Industria y Co
SUPERINTEND

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-024772- -00013-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-096189- -00000-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 13-096189

54. **TÍTULO** NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE Y EL USO DE LOS MISMOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** Boehringer Ingelheim Vetmedica GMBH

DOMICