Los ratones en el grupo de control no se recuperaron completamente de los síntomas del choque incluso el día 4 después del reto. Dos ratones en el grupo de control y un ratón en el grupo vacunado con el polipéptido GAS murieron aproximadamente 36 horas después del reto. Se aislaron los cultivos puros de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum* de la sangre del corazón de los tres ratones.

Patología hepática

- Los ratones recibieron la eutanasia 4 días después del reto y se examinaron los órganos internos por los abscesos. Ninguno de los ratones vacunados con truncamiento de leucotoxina SH tenía ningún absceso hepático (Tabla 6).

- Tabla 6.** Mortalidad, formación de abscesos hepáticos, peso del hígado y carga bacteriana en el hígado en ratones vacunados con preparaciones de leucotoxina después del reto experimental con *Fusobacterium necrophorum*.

Preparaciones de leucotoxina	Número de ratones muertos	No. de ratones con abscesos hepáticos (%) (g)	Peso promedio del hígado	Recuento de MPN en el hígado
Control (PBS)	2/10	0/8 (0) ^a	1.86	5.3 x 10 ⁶
BSBSE	0/10	1/10 (10)	1.29*	1.2 x 10 ^{3*}
SX	0/10	5/10(50)	1.39*	8.2 x 10 ^{3*}
GAS	1/10	3/9 (33)	1.32*	1.5 x 10 ⁶
SH	0/10	0/10 (0)	1.20*	5.3 x 10 ^{2*}
FINAL	0/10	3/10 (30)	1.44*	6.8 x 10 ^{3*}
BSBSE + GAS	0/10	3/10 (30)	1.27*	1.4 x 10 ^{5*}
TODOS LOS CINCO	0/10	3/10 (30)	1.33*	5.5 x 10 ^{10*}
Leucotoxina Nativa	0/10	3/10 (30)	1.31*	5.9 x 10 ^{4*}
Sobrenadante del Cultivo	0/10	1/10 (10)	1.51*	1.6 x 10 ^{4*}
*Difiere del grupo de control (P < 0.01)				

Preparaciones de leucotoxina	Número de ratones muertos	No. de ratones con abscesos hepáticos (%) (g)	Peso promedio del hígado	Recuento de MPN en el hígado
^a Hígados sin abscesos, pero se encontraban muy congestionados y con ictericia.				

Los ocho ratones que sobrevivieron en el grupo de control tenían hígados altamente congestionados y con ictericia, pero no tenían abscesos. Treinta por ciento de los ratones vacunados con leucotoxina nativa purificada por afinidad, truncamientos GAS o FINAL, o mezclas (BSBSE y GAS, o todos los cinco truncamientos) tenían abscesos hepáticos. Cinco de cada diez ratones vacunados con polipéptido SX truncado de leucotoxina desarrollaron abscesos hepáticos. Sin embargo, en los grupos vacunados con el polipéptido BSBSE truncado de leucotoxina o con el sobrenadante del cultivo inactivado, únicamente uno de cada 10 tenía abscesos hepáticos.

El peso promedio de los hígados del grupo de control era significativamente mayor que los pesos promedio de los hígados de los otros grupos. Los hígados del grupo que recibió sobrenadante del cultivo inactivado tenían el siguiente tamaño de hígado más grande. Esto se correlaciona con los signos clínicos de choque agudo mostrados por estos dos grupos.

Enumeración de *F. necrophorum* en tejido hepático

Se aisló la subespecie *necrophorum* de *Fusobacterium necrophorum* del tejido hepático homogenizado y los abscesos de todos los ratones. Los recuentos de *F. necrophorum* de los hígados de los ratones inyectados con cualquier preparación de leucotoxina fueron menores ($p < 0.01$) que el control (Tabla 6). Los hígados de los ratones vacunados con truncamientos BSBSE o SH de leucotoxina mostraron recuentos bacterianos significativamente menores ($p < 0.01$) que los ratones vacunados con otras preparaciones. Entre los truncamientos de leucotoxina, SX mostró menos protección seguido por los polipéptidos FINAL y GAS como se evidencia por medio de los recuentos bacterianos en los hígados de ratones vacunados con estos polipéptidos. Los recuentos bacterianos fueron considerablemente menores entre los grupos vacunados con mezclas de truncamientos de leucotoxina (BSBSE y GAS o todos los cinco truncamientos), o la leucotoxina nativa purificada por afinidad comparado con el grupo de control pero mayor que SH, BSBSE o el sobrenadante del cultivo inactivado (Tabla 6).

Los cinco polipéptidos truncados creados de leucotoxina que se superponen permitieron la expresión del gen entero de la leucotoxina sin toxicidad para las células huésped de *E. coli*. Los iniciadores para la amplificación de diferentes productos del gen truncado de leucotoxina fueron diseñados de tal forma que los polipéptidos expresados no eran tóxicos para las células huésped de *E. coli*, pero eran lo suficientemente grandes (al menos 30 kDa) para ser buenos inmunógenos. Los polipéptidos purificados en columna de afinidad de níquel fueron analizados por su pureza en términos de proteínas contaminantes o lipopolisacáridos por medio de coloración con plata de las proteínas separadas por SDS-PAGE. Ya que todos los polipéptidos truncados fueron purificados bajo condiciones desnaturizantes, no eran tóxicos como se determinó por medio de los ensayos con MTT. El sobrenadante del cultivo de *Fusobacterium necrophorum* y la leucotoxina nativa purificada por afinidad fueron inactivados con formalina al 0.3% antes de la inyección, por lo tanto no eran tóxicos.

La neutralización de la toxicidad de la leucotoxina de *F. necrophorum* contra los PMN periféricos de bovino por medio del antisuero producido contra los polipéptidos BSBSE y GAS sugirió que dominios biológicamente importantes, tal como aquellos responsables por la toxicidad o el enlazamiento del receptor de la célula huésped se localizaba en estas regiones. Por lo tanto, se utilize

también una mezcla de estos dos polipéptidos (BSBSE + GAS) en una preparación de una vacuna en nuestros experimentos de reto con ratones.

Los niveles significativamente mayores de anticuerpo observados entre grupos vacunados con preparaciones que contenían proteínas leucotoxina de longitud completa (leucotoxina nativa purificada por afinidad, sobrenadante del cultivo, o una mezcla de polipéptidos de leucotoxina recombinante que contenía todos los cinco truncamientos) pueden ser debidos a difusión del determinante, o debidos a un aumento de la respuesta del anticuerpo antileucotoxina por la presencia de múltiples epítomos inmunodominantes sobre la proteína leucotoxina. Las leucotoxina truncadas GAS produjeron una baja respuesta del anticuerpo. La alta hidrofobicidad de este polipéptido puede ser la razón para su reducida inmunogenicidad. También, se recubrieron los pozos en las placas para ELISA con leucotoxina nativa purificada por inmuoafinidad, y los dominios representados por el polipéptido GAS posiblemente podrían estar ocultos y no expuestos para el enlace de los anticuerpos contra el polipéptido GAS.

La disminución en los niveles de anticuerpo antileucotoxina entre diferentes grupos de ratones el día 46 (4 días después del reto experimental con *F. necrophorum*) sugirió la neutralización del efecto y el despeje de la toxina secretada por *F. necrophorum* usada para el reto experimental por parte de estos anticuerpos. Se aislaron cultivos puros de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum* de la sangre el corazón de los tres ratones (dos del grupo de control negativo y uno del grupo inyectado con polipéptido GAS) que murieron 2 días después del reto, sugiriendo que la muerte se debió a septicemia inducida por *F. necrophorum*. El tejido hepático del grupo de control negativo mostró inflamación, congestión e ictericia característica de una fase de respuesta aguda, pero no mostró abscesos.

Se consideraron múltiples respuestas incluida mortalidad, signos clínicos, peso de los hígados, presencia de abscesos, y carga bacteriana en el hígado para evaluar la efectividad de las diferentes preparaciones de vacunas en el suministro de inmunidad ya la protección contra el reto experimental con *F. necrophorum*. El truncamiento SH de leucotoxina fue un inmunógeno muy efectivo como se evidencia por medio de un aumento en los niveles de anticuerpo antileucotoxina en muestras de suero el día 21 ó 42. Tampoco hubo mortalidad, inflamación hepática o abscesos en ratones vacunados con este polipéptido después del reto experimental. La carga bacteriana promedio en los hígados de los ratones de este grupo fue la más baja (5.3×10^2). En forma muy interesante, el polipéptido truncado de leucotoxina SH no indujo anticuerpos de neutralización en conejos. La producción de anticuerpos de alta afinidad contra ciertos dominios inmunodominantes que logra una opsonización efectiva y despeje de leucotoxina en un modelo de reto experimental puede volver a este polipéptido truncado (SH) un antígeno protector.

La vacunación con BSBSE de truncamiento en el terminal N o con sobrenadante del cultivo seguido por reto experimental con *F. necrophorum* no provoca mortalidad, pero los hígados tenían abscesos en 10% de los ratones. Los ratones vacunados con BSBSE, sin embargo, que tenían menos signos clínicos de LPS indujeron choque después de las vacunaciones o el reto, menor peso de los hígados y menores recuentos bacterianos - hepáticos comparado con los ratones vacunados con sobrenadante del cultivo inactivado.

La leucotoxina nativa purificada por columnas de inmuoafinidad del sobrenadante del cultivo de *F. necrophorum* fue la cuarta mejor preparación de vacuna (detrás de SH, BSBSE, y del sobrenadante del cultivo) en términos de los niveles de anticuerpo en el suero, de protección contra la formación de abscesos hepáticos (30%), y el número de bacterias en el tejido hepático. La vacuna que consiste de una mezcla de todos los cinco polipéptidos truncados recombinantes de leucotoxina

también protegió 70% de los ratones de la formación de abscesos y los recuentos bacterianos en sus tejidos hepáticos no fueron significativamente diferentes de la de los ratones que fueron vacunados con leucotoxina nativa.

El polipéptido truncado GAS, aunque invocó anticuerpos de neutralización en conejos, fue un
 5 inmunógeno más pobre y protegió 67% de los ratones en su grupo de la formación de abscesos hepáticos pero uno de los diez ratones en este grupo murió después del reto. Como se mencionó anteriormente, esta región podría contener un dominio(s) de importancia toxicológica tal como, el enlazamiento a células objetivo, actividades biológicas. Sin embargo, múltiples factores del huésped tales como, la disponibilidad de una subpoblación específica de linfocitos para selección clonal, el tipo
 10 de células T auxiliares estimuladas, la habilidad para invocar anticuerpos capaces de opsonización, deciden si un anticuerpo que responde a una proteína particular es protector en la especie de animal analizado.

El polipéptido truncado de leucotoxina SX suministró menos protección a la formación de abscesos hepáticos. El número de bacterias en el tejido hepático de ratones vacunados con GAS o SX
 15 fue significativamente mayor ($P < 0.01$) que en hígados de ratones vacunados con SH, BSBSE, sobrenadante del cultivo o leucotoxina nativa o recombinante de longitud completa (mezcla de cinco truncamientos), pero fue menor que en los ratones del grupo negativo de control. Una mezcla de polipéptidos BSBSE y GAS o el FINAL suministró únicamente una protección mediocre contra el reto experimental. Los antisueros policlonales producidos en conejos contra BSBSE o GAS
 20 neutralizaron la actividad de leucotoxina nativa contra los PMN utilizados como células objetivo y fueron escogidos por lo tanto para ser utilizados en combinación.

Los polipéptidos truncados recombinantes de leucotoxina SH y BSBSE suministraron una protección significativa en ratones cuando se los usó individualmente como vacuna. La dilución de epítomos inmunodominantes y protectores presentes dentro de estas regiones por medio de la inclusión
 25 de otros polipéptidos truncados como se observa en preparaciones de vacunas que contienen leucotoxina purificada por afinidad o combinaciones de polipéptidos truncados de leucotoxina posiblemente provocó una disminución en la protección global. Deben llevarse a cabo otros estudios para analizar la efectividad de los truncamientos de leucotoxina BSBSE y SH en forma individual o en combinación que proporcionen protección contra infecciones naturales o experimentales con
 30 infecciones por *F. necrophorum*. Este estudio aportó mayor credibilidad a la importancia de la leucotoxina como el principal factor de virulencia de *F. necrophorum* y la proteína porta un dominio (s) o epítopo (s) que indican inmunidad protectora contra una infección experimental. La vacuna que produjo mejor título antileucotoxina no siempre proporcionó buena protección contra una infección experimental. Por lo tanto, ciertos epítomos pueden ser más importantes en conferir inmunidad
 35 protectora para una infección. Los resultados de este estudio sugieren que algunos de estos epítomos importantes residen en los polipéptidos BSBSE y SH.

Discusión

La subespecie *necrophorum* de *Fusobacterium necrophorum* se aísla más a menudo que la subespecie *funduliforme* a partir de abscesos necróticos. Las cepas de la subespecie *necrophorum*
 40 producen la leucotoxina de alto peso molecular en mayores cantidades que las cepas de la subespecie *funduliforme*. En este estudio, hemos clonado al gen de la leucotoxina a partir de la cepa altamente virulenta A25 de la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*. La evidencia de que el determinante de *lktA* codifica la leucotoxina es la siguiente: (1) el ORF codifica una proteína de 336 kDa, un tamaño consistente con estudios previos de la toxina; (2) la proteína codificada por el determinante de
 45 *lktA* recombinante se reconoce tanto por medio de anticuerpos monoclonales como policlonales y

producidos contra leucotoxina purificada de *F. necrophorum*; (3) los antisueros producidos contra polipéptidos del determinante clonado de *lktA* reconocieron la toxina nativa en transferencia tipo Western; (4) los antisueros producidos contra dos de los polipéptidos truncados neutralizaron la actividad tóxica de la leucotoxina; y (5) la proteína recombinante expresada en *E. coli* es relativamente más tóxica para neutrófilos de bovino comparado con los linfocitos de bovino. Estos diferentes grados de toxicidad hacia los neutrófilos con relación a los linfocitos es observada también con leucotoxina que fue purificada por afinidad a partir de sobrenadantes el cultivo de *F. necrophorum*.

El ORF de leucotoxina tiene una longitud de 9.726 pares de bases que codifican una proteína de 3.241 aminoácidos con una masa molecular total de 335.956 daltons. Se compararon el ADN y las secuencias deducidas de aminoácidos con las secuencias en el GenBank pero no se encontraron similitudes significativas (superiores a una identidad del 25%) con otras toxinas bacterianas. Por ejemplo, la identidad más cercana se encontró con *HmwA* de *Haemophilus influenzae* (22% ó 356 de 1.625 residuos). Se encontraron otras homologías similares en *SrpA* de *Streptococcus cristatus* (17% o 388 de 2.239 residuos), *OmpA* de *Rickettsia australis* (21% o 321 de 1.489 residuos) y el antígeno de superficie de 190 kDa de *Rickettsia rickettsii* (21% o 379 de 1.770 residuos). Por lo tanto, la leucotoxina de *F. necrophorum* parece ser diferente de todas las leucotoxinas conocidas y toxinas del tipo RTX. Cuando se sometió la secuencia deducida de aminoácidos de la región de *lktA* al análisis de hidropatía de Kyte-Doolittle (Fig. 3), se encontraron 14 sitios de longitud suficiente y de carácter hidrófobo para ser regiones potenciales que abarcan la membrana. Secuencia arriba del ORF de leucotoxina está un marco de lectura abierta de al menos 1.4 kb de longitud, que está en la misma orientación. Codifica una proteína que tiene alguna identidad de secuencia con la proteína para utilización de hemo-hemopexina (UxuB) de *Haemophilus influenzae*.

Adicionalmente, la proteína es mayor que cualquiera de las endotoxinas bacterianas identificadas hasta la fecha y no muestra similitud de secuencia con otras leucotoxinas conocidas. Por lo tanto, esta proteína puede representar una nueva clase de leucotoxinas bacterianas. La proteína es inusual ya que carece de cisteína. Esta no es una característica de las proteínas de bacterias anaerobias, como se evidencia por medio del contenido normal de residuos de cisteína en las toxinas clostridiales incluida la neurotoxina *Clostridium botulinum*, la citotoxina *Cl. difficile* B, la toxina alfa de *Cl. septicum*, y la toxina del tétanos *Cl. tetani* (números de acceso del GenBank AB037166, AB217292, D17668, y X06214, respectivamente). La proteína leucotoxina tiene una secuencia en su terminal N que tiene las propiedades de una secuencia de señal. Esto puede indicar que la proteína es exportada a través de la membrana citoplasmática en *F. necrophorum* en una forma que depende de la ruta Sec.

Las secuencias de ADN que flanquean *lktA* sugieren que este gen de la toxina puede ser parte de un operón multigén con al menos un ORF secuencia arriba y otra secuencia debajo de este gen. La actividad de la proteína LktA expresada en *E. coli* indica que no se requiere que las otras proteínas codificadas en el operón putativo de leucotoxina para producir una toxina biológicamente activa. Su papel puede estar en la secreción de la toxina a través de las membranas citoplasmáticas y exteriores de *F. necrophorum* en el fluido del cultivo.

Si el determinante de *lktA* es parte de un operón, tendría una longitud mayor a 12 kb. Un dilema con un operón tan grande puede ser trasladar eficientemente a la especie de ARN mensajero sin disociación prematura del ribosoma del mensaje. Una peculiaridad en la región clonada es una abundancia de secuencias del sitio de enlazamiento del ribosoma potencial. Dentro de la región clonada, hay 26 ocurrencias de GGAGG, que es una correspondencia perfecta con la secuencia en el extremo 3' del ARNr 16S. La secuencia complementaria, CCTCC, que tiene el mismo contenido de

G+C pero no actúa como un sitio de enlazamiento del ribosoma, está presente únicamente dos veces en la secuencia. La abundancia de la secuencia GGAGG podría proporcionar secuencias de refuerzo de la traducción para ayudar a garantizar que un ribosoma permanezca asociado con el mensaje y complete la traducción de los ORF. La abundancia de la secuencia putativa RBS (GGAGG) es la presencia de repeticiones de diglicina en la secuencia de aminoácidos. El codón de glicina GGA se presenta 263 veces en el ORF de leucotoxina y 24 de las 26 ocurrencias de GGAGG en las 11.130 pb secuenciadas hasta la fecha corresponden a repeticiones en tándem de este codón. Esta característica de la secuencia de aminoácidos en la proteína puede proporcionar el beneficio adicional de permitir una traducción más eficiente del mensaje.

La expresión de la secuencia de 3.5 kb del extremo 5' de *lktA* provocó la cesación inmediata del crecimiento y la lisis de *E. coli* que transporta este vector de expresión recombinante. La creación de los truncamientos que se superponen permitió la expresión del gen entero de la leucotoxina sin una toxicidad significativa para las células huésped de *E. coli*. El antisuero antileucotoxina policlonal reaccionó fuertemente con tres polipéptidos truncados (BSBSE, SX y FINAL) y más débilmente con los otros dos polipéptidos truncados (GAS y SH) en análisis de transferencia tipo Western. Esta baja reactividad no fue debida a una pobre inmunogenicidad de estos polipéptidos relativamente hidrófobos, debido a que ambos polipéptidos (GAS y SH), produjeron altos títulos de anticuerpo en conejos. Por lo tanto, puede deberse al patrón de plegamiento terciario de la leucotoxina bajo condiciones nativas. La toxina que es una proteína secretada, tendría sus dominios hidrófobos internalizados cuando la proteína fue adecuadamente plegada. Los epítomos correspondientes a estos dominios pueden no estar tan accesibles para el sistema inmunológico. Los anticuerpos contra estos epítomos estarían por lo tanto subrepresentados cuando la toxina entera sin desnaturalizar es utilizada como el inmunógeno. En forma muy interesante, los anticuerpos para uno de estos polipéptidos, GAS, fueron neutralizados. Por lo tanto, al menos algunos de los epítomos críticos están disponibles en la toxina activa.

Se introdujo el gen intacto de la leucotoxina en *E. coli* bajo el control del promotor *lac*. Se logró la expresión inducible de la proteína leucotoxina de longitud completa sin ninguna toxicidad reconocible para células huésped de *E. coli*. La expresión de la leucotoxina de longitud completa en vez de los polipéptidos truncados puede permitir el plegado correcto de la toxina. Esto resultaría en internalización de los dominios hidrófobos con una reducción correspondiente de la toxicidad en células huésped de *E. coli*. Tanto los anticuerpos monoclonal como policlonal contra leucotoxina nativa reconocieron un especie de proteína con un tamaño consistente con aquel de la leucotoxina intacta en análisis de transferencias tipo Western de lisados celulares de *E. coli* que albergan pSN2000. Los anticuerpos producidos contra todos los cinco polipéptidos truncados de leucotoxina, pero no el polipéptido secuencia arriba, reconocieron también la leucotoxina recombinante de longitud completa.

Con el propósito de determinar la prevalencia y heterogeneidad del gen de la leucotoxina en esta especie, se seleccionaron 15 cepas de *F. necrophorum* pertenecientes a la subespecie *necrophorum* y a la subespecie *funduliforme* aisladas de abscesos hepáticos (patógenos oportunistas) o de contenidos de rumen (habitante normal) para *lktA* por medio de transferencias tipo Southern. Las cepas pertenecientes a la subespecie *necrophorum* de *F. necrophorum*, independientemente de su situación de aislamiento (abscesos hepáticos o contenidos ruminales) tenían patrones de hibridación similares. En forma similar, todas las cepas de la subespecie *funduliforme* de *F. necrophorum*, independientemente del sitio a partir del cual fue aislada tuvo patrones de hibridación idénticos, pero que difieren del patrón de la subespecie *necrophorum*. La diferencia en los patrones de hibridación de

las transferencias tipo Southern sugiere que la disparidad en los niveles de leucotoxina producidos entre las dos subespecies puede ser debida a diferencias en organización genética del locus de la leucotoxina.

LISTADOS DE SECUENCIA

- 5 <110> KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION NAGARAJA, T.
STEWART, GEORGE
NARAYANAN, SANJEEV
CRENGAPPA, M.
- 10 <120> VACUNA RECOMBINANTE DE LEUCOTOXINA DE FUSOBACTERIUM
NECROPHORUM Y LA PREPARACIÓN DE LA MISMA
<130> PCT-30962
<160> 15
<170> PatentIn versión 3.0
<210> 1
- 15 <211> 3241
<212> PRT
<213> Fusobacterium necrophorum
<400> 1
- Met Ser Gly Ile Lys Asn Asn Val Gln Arg Thr Arg Lys Arg Ile Ser**
1 5 10 15
- Asp Ser Lys Lys Val Leu Met Ile Leu Gly Leu Leu Ile Asn Thr Met**
20 25 30
- Thr Val Arg Ala Asn Asp Thr Ile Thr Ala Thr Glu Asn Phe Gly Thr**
35 40 45
- Lys Ile Glu Lys Lys Asp Asn Val Tyr Asp Ile Thr Thr Asn Lys Ile**
50 55 60
- Gln Gly Glu Asn Ala Phe Asn Ser Phe Asn Arg Phe Ala Leu Thr Glu**
65 70 75 80
- Asn Asn Ile Ala Asn Leu Tyr Phe Gly Glu Lys Asn Ser Thr Gly Val**
85 90 95
- Asn Asn Leu Phe Asn Phe Val Asn Gly Lys Ile Glu Val Asp Gly Ile**
100 105 110
- Ile Asn Gly Ile Arg Glu Asn Lys Ile Gly Gly Asn Leu Tyr Phe Leu**
115 120 125

Ser Ser Glu Gly Met Ala Val Gly Lys Asn Gly Val Ile Asn Ala Gly
 130 135 140
 Ser Phe His Ser Ile Ile Pro Lys Gln Asp Asp Phe Lys Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Glu Glu Ala Lys His Gly Lys Val Phe Asn Gly Ile Ile Pro Val Asp
 165 170 175
 Gly Lys Val Lys Ile Pro Leu Asn Pro Asn Gly Ser Ile Thr Val Glu
 180 185 190
 Gly Lys Ile Asn Ala Val Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Ala Ala Asp Ile
 195 200 205
 Arg Leu Lys Asp Thr Ala Ile Leu Lys Thr Gly Ile Thr Asp Phe Lys
 210 215 220
 Asn Leu Val Asn Ile Ser Asp Arg Ile Asn Ser Gly Leu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Leu Lys Ala Thr Lys Thr Lys Ser Gly Asp Ile Ile Leu Ser Ala His
 245 250 255
 Ile Asp Ser Pro Gln Lys Ala Met Gly Lys Asn Ser Thr Val Gly Lys
 260 265 270
 Arg Ile Glu Glu Tyr Val Lys Gly Asn Thr Lys Ala Asn Ile Glu Ser
 275 280 285
 Asp Ala Val Leu Glu Ala Asp Gly Asn Ile Lys Ile Ser Ala Lys Ala
 290 295 300
 Thr Asn Gly Arg Phe Ile Lys Lys Glu Gly Glu Lys Glu Thr Tyr Asn
 305 310 315 320
 Thr Pro Leu Ser Leu Ser Asp Val Glu Ala Ser Val Arg Val Asn Lys
 325 330 335
 Gly Lys Val Ile Gly Lys Asn Val Asp Ile Thr Ala Glu Ala Lys Asn
 340 345 350
 Phe Tyr Asp Ala Thr Leu Val Thr Lys Leu Ala Lys His Ser Phe Ser
 355 360 365
 Phe Val Thr Gly Ser Ile Ser Pro Ile Asn Leu Asn Gly Phe Leu Gly
 370 375 380
 Leu Leu Thr Ser Lys Ser Ser Val Val Ile Gly Lys Asp Ala Lys Val
 385 390 395 400
 Glu Ala Thr Glu Gly Lys Ala Asn Ile His Ser Tyr Ser Gly Val Arg
 405 410 415
 Ala Thr Met Gly Ala Ala Thr Ser Pro Leu Lys Ile Thr Asn Leu Tyr
 420 425 430
 Leu Glu Lys Ala Asn Gly Lys Leu Leu Ser Ile Gly Ala Gly Tyr Ile
 435 440 445
 Ser Ala Lys Ser Asn Ser Asn Val Thr Ile Glu Gly Glu Val Lys Ser
 450 455 460
 Lys Gly Arg Ala Asp Ile Thr Ser Lys Ser Glu Asn Thr Ile Asp Ala
 465 470 475 480
 Ser Val Ser Val Gly Thr Met Arg Asp Ser Asn Lys Val Ala Leu Ser

485										490					495				
Val	Leu	Val	Thr 500	Glu	Gly	Glu	Asn	Lys 505	Ser	Ser	Val	Lys	Ile 510	Ala	Lys				
Gly	Ala	Lys 515	Val	Glu	Ser	Glu	Thr 520	Asp	Asp	Val	Asn	Val 525	Arg	Ser	Glu				
Ala	Ile 530	Asn	Ser	Ile	Arg	Ala 535	Ala	Val	Lys	Gly	Gly 540	Leu	Gly	Asp	Ser				
Gly 545	Asn	Gly	Val	Val	Ala 550	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn 555	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser 560				
Arg	Ile	Asp	Val	Asp 565	Gly	Tyr	Leu	His	Ala 570	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn 575	Val				
Glu	Ala	His	Asn 580	Ile	Thr	Lys	Asn	Ser 585	Val	Leu	Gln	Thr	Gly 590	Ser	Asp				
Leu	Gly	Thr 595	Ser	Lys	Phe	Met	Asn 600	Asp	His	Val	Tyr	Glu 605	Ser	Gly	His				
Leu	Lys 610	Ser	Ile	Leu	Asp	Ala 615	Ile	Lys	Gln	Arg	Phe 620	Gly	Gly	Asp	Ser				
Val 625	Asn	Glu	Glu	Ile	Lys 630	Asn	Lys	Leu	Thr	Asn 635	Leu	Phe	Ser	Val	Gly 640				
Val	Ser	Ala	Thr	Ile 645	Ala	Asn	His	Asn	Asn 650	Ser	Ala	Ser	Val	Ala 655	Ile				
Gly	Glu	Ser	Gly 660	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly 665	Val	Glu	Gly	Ser	Asn 670	Val	Arg				
Ala	Leu	Asn 675	Glu	Ala	Gln	Asn	Leu 680	Arg	Ala	Thr	Thr	Ser 685	Ser	Gly	Ser				
Val	Ala 690	Val	Arg	Lys	Glu	Glu 695	Lys	Lys	Lys	Leu	Ile 700	Gly	Asn	Ala	Ala				
Val 705	Phe	Tyr	Gly	Asn	Tyr 710	Lys	Asn	Asn	Ala	Ser 715	Val	Thr	Ile	Ala	Asp 720				
His	Ala	Glu	Leu	Val 725	Ser	Glu	Gly	Lys	Ile 730	Asp	Ile	Asn	Ser	Glu 735	Asn				
Lys	Ile	Glu	Tyr 740	Lys	Asn	Pro	Ser	Lys 745	Met	Ala	Lys	Ser	Val 750	Ile	Asp				
Lys	Leu	Glu 755	Leu	Leu	Lys	Arg	Ala 760	Phe	Gly	Lys	Glu	Thr 765	Lys	Thr	Pro				
Glu	Tyr 770	Asp	Pro	Lys	Asp	Ile 775	Glu	Ser	Ile	Glu	Lys 780	Leu	Leu	Asn	Ala				
Phe 785	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp 790	Gly	Lys	Pro	Glu	Leu 795	Leu	Leu	Asn	Gly	Glu 800				
Arg	Met	Thr	Ile	Ile 805	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr 810	Ser	Lys	Thr	Gly	Thr 815	Ala				
Ile	Glu	Ile	Ala 820	Asn	Tyr	Val	Gln	Gly 825	Glu	Met	Lys	Lys	Leu 830	Glu	Glu				
Lys	Leu	Pro 835	Lys	Gly	Phe	Lys	Ala 840	Phe	Ser	Glu	Gly	Leu 845	Ser	Gly	Leu				

Ile Lys Glu Thr Leu Asn Phe Thr Gly Val Gly Asn Tyr Ala Asn Phe
 850 855 860
 His Thr Phe Thr Ser Ser Gly Ala Asn Gly Glu Arg Asp Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Val Gly Gly Ala Val Ser Trp Val Glu Gln Glu Asn Tyr Ser Lys Val
 885 890 895
 Ser Val Gly Lys Gly Ala Lys Leu Ala Ala Lys Lys Asp Leu Asn Ile
 900 905 910
 Lys Ala Ile Asn Lys Ala Glu Thr Val Asn Leu Val Gly Asn Ile Gly
 915 920 925
 Leu Ala Arg Ser Ser Thr Ser Gly Ser Ala Val Gly Gly Arg Leu Asn
 930 935 940
 Val Gln Arg Ser Lys Asn Ser Ala Ile Val Glu Ala Lys Glu Lys Ala
 945 950 955 960
 Glu Leu Ser Gly Glu Asn Ile Asn Ala Asp Ala Leu Asn Arg Leu Phe
 965 970 975
 His Val Ala Gly Ser Phe Asn Gly Gly Ser Gly Gly Asn Ala Ile Asn
 980 985 990
 Gly Met Gly Ser Tyr Ser Gly Gly Ile Ser Lys Ala Arg Val Ser Ile
 995 1000 1005
 Asp Asp Glu Ala Tyr Leu Lys Ala Asn Lys Lys Ile Ala Leu Asn
 1010 1015 1020
 Ser Lys Asn Asp Thr Ser Val Trp Asn Ala Ala Gly Ser Ala Gly
 1025 1030 1035
 Ile Gly Thr Lys Asn Ala Ala Val Gly Val Ala Val Ala Val Asn
 1040 1045 1050
 Asp Tyr Asp Ile Ser Asn Lys Ala Ser Ile Glu Asp Asn Asp Glu
 1055 1060 1065
 Gly Gln Ser Lys Tyr Asp Lys Asn Lys Asp Asp Glu Val Thr Val
 1070 1075 1080
 Thr Ala Glu Ser Leu Glu Val Asp Ala Lys Thr Thr Gly Thr Ile
 1085 1090 1095
 Asn Ser Ile Ser Val Ala Gly Gly Ile Asn Lys Val Gly Ser Lys
 1100 1105 1110
 Pro Ser Glu Glu Lys Pro Lys Ser Glu Glu Arg Pro Glu Gly Phe
 1115 1120 1125
 Phe Gly Lys Ile Gly Asn Lys Val Asp Ser Val Lys Asn Lys Ile
 1130 1135 1140
 Thr Asp Ser Met Asp Ser Leu Thr Glu Lys Ile Thr Asn Tyr Ile
 1145 1150 1155
 Ser Glu Gly Val Lys Lys Ala Gly Asn Leu Pro Ser Asn Val Ser
 1160 1165 1170
 His Thr Pro Asp Lys Gly Pro Ser Phe Ser Leu Gly Ala Ser Gly
 1175 1180 1185
 Ser Val Ser Phe Asn Asn Ile Lys Lys Glu Thr Ser Ala Val Val
 1190 1195 1200

Asp	Gly	Val	Lys	Ile	Asn	Leu	Lys	Gly	Ala	Asn	Lys	Lys	Val	Glu
	1205					1210					1215			
Val	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Thr	Phe	Val	Gly	Ala	Trp	Gly	Gly	Ser
	1220					1225					1230			
Ala	Ala	Leu	Gln	Trp	Asn	His	Ile	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Asn	Ile
	1235					1240					1245			
Ser	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Asn	Ile	Gln	Ser
	1250					1255					1260			
Lys	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Lys	Asn	Ser	Asp	Ile	Arg	Asn	Ala	Asn
	1265					1270					1275			
Lys	Phe	Lys	Val	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Gly	Thr	Gln	Val	Ala	Ala
	1280					1285					1290			
Gly	Ala	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Gly	Gly	Gln	Gly	Lys
	1295					1300					1305			
Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Ile	Asn	Leu	Val	Asn	Asn
	1310					1315					1320			
Glu	Val	Ser	Ala	Lys	Ser	Glu	Asn	Asn	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Ser
	1325					1330					1335			
Glu	Ser	Gln	Lys	Met	Asp	Val	Asp	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Ala	Asp
	1340					1345					1350			
Thr	Gln	Val	Thr	Gly	Ala	Leu	Asn	Leu	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Asn
	1355					1360					1365			
Gly	Thr	Val	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Ala	Lys	Leu	Asn	Asn	Lys
	1370					1375					1380			
Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Arg	Tyr	Thr	Asn	Val	Asn	Arg
	1385					1390					1395			
Ala	Asp	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Gln	Val	Thr	Ala	Ala
	1400					1405					1410			
Val	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ala	Gly	Leu	Gly	Asn
	1415					1420					1425			
Tyr	Gln	Gly	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Lys	Ile	Asp	Asn	Asp	Val	Glu
	1430					1435					1440			
Ala	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ile	Glu	Gly	Ala	Asn	Glu	Ile	Asn
	1445					1450					1455			
Val	Ile	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Ala	Lys	Glu
	1460					1465					1470			
Tyr	Gln	Ala	Leu	Leu	Asn	Gly	Lys	Asp	Lys	Lys	Tyr	Leu	Glu	Asp
	1475					1480					1485			
Arg	Gly	Ile	Asn	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Lys	Glu	Gln
	1490					1495					1500			
Leu	Glu	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Val	Asn	Ala
	1505					1510					1515			
Ala	Leu	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Asp	Lys	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Ala
	1520					1525					1530			
Ile	Ala	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Asn	Lys	Phe	Lys	Ala	Glu	Leu	Ser

1535	1540	1545
Gly Ser 1550	Asn Lys Glu Ala Gly 1555	Glu Asp Lys Ile His 1560
Val Asn 1565	Val Glu Ala Lys Ser 1570	Val Asn Ala Ala 1575
Ser Gly 1580	Leu Ala Ile Ser Lys 1585	Asp Ala Phe Ser Gly 1590
Gly Ala 1595	Trp Gln Asp Leu Ser 1600	Asn Asp Thr Ile Ala 1605
Lys Gly 1610	Arg Ile Ser Ala Asp 1615	Ser Leu Asn Val Asn 1620
Ser Ile 1625	Leu Gly Val Asn Val 1630	Ala Gly Thr Ile Ala 1635
Ser Thr 1640	Ala Val Gly Ala Ala 1645	Phe Ala Asn Asn Thr 1650
Lys Thr 1655	Ser Ala Leu Ile Thr 1660	Gly Thr Lys Val Asn 1665
Gly Lys 1670	Asn Thr Lys Val Asn 1675	Val Gln Ala Leu Asn 1680
Ile Thr 1685	Asn Val Ser Ala Gly 1690	Gly Ala Ala Ser Ile 1695
Gly Ile 1700	Gly Gly Met Val Ser 1705	Val Asn Arg Gly Ser 1710
Glu Ala 1715	Leu Val Ser Asp Ser 1720	Glu Phe Glu Gly Val 1725
Asn Val 1730	Asp Ala Lys Asp Gln 1735	Lys Thr Ile Asn Thr 1740
Asn Ala 1745	Asn Gly Gly Lys Ala 1750	Ala Gly Val Gly Ala 1755
His Thr 1760	Asn Ile Gly Lys Gln 1765	Ser Val Ile Ala Ile 1770
Ser Lys 1775	Ile Thr Thr Ala Asn 1780	Asp Gln Asp Arg Lys 1785
Val Thr 1790	Ala Lys Asp Tyr Thr 1795	Met Thr Asn Thr Ile 1800
Val Gly 1805	Gly Ala Lys Gly Ala 1810	Ser Val Gln Gly Ala 1815
Thr Thr 1820	Leu Asn Lys Thr Val 1825	Ser Ser His Val Asp 1830
Ile Asp 1835	Lys Asp Leu Glu Glu 1840	Glu Asn Asn Gly Asn 1845
Ala Asn 1850	Val Asn Val Leu Ala 1855	Glu Asn Thr Ser Gln 1860
Asn Ala 1865	Thr Val Leu Ser Gly 1870	Ala Ser Gly Gln Ala 1875

Ala Gly 1880	Val Ala Val	Asn Lys 1885	Ile Thr Gln Asn 1890	Ser Ala His
Ile Lys 1895	Asn Ser Thr Gln	Asn Val Arg Asn Ala 1900	Leu Val Lys Ser	
Lys Ser 1910	His Ser Ser Ile	Lys Thr Ile Gly Ile 1915	Gly Ala Gly Val	
Gly Ala 1925	Gly Gly Ala Gly	Val Thr Gly Ser Val 1930	Ala Val Asn Lys	
Ile Val 1940	Asn Asn Thr Ile	Ala Glu Leu Asn His 1945	Ala Lys Ile Thr	
Ala Lys 1955	Gly Asn Val Gly	Val Ile Thr Glu Ser 1960	Asp Ala Val Ile	
Ala Asn 1970	Tyr Ala Gly Thr	Val Ser Gly Val Ala 1975	Arg Ala Ala Ile	
Gly Ala 1985	Ser Thr Ser Val	Asn Glu Ile Thr Gly 1990	Ser Thr Lys Ala	
Tyr Val 2000	Lys Asp Ser Thr	Val Ile Ala Lys Glu 2005	Glu Thr Asp Asp	
Tyr Ile 2015	Thr Thr Gln Gly	Gln Val Asp Lys Val 2020	Val Asp Lys Val	
Phe Lys 2030	Asn Leu Asn Ile	Asn Glu Asp Leu Ser 2035	Gln Lys Arg Lys	
Ile Ser 2045	Asn Lys Lys Gly	Phe Val Thr Asn Ser 2050	Ser Ala Thr His	
Thr Leu 2060	Lys Ser Leu Leu	Ala Asn Ala Ala Gly 2065	Ser Gly Gln Ala	
Gly Val 2075	Ala Gly Thr Val	Asn Ile Asn Lys Val 2080	Tyr Gly Glu Thr	
Glu Ala 2090	Leu Val Glu Asn	Ser Ile Leu Asn Ala 2095	Lys His Tyr Ser	
Val Lys 2105	Ser Gly Asp Tyr	Thr Asn Ser Ile Gly 2110	Val Val Gly Ser	
Val Gly 2120	Val Gly Gly Asn	Val Gly Val Gly Ala 2125	Ser Ser Asp Thr	
Asn Ile 2135	Ile Lys Arg Asn	Thr Lys Thr Arg Val 2140	Gly Lys Thr Thr	
Met Ser 2150	Asp Glu Gly Phe	Gly Glu Glu Ala Glu 2155	Ile Thr Ala Asp	
Ser Lys 2165	Gln Gly Ile Ser	Ser Phe Gly Val Gly 2170	Val Ala Ala Ala	
Gly Val 2180	Gly Ala Gly Val	Ala Gly Thr Val Ser 2185	Val Asn Gln Phe	
Ala Gly 2195	Lys Thr Glu Val	Asp Val Glu Glu Ala 2200	Lys Ile Leu Val	
Lys Lys 2210	Ala Glu Ile Thr	Ala Lys Arg Tyr Ser 2215	Ser Val Ala Ile	

Gly Asn 2225	Ala Ala Val Gly Val 2230	Ala Ala Lys Gly Ala 2235	Gly Ile Gly
Ala Ala 2240	Val Ala Val Thr Lys 2245	Asp Glu Ser Asn Thr 2250	Arg Ala Arg
Val Lys 2255	Asn Ser Lys Ile Met 2260	Thr Arg Asn Lys Leu 2265	Asp Val Ile
Ala Glu 2270	Asn Glu Ile Lys Ser 2275	Gly Thr Gly Ile Gly 2280	Ser Ala Gly
Ala Gly 2285	Ile Leu Ala Ala Gly 2290	Val Ser Gly Val Val 2295	Ser Val Asn
Asn Ile 2300	Ala Asn Lys Val Glu 2305	Thr Asp Ile Asp His 2310	Ser Thr Leu
His Ser 2315	Ser Thr Asp Val Asn 2320	Val Lys Ala Leu Asn 2325	Lys Ile Ser
Asn Ser 2330	Leu Thr Ala Gly Gly 2335	Gly Ala Ala Gly Leu 2340	Ala Ala Val
Thr Gly 2345	Val Val Ser Val Asn 2350	Thr Ile Asn Ser Ser 2355	Val Ile Ala
Arg Val 2360	His Asn Asn Ser Asp 2365	Leu Thr Ser Val Arg 2370	Glu Lys Val
Asn Val 2375	Thr Ala Lys Glu Glu 2380	Lys Asn Ile Lys Gln 2385	Thr Ala Ala
Asn Ala 2390	Gly Ile Gly Gly Ala 2395	Ala Ile Gly Ala Asn 2400	Val Leu Val
Asn Asn 2405	Phe Gly Thr Ala Val 2410	Glu Asp Arg Lys Asn 2415	Ser Glu Gly
Lys Gly 2420	Thr Glu Val Leu Lys 2425	Thr Leu Asp Glu Val 2430	Asn Lys Glu
Gln Asp 2435	Lys Lys Val Asn Asp 2440	Ala Thr Lys Lys Ile 2445	Leu Gln Ser
Ala Gly 2450	Ile Ser Thr Glu Asp 2455	Thr Ser Val Lys Ala 2460	Asp Arg Gly
Asp Thr 2465	Gln Gly Glu Gly Ile 2470	Lys Ala Ile Val Lys 2475	Thr Ser Asp
Ile Ile 2480	Gly Lys Asn Val Asp 2485	Ile Thr Thr Glu Asp 2490	Lys Asn Asn
Ile Thr 2495	Ser Thr Gly Gly Leu 2500	Gly Thr Ala Gly Leu 2505	Ala Ser Ala
Ser Gly 2510	Thr Val Ala Val Thr 2515	Asn Ile Lys Arg Asn 2520	Ser Gly Val
Thr Val 2525	Glu Asn Ser Phe Val 2530	Lys Ala Ala Glu Lys 2535	Val Asn Val
Arg Ser 2540	Asp Ile Thr Gly Asn 2545	Val Ala Leu Thr Ala 2550	Tyr Gln Gly
Pro Val	Gly Ala Leu Gly Ile	Gly Ala Ala Tyr Ala	Glu Leu Asn

2555	2560	2565
Ser Asn Gly Arg Ser Asn	Ile Ser Ile Lys Asn	Ser Lys Leu Leu
2570	2575	2580
Gly Lys Asn Ile Asp Val	Ile Val Lys Asp Lys	Ser Glu Leu Arg
2585	2590	2595
Ala Glu Ala Lys Gly Leu	Thr Val Gly Ala Val	Ala Ala Gly Ala
2600	2605	2610
Ile Ile Ser Lys Ala Lys	Asn Glu Met Asn Ser	Glu Val Glu Ile
2615	2620	2625
Glu Lys Ser Ile Phe Asn	Glu Glu Asn Arg Val	Thr Ser Pro Ser
2630	2635	2640
Lys Gly Ile Gly Arg Glu	Ile Asn Val Lys Val	Glu Lys Glu Asn
2645	2650	2655
Arg Val Thr Ala Glu Ser	Gln Gly Ala Ser Val	Gly Ala Val Ala
2660	2665	2670
Gly Ala Gly Ile Ile Ser	Glu Ala Lys Asp Ala	Gly Ser Ser Tyr
2675	2680	2685
Leu Lys Val Ser Thr Lys	Ser Gly Arg Ser Ile	Phe His Ala Asp
2690	2695	2700
Asn Val Asn Met Glu Ala	Thr His Lys Met Lys	Val Thr Ala Val
2705	2710	2715
Ser Lys Ala Val Thr Gly	Ser Val Leu Gly Gly	Val Gly Val Thr
2720	2725	2730
Lys Ala Glu Ala Thr Ala	Ala Gly Lys Thr Met	Val Glu Val Glu
2735	2740	2745
Glu Gly Asn Leu Phe Arg	Thr Asn Arg Leu Asn	Ala Ile Ser Lys
2750	2755	2760
Val Glu Gly Leu Asp Glu	Asp Lys Val Thr Ala	Lys Ser Ser Val
2765	2770	2775
Val Ser Gly Asn Gly Gly	Gly Ile Ala Gly Ala	Gly Val Asn Thr
2780	2785	2790
Ser Thr Ala Gln Ser Asn	Thr Glu Ser Val Val	Arg Leu Arg Lys
2795	2800	2805
Gln Asp Tyr Glu Asn Asn	Asp Tyr Thr Lys Lys	Tyr Ile Ser Glu
2810	2815	2820
Val Asn Ala Leu Ala Leu	Asn Asp Thr Lys Asn	Glu Ala Asn Ile
2825	2830	2835
Glu Ser Leu Ala Val Ala	Gly Val His Ala Gln	Gly Thr Asn Lys
2840	2845	2850
Ala Phe Thr Arg Ser Asn	Lys Leu Thr Ser Thr	Thr Val Asn Gly
2855	2860	2865
Gly Asn Val Ser Gln Leu	Arg Ala Lys Ala Leu	Ala Lys Asn Glu
2870	2875	2880
Asn Tyr Gly Asn Val Lys	Gly Thr Gly Gly Ala	Leu Val Gly Ala
2885	2890	2895

Glu Thr 2900	Ala Ala Val	Glu Asn 2905	Tyr Thr Lys Ser Thr 2910	Thr Gly Ala
Leu Val 2915	Ala Gly Asn Trp	Glu 2920	Ile Gly Asp Lys Leu 2925	Glu Thr Ile
Ala Arg 2930	Asp Asn Thr Ile	Val 2935	Arg Val Asn Gly Asp 2940	Gly Thr Lys
Gly Gly 2945	Leu Val Gly Lys	Asn 2950	Gly Ile Ser Val Lys 2955	Asn Thr Ile
ser Gly 2960	Glu Thr Lys Ser	Ser 2965	Ile Glu Asp Lys Ala 2970	Arg Ile Val
Gly Thr 2975	Gly Ser Val Asn	Val 2980	Asp Ala Leu Asn Glu 2985	Leu Asp Val
Asp Leu 2990	Gln Gly Lys Ser	Gly 2995	Gly Tyr Gly Gly Ile 3000	Gly Ile Gly
Asn Val 3005	Asp Val Asn Asn	Val 3010	Ile Lys Lys Asn Val 3015	Glu Ala Lys
Ile Gly 3020	Arg His Ala Ile	Val 3025	Glu Thr Thr Gly Lys 3030	Gln Glu Tyr
Gln Ala 3035	Phe Thr Arg Ala	Lys 3040	Val Asn Ile Leu Gly 3045	Lys Gly Asp
Ala Ala 3050	Ala Ala Ala Ala	Ile 3055	Ser Asn Val His Ile 3060	Ser Asn Glu
Met Asp 3065	Ile Lys Asn Leu	Ala 3070	Lys Gln Tyr Ala Ser 3075	Ser Gln Leu
Ile Thr 3080	Lys Asn Ser Lys	Asn 3085	Asn Ile Thr Leu Ala 3090	Ser Ser Ser
Glu Ser 3095	Asn Val Asn Val	His 3100	Gly Val Ala Glu Ala 3105	Arg Gly Ala
Gly Ala 3110	Lys Ala Thr Val	Ser 3115	Val Lys Asn Gln Ile 3120	Asn Arg Thr
Asn Asn 3125	Val Asp Leu Ala	Gly 3130	Lys Ile Lys Thr Glu 3135	Gly Asn Ile
Asn Val 3140	Tyr Ala Gly Tyr	Asp 3145	Lys Asn Tyr Asn Ile 3150	Ser Lys Thr
Asn Ser 3155	Lys Ala Ile Ala	Asp 3160	Ala Lys Ser His Ala 3165	Ala Ala Ala
Ser Ala 3170	Thr Ala Thr Ile	Glu 3175	Lys Asn Glu Val Lys 3180	Phe Asn Asn
Ala Ile 3185	Arg Glu Phe Lys	Asn 3190	Asn Leu Ala Arg Leu 3195	Glu Gly Lys
Ala Asn 3200	Lys Lys Thr Ser	Val 3205	Gly Ser Asn Gln Val 3210	Asp Trp Tyr
Thr Asp 3215	Lys Tyr Thr Trp	His 3220	Ser Ser Glu Lys Ala 3225	Tyr Lys Lys
Leu Thr 3230	Tyr Gln Ser Lys	Arg 3235	Gly Glu Lys Gly Lys 3240	Lys

<211> 369

<212> PRT

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 2

5

Met ser Gly Ile Lys Asn Asn Val Gln Arg Thr Arg Lys Arg Ile Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Lys Lys Val Leu Met Ile Leu Gly Leu Leu Ile Asn Thr Met
 20 25 30
 Thr Val Arg Ala Asn Asp Thr Ile Thr Ala Thr Glu Asn Phe Gly Thr
 35 40 45
 Lys Ile Glu Lys Lys Asp Asn Val Tyr Asp Ile Thr Thr Asn Lys Ile
 50 55 60
 Gln Gly Glu Asn Ala Phe Asn Ser Phe Asn Arg Phe Ala Leu Thr Glu
 65 70 75 80
 Asn Asn Ile Ala Asn Leu Tyr Phe Gly Glu Lys Asn Ser Thr Gly Val
 85 90 95
 Asn Asn Leu Phe Asn Phe Val Asn Gly Lys Ile Glu Val Asp Gly Ile
 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Arg Glu Asn Lys Ile Gly Gly Asn Leu Tyr Phe Leu
 115 120 125
 Ser Ser Glu Gly Met Ala Val Gly Lys Asn Gly Val Ile Asn Ala Gly
 130 135 140
 Ser Phe His Ser Ile Ile Pro Lys Gln Asp Asp Phe Lys Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Glu Glu Ala Lys His Gly Lys Val Phe Asn Gly Ile Ile Pro Val Asp
 165 170 175
 Gly Lys Val Lys Ile Pro Leu Asn Pro Asn Gly Ser Ile Thr Val Glu
 180 185 190
 Gly Lys Ile Asn Ala Val Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Ala Ala Asp Ile
 195 200 205
 Arg Leu Lys Asp Thr Ala Ile Leu Lys Thr Gly Ile Thr Asp Phe Lys
 210 215 220
 Asn Leu Val Asn Ile Ser Asp Arg Ile Asn Ser Gly Leu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Leu Lys Ala Thr Lys Thr Lys Ser Gly Asp Ile Ile Leu Ser Ala His
 245 250 255
 Ile Asp Ser Pro Gln Lys Ala Met Gly Lys Asn Ser Thr Val Gly Lys
 260 265 270
 Arg Ile Glu Glu Tyr Val Lys Gly Asn Thr Lys Ala Asn Ile Glu Ser
 275 280 285
 Asp Ala Val Leu Glu Ala Asp Gly Asn Ile Lys Ile Ser Ala Lys Ala

45

290 295 300
 Thr Asn Gly Arg Phe Ile Lys Lys Glu Gly Glu Lys Glu Thr Tyr Asn
 305 310 315 320
 Thr Pro Leu Ser Leu Ser Asp Val Glu Ala Ser Val Arg Val Asn Lys
 325 330 335
 Gly Lys Val Ile Gly Lys Asn Val Asp Ile Thr Ala Glu Ala Lys Asn
 340 345 350
 Phe Tyr Asp Ala Thr Leu Val Thr Lys Leu Ala Lys His Ser Phe Ser
 355 360 365
 Phe

<210> 3

<211> 927

5 <212> PRT

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 3

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

Lys Val Glu Ser Glu Thr Asp Asp Val Asn Val Arg Ser Glu Ala Ile
 210 215 220
 Asn Ser Ile Arg Ala Ala Val Lys Gly Gly Leu Gly Asp Ser Gly Asn
 225 230 235 240
 Gly Val Val Ala Ala Asn Ile Ser Asn Tyr Asn Ala Ser Ser Arg Ile
 245 250 255
 Asp Val Asp Gly Tyr Leu His Ala Lys Lys Arg Leu Asn Val Glu Ala
 260 265 270
 His Asn Ile Thr Lys Asn Ser Val Leu Gln Thr Gly Ser Asp Leu Gly
 275 280 285
 Thr Ser Lys Phe Met Asn Asp His Val Tyr Glu Ser Gly His Leu Lys
 290 295 300
 Ser Ile Leu Asp Ala Ile Lys Gln Arg Phe Gly Gly Asp Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Glu Glu Ile Lys Asn Lys Leu Thr Asn Leu Phe Ser Val Gly Val Ser
 325 330 335
 Ala Thr Ile Ala Asn His Asn Asn Ser Ala Ser Val Ala Ile Gly Glu
 340 345 350
 Ser Gly Arg Leu Ser Ser Gly Val Glu Gly Ser Asn Val Arg Ala Leu
 355 360 365
 Asn Glu Ala Gln Asn Leu Arg Ala Thr Thr Ser Ser Gly Ser Val Ala
 370 375 380
 Val Arg Lys Glu Glu Lys Lys Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ala Val Phe
 385 390 395 400
 Tyr Gly Asn Tyr Lys Asn Asn Ala Ser Val Thr Ile Ala Asp His Ala
 405 410 415
 Glu Leu Val Ser Glu Gly Lys Ile Asp Ile Asn Ser Glu Asn Lys Ile
 420 425 430
 Glu Tyr Lys Asn Pro Ser Lys Met Ala Lys Ser Val Ile Asp Lys Leu
 435 440 445
 Glu Leu Leu Lys Arg Ala Phe Gly Lys Glu Thr Lys Thr Pro Glu Tyr
 450 455 460
 Asp Pro Lys Asp Ile Glu Ser Ile Glu Lys Leu Leu Asn Ala Phe Ser
 465 470 475 480
 Glu Lys Leu Asp Gly Lys Pro Glu Leu Leu Leu Asn Gly Glu Arg Met
 485 490 495
 Thr Ile Ile Leu Pro Asp Gly Thr Ser Lys Thr Gly Thr Ala Ile Glu
 500 505 510
 Ile Ala Asn Tyr Val Gln Gly Glu Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys Leu
 515 520 525
 Pro Lys Gly Phe Lys Ala Phe Ser Glu Gly Leu Ser Gly Leu Ile Lys
 530 535 540
 Glu Thr Leu Asn Phe Thr Gly Val Gly Asn Tyr Ala Asn Phe His Thr
 545 550 555 560
 Phe Thr Ser Ser Gly Ala Asn Gly Glu Arg Asp Val Ser Ser Val Gly
 565 570 575

Gly Ala Val Ser Trp Val Glu Gln Glu Asn Tyr Ser Lys Val Ser Val
 580 585 590
 Gly Lys Gly Ala Lys Leu Ala Ala Lys Lys Asp Leu Asn Ile Lys Ala
 595 600 605
 Ile Asn Lys Ala Glu Thr Val Asn Leu Val Gly Asn Ile Gly Leu Ala
 610 615 620
 Arg Ser Ser Thr Ser Gly Ser Ala Val Gly Gly Arg Leu Asn Val Gln
 625 630 635 640
 Arg Ser Lys Asn Ser Ala Ile Val Glu Ala Lys Glu Lys Ala Glu Leu
 645 650 655
 Ser Gly Glu Asn Ile Asn Ala Asp Ala Leu Asn Arg Leu Phe His Val
 660 665 670
 Ala Gly Ser Phe Asn Gly Gly Ser Gly Gly Asn Ala Ile Asn Gly Met
 675 680 685
 Gly Ser Tyr Ser Gly Gly Ile Ser Lys Ala Arg Val Ser Ile Asp Asp
 690 695 700
 Glu Ala Tyr Leu Lys Ala Asn Lys Lys Ile Ala Leu Asn Ser Lys Asn
 705 710 715 720
 Asp Thr Ser Val Trp Asn Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ile Gly Thr Lys
 725 730 735
 Asn Ala Ala Val Gly Val Ala Val Ala Val Asn Asp Tyr Asp Ile Ser
 740 745 750
 Asn Lys Ala Ser Ile Glu Asp Asn Asp Glu Gly Gln Ser Lys Tyr Asp
 755 760 765
 Lys Asn Lys Asp Asp Glu Val Thr Val Thr Ala Glu Ser Leu Glu Val
 770 775 780
 Asp Ala Lys Thr Thr Gly Thr Ile Asn Ser Ile Ser Val Ala Gly Gly
 785 790 795 800
 Ile Asn Lys Val Gly Ser Lys Pro Ser Glu Glu Lys Pro Lys Ser Glu
 805 810 815
 Glu Arg Pro Glu Gly Phe Phe Gly Lys Ile Gly Asn Lys Val Asp Ser
 820 825 830
 Val Lys Asn Lys Ile Thr Asp Ser Met Asp Ser Leu Thr Glu Lys Ile
 835 840 845
 Thr Asn Tyr Ile Ser Glu Gly Val Lys Lys Ala Gly Asn Leu Pro Ser
 850 855 860
 Asn Val Ser His Thr Pro Asp Lys Gly Pro Ser Phe Ser Leu Gly Ala
 865 870 875 880
 Ser Gly Ser Val Ser Phe Asn Asn Ile Lys Lys Glu Thr Ser Ala Val
 885 890 895
 Val Asp Gly Val Lys Ile Asn Leu Lys Gly Ala Asn Lys Lys Val Glu
 900 905 910
 Val Thr Ser Ser Asp Ser Thr Phe Val Gly Ala Trp Gly Gly Ser
 915 920 925

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> *Fusobacterium necrophorum*

5

<400> 4

Gly Ala Ser Gly Ser Val Ser Asn Asn Lys Lys Thr Ser Ala Val Val
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Lys Asn Lys Gly Ala Asn Lys Lys Val Val Thr Ser Ser
 20 25 30
 Asp Ser Thr Val Gly Ala Trp Gly Gly Ser Ala Ala Trp Asn His Gly
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Asn Ser Ala Gly Ala Gly Ala Ala Val Asn Asn
 50 55 60
 Ser Lys Thr Ser Ala Val Lys Asn Ser Asp Arg Asn Ala Asn Lys Lys
 65 70 75 80
 Val Asn Ala Ser Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Lys
 85 90 95
 Ser Gly Gly Gly Lys Ser Tyr Gly Thr Ser Ala Ser Asn Val Asn Asn
 100 105 110
 Val Ser Ala Lys Ser Asn Asn Thr Val Ala Gly Ser Ser Lys Met Asp
 115 120 125
 Val Asp Val Thr Ala Tyr Ala Asp Thr Val Thr Gly Ala Asn Ala Gly
 130 135 140
 Lys Ser Asn Gly Thr Val Gly Ala Thr Val Thr Val Ala Lys Asn Asn
 145 150 155 160
 Lys Val Asn Ala Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Asn Val Asn Arg Ala
 165 170 175
 Asp Ala Lys Ala Ala Thr Thr Val Thr Ala Ala Val Thr Thr Gly Gly
 180 185 190
 Thr Ser Ser Gly Ala Gly Gly Asn Tyr Gly Ala Val Ser Val Asn Lys
 195 200 205
 Asp Asn Asp Val Ala Ser Val Asp Lys Ser Ser Gly Ala Asn Asn Val
 210 215 220
 Ala Lys Asp Val Lys Gly Ser Ser Asp Ala Lys Tyr Ala Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Asp Lys Lys Tyr Asp Arg Gly Asn Thr Thr Gly Asn Gly Tyr Tyr Thr
 245 250 255
 Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Ala Val Val Asn Ala Ala Ser Val Ala
 260 265 270
 Gly Thr Asp Lys Ser Ala Gly Gly Val Ala Ala Val Asn Thr Val Lys
 275 280 285
 Asn Lys Lys Ala Ser Gly Ser Asn Lys Ala Gly Asp Lys His Ala Lys
 290 295 300

49

His val Asn Val Ala Lys Ser Ser Thr Val Val Val Asn Ala Ala Ser
 305 310 315 320
 Gly Ala Ser Lys Asp Ala Ser Gly Met Gly Ser Gly Ala Trp Asp Ser
 325 330 335
 Asn Asp Thr Ala Lys Val Asp Lys Gly Arg Ser Ala Asp Ser Asn Val
 340 345 350
 Asn Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser Ser
 355 360 365
 Thr Ala Val Gly Ala Ala Ala Asn Asn Thr His Asn Lys Thr Ser Ala
 370 375 380
 Thr Gly Thr Lys Val Asn Ser Gly Lys Asn Thr Lys Val Asn Val Ala
 385 390 395 400
 Asn Asp Ser His Thr Asn Val Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ser Lys Ala
 405 410 415
 Gly Gly Gly Met Val Ser Val Asn Arg Gly Ser Asp Thr Ala Val Ser
 420 425 430
 Asp Ser Gly Val Ser Ser Asn Val Asp Ala Lys Asp Lys Thr Asn Thr
 435 440 445
 Ala Gly Asn Ala Asn Gly Gly Lys Ala Ala Gly Val Gly Ala Thr Val
 450 455 460
 Ala His Thr Asn Gly Lys Ser Val Ala Val Lys Asn Ser Lys Thr Thr
 465 470 475 480
 Ala Asn Asp Asp Arg Lys Asn Asn Val Thr Ala Lys Asp Tyr Thr Met
 485 490 495
 Thr Asn Thr Ala Val Gly Val Gly Gly Ala Lys Gly Ala Ser Val Gly
 500 505 510
 Ala Ser Ala Ser Thr Thr Asn Lys Thr Val Ser Ser His Val Asp Thr
 515 520 525
 Asp Asp Lys Asp Asn Asn Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Asn Val Ala
 530 535 540
 Asn Thr Ser Val Val Thr Asn Ala Thr Val Ser Gly Ala Ser Gly Ala
 545 550 555 560
 Ala Val Gly Ala Gly Val Ala Val Asn Lys Thr Asn Thr Ser Ala His
 565 570 575
 Lys Asn Ser Thr
 580

<210> 5

<211> 628

5

<212> PRT

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 5

Ala val Gly Ala gly val Ala val Asn Lys Ile Thr Gln Asn Thr Ser
 1 5 10 15

50

Ala His Ile Lys Asn Ser Thr Gln Asn Val Arg Asn Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 ser Lys Ser His Ser Ser Ile Lys Thr Ile Gly Ile Gly Ala Gly val
 35 40 45
 Gly Ala Gly Gly Ala Gly Val Thr Gly Ser Val Ala Val Asn Lys Ile
 50 55 60
 val Asn Asn Thr Ile Ala Glu Leu Asn His Ala Lys Ile Thr Ala Lys
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Gly Val Ile Thr Glu Ser Asp Ala Val Ile Ala Asn Tyr
 85 90 95
 Ala Gly Thr Val Ser Gly Val Ala Arg Ala Ala Ile Gly Ala Ser Thr
 100 105 110
 ser Val Asn Glu Ile Thr Gly Ser Thr Lys Ala Tyr Val Lys Asp ser
 115 120 125
 Thr Val Ile Ala Lys Glu Glu Thr Asp Asp Tyr Ile Thr Thr Gln Gly
 130 135 140
 Gln Val Asp Lys Val Val Asp Lys Val Phe Lys Asn Leu Asn Ile Asn
 145 150 155 160
 Glu Asp Leu Ser Gln Lys Arg Lys Ile Ser Asn Lys Lys Gly Phe Val
 165 170 175
 Thr Asn Ser Ser Ala Thr His Thr Leu Lys Ser Leu Leu Ala Asn Ala
 180 185 190
 Ala Gly Ser Gly Gln Ala Gly Val Ala Gly Thr Val Asn Ile Asn Lys
 195 200 205
 Val Tyr Gly Glu Thr Glu Ala Leu Val Glu Asn Ser Ile Leu Asn Ala
 210 215 220
 Lys His Tyr Ser Val Lys Ser Gly Asp Tyr Thr Asn Ser Ile Gly Val
 225 230 235 240
 Val Gly Ser Val Gly Val Gly Gly Asn Val Gly Val Gly Ala Ser Ser
 245 250 255
 Asp Thr Asn Ile Ile Lys Arg Asn Thr Lys Thr Arg Val Gly Lys Thr
 260 265 270
 Thr Met Ser Asp Glu Gly Phe Gly Glu Glu Ala Glu Ile Thr Ala Asp
 275 280 285
 Ser Lys Gln Gly Ile Ser Ser Phe Gly Val Gly Val Ala Ala Ala Gly
 290 295 300
 Val Gly Ala Gly Val Ala Gly Thr Val Ser Val Asn Gln Phe Ala Gly
 305 310 315 320
 Lys Thr Glu Val Asp Val Glu Glu Ala Lys Ile Leu Val Lys Lys Ala
 325 330 335
 Glu Ile Thr Ala Lys Arg Tyr Ser Ser Val Ala Ile Gly Asn Ala Ala
 340 345 350
 Val Gly Val Ala Ala Lys Gly Ala Gly Ile Gly Ala Ala Val Ala Val
 355 360 365
 Thr Lys Asp Glu Ser Asn Thr Arg Ala Arg Val Lys Asn Ser Lys Ile

370 375 380
 Met Thr Arg Asn Lys Leu Asp Val Ile Ala Glu Asn Glu Ile Lys Ser
 385 390 395 400
 Gly Thr Gly Ile Gly Ser Ala Gly Ala Gly Ile Leu Ala Ala Gly Val
 405 410 415
 Ser Gly Val Val Ser Val Asn Asn Ile Ala Asn Lys Val Glu Thr Asp
 420 425 430
 Ile Asp His Ser Thr Leu His Ser Ser Thr Asp Val Asn Val Lys Ala
 435 440 445
 Leu Asn Lys Ile Ser Asn Ser Leu Thr Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly
 450 455 460
 Leu Ala Ala Val Thr Gly Val Val Ser Val Asn Thr Ile Asn Ser Ser
 465 470 475 480
 Val Ile Ala Arg Val His Asn Asn Ser Asp Leu Thr Ser Val Arg Glu
 485 490 495
 Lys Val Asn Val Thr Ala Lys Glu Glu Lys Asn Ile Lys Gln Thr Ala
 500 505 510
 Ala Asn Ala Gly Ile Gly Gly Ala Ala Ile Gly Ala Asn Val Leu Val
 515 520 525
 Asn Asn Phe Gly Thr Ala Val Glu Asp Arg Lys Asn Ser Glu Gly Lys
 530 535 540
 Gly Thr Glu Val Leu Lys Thr Leu Asp Glu Val Asn Lys Glu Gln Asp
 545 550 555 560
 Lys Lys Val Asn Asp Ala Thr Lys Lys Ile Leu Gln Ser Ala Gly Ile
 565 570 575
 Ser Thr Glu Asp Thr Ser Val Lys Ala Asp Arg Gly Asp Thr Gln Gly
 580 585 590
 Glu Gly Ile Lys Ala Ile Val Lys Thr Ser Asp Ile Ile Gly Lys Asn
 595 600 605
 Val Asp Ile Thr Thr Glu Asp Lys Asn Asn Ile Thr Ser Thr Gly Gly
 610 615 620
 Leu Gly Thr Ala
 625

<210> 6

<211> 773

5

<212> PRT

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 6

Gly Ile Lys Ala Ile Val Lys Thr Ser Asp Ile Ile Gly Lys Asn Val
 1 5 10 15
 Asp Ile Thr Thr Glu Asp Lys Asn Asn Ile Thr Ser Thr Gly Gly Leu
 20 25 30

Gly Thr Ala Gly Leu Ala Ser Ala Ser Gly Thr Val Ala Val Thr Asn
 35 40 45
 Ile Lys Arg Asn Ser Gly Val Thr Val Glu Asn Ser Phe Val Lys Ala
 50 55 60
 Ala Glu Lys Val Asn Val Arg Ser Asp Ile Thr Gly Asn Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Ala Tyr Gln Gly Pro Val Gly Ala Leu Gly Ile Gly Ala Ala Tyr
 85 90 95
 Ala Glu Leu Asn Ser Asn Gly Arg Ser Asn Ile Ser Ile Lys Asn Ser
 100 105 110
 Lys Leu Leu Gly Lys Asn Ile Asp Val Ile Val Lys Asp Lys Ser Glu
 115 120 125
 Leu Arg Ala Glu Ala Lys Gly Leu Thr Val Gly Ala Val Ala Ala Gly
 130 135 140
 Ala Ile Ile Ser Lys Ala Lys Asn Glu Met Asn Ser Glu Val Glu Ile
 145 150 155 160
 Glu Lys Ser Ile Phe Asn Glu Glu Asn Arg Val Thr Ser Pro Ser Lys
 165 170 175
 Gly Ile Gly Arg Glu Ile Asn Val Lys Val Glu Lys Glu Asn Arg Val
 180 185 190
 Thr Ala Glu Ser Gln Gly Ala Ser Val Gly Ala Val Ala Gly Ala Gly
 195 200 205
 Ile Ile Ser Glu Ala Lys Asp Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Lys Val Ser
 210 215 220
 Thr Lys Ser Gly Arg Ser Ile Phe His Ala Asp Asn Val Asn Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Thr His Lys Met Lys Val Thr Ala Val Ser Lys Ala Val Thr Gly
 245 250 255
 Ser Val Leu Gly Gly Val Gly Val Thr Lys Ala Glu Ala Thr Ala Ala
 260 265 270
 Gly Lys Thr Met Val Glu Val Glu Glu Gly Asn Leu Phe Arg Thr Asn
 275 280 285
 Arg Leu Asn Ala Ile Ser Lys Val Glu Gly Leu Asp Glu Asp Lys Val
 290 295 300
 Thr Ala Lys Ser Ser Val Val Ser Gly Asn Gly Gly Gly Ile Ala Gly
 305 310 315 320
 Ala Gly Val Asn Thr Ser Thr Ala Gln Ser Asn Thr Glu Ser Val Val
 325 330 335
 Arg Leu Arg Lys Gln Asp Tyr Glu Asn Asn Asp Tyr Thr Lys Lys Tyr
 340 345 350
 Ile Ser Glu Val Asn Ala Leu Ala Leu Asn Asp Thr Lys Asn Glu Ala
 355 360 365
 Asn Ile Glu Ser Leu Ala Val Ala Gly Val His Ala Gln Gly Thr Asn
 370 375 380
 Lys Ala Phe Thr Arg Ser Asn Lys Leu Thr Ser Thr Thr Val Asn Gly
 385 390 395 400

Gly Asn Val Ser Gln Leu Arg Ala Lys Ala Leu Ala Lys Asn Glu Asn
 405 410 415
 Tyr Gly Asn Val Lys Gly Thr Gly Gly Ala Leu Val Gly Ala Glu Thr
 420 425 430
 Ala Ala Val Glu Asn Tyr Thr Lys Ser Thr Thr Gly Ala Leu Val Ala
 435 440 445
 Gly Asn Trp Glu Ile Gly Asp Lys Leu Glu Thr Ile Ala Arg Asp Asn
 450 455 460
 Thr Ile Val Arg Val Asn Gly Asp Gly Thr Lys Gly Gly Leu Val Gly
 465 470 475 480
 Lys Asn Gly Ile Ser Val Lys Asn Thr Ile Ser Gly Glu Thr Lys Ser
 485 490 495
 Ser Ile Glu Asp Lys Ala Arg Ile Val Gly Thr Gly Ser Val Asn Val
 500 505 510
 Asp Ala Leu Asn Glu Leu Asp Val Asp Leu Gln Gly Lys Ser Gly Gly
 515 520 525
 Tyr Gly Gly Ile Gly Ile Gly Asn Val Asp Val Asn Asn Val Ile Lys
 530 535 540
 Lys Asn Val Glu Ala Lys Ile Gly Arg His Ala Ile Val Glu Thr Thr
 545 550 555 560
 Gly Lys Gln Glu Tyr Gln Ala Phe Thr Arg Ala Lys Val Asn Ile Leu
 565 570 575
 Gly Lys Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ile Ser Asn Val His Ile
 580 585 590
 Ser Asn Glu Met Asp Ile Lys Asn Leu Ala Lys Gln Tyr Ala Ser Ser
 595 600 605
 Gln Leu Ile Thr Lys Asn Ser Lys Asn Asn Ile Thr Leu Ala Ser Ser
 610 615 620
 Ser Glu Ser Asn Val Asn Val His Gly Val Ala Glu Ala Arg Gly Ala
 625 630 635 640
 Gly Ala Lys Ala Thr Val Ser Val Lys Asn Gln Ile Asn Arg Thr Asn
 645 650 655
 Asn Val Asp Leu Ala Gly Lys Ile Lys Thr Glu Gly Asn Ile Asn Val
 660 665 670
 Tyr Ala Gly Tyr Asp Lys Asn Tyr Asn Ile Ser Lys Thr Asn Ser Lys
 675 680 685
 Ala Ile Ala Asp Ala Lys Ser His Ala Ala Ala Ala Ser Ala Thr Ala
 690 695 700
 Thr Ile Glu Lys Asn Glu Val Lys Phe Asn Asn Ala Ile Arg Glu Phe
 705 710 715 720
 Lys Asn Asn Leu Ala Arg Leu Glu Gly Lys Ala Asn Lys Lys Thr Ser
 725 730 735
 Val Gly Ser Asn Gln Val Asp Trp Tyr Thr Asp Lys Tyr Thr Trp His
 740 745 750
 Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Lys Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Lys Arg Gly

54

755

760

765

Glu Lys Gly Lys Lys
770

<210> 7

<211> 338

5

<212> PRT

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 7

Ile Asn Met Ala Ser Gly Lys Val Pro Gly Thr Thr Asp Tyr Phe Val
1 5 10 15
Gln Ile Tyr Glu Pro Lys Arg Gln Gln Phe Phe Val Phe Ala Asp Asn
20 25 30
Leu Gly Gln Lys Asn Thr Gly Glu Leu Arg Trp Gly Leu Asn Tyr Ile
35 40 45
Asn Asn Ser Val Thr Gly Asn Arg Asp Gln Leu Ser Leu Thr Ser Leu
50 55 60
Val Thr Glu Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Phe Tyr Thr Phe Pro Val
65 70 75 80
Ser Lys Lys Gly Thr Lys Ile Ser Leu Gln His Ser Val Gly Lys Leu
85 90 95
Lys His Ile Gln Gly Ala Leu Lys His Lys Ile Thr Gly Asn Ser Tyr
100 105 110
Ser Tyr Gly Val Gly Ile Val His Pro Ile Leu Val His Glu Lys Asn
115 120 125
Lys Val Glu Leu Ser Leu Asp Trp Val Lys Gln Arg Thr Val Thr Asp
130 135 140
Leu Leu Lys Leu Lys Trp Val Asn Asn Arg Leu Ser Lys Tyr Thr Ala
145 150 155 160
Gly Ile Gly Ile Ser His Tyr Glu Glu Asp Ser Val Phe Tyr Thr Lys
165 170 175
Gln Asn Ile Thr Lys Gly Lys Phe Ile Pro Ile Ser Gly Asp Ala Arg
180 185 190
Asn Tyr Thr Lys Tyr Asp Met Phe Leu Ile Tyr Gln Lys Asn Leu Lys
195 200 205
Tyr Asn Thr Leu Val Thr Leu Lys Met Ala Gly Gln Tyr Ser Leu Ser
210 215 220
Lys Lys Leu Pro Ser Val Glu Gln Ile Tyr Ala Gly Gly Ala Tyr Asn
225 230 235 240
Val Arg Gly Tyr Pro Glu Asn Phe Met Gly Ala Glu His Gly Val Phe
245 250 255
Phe Asn Ala Glu Leu Ser Lys Leu Val Glu Asn Lys Gly Glu Phe Phe
260 265 270

Val Phe Leu Asp Gly Ala Ser Leu His Gly Glu Ser Ala Trp Gln Glu
275 280 285

Asn Arg Ile Phe Ser Ser Gly Phe Gly Tyr Lys Ile Arg Phe Leu Glu
290 295 300

Lys Asn Asn Ile Ala Val Ser Met Ala Phe Pro Trp Lys Lys Lys Ile
305 310 315 320

Asn Ser Ile Ser Val Asp Ser Asn Arg Ile Tyr Ile Thr Ile Asn His
325 330 335

Glu Phe

 $\langle 210 \rangle$ 8

<211> 9726

<212> ADN

<213> *Fusobacterium necrophorum*

 $\langle 400 \rangle$ 8

5

atgagcggca	tcaaaaaataa	cgttcagagg	acaaggaaga	ggatattcaga	ttctaaaaaa	60
gttttaatatga	ttttgggatt	gttgattaac	actatgacgg	tgagggctaa	tgatacaatc	120
accgcgactg	agaatttttg	aacaaaaata	gaaaaaaagg	ataatgttta	tgacattact	180
acaaacaaga	ttcaaggggga	gaacgctttt	aacagtttta	atagatttgc	tttaacagaa	240
aataatatag	caaatctata	ttttggggaa	aagaatagta	cgggggtaaa	taatcttttt	300
aactttgtca	atggaaaaat	tgaagtagat	gggattatca	acggaattcg	agaaaaataa	360
attggaggaa	atttatattt	cttaagctcg	gaagggatgg	cagtaggaaa	aaatggagtt	420
atcaatgctg	gttcttttca	ttctattatt	ccaaaacaag	atgattttaa	gaaggctttg	480
gaagaagcca	aacatggtaa	agttttta	ggaatcattc	cagtagatgg	aaaagtaaaa	540
attccattga	atccgaatgg	aagcattacg	gtagaaggaa	aaatcaatgc	tgttgaaggc	600
atcggtttat	atgcggcgga	tatttagattg	aaagatactg	caataactaaa	gacaggaatt	660
acagatttta	aaaattttagt	caatattagt	gatcgaataa	attctggtct	gaccggagat	720
ttaaaagcta	ccaagacaaa	atctggagat	attattcttt	cagctcacat	agattctcct	780
caaaaagcta	tgggaaaaaa	ttcaactggt	ggaaagagaa	tagaagaata	tgtaaaagga	840
aataccaaag	caaatattga	atctgatgct	gtattggaag	cagatggaaa	tataaaaatt	900
agtgcgaaaag	ctacaaatgg	gagatttata	aagaaagaag	gggaaaaaga	aacttataac	960
actcctttta	gtttatcaga	tgtggaagct	tccgtaagag	taaataaagg	aaaagtcata	1020
ggaaagaatg	ttgacattac	agctgaagca	aagaatttct	atgatgcaac	tttagttact	1080
aagcttgcaa	agcactcttt	tagctttggt	acaggttcta	tttctcctat	caattttaa	1140
ggatttttag	gtttattgac	aagtaagtcc	agtgtcgtta	ttggaaaaga	tgccaaagtc	1200
gaagcaacag	aaggaaaaggc	aaatattcat	tcttacagtg	gagtaagagc	aactatggga	1260

gcagctactt	ctccattaaa	aattaccaat	ttatatattg	agaaagccaa	tggaaaactt	1320
ctcagtatcg	gagcgggata	tatttctgca	aaaagtaatt	ccaatgtaac	tattgaagga	1380
gaagtaaaat	cgaaggggaag	agcagatatt	acttcaaaat	ctgaaaatac	tattgatgct	1440
tctgtttctg	ttggaacgat	gagagattcc	aataaagtag	ctctttcagt	attggtgacg	1500
gaaggagaaa	ataaatcttc	cgtcaagatt	gctaaaggag	caaaagtaga	atcagaaacg	1560
gatgatgtaa	atgtgagaag	tgaagcgatt	aattccattc	gagctgctgt	aaaaggtgga	1620
ttgggggata	gtggtaatgg	ggttgtggct	gcaaataatt	ctaactataa	tgcttcctcc	1680
cgtatagatg	tagatggata	tctacatgcc	aagaagcgac	taaatgtgga	ggctcataac	1740
attactaaaa	atagtgttct	gcaaacagga	tctgatttgg	gaacttccaa	gtttatgaat	1800
gatcacgttt	atgaatcagg	tcatctaaaa	tcaattttag	atgcaataaa	acagcggttt	1860
ggaggagaca	gtgtcaatga	ggaaataaag	aataagctaa	cgaacttatt	tagtgtcggg	1920
gtgtctgcaa	ccatagcaaa	tcataataat	tctgcttctg	tggcaatagg	agagagtggg	1980
agactttctt	caggagtggg	agggagtaat	gtaagggcat	taaatgaagc	tcaaaatctt	2040
cgagcgacta	cgtcaagtgg	aagtgtggct	gtacgaaagg	aagaaaaaaa	gaaacttatt	2100
ggaaatgcag	cagtttttta	tggaaactat	aaaaataatg	cttctgtgac	aattgccgat	2160
catgctgaat	tggtatcgga	aggaaaaatt	gatatcaaca	gtgaaaataa	aattgaatat	2220
aaaaatcctt	caaaaatggc	aaagtctggt	attgataaat	tagaactttt	aaagagagct	2280
tttggaagg	aaacgaaaac	tccagaatat	gatccgaaag	atattgaatc	tattgaaaaa	2340
ttattgaatg	cattttcaga	aaaattggat	ggaaaaccgg	agcttttact	aaatggtgaa	2400
agaatgacaa	ttattcttcc	ggatggaact	tcaaaaacag	gaactgctat	agaaattgca	2460
aactatgttc	agggagaaat	gaaaaaatta	gaggaaaaat	taccgaaagg	atttaaagct	2520
ttttcagaag	gattgagtgg	actgattaaa	gaaactttga	attttacagg	agtaggaaat	2580
tatgcaaatt	ttcacacttt	tacctcttcc	ggagctaatt	gagaaagaga	tgtttcttct	2640
gtgggaggag	ctgtttcgtg	ggtagaacag	gagaattata	gcaaggatc	cgttggaaaa	2700
ggagctaaac	ttgctgcaaa	aaaagattta	aatataaaag	ctatcaataa	agcagaaaca	2760
gtgaatttag	ttggaaatat	tggacttgcg	agaagcagta	catccggaag	tgtagtcgga	2820
ggaagattaa	atgttcaaag	atcgaaaaat	tcagctatcg	tagaagctaa	agaaaaagct	2880
gaattatcag	gagaaaatat	taatgcagat	gcattgaaca	gactttttca	tgtagcggga	2940
tcttttaaat	gtggctcagg	tgggaatgca	atcaatggaa	tgggaagtta	tagtggagggt	3000
atcagtaagg	caagagtttc	cattgatgac	gaagcatatt	tgaaagctaa	taaaaaatt	3060
gcttttaaaca	gtaagaatga	tacttctggt	tggaaatgct	ccggttcagc	gggaatcgga	3120
acgaaaaatg	cggcggtcgg	ggttgctggt	gcggtaaatg	attatgatat	ttcaaacaaa	3180
gcttccattg	aagataatga	cgaaggacaa	agtaaatatg	ataagaataa	agatgatgaa	3240
gtaacagtaa	ctgcggaatc	tttagaagta	gatgcaaaaa	cgaccggaac	aatcaacagt	3300

atctctgttg	ccggaggaat	taataagggt	ggaagtaa	cgagtgaaga	aaaaccgaaa	3360
tcagaagaaa	gaccagaggg	atctctgttg	aaaatcggaa	acaaagtga	ctctgtaaaa	3420
aataaaatta	cggatagtat	ggattcatta	acagaaaaaa	ttacaaatta	cattcttgaa	3480
ggagtaaaaa	aagcggggaa	tcttccttcg	aacgtttctc	atactcccga	taaaggaccg	3540
tctttcagtt	tgggagcttc	tgggaagtgt	tctttcaata	atattaaaa	ggaaacatct	3600
gctgtcgtag	atggagtaaa	gataaatttg	aagggagcaa	ataaaaagg	agaggtgact	3660
tcttctgatt	ctacttttgt	tggagcatgg	ggcggatctg	ctgcacttca	gtggaatcat	3720
attggaagt	gaaatagcaa	catcagtgtc	ggttttagctg	gagcggctgc	tgtaaataat	3780
attcaaagta	aaacaagtgc	tttggttaaa	aatagtata	ttcgaaatgc	caataaattt	3840
aaagtaaat	ctttgagtgg	aggaactcaa	gtagcagcag	gagcaggttt	ggaagcagtt	3900
aaagaaagt	gaggacaagg	aaaaagttat	ctattgggaa	cttctgcttc	tatcaactta	3960
gtgaacaat	aagtttctgc	aaaatcagaa	aataatacag	tagcaggaga	atctgaaagc	4020
caaaaaatg	atgttgatgt	cactgcttat	caagcggaca	cccaagtgc	aggagcttta	4080
aattttaca	ctggaaagtc	aaatggaact	gtaggggcta	ctgtgactgt	tgccaaatta	4140
aacaacaaag	taaatgcttc	tattagtgg	gggagatata	ctaactgtaa	tcgagcggac	4200
gcaaaagctc	ttttagcaac	cactcaagt	actgctgcag	tgacgacggg	agggacaatt	4260
agttctggag	cgggattagg	aaattatcaa	ggggctgttt	ctgtcaataa	gattgacaat	4320
gacgtggaag	ctagcgttga	taaatcttcc	atcgaaggag	ctaataaat	caatgtcatt	4380
gccaaagatg	tcaaaggaag	ttctgatcta	gcaaaagaat	atcaggcttt	actaaatgga	4440
aaagataaaa	aatatttaga	agatcgtgg	attaatacga	ctggaaatgg	ttattatacg	4500
aaggaacaac	tagaaaaagc	aaagaaaaaa	gaaggagcgg	tcattgtaaa	tgctgcttta	4560
tcggttgctg	gaacggataa	atccgctgga	ggagtagcta	ttgcagtcaa	tactgttaaa	4620
aataaattta	aagcagaatt	gagtggaaag	aataaggaag	ccggagagga	taaaattcat	4680
gcgaaacatg	taaatgtgga	ggcaaaatca	tctactgttg	ttgtgaatgc	ggcttctgga	4740
cttgctatca	gcaaagatgc	tttttcagga	atgggatctg	gagcatggca	agacttatca	4800
aatgacacga	ttgcaaaggt	ggataaagga	agaatttctg	ctgattcctt	aaatgtgaac	4860
gcaaataatt	ccattcttgg	ggtgaatgtt	gcgggaacca	ttgccggttc	tctttctacg	4920
gcggtaggag	ctgcttttgc	gaataatact	cttcataata	aaacctctgc	tttgattaca	4980
ggaacgaagg	taaatccttt	tagtggaaag	aatacaaaag	tcaatgtaca	agctttgaat	5040
gattctcata	ttacaaacgt	ttctgctgga	ggcgtgcaa	gtattaagca	ggctggaatc	5100
ggaggaatgg	tatctgtcaa	tcgtggttct	gatgaaacgg	aagctttagt	tagtgattct	5160
gagtttgaag	gagtaagttc	tttcaatgta	gatgcaaaag	atcaaaaaac	aataaataca	5220
attgccggaa	atgcaaaggt	aggaaaagcg	gctggagttg	gagcaacagt	tgctcataca	5280
aatattggaa	aacaatcagt	tatagctatt	gtaaaaaaca	gtaaaattac	aacggcgaat	5340

gatcaagata	gaaaaaatat	caatgtgact	gcaaaagatt	atactatgac	caatactata	5400
gcagtcggag	ttggaggagc	aaaaggagcc	tctgtgcaag	gagcttctgc	aagtactacc	5460
ttgaataaga	cagtttcttc	tcatgttgat	caaactgata	ttgacaaaga	tttagaggaa	5520
gaaaataatg	gaaataagga	aaaggcaa	gttaatgttc	tagctgaaaa	tacgagtcaa	5580
gtggtcacia	atgcgacagt	gctttccgga	gcaagtggac	aagctgcagt	aggagctgga	5640
gtagcagtta	ataaaattac	acaaaatact	tctgcacata	taaaaaatag	tactcaaaat	5700
gtacgaaatg	cttttggtaaa	aagcaa	cattcatcta	ttaaaacaat	tggaattgga	5760
gctggagttg	gagctggagg	agctggagtg	acaggttctg	tagcagtga	taagattgta	5820
aataatacga	tagcagaatt	aaatcatgca	aaaatcactg	cgaagggaaa	tgctggagtt	5880
attacagagt	ctgatgcggt	aattgcta	tatgcaggaa	cagtgtctgg	agtggccctg	5940
gcagcaatag	gagcctcaac	cagtgtgaat	gaaattacag	gatctacaaa	agcatatgta	6000
aaagattcta	cagtgattgc	taaagaagaa	acagatgatt	atattactac	tcaagggcaa	6060
gtagataaag	tggtagataa	agtattcaaa	aatcttaata	ttaacgaaga	cttatcacia	6120
aaaagaaaaa	taagtaataa	aaaaggattt	gttaccaata	gttcagctac	tcatacttta	6180
aaatctttat	tggaatgc	cgctggttca	ggacaagccg	gagtggcagg	aactgttaat	6240
atcaacaagg	tttatggaga	aacagaagct	cttgtagaaa	attctatatt	aaatgcaaaa	6300
cattattctg	taaaatcagg	agattacacg	aattcaatcg	gagtagtagg	ttctgttggt	6360
gttggtagaa	atgtaggagt	aggagcttct	tctgatacca	atattataaa	aagaaatacc	6420
aagacaagag	ttggaaaaac	tacaatgtct	gatgaagggt	tcggagaaga	agctgaaatt	6480
acagcagatt	ctaagcaagg	aatttcctct	tttggagtcg	gagtcgcagc	agccggggta	6540
ggagccggag	tggcaggaac	cgtttccgta	aatcaatttg	caggaaagac	ggaagtagat	6600
gtggaagaag	caaagatttt	ggtaaaaaaa	gctgagatta	cagcaaaacg	ttatagttct	6660
gttgcaattg	gaaatgccgc	agtcggagtg	gctgcaaaag	gagctggaat	tggaagcagca	6720
gtggcagtta	ccaaagatga	atcaaacacg	agagcaagag	tgaaaaattc	taaaattatg	6780
actcgaaca	agttagatgt	aatagcagaa	aatgagataa	aatcaggtag	tggaatcggg	6840
tcagccggag	ctggaattct	tcagccgga	gtatctggag	tggtttctgt	caataatatt	6900
gcaataaagg	tagaaacaga	tatgatcat	agtactttac	actcttctac	tgatgtaaat	6960
gtaaaagctc	ttaataaaa	ttcgaattcc	ttgacagccg	gtggaggagc	cgcaggctct	7020
gcagcagtta	ccggagtggg	ttctgttaac	actataaata	gttctgtgat	agctcgagtt	7080
cacaataact	ctgatttgac	ttccgtacga	gaaaaagtaa	atgtaacggc	aaaagaggaa	7140
aaaaatatta	agcaaacagc	agcaaatgca	ggaatcgag	gagcagcaat	cggagccaat	7200
gtcttggtaa	ataattttgg	aacagctgta	gaagatagaa	aaaattctga	aggaaaagga	7260
acagaagttt	taaaaacttt	agacgaagtt	aacaaagaac	aagataaaaa	agtaaatgat	7320
gctacgaaaa	aaatcttaca	atcagcaggt	atttctacag	aagatacttc	tgtaaaagcg	7380

gatagaggag atactcaggg agaaggaatt aaagccattg tgaagacttc tgatattatt	7440
ggaaaaaatg tagatattac aacagaggac aagaataata tcacttctac tgggtggttg	7500
ggaactgcag gtcttgcttc cgcacagga acagtggcag ttacaaatat taaaagaaat	7560
tccggagtta ctgttgaaaa ttcttttggtg aaagcagctg aaaaagtaaa tgtagatcg	7620
gatattacag gaaatgttgc tttacagca tatcaaggtc ctgtaggagc attggaata	7680
ggagctgcct atgcagaatt aaattctaatt ggaagatcaa atatcagtat taaaaattct	7740
aagctattag gaaaaaatat tgatgttatt gtaaaagata aatcggaatt gagagcggaa	7800
gcaaaaggat taaccgtagg agcggtagct gccggagcca ttatctcaa agcaaagaat	7860
gaaatgaatt cagaggttga aattgagaag agtattttca atgaagaaa tagagtaact	7920
agcccttcta aaggaattgg aagagaaatc aatgtcaaag tggaaaaga aaacagagtg	7980
actgctgaat ctcaaggagc ttctgttaga gcagtagcag gggcaggaaat tattccgaa	8040
gcaaaagatg ccggaagctc ttatttgaaa gttagtacaa aatccggaag aagtattttt	8100
catgcagata atgtgaatat ggaagcaaca cataaaatga aagtaacagc agtttctaaa	8160
gcagtaacag gttctgtatt gggaggagt ggagtcacca aggcagaagc tactgctgca	8220
ggtaaaacta tggtagaagt tgaggaagga aatttgttca gaacaaatcg attgaatgca	8280
atttctaaag tagaaggttt ggatgaagat aaagtaactg ctaaatcttc tgtagtatca	8340
ggaaatggag gaggaattgc cggagcagga gtgaatactt ctacagcaca aagtaatact	8400
gaatccgtag ttcgtttacg aaagcaagat tatgaaaata atgattacac aaaaaatat	8460
atttcagaag tcaatgctct tgctttaaat gatacaaaga atgaagcgaa tatagaatct	8520
ttagcggtag ccggtgtgca tgcacaagga acaaaacaag catttacgag atcaaacaag	8580
ttaacttcta caactgtaaa tggaggaaac gtatctcaac ttcgtgcaaa agctttggct	8640
aaaaatgaaa attatggaaa tgtaaaagga actggaggag ccttagtcgg agcggaaaca	8700
gcagccgttg aaaattatac aaagagtact acaggagcat tggttgcagg aaattgggaa	8760
attggagata aattagaaac gattgcaaga gataatacga ttgtaagagt caacggagac	8820
ggaaccaaag gaggtcttgt cggaaagaat ggtatttctg tgaaaaatac aatttcaggg	8880
gaaacaaaat catccattga agataaagcc agaattgttg gaaccggaag tgtaaattga	8940
gatgctttga atgaacttga tgtagatcta caaggaaaaa gtggtggcta tggtggaatt	9000
ggtattggaa atgttgatgt aaataatgtg attaagaaaa atgtagaagc caaaatcgga	9060
agacatgcta ttgtagaaac tactggaaaa caagaatatc aagcatttac aagagcaaaa	9120
gtaaatattc ttggaaaagg agacgtgca gctgcagctg caatatcgaa tgtacacatt	9180
tccaatgaga tggatattaa aaatttgcca aagcagtatg catcttctca attaataacc	9240
aaaaattcaa aaaataatat tacttttagca tcaagtagtg aatcgaatgt gaatgttcac	9300
ggggtggctg aagcaagagg tgcaggagcc aaagcgacag ttagtgtaaa gaatcaaata	9360
aatagaacta ataatgttga tttagcagga aaaattaaaa cagagggaaa catcaatgta	9420

60

tatgcccgat atgataaaaa ttataatata agtaagacaa attctaaggc tattgccgat 9480
 gccaaaagtc atgctgcagc tgcttcggca actgccacta ttgaaaaaaa tgaagtaaaa 9540
 ttttaataatg cgatccgaga atttaaaaaat aatctggcaa gattggaagg gaaagctaata 9600
 aaaaaaacgt cggtaggatac taatcaggta gactgggtata cggataaata tacatggcat 9660
 tcttctgaaa aagcatacaa aaaattgaca tatcaatcaa agagaggaga aaaagggaaa 9720
 aaatga 9726

<210> 9

<211> 1130

5

<212> ADN

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 9

atgagcggca tcaaaaataa cgttcagagg acaaggaaga ggatatacaga ttctaataaaa 60
 gttttaaatga ttttgggatt gttgattaac actatgacgg tgaggggctaa tgatacaatc 120
 accgcgactg agaatttttg aacaaaaata gaaaaaaagg ataattgtta tgacattact 180
 acaaaacaaga ttcaagggga gaacgctttt aacagtttta atagatttgc tttaacagaa 240
 aataatatag caaatctata ttttggggaa aagaatagta cgggggtaaa taatcttttt 300
 aactttgtca atggaaaaat tgaagtagat gggattatca acggaattcg agaaaataaa 360
 attggaggaa atttatattt cttaagctcg gaagggatgg cagtaggaaa aaatggagtt 420
 atcaatgctg gttcttttca ttctattatt ccaaaacaag atgattttta gaaggctttg 480
 gaagaagcca aacatggtaa agtttttaat ggaatcattc cagtagatgg aaaagtaaaa 540
 attccattga atccgaatgg aagcattacg gtagaaggaa aaatcaatgc tgttgaaggc 600
 atcggtttat atgcggcgga tatttagattg aaagatactg caataactaaa gacaggaatt 660
 acagatttta aaaatttagt caatattagt gatcgaataa attcttgtct gaccggagat 720
 ttaaaagcta ccaagacaaa atctggagat attattcttt cagctcacat agattctcct 780
 caaaaagcta tgggaaaaaa ttcaactgtt ggaaagagaa tagaagaata tgtaaaagga 840
 aataccaaag caaatattga atctgatgct gtattggaag cagatggaaa tataaaaatt 900
 agtgcgaaag ctacaaatgg gagatttata aagaagaag gggaaaaaga aacttataac 960
 actcctttaa gtttatcaga tgtggaagct tccgtaagag taaataaagg aaaagtcata 1020
 ggaaagaatg ttgacattac agctgaagca aagaatttct atgatgcaac tttagttact 1080
 aagcttgcaa agcactcttt tagctttgtt acaggttcta tttctctat 1130

10

<210> 10

<211> 2780

<212> ADN

<213> Fusobacterium necrophorum

15

<400> 10

gggagattta	taaagaaaga	aggggaaaaa	gaaacttata	acactccttt	aagtttatca	60
gatgtggaag	cttccgtaag	agtaataaa	ggaaaagtca	taggaaagaa	tgttgacatt	120
acagctgaag	caaagaattt	ctatgatgca	actttagtta	ctaagcttgc	aaagcactct	180
tttagctttg	ttacagggtc	tatttctcct	atcaatttaa	atggattttt	aggtttattg	240
acaagtaagt	ccagtgtcgt	tattggaaaa	gatgccaaag	tcgaagcaac	agaaggaaaag	300
gcaaataattc	attcttacag	tggagtaaga	gcaactatgg	gagcagctac	ttctccatta	360
aaaattacca	atttatattt	ggagaaagcc	aatggaaaac	ttctcagtat	cggagcggga	420
tatatttctg	caaaaagtaa	ttccaatgta	actattgaag	gagaagtaaa	atcgaaggga	480
agagcagata	ttacttcaaa	atctgaaaat	actattgatg	cttctgtttc	tggtggaacg	540
atgagagatt	ccaataaagt	agctctttca	gtattggtga	cgggaaggaga	aaataaatct	600
tccgtcaaga	ttgctaaagg	agcaaaagta	gaatcagaaa	cggatgatgt	aaatgtgaga	660
agtgaagcga	ttaattccat	tcgagctgct	gtaaaagggtg	gattggggga	tagtggtaat	720
ggggttgtgg	ctgcaaatat	ttctaactat	aatgcttcct	cccgtataga	tgtagatgga	780
tatctacatg	ccaagaagcg	actaaatgtg	gaggctcata	acattactaa	aaatagtgtt	840
ctgcaaacag	gatctgattt	gggaacttcc	aagtttatga	atgacacgt	ttatgaatca	900
ggtcatctaa	aatcaatttt	agatgcaata	aaacagcggg	ttggaggaga	cagtgtcaat	960
gaggaaataa	agaataagct	aacgaactta	tttagtgtcg	gtgtgtctgc	aaccatagca	1020
aatcataata	attctgcttc	tgtggcaata	ggagagagtg	gaagactttc	ttcaggagtg	1080
gaagggagta	atgtaagggc	attaaatgaa	gctcaaaatc	ttcgagcgac	tacgtcaagt	1140
ggaagtgtgg	ctgtacgaaa	ggaagaaaaa	aagaaaactta	ttggaaatgc	agcagttttt	1200
tatggaaact	ataaaaataa	tgcttctgtg	acaattgccg	atcatgctga	attggtatcg	1260
gaaggaaaaa	ttgatatcaa	cagtgaaaat	aaaattgaat	ataaaaatcc	ttcaaaaatg	1320
gcaaagtctg	ttattgataa	attagaactt	ttaaagagag	cttttgghaa	agaaacgaaa	1380
actccagaat	atgatccgaa	agatattgaa	tctattgaaa	aattattgaa	tgcattttca	1440
gaaaaattgg	atggaaaacc	ggagctttta	ctaaatgggtg	aaagaatgac	aattattctt	1500
ccggatggaa	cttcaaaaac	aggaactgct	atagaaattg	caaactatgt	tcaggggagaa	1560
atgaaaaaat	tagaggaaaa	attaccgaaa	ggattttaaag	ctttttcaga	aggattgagt	1620
ggactgatta	aagaaacttt	gaattttaca	ggagtaggaa	attatgcaaa	ttttcacact	1680
tttacctctt	ccggagctaa	tggagaaaga	gatgtttctt	ctgtgggagg	agctgtttcg	1740
tgggtagaac	aggagaatta	tagcaaggta	tccgttggaa	aaggagctaa	acttgctgca	1800
aaaaaagatt	taaatataaa	agctatcaat	aaagcagaaa	cagtgaattt	agttggaaat	1860

attggacttg	cgagaagcag	tacatccgga	agtgcagtcg	gaggaagatt	aaatgttcaa	1920
agatcgaaaa	attcagctat	cgtagaagct	aaagaaaaag	ctgaattatc	aggagaaaat	1980
attaatgcag	atgcattgaa	cagacttttt	catgtagcgg	gatcttttaa	tggtggctca	2040
ggtgggaatg	caatcaatgg	aatgggaagt	tatagtggag	gtatcagtaa	ggcaagagtt	2100
tccattgatg	acgaagcata	tttgaaagct	aataaaaaaa	ttgctttaaa	cagtaagaat	2160
gatacttctg	tttggaatgc	tgccggttca	gcgggaatcg	gaacgaaaaa	tgccggcggtc	2220
ggggttgctg	ttgcggtaaa	tgattatgat	atttcaaaca	aagcttccat	tgaagataat	2280
gacgaaggac	aaagtaaata	tgataagaat	aaagatgatg	aagtaacagt	aactgcggaa	2340
tctttagaag	tagatgcaaa	aacgaccgga	acaatcaaca	gtatttctgt	tgccggaggga	2400
attaataagg	ttggaagtaa	accgagtga	gaaaaaccga	aatcagaaga	aagaccagag	2460
ggattttttg	gcaaaatcgg	aaacaaagtg	gactctgtaa	aaaataaaat	tacggatagt	2520
atggattcat	taacagaaaa	aattacaaat	tacatttctg	aaggagtaaa	aaaagcgggg	2580
aatcttctct	cgaacgtttc	tcatactccc	gataaaggac	cgtctttcag	tttgggagct	2640
tctggaagtg	tttctttcaa	taatattaaa	aaggaaacat	ctgctgtcgt	agatggagta	2700
aagataaatt	tgaaggggagc	aaataaaaag	gtagaggtga	cttcttctga	ttctactttt	2760
gttggagcat	ggggcggtac					2780

<210> 11

<211> 2141

5

<212> ADN

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 11

ggagcttctg	gaagtgtttc	tttcaataat	attaaaaagg	aaacatctgc	tgtcgtagat	60
ggagtaaaga	taaatttgaa	gggagcaa	aaaaaggtag	aggtgacttc	ttctgattct	120
acttttggtg	gagcatgggg	cggatctgct	gcacttcagt	ggaatcatat	tggaagtgga	180
aatagcaaca	tcagtgtctg	tttagctgga	gcggctgctg	taaataatat	tcaaagttaa	240
acaagtgcct	tggttaaaaa	tagtgatatt	cgaaatgcca	ataaatTTAA	agtaaatgct	300
ttgagtggag	gaactcaagt	agcagcagga	gcagggttgg	aagcagttaa	agaaagtgga	360
ggacaaggaa	aaagttatct	attgggaact	tctgcttcta	tcaacttagt	gaacaatgaa	420
gtttctgcaa	aatcagaaaa	taatacagta	gcaggagaat	ctgaaagcca	aaaaatggat	480
gttgatgtca	ctgcttatca	agcggacacc	caagtgtacag	gagctttaaa	tttacaagct	540
ggaaagtcaa	atggaaactgt	aggggctact	gtgactgttg	ccaaattaaa	caacaaagta	600
aatgcttcta	ttagtggtgg	gagatatact	aacgttaatc	gagcggacgc	aaaagctctt	660
ttagcaacca	ctcaagtgtac	tgctgcagtg	acgacgggag	ggacaattag	ttctggagcg	720

```

ggattaggaa attatcaagg ggctgtttct gtcaataaga ttgacaatga cgtggaagct 780
agcgttgata aatcttccat cgaaggagct aatgaaatca atgtcattgc caaagatgtc 840
aaaggaagtt ctgatctagc aaaagaatat caggctttac taaatggaaa agataaaaaa 900
tatttagaag atcgtggtat taatacgact ggaatgggtt attatacgaa ggaacaacta 960
gaaaaagcaa agaaaaaaga aggagcgggc attgtaaatg ctgctttatc gggtgctgga 1020
acggataaat ccgctggagg agtagctatt gcagtcaata ctgttaaaaa taaattttaa 1080
gcagaattga gtggaagcaa taaggaagcc ggagaggata aaattcatgc gaaacatgta 1140
aatgtggagg caaatcatc tactgttggt gtgaatgcgg cttctggact tgctatcagc 1200
aaagatgctt tttcaggaat gggatctgga gcatggcaag acttatcaaa tgacacgatt 1260
gcaaagggtg ataaaggaag aatttctgct gattccttaa atgtgaacgc aaataattcc 1320
attcttgagg tgaatgttg gcgaaccatt gccggttctc tttctacggc ggtaggagct 1380
gcttttgca ataatactct tcataataaa acctctgctt tgattacagg aacgaaggta 1440
aatcctttta gtggaagaa tacaaaagtc aatgtacaag ctttgaatga ttctcatatt 1500
acaaacgttt ctgctggagg cgctgcaagt attaagcagg ctggaatcgg aggaatggta 1560
tctgtcaatc gtggttctga tgaaacggaa gctttagtta gtgattctga gtttgaagga 1620
gtaagtctt tcaatgtaga tgcaaaagat caaaaaacaa taaatacaat tgccggaaat 1680
gcaaatggag gaaaagcggc tggagttgga gcaacagttg ctcatacaaa tattggaaaa 1740
caatcagtta tagctattgt aaaaaacagt aaaattacaa cggcgaatga tcaagataga 1800
aaaaatatca atgtgactgc aaaagattat actatgacca atactatagc agtcggagtt 1860
ggaggagcaa aaggagcctc tgtgcaagga gcttctgcaa gtactacctt gaataagaca 1920
gtttcttctc atgttgatca aactgatatt gacaaagatt tagaggaaga aaataatgga 1980
aataaggaaa aggcaaatgt taatgttcta gctgaaaata cgagtcaagt ggtcacaaat 2040
gcgacagtgc tttccggagc aagtggacaa gctgcagtag gagctggagt agcagttaat 2100
aaaattacac aaaatacttc tgcacatata aaaaatagta c 2141

```

<210> 12

<211> 1887

5

<212> ADN

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 12

```

ctgcagtagg agctggagta gcagttaata aaattacaca aaatacttct gcacatataa 60
aaaatagtac tcaaatgta cgaaatgctt tggtaaaaag caaatctcat tcacttatta 120
aaacaattgg aattggagct ggagttggag ctggaggagc tggagtgaac gggtctgtag 180
cagtgaataa gattgtaaat aatacgatag cagaattaaa tcatgcaaaa atcactgcga 240

```

```

agggaaatgt cggagttatt acagagtctg atgcggtaat tgctaattat gcaggaacag 300
tgtctggagt ggcccgtgca gcaataggag cctcaaccag tgtgaatgaa attacaggat 360
ctacaaaagc atatgtaaaa gattctacag tgattgctaa agaagaaaca gatgattata 420
ttactactca agggcaagta gataaagtgg tagataaagt attcaaaaat cttaatatta 480
acgaagactt atcacaaaaa agaaaaataa gtaataaaaa aggatttggt accaatagtt 540
cagctactca tactttaaaa tctttattgg caaatgccgc tggttcagga caagccggag 600
tggcaggaac tgtaatatc aacaagggtt atggagaaac agaagctctt gtagaaaatt 660
ctatattaaa tgcaaacat tattctgtaa aatcaggaga ttacacgaat tcaatcggag 720
tagtaggttc tgttggtggt ggtggaaatg taggagtagg agcttcttct gataccaata 780
ttataaaaag aaataccaag acaagagttg gaaaaactac aatgtctgat gaagggttcg 840
gagaagaagc tgaaattaca gcagattcta agcaaggaat ttcctctttt ggagtcggag 900
tcgcagcagc cggggtagga gccggagtg caggaaccgt ttccgtaa atcaatttcgag 960
gaaagacgga agtagatgtg gaagaagcaa agattttggt aaaaaagct gagattacag 1020
caaaacgtta tagttctgtt gcaattggaa atgccgcagt cggagtggct gcaaaaggag 1080
ctggaattgg agcagcagtg gcagttacca aagatgaatc aaacacgaga gcaagagtga 1140
aaaattctaa aattatgact cgaaacaagt tagatgtaat agcagaaaat gagataaaat 1200
caggtactgg aatcggttca gccggagctg gaattcttgc agccggagta tctggagtgg 1260
tttctgtcaa taatattgca aataaggtag aaacagatat cgatcatagt actttacact 1320
cttctactga tgtaaatgta aaagctctta ataaaatttc gaattccttg acagccggtg 1380
gaggagccgc aggtcttgca gcagttaccg gagtgggttc tgtaaacact ataaatagtt 1440
ctgtgatagc tcgagttcac aataactctg atttgacttc cgtacgagaa aaagtaaatg 1500
taacggcaaa agaggaaaaa aatattaagc aaacagcagc aaatgcagga atcggaggag 1560
cagcaatcgg agccaatgtc ttggtaaata attttggaac agctgtagaa gatagaaaaa 1620
attctgaagg aaaaggaaca gaagttttaa aaactttaga cgaagttaac aaagaacaag 1680
ataaaaaagt aatgatgct acgaaaaaaa tcttacaatc agcaggtatt tctacagaag 1740
atacttctgt aaaagcggat agaggagata ctcagggaga aggaattaaa gccattgtga 1800
agacttctga tattattgga aaaaatgtag atattacaac agaggacaag aataatatca 1860
cttctactgg tggtttggga actgcag 1887

```

<210> 13

<211> 2322

5

<212> ADN

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 13

ggaattaaag ccattgtgaa gacttctgat attattggaa aaaatgtaga tattacaaca	60
gaggacaaga ataatatcac ttctactggt ggtttgggaa ctgcaggtct tgcttccgca	120
tcaggaacag tggcagttac aaatattaaa agaaattccg gagttactgt tgaaaattct	180
tttgtgaaag cagctgaaaa agtaaatgtt agatcggata ttacaggaaa tgttgcttta	240
acagcatatc aaggtcctgt aggagcattg ggaataggag ctgcctatgc agaattaaat	300
tctaattgaa gatcaaatat cagtattaaa aattctaagc tattaggaaa aaatattgat	360
gttattgtaa aagataaatc ggaattgaga gcggaagcaa aaggattaac cgtaggagcg	420
gtagctgccg gagccattat ctcaaaagca aagaatgaaa tgaattcaga ggttgaaatt	480
gagaagagta ttttcaatga agaaaataga gtaactagcc cttctaaagg aattggaaga	540
gaaatcaatg tcaaagtgga aaaagaaaac agagtgactg ctgaatctca aggagcttct	600
gtaggagcag tagcaggggc aggaattatt tccgaagcaa aagatgccgg aagctcttat	660
ttgaaagtta gtacaaaatc cggaagaagt atttttcatg cagataatgt gaatatggaa	720
gcaacacata aatgaaaagt aacagcagtt tctaaagcag taacagggtc tgtattggga	780
ggagttggag tcaccaaggc agaagctact gctgcaggta aaactatggt agaagttgag	840
gaaggaaatt tgttcagaac aaatcgattg aatgcaattt ctaaagtaga aggtttggat	900
gaagataaag taactgctaa atcttctgta gtatcaggaa atggaggagg aattgccgga	960
gcaggagtga atacttctac agcacaaagt aatactgaat ccgtagtctg tttacgaaag	1020
caagattatg aaaataatga ttacacaaaa aaatatattt cagaagtcaa tgctcttgct	1080
ttaaatgata caaagaatga agcgaatata gaatctttag cggtagccgg tgtgcatgca	1140
caaggaacaa acaaagcatt tacgagatca aacaagttaa cttctacaac tgtaaatgga	1200
ggaaacgtat ctcaacttcg tgcaaaagct ttggctaata atgaaaatta tggaaatgta	1260
aaagggaactg gaggagcctt agtcggagcg gaaacagcag ccgttgaaaa ttatacaag	1320
agtactacag gagcattggt tgcaaggaaat tgggaaattg gagataaatt agaaacgatt	1380
gcaagagata atacgattgt aagagtcaac ggagacggaa ccaaaggagg tcttgtcggg	1440
aagaatggta tttctgtgaa aaatacaatt tcagggggaa caaatcatc cattgaagat	1500
aaagccagaa ttgttggaac cggaagtgt aatgtagatg ctttgaatga acttgatgta	1560
gatctacaag gaaaaagtgg tggctatggt ggaattggta ttggaaatgt tgatgtaaat	1620
aatgtgatta agaaaaatgt agaagccaaa atcgggaagc atgctattgt agaaactact	1680
ggaaaacaag aatatcaagc atttacaaga gcaaaagtaa atattcttg aaaggagac	1740
gctgcagctg cagctgcaat atcgaatgta cacatttcca atgagatgga tattaaaaat	1800
ttggcaaagc agtatgcac ttctcaatta ataaccaaaa attcaaaaaa taatattact	1860
ttagcatcaa gtagtgaatc gaatgtgaat gttcatgggg tggctgaagc aagaggtgca	1920
ggagccaaag cgacagttag tgtaaagaat caaataaata gaactaataa tgttgattta	1980
gcaggaaaaa ttaaacaga gggaaacatc aatgtatatg ccggatatga taaaaattat	2040
aatataagta agacaaattc taaggctatt gcggatgcc aagtcatgc tgcagctgct	2100
tcggcaactg ccactattga aaaaaatgaa gtaaaattta ataatgcgat ccgagaattt	2160
aaaaataatc tggcaagatt ggaagggaaa gctaataaaa aaacgtcggg aggatcta	2220
caggtagact ggtatcggg taaatataca tggcattctt ctgaaaaagc atacaaaaaa	2280
ttgacatatc aatcaaagag aggagaaaaa gggaaaaaat ga	2322

66

<210> 14

<211> 1017

<212> ADN

<213> Fusobacterium necrophorum

5

<400> 14

```

atcaatatgg cttccgaaa agttccggga acgaccgatt attttgtgca aatctatgaa    60
ccaaaaagac agcagttttt tgtttttgca gataatttag gacaaaaaaa tacaggagaa   120
ttacgatggg ggctaaatta tattaataat agtggttacag gaaacagaga tcaactgtct   180
cttacctctt tagtaacaga aggaacggct tctctatctt ctttttatac ttttcctgtt   240
tctaaaaaag gaaccaaagt atcactacaa cattctgtag gaaagttgaa acatatacaa   300
ggggctttta agcataaat aactggaaac tcttatagtt atggggttgg aatagttcat   360
cctattcttg ttcatgaaaa aaataaagta gaactttcct tggattgggt aaaacaaagg   420
actgttacag atctattgaa attgaaatgg gtaataata gactttctaa gtatacagcg   480
ggaattggaa taagccatta tgaggaagat agtggtttct atacaaagca aaatattaca   540
aagggaaaat ttattccaat ttcgggagat gcaagaaatt atacaaagta tgatatgttt   600
ctaatatatc agaaaaactt gaaatataac acttttagta cactaaagat ggcagggcaa   660
tattctctga gtaaaaaatt accctctgtc gagcaaattt atgcaggagg agcctataat   720
gttcgtggtt atccggaaaa ttttatggga gctgaacacg gagttttttt caatgctgaa   780
ttatcaaat tagtagagaa taaaggagaa ttttttgtt ttttagatgg ggcttctctt   840
catggagaga gtgcttgga ggaaaataga attttttagct caggttttgg atataaaata   900
agggttttag aaaaaaataa tattgctgtt agcatggcat ttccatggaa gaaaaaata   960
aatagtattt cagtagattc taatcgaatc tatattacaa taaatcatga attttaa   1017

```

<210> 15

<211> 11130

<212> ADN

<213> Fusobacterium necrophorum

10

<400> 15

gatcaatatg gcttccggaa aagttccggg aacgaccgat tattttgtgc aaatctatga	60
acaaaaaaga cagcagtttt ttgtttttgc agataattta ggacaaaaaa atacaggaga	120
attacgatgg gggctaaatt atattaataa tagtgttaca ggaaacagag atcaactgtc	180
tcttacctct ttagtaacag aaggaacggc ttctctatct tctttttata cttttcctgt	240
ttctaaaaaa ggaacccaaa tatcactaca acattctgta ggaaagtga aacatataca	300
aggggcttta aagcataaaa taactggaaa ctcttatagt tatgggggtg gaatagttca	360
tcctattctg gttcatgaaa aaaataaagt agaactttcc ttggattggg taaaacaaag	420
gactgttaca gatctattga aattgaaatg ggtaaataat agactttcta agtatacagc	480
gggaattgga ataagccatt atgaggaaga tagtgttttc tatacaaagc aaaatattac	540
aaagggaaaa tttattccaa ttccgggaga tgcaagaaat tatacaaagt atgatatgtt	600
tctaatatat cagaaaaact tgaaatataa cacttttagta acactaaaga tggcagggca	660
atattctctg agtaaaaaat taccctctgt cgagcaaatt tatgcaggag gagcctataa	720
tgttcgtggt tatccggaaa attttatggg agctgaacac ggagtttttt tcaatgctga	780
attatcaaaa ttagtagaga ataaaggaga attttttgtt ttttagatg gggcttctct	840
tcattggagag agtgcttggc aggaaaatag aatttttagc tcaggttttg gatataaaat	900
aagggtttta gaaaaaata atattgctgt tagcatggca tttccatgga agaaaaaat	960
aaatagtatt tcagtagatt ctaatcgaat ctatattaca ataatcatg aattttaaag	1020
ggggtaaagc aaaatgagcg gcatcaaaaa taacgttcag aggacaagga agaggatatc	1080
agattctaaa aaagttttaa tgattttggg attgttgatt aacactatga cggtagggc	1140
taatgatata atcaccgcga ctgagaattt tggaacaaaa atagaaaaaa aggataatgt	1200
ttatgacatt actacaaaca agattcaagg ggagaacgct tttaacagtt ttaatagatt	1260
tgctttaaca gaaaataata tagcaaatct atattttggg gaaaagaata gtacgggggt	1320
aaataatctt ttttaactttg tcaatggaaa aattgaagta gatgggatta tcaacggaat	1380
tcgagaaaaat aaaattggag gaaatttata tttcttaagc tcggaaggga tggcagtagg	1440
aaaaaatgga gttatcaatg ctggttcttt tcattctatt attccaaaac aagatgattt	1500
taagaaggct ttggaagaag ccaaacatgg taaagttttt aatggaatca ttccagtaga	1560
tggaagaagta aaaattccat tgaatccgaa tggaagcatt acggtagaag gaaaaatcaa	1620
tgctgttgaa ggcacgggtt tatatgcggc ggatattaga ttgaaagata ctgcaatact	1680
aaagacagga attacagatt ttaaaaattt agtcaatatt agtgatcgaa taaattctgg	1740
tctgaccgga gatttaaaag ctaccaagac aaaatctgga gatattattc tttcagctca	1800
catagattct cctcaaaaag ctatgggaaa aaattcaact gttggaaaga gaatagaaga	1860
atatgtaaaa ggaaatacca aagcaaatat tgaatctgat gctgtattgg aagcagatgg	1920
aaatataaaa attagtgcga aagctacaaa tgggagattt ataaagaaag aaggggaaaa	1980
agaaacttat aacactcctt taagtttatc agatgtggaa gcttccgtaa gagtaaataa	2040

aggaaaagtc ataggaaaga atgttgacat tacagctgaa gcaaagaatt tctatgatgc	2100
aacttttagtt actaagcttg caaagcactc ttttagcttt gttacagggt ctatttctcc	2160
tatcaattta aatggatttt taggtttatt gacaagtaag tccagtgtcg ttattggaaa	2220
agatgccaaa gtcgaagcaa cagaaggaaa ggcaaatatt cattcttaca gtggagtaag	2280
agcaactatg ggagcagcta cttctccatt aaaaattacc aatttatatt tggagaaagc	2340
caatggaaaa cttctcagta tcggagcggg atatatttct gcaaaaagta attccaatgt	2400
aactattgaa ggagaagtaa aatcgaaggg aagagcagat attacttcaa aatctgaaaa	2460
tactattgat gcttctgttt ctgttggaac gatgagagat tccaataaag tagctctttc	2520
agtattggtg acggaaggag aaaataaatc ttccgtcaag attgctaaag gagcaaaagt	2580
agaatcagaa acggatgatg taaatgtgag aagtgaagcg attaattcca ttcgagctgc	2640
tgtaaaaggt ggattggggg atagtggtaa tgggggtgtg gctgcaaata tttctaacta	2700
taatgcttcc tcccgatatag atgtagatgg atatctacat gccaagaagc gactaaatgt	2760
ggaggctcat aacattacta aaaatagtgt tctgcaaaca ggatctgatt tgggaacttc	2820
caagtttatg aatgatcacg tttatgaatc aggtcatcta aaatcaattt tagatgcaat	2880
aaaacagcgg tttggaggag acagtgtcaa tgaggaaata aagaataagc taacgaactt	2940
atttagtgtc ggtgtgtctg caaccatagc aaatcataat aattctgctt ctgtggcaat	3000
aggagagagt ggaagacttt cttcaggagt ggaagggagt aatgtaaggg cattaaatga	3060
agctcaaaat cttcgagcga ctacgtcaag tggaagtgtg gctgtacgaa aggaagaaaa	3120
aaagaaactt attggaaatg cagcagtttt ttatggaaac tataaaaata atgcttctgt	3180
gacaattgcc gatcatgctg aatttggtatc ggaaggaaaa attgatatca acagtgaaaa	3240
taaaattgaa tataaaaatc cttcaaaaat ggcaaagtct gttattgata aattagaact	3300
tttaaagaga gcttttgaa aagaaacgaa aactccagaa tatgatccga aagatattga	3360
atctattgaa aaattattga atgcattttc agaaaaattg gatggaaaac cggagctttt	3420
actaaatggt gaaagaatga caattattct tccggatgga acttcaaaaa caggaaactgc	3480
tatagaaatt gcaaaactatg ttcagggaga aatgaaaaaa ttagaggaaa aattaccgaa	3540
aggatttaaa gctttttcag aaggattgag tggactgatt aaagaaactt tgaattttac	3600
aggagtagga aattatgcaa attttcacac ttttacctct tccggagcta atggagaaag	3660
agatgtttct tctgtgggag gagctgtttc gtgggtagaa caggagaatt atagcaaggt	3720
atccgttgga aaaggagcta aacttgctgc aaaaaaagat ttaaataaa aagctatcaa	3780
taaagcagaa acagtgaatt tagttggaaa tattggactt gcgagaagca gtacatccgg	3840
aagtgcagtc ggaggaagat taaatgttca aagatcgaaa aattcagcta tcgtagaagc	3900
taaagaaaaa gctgaattat caggagaaaa tattaatgca gatgcattga acagactttt	3960
tcatgtagcg ggatctttta atggtggctc aggtgggaat gcaatcaatg gaatgggaag	4020
ttatagtgga ggtatcagta aggcaagagt ttccattgat gacgaagcat atttgaagc	4080

taataaaaaa	attgctttaa	acagtaagaa	tgatacttct	gtttggaatg	ctgccgggttc	4140
agcgggaatc	ggaacgaaaa	atgcggcggg	cgggggttgc	gttgcggtaa	atgattatga	4200
tatttcaaac	aaagcttcca	ttgaagataa	tgacgaagga	caaagtaa	atgataagaa	4260
taaagatgat	gaagtaacag	taactgcgga	atcttttagaa	gtagatgcaa	aaacgaccgg	4320
aacaatcaac	agtatttctg	ttgccggagg	aattaataag	gttggaagta	aaccgagtga	4380
agaaaaaccg	aatcagaag	aaagaccaga	gggatttttt	ggcaaatcg	gaaacaaagt	4440
ggactctgta	aaaaataaaa	ttacggatag	tatggattca	ttacagaaa	aaattacaaa	4500
ttacatttct	gaaggagtaa	aaaaagcggg	gaatcttcct	tcgaacgttt	ctcatactcc	4560
cgataaagga	ccgtctttca	gtttgggagc	ttctgggaagt	gtttctttca	ataatattaa	4620
aaaggaaaca	tctgctgtcg	tagatggagt	aaagataaat	ttgaagggag	caaataaaaa	4680
ggtagagggtg	acttcttctg	attctacttt	tggtggagca	tggggcggtat	ctgctgcact	4740
tcagtggaa	catattggaa	gtggaaatag	caacatcagt	gctggtttag	ctggagcggc	4800
tgctgtaaat	aatattcaaa	gtaaaacaag	tgctttgggt	aaaaatagt	atattcgaaa	4860
tgccaataaa	tttaaagtaa	atgctttgag	tggaggaaact	caagtagcag	caggagcagg	4920
tttggaaagca	gttaaagaaa	gtggaggaca	aggaaaaagt	tatctattgg	gaacttctgc	4980
ttctatcaac	ttagtgaaca	atgaagtttc	tgcaaatca	gaaaataata	cagtagcagg	5040
agaatctgaa	agccaaaaaa	tggtatgtga	tgctactgct	tatcaagcgg	acaccaagt	5100
gacaggagct	ttaaatttac	aagctggaaa	gtcaaatgga	actgtagggg	ctactgtgac	5160
tgttgccaaa	ttaaacaaca	aagtaaatgc	ttctattagt	ggtgggagat	atactaactg	5220
taatcgagcg	gacgcaaaag	ctcttttagc	aaccactcaa	gtgactgctg	cagtgcgcac	5280
gggagggaca	attagtctctg	gagcgggatt	aggaaattat	caaggggctg	tttctgtcaa	5340
taagattgac	aatgacgtgg	aagctagcgt	tgataaatct	tccatcgaag	gagctaataga	5400
aatcaatgtc	attgccaaag	atgtcaaagg	aagtcttgat	ctagcaaaag	aatatcaggc	5460
tttactaaat	ggaaaagata	aaaaatattt	agaagatcgt	ggtattaata	cgactggaaa	5520
tggttattat	acgaaggaac	aactagaaaa	agcaaagaaa	aaagaaggag	cggtcattgt	5580
aatgctgct	ttatcggttg	ctggaacgga	taaatccgct	ggaggagtag	ctattgcagt	5640
caatactgtt	aaaaataaat	ttaaagcaga	attgagtgga	agcaataagg	aagccggaga	5700
ggataaaatt	catgcgaaac	atgtaaatgt	ggaggcaaaa	tcatctactg	ttgttgtaga	5760
tgcggttct	ggacttgcta	tcagcaaaga	tgctttttca	ggaatgggat	ctggagcatg	5820
gcaagactta	tcaaatgaca	cgattgcaaa	ggtggataaa	ggaagaattt	ctgctgattc	5880
cttaaatgtg	aacgcaaata	attccattct	tggggtgaat	gttgcgggaa	ccattgccgg	5940
ttctctttct	acggcggtag	gagctgcttt	tgcaataaat	actcttcata	ataaaacctc	6000
tgctttgatt	acaggaacga	aggtaaattcc	ttttagtggg	aagaatacaa	aagtcaatgt	6060
acaagctttg	aatgattctc	atattacaaa	cgtttctgct	ggaggcgctg	caagtattaa	6120

gcaggctgga atcggaggaa tggatatctgt caatcgtggt tctgatgaaa cggaagcttt 6180
 agtttagtgat tctgagtttg aaggagtaag ttctttcaat gtagatgcaa aagatcaaaa 6240
 aacaataaat acaattgccg gaaatgcaaa tggaggaaaa gcggctggag ttggagcaac 6300
 agttgctcat acaaatattg gaaaacaatc agttatagct attgtaaaaa acagtataat 6360
 tacaacggcg aatgatcaag atagaaaaaa tatcaatgtg actgcaaaaag attatactat 6420
 gaccaatact atagcagtcg gagttggagg agcaaaagga gcctctgtgc aaggagcttc 6480
 tgcaagtact accttgaata agacagtttc ttctcatgtt gatcaaactg atattgacaa 6540
 agatttagag gaagaaaata atggaaataa ggaaaaggca aatgttaatg ttctagctga 6600
 aaatcagagt caagtggta caaatgcgac agtgctttcc ggagcaagtg gacaagctgc 6660
 agtaggagct ggagtagcag ttaataaaat tacacaaaat acttctgcac atataaaaaa 6720
 tagtactcaa aatgtacgaa atgctttggt aaaaagcaaa tctcattcat ctattaaaac 6780
 aattggaatt ggagctggag ttggagctgg aggagctgga gtgacagggt ctgtagcagt 6840
 gaataagatt gtaataata cgatagcaga attaaatcat gcaaaaatca ctgcgaaggg 6900
 aaatgtcggg gttattacag agtctgatgc ggtaattgct aattatgcag gaacagtgtc 6960
 tggagtggcc cgtgcagcaa taggagctc aaccagtgtg aatgaaatta caggatctac 7020
 aaaagcatat gtaaaagatt ctacagtgat tgctaaagaa gaaacagatg attatattac 7080
 tactcaaggg caagtagata aagtggtaga taaagtattc aaaaatctta atattaacga 7140
 agacttatca caaaaaagaa aaataagtaa taaaaagga ttgtttacca atagttcagc 7200
 tactcatact taaaatctt tattggcaaa tgccgctggt tcaggacaag ccggagtggc 7260
 aggaaactgtt aatatcaaca aggtttatgg agaaacagaa gctctttagt aaaattctat 7320
 attaaatgca aaacattatt ctgtaaaatc aggagattac acgaattcaa tcggagtagt 7380
 aggttctgtt ggtgttggtg gaaatgtagg agtaggagct tcttctgata ccaatattat 7440
 aaaaagaaat accaagacaa gagttggaaa aactacaatg tctgatgaag gtttcggaga 7500
 agaagctgaa attacagcag attctaagca aggaatttcc tcttttggag tcggagctgc 7560
 agcagccggg gtaggagccg gagtggcagg aaccgtttcc gtaaatcaat ttgcaggaaa 7620
 gacggaagta gatgtggaag aagcaaagat tttggtaaaa aaagctgaga ttacagcaaa 7680
 acgttatagt tctgttgcaa ttggaaatgc cgagctcgga gtggctgcaa aaggagctgg 7740
 aattggagca gcagtggcag ttaccaaaga tgaatcaaac acgagagcaa gagtgaaaaa 7800
 ttctaaaatt atgactcgaa acaagttaga tgtaatagca gaaaatgaga taaaatcagg 7860
 tactggaatc ggttcagccg gagctggaat tcttgagcc ggagtatctg gagtggtttc 7920
 tgtcaataat attgcaaata aggtagaaac agatattgat catagtactt tacactcttc 7980
 tactgatgta aatgtaaaag ctcttaataa aatttcgaat tccttgacag ccggtggagg 8040
 agccgcaggt cttgcagcag ttaccggagt ggtttctgtt aacactataa atagttctgt 8100
 gatagctcga gttcacaata actctgattt gacttccgta cgagaaaaag taaatgtaac 8160

ggcaaaagag	gaaaaaata	ttaagcaaac	agcagcaaat	gcaggaatcg	gaggagcagc	8220
aatcggagcc	aatgtcttgg	taaataattt	tggaacagct	gtagaagata	gaaaaaatc	8280
tgaaggaaaa	ggaacagaag	ttttaaaaac	tttagacgaa	gttaacaaag	aacaagataa	8340
aaaagtaaat	gatgctacga	aaaaaatctt	acaatcagca	ggtatttcta	cagaagatac	8400
ttctgtaaaa	gcggatagag	gagatactca	gggagaagga	attaaagcca	ttgtgaagac	8460
ttctgatatt	attggaaaaa	atgtagatat	tacaacagag	gacaagaata	atatcacttc	8520
tactgggtgt	ttgggaactg	caggtcttgc	ttccgcatca	ggaacagtgg	cagttacaaa	8580
tattaaaaga	aattccggag	ttactgttga	aaattctttt	gtgaaagcag	ctgaaaaagt	8640
aaatgttaga	tcggatatta	caggaaatgt	tgctttaaca	gcatatcaag	gtcctgtagg	8700
agcattggga	ataggagctg	cctatgcaga	attaaattct	aatggaagat	caaatatcag	8760
tattaaaaat	tctaagctat	taggaaaaaa	tattgatgtt	attgtaaaag	ataaatcgga	8820
attgagagcg	gaagcaaaag	gattaaccgt	aggagcggta	gctgccggag	ccattatctc	8880
aaaagcaaa	aatgaaatga	attcagaggt	tgaaattgag	aagagtattt	tcaatgaaga	8940
aaatagagta	actagccctt	ctaaaggaat	tggaagagaa	atcaatgtca	aagtggaaaa	9000
agaaaacaga	gtgactgctg	aatctcaagg	agcttctgta	ggagcagtag	caggggcagg	9060
aattatttcc	gaagcaaaag	atgccggaag	ctcttatttg	aaagttagta	caaaatccgg	9120
aagaagtatt	tttcatgcag	ataatgtgaa	tatggaagca	acacataaaa	tgaaagtaac	9180
agcagtttct	aaagcagtaa	caggttctgt	attgggagga	gttgagtgca	ccaaggcaga	9240
agctactgct	gcaggtaaaa	ctatggtaga	agttgaggaa	ggaaatttgt	tcagaacaaa	9300
tcgattgaat	gcaatttcta	aagtagaagg	tttggatgaa	gataaagtaa	ctgctaaatc	9360
ttctgtagta	tcaggaaatg	gaggaggaat	tgccggagca	ggagtgaata	cttctacagc	9420
acaaagtaat	actgaatccg	tagttcgttt	acgaaagcaa	gattatgaaa	ataatgatta	9480
cacaaaaaaa	tatatttcag	aagtcaatgc	tcttgcttta	aatgatacaa	agaatgaagc	9540
gaatatagaa	tctttagcgg	tagccggtgt	gcatgcacaa	ggaacaaaca	aagcatttac	9600
gagatcaaac	aagttaactt	ctacaactgt	aaatggagga	aacgtatctc	aacttcgtgc	9660
aaaagctttg	gctaaaaaat	aaaattatgg	aaatgtaaaa	ggaactggag	gagccttagt	9720
cggagcggaa	acagcagccg	ttgaaaatta	tacaaagagt	actacaggag	cattgggtgc	9780
aggaaattgg	gaaattggag	ataaattaga	aacgattgca	agagataata	cgattgtaag	9840
agtcaacgga	gacggaacca	aaggaggctc	tgtcggaaag	aatggtattt	ctgtgaaaaa	9900
tacaatttca	ggggaaacaa	aatcatccat	tgaagataaa	gccagaattg	ttggaaccgg	9960
aagtgtaaat	gtagatgctt	tgaatgaact	tgatgtagat	ctacaaggaa	aaagtgggtg	10020
ctatgggtgga	attggatttg	gaaatgttga	tgtaataaat	gtgattaaga	aaaatgtaga	10080
agccaaaatc	ggaagacatg	ctattgtaga	aactactgga	aaacaagaat	atcaagcatt	10140
tacaagagca	aaagtaata	ttcttggaag	aggagacgct	gcagctgcag	ctgcaatatc	10200

gaatgtacac atttccaatg agatggatat taaaaatttg gcaaagcagt atgcatcttc 10260
 tcaattaata accaaaaatt caaaaaataa tattacttta gcatcaagta gtgaatcgaa 10320
 tgtgaatggt catgggggtg ctgaagcaag aggtgcagga gccaaagcga cagttagtgt 10380
 aaagaatcaa ataaatagaa ctaataatgt tgatttagca ggaaaaatta aaacagaggg 10440
 aaacatcaat gtatatgccg gatatgataa aaattataat ataagtaaga caaattctaa 10500
 ggctattgcg gatgccaaaa gtcatgctgc agctgcttcg gcaactgcc aatttgaaaa 10560
 aaatgaagta aaatttaata atgcgatccg agaatttaaa aataatctgg caagattgga 10620
 agggaaagct aataaaaaaa cgtcggtagg atctaatacag gtagactggt atacggataa 10680
 atatacatgg cattcttctg aaaaagcata caaaaaattg acatatcaat caaagagagg 10740
 agaaaaaggg aaaaaatgaa ttaagagag agtaaattha gtgagttttt aaaaaattca 10800
 aacataactt gttttgaaag agaagaagt aaagatgagt tagaaacagt tgtatatcga 10860
 agttttatgg aagtagaggg acaaaattta cctatggtaa ttgtgatgga taacagtatt 10920
 tatacgaata tccgagtgc aattgctcca aaagtcataa aagatactaa taaagaagcg 10980
 gtactttcct atatcaatga attgaaccga gaatacaaag tatttaata ttatgtgaca 11040
 gaggatgcag atgtttgttt agatagttgt gtaacctcca ttgcagaaga atttaatcca 11100
 gaaatggttt acactathtt aaatgtgatc 11130

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6, en donde dicho polipéptido es capaz de inducir anticuerpos antileucotoxina en un mamífero, cuando se administra a dicho mamífero.
- 10 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
- 10 3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
- 15 4. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
- 15 5. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
- 20 6. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13, en donde dichas secuencias de nucleótidos codifican secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6, y en donde dicho polipéptido es capaz de inducir anticuerpos antileucotoxina en un mamífero, cuando se administra a dicho mamífero.
- 25 7. El ácido nucleico de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
- 30 8. El ácido nucleico de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
- 30 9. El ácido nucleico de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
- 35 10. El ácido nucleico de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
- 40 11. Un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6 y en donde dicho polipéptido es capaz de inducir anticuerpos antileucotoxina en un mamífero, cuando se administra a dicho mamífero.
- 45 12. El vector e la reivindicación 11, teniendo dicha secuencia de nucleótidos aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.

13. El vector e la reivindicación 11, teniendo dicha secuencia de nucleótidos aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
14. El vector e la reivindicación 11, teniendo dicha secuencia de nucleótidos aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
15. El vector e la reivindicación 11, teniendo dicha secuencia de nucleótidos aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
16. Una vacuna que comprende un polipéptido que tiene una secuencia que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
17. La vacuna de la reivindicación 16, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
18. La vacuna de la reivindicación 16, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
19. La vacuna de la reivindicación 16, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
20. La vacuna de la reivindicación 16, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
21. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, comprendiendo además dicha vacuna un portador farmacológicamente compatible.
22. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, comprendiendo además dicha vacuna un adyuvante.
23. Un polipéptido recombinantemente derivado que tiene una secuencia que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 1 - 6, en donde dicho polipéptido es capaz de inducir anticuerpos antileucotoxina en un mamífero, cuando se administra a dicho mamífero.
24. El polipéptido de la reivindicación 23, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 60% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
25. El polipéptido de la reivindicación 23, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 75% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
26. El polipéptido de la reivindicación 23, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 87% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
27. El polipéptido de la reivindicación 23, teniendo dicha secuencia aproximadamente al menos 95% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.

28. Un método de preparación de una vacuna que confiere inmunidad efectiva contra una infección causada por *F. necrophorum* que comprende las etapas de:
- a) proveer el gen de *F. necrophorum* que expresa leucotoxina;
 - b) truncamiento de dicho gen de *F. necrophorum* en una pluralidad de secuencias de nucleótidos discretos, cada una de dichas secuencias de nucleótidos discretos que codifica un polipéptido respectivo que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 1 - 6;
 - c) expresión y recuperación de dicho polipéptido respectivo;
 - d) combinación de dicho polipéptido recuperado con un portador compatible farmacológicamente adecuado para producir dicha vacuna.
29. El método de la reivindicación 28, comprendiendo dicho gen la SEQ ID No. 8.
30. El método de la reivindicación 28 ó 29, teniendo dichas secuencias de nucleótidos discretos una secuencia que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 9 - 13.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, que comprende además la etapa de combinar dichos polipéptidos recuperados con un adyuvante adecuado.
32. El método de la reivindicación 28, que comprende además la etapa de amplificar al menos una de dichas secuencias de nucleótidos discretos a través de PCR.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, siendo dicho vacuna capaz de provocar la respuesta de un anticuerpo en un organismo seleccionado del grupo que consiste de ganado, ovejas, y cabras.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, siendo dicho vacuna sustancialmente no tóxica.
35. El uso de un polipéptido aislado que tiene aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 1 - 6 para la preparación de una vacuna recombinante que induce la producción de anticuerpo antileucotoxina para inmunizar un animal contra abscesos hepáticos causados por *F. necrophorum*.
36. Un polipéptido recombinante aislado que es reconocidos por anticuerpos antileucotoxina nativa en un análisis de transferencias tipo Western, teniendo dicho polipéptido aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6.
37. Un secuencia de un polipéptido recombinante aislado cuya actividad neutralizadora de los antiseros de una leucotoxina nativa contra leucocitos polinucleares de bovino, teniendo dicho polipéptido aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 1, 2 y 4.
38. Un polipéptido aislado derivado en forma recombinante efectivo para conferir inmunidad protectora contra una infección por *F. necrophorum* en animales, teniendo dicho polipéptido aproximadamente al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos. 2 y 5.
39. El uso de un polipéptido aislado que contiene una secuencia que tiene al menos 50% de homología de secuencia sobre toda la longitud con una secuencia seleccionada del grupo que

76

consiste de las SEQ ID Nos. 2 - 6 para la preparación de una vacuna para prevenir la necrosis de las patas causada por una infección con *F. necrophorum*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

“Siguen 13 páginas de dibujos”

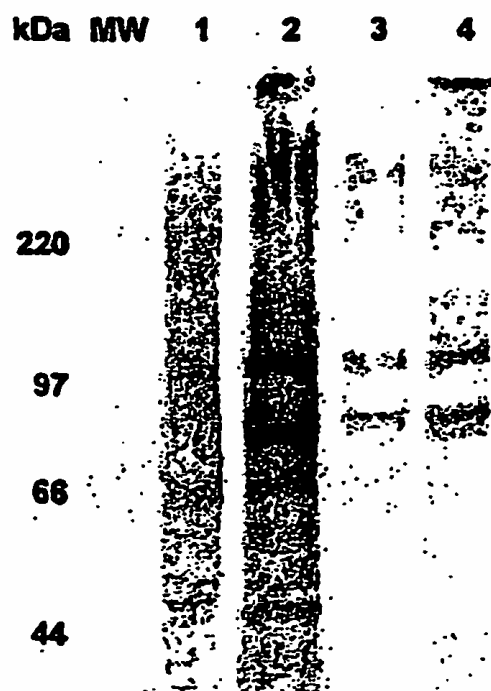


Figura 1

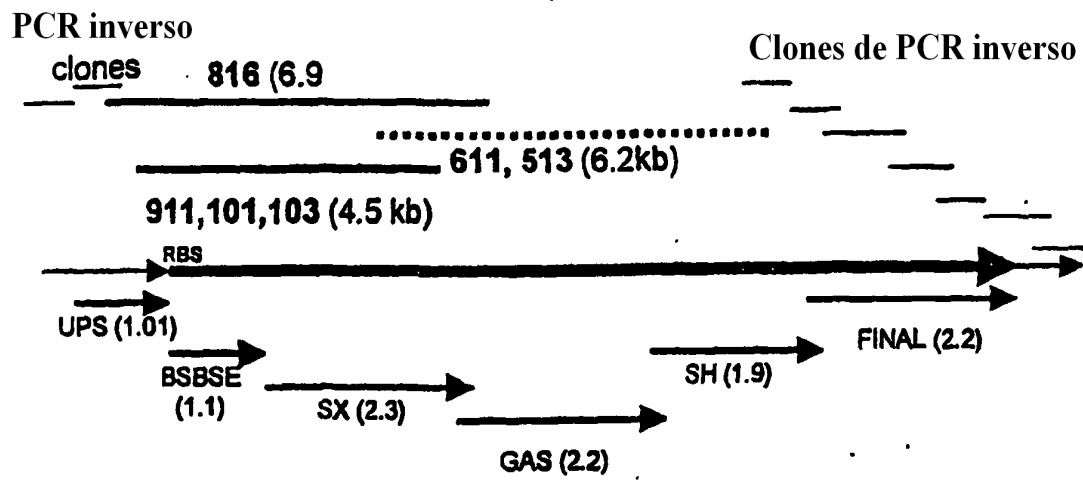


FIGURA 2

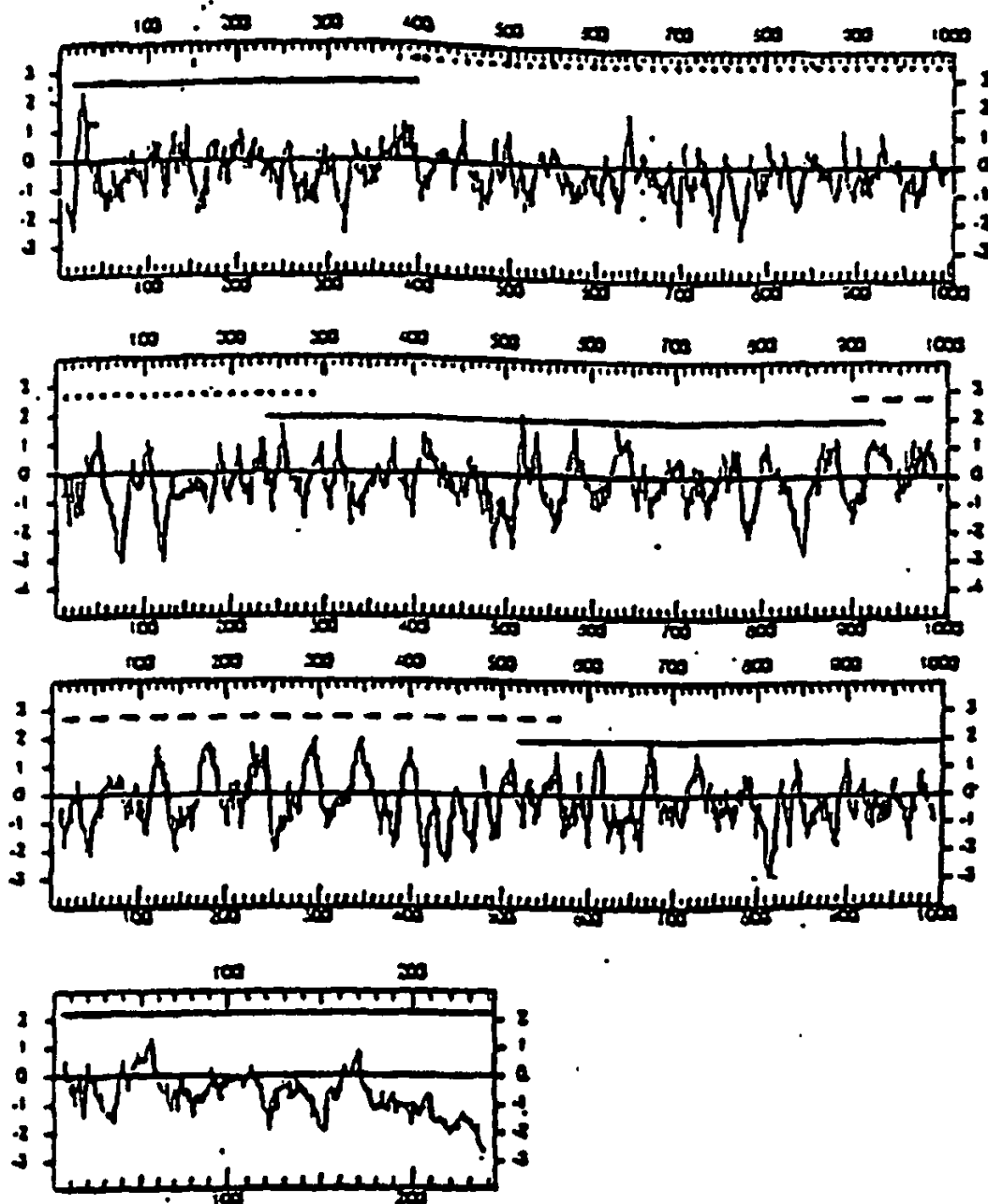


Fig. 3

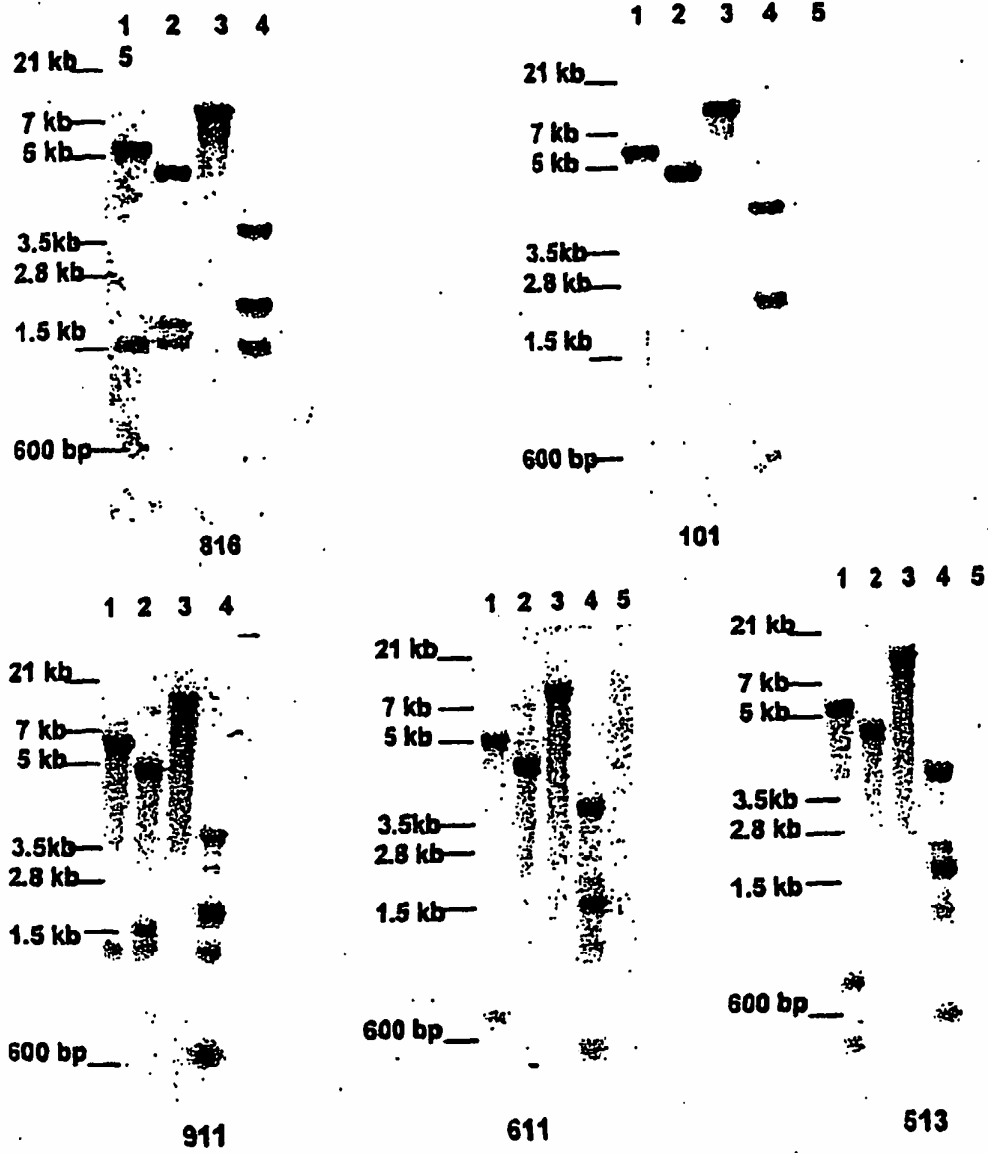


Figura 4

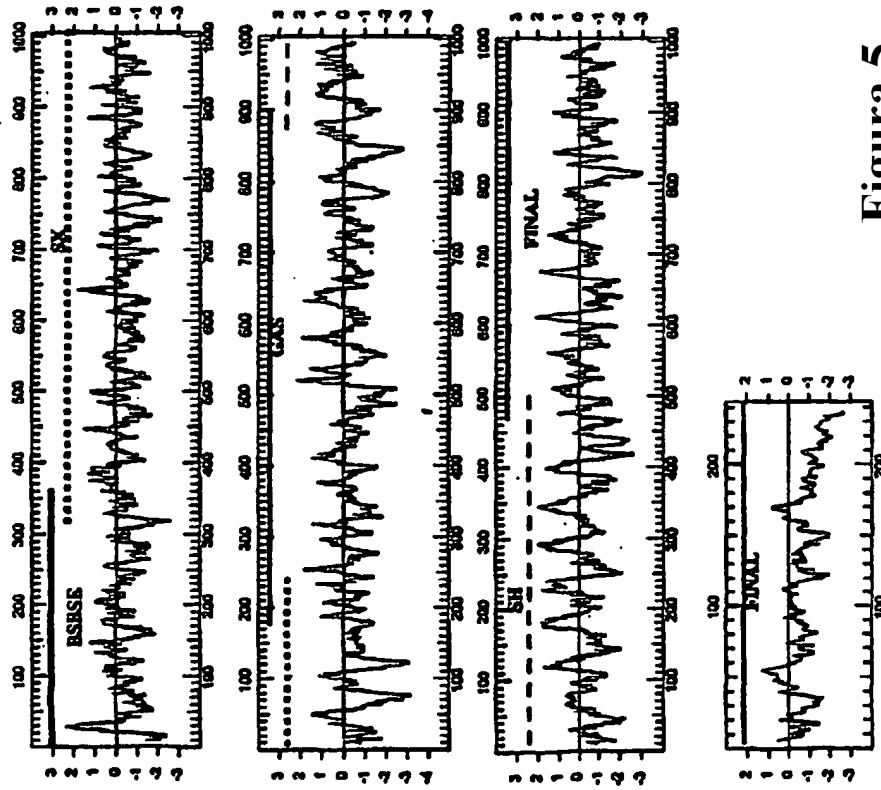


Figure 5

816	
101	
611	
IPCR	
PSN2000	
11,130	
OTB	ETA
OTC	OTC
UPS	
2 - 1,024	
BSBSE	
1,034 - 2,140	
SX	
1,952 - 4,729	
GAS	
4,586 - 6,724	
SH	
6,659 - 8,542	
FINAL	
8,438 - 10,756	

Figura 6

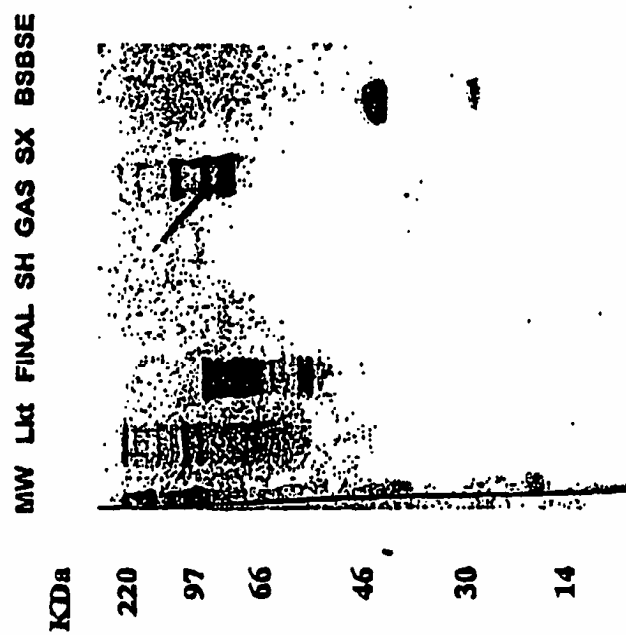


Figura 7a

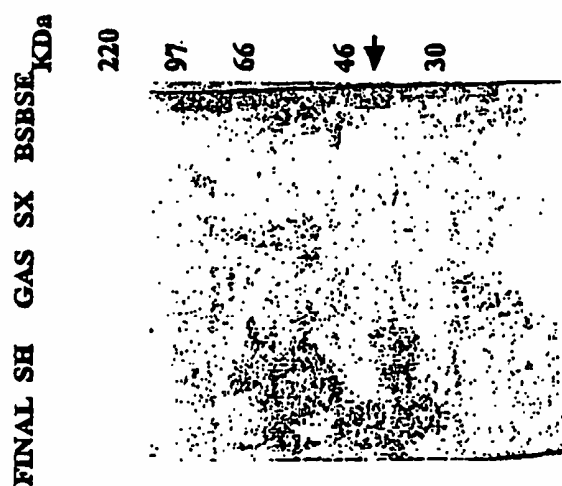


Figura 7b

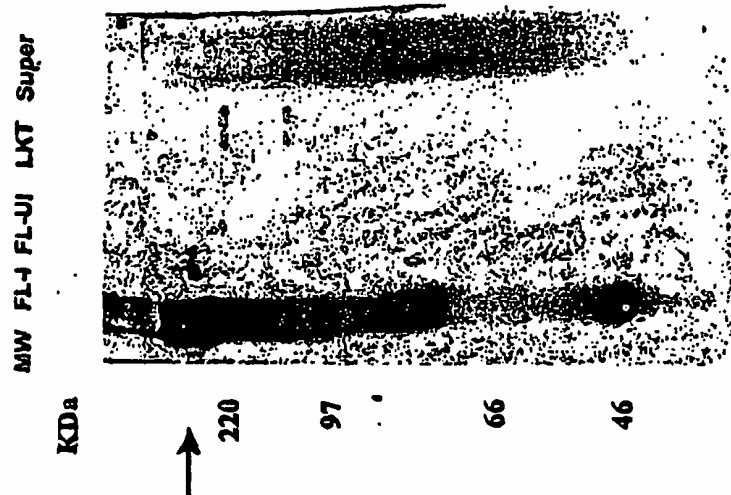


Figura 7c

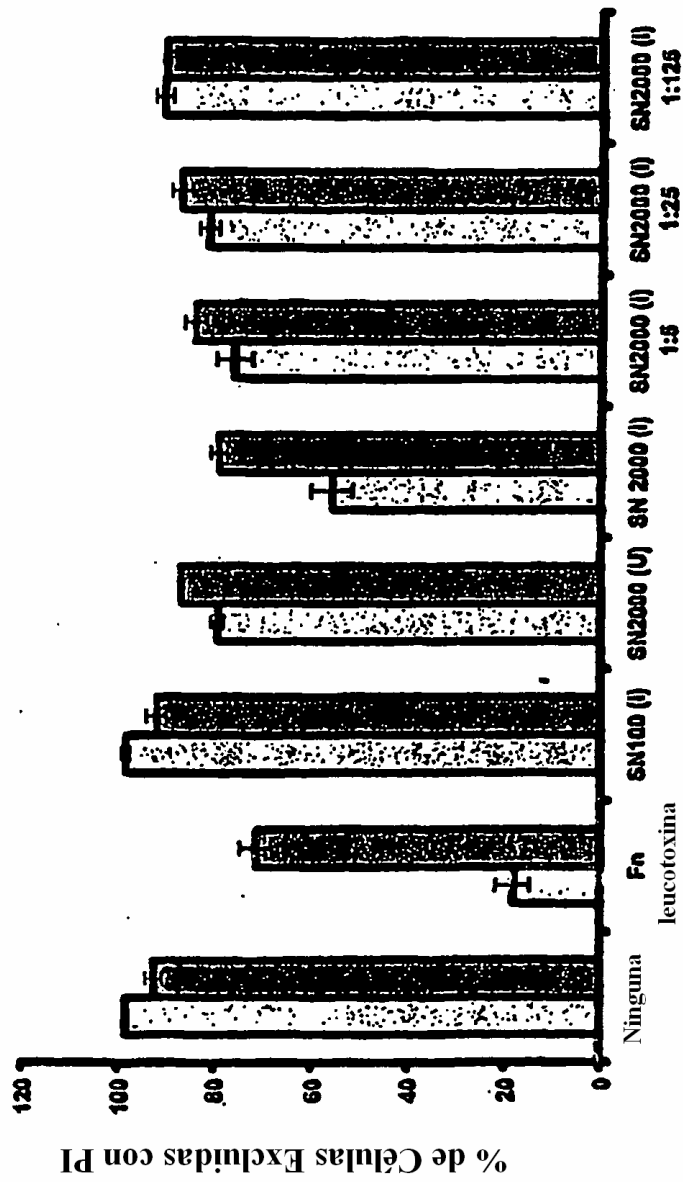


Figura 8

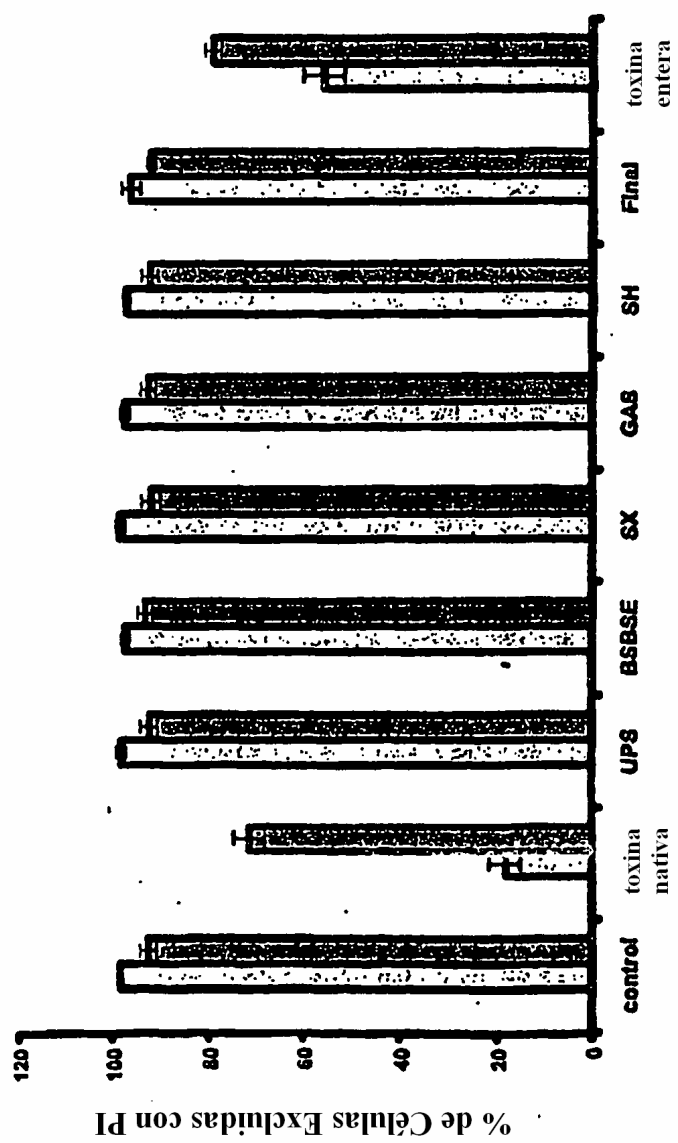


Figure 9

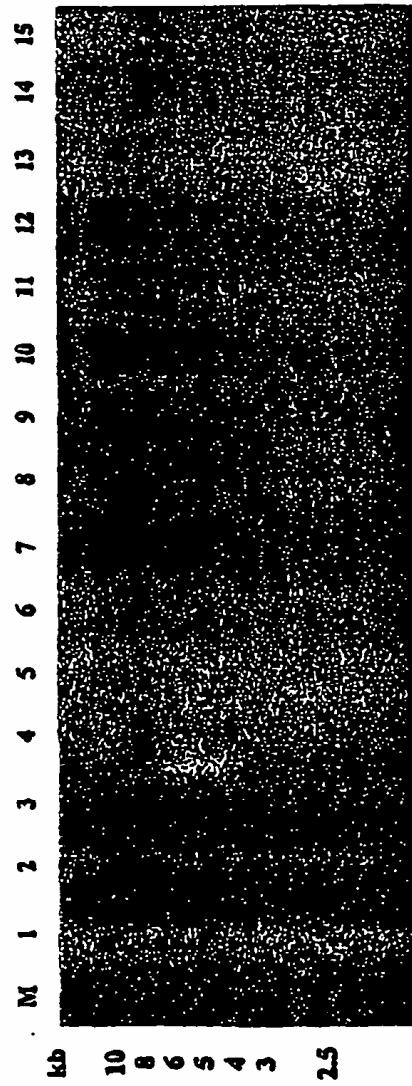


Figura 10

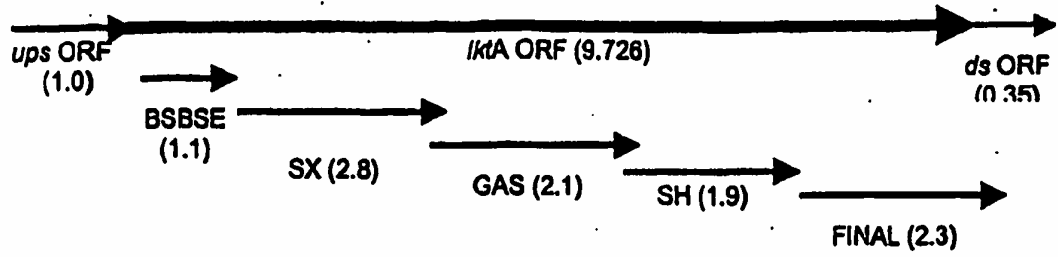


Figura 11

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 460480 A [0010]
- US 5455034 A [0010]

10 **Literatura citada en la descripción que no es de patente**

- **Scanlan y colaboradores** Bovine rumenitis-liver abscess complex: a bacteriological review. Cornell Vet., 1983, vol. 73, 288 - 297 [0006]
- **Nagaraja, T. G. y colaboradores** Liver abscesses in feedlot cattle: A review. J. Anim. Sci., 1998, vol. 76, 287 - 298 [0006]
- **Tan y colaboradores** Fusobacterium necrophorum infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. Vet. Res. Comm., 1996, vol. 20, 113 - 140 [0006]
- **Langworth.** Fusobacterium necrophorum: its characteristics and role as an animal pathogen. Bacteriol. Rev., 1977, vol. 41, 373 - 390 [0009]
- **Berg y colaboradores** Studies of Fusobacterium necrophorum from bovine hepatic abscesses: Biotypes, quantitation, virulence, and antibiotic susceptibility. Am. J. Vet. Res., 1982, vol. 43, 1580 - 1586 [0009]
- **Shinjo y colaboradores** Recognition of biovar C of Fusobacterium necrophorum (flugge) Moore and Holdeman as Fusobacterium pseudonecrophorum sp. nov., nom. rev. (ex prevot 1940). Int. J. Sys. Bacteriol., 1990, vol. 41, 395 - 397 [0009]
- **Emery y colaboradores** Generation of immunity against Fusobacterium necrophorum in mice inoculated with extracts containing leucotoxina. Vet. Microbiol., 1986, vol. 12, 255 - 268 [0009]
- **Coyle-Dennis y colaboradores** Correlation between leukocidin production and virulence of two isolates of Fusobacterium necrophorum. Am. J. Vet. Res., 1979, vol. 40, 274 - 276 [0009]
- **Emery y colaboradores** Culture characteristics and virulence of strains of Fusobacterium necrophorum isolated from feet of cattle and sheep. Australian Vet. J., 1985, vol. 62, 43 - 46 [0009]
- **Saginala y colaboradores** The serum neutralizing antibody response in cattle to Fusobacterium necrophorum leukotoxoid and possible protection against experimentally induced hepatic abscesses. Vet. Res. Comm., 1996, vol. 20, 493 - 504 [0009]
- **Saginala y colaboradores** The serum neutralizing antibody response and protection against experimentally induced liver abscesses in steers vaccinated with Fusobacterium necrophorum. Am. J. Vet Res., 1996, vol. 57, 483 - 488 [0009]
- Int. J. Sys. Bacteriol., vol. 41, 395 - 397 [0009]
- **Clark y colaboradores** Studies into immunization of cattle against interdigital necrobacillosis. Aust. Vet. J., 1986, vol. 63, 107-110 [0010]
- **Tan y colaboradores** Factors affecting leucotoxina activity of F. necrophorum. Vet. Microbiol., 1992, vol. 33, 15 - 28 [0010]
- **Abe y colaboradores** Infection and Immunity, 1976, vol. 13, 1473 - 1478 [0010]
- **Garcia y colaboradores** Canadian J. Comp. Med, 1974, vol. 38, 222 - 226 [0010]
- **Emery y colaboradores** Vet. Microbiol., 1986, vol. 12, 255 - 268 [0010]

45

- Computational Molecular Biology. Oxford University Press, 1988 [0020]
- Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, 1993 [0020]
- Computer Analysis of Sequence Data. Humana Press, 1994 [0020]
- **Heinge, G.** Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0020]
- 5 • Sequence Analysis Primer. Stockton Press, 1991 [0020]
- **Carillo, H. y colaboradores** Applied Math., 1988, vol. 48, 1073 [0020]
- **Devereux, J. y colaboradores** Nucleic Acids Research, 1984, vol. 12 (1), 387 [0020]
- **Altschul, S. F. y colaboradores** J. Molec. Biol., 1990, vol. 215, 403 - 410 [0020]
- **Hull y colaboradores** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-
- 10 mannose-resistant pili from a urinary tract infection Echerichia coli isolate. Infect. Immun., 1981, vol. 33, 933 - 938 [0027]
- **Baxter-Gabbard.** A simple method for the large scale preparation of sucrose gradients. FEBS. Lett., 1972, 20117 - 119 [0027]
- **Sambrook y colaboradores** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory,
- 15 1989 [0029]
- **Southern.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 1975, vol. 98, 503 [0030]
- **Birnboim; Doly.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids Res, 1979, vol. 7, 1513 [0031]
- 20 • **Sanger y colaboradores** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Nail. Acad. Sci., 1977, vol. 74, 5463 - 5467 [0031]
- Amplification of flanking sequences by inverse PCR. **Ochman y colaboradores** PCR protocols; A guide to methods and applications. Acad. Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, 1990, 219 - 227 [0033]
- 25 • **Tan, Z. L.; T. G. Nagaraja; M. M. Chengappa; J. J. Staats.** Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina using monoclonal antibodies. Vet. Microbiol., 1994, vol. 42, 121 - 133 [0035] [0041]
- **Tan, Z. L.; T. G. Nagaraja; M. M. Chengappa.** Factors affecting leucotoxina activity of *Fusobacterium necrophorum* . Vet. Microbiol., 1992, vol. 33, 15 - 28 [0035] [0044]
- 30 • **Tan, Z. L.; T. G. Nagaraja; M. M. Chengappa; J. S. Smith.** Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina. Am. J. Vet Res., 1994, vol. 55, 515 - 519 [0035]
- **Tan, Z. L.; T. G. Nagaraja; M. M. Chengappa; J. J. Staats.** Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina using monoclonal antibodies. Vet. Microbiol, 1994, vol. 42,
- 35 121 - 133 [0035]
- **Hull, R. A. ; R. E. Gill ; P. Hsu ; B. H. Minshew ; S. Falkow.** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. Infect. Immun, 1981, vol. 33, 933 - 938 [0036]
- **Lerner, C.G. ; M. Inouye.** Low copy number plasmids for regulated low level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. Nucl. Acid. Res., 1990, vol. 18, 4631 - 4633 [0043]
- 40 • **Tan, Z. L. ; T. G. Nagaraja ; M. M. Chengappa ; J. S. Smith.** Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum* leucotoxina. Am. J. Vet. Res., 1994, vol. 55, 515 - 519 [0044]

- **Rowe, R.; Todd, R. ; Waide, J.** Microtechnique for most-probable-number analysis. Appl. Environ. Microbiol., 1977, vol. 33, 675 - 680 [0074]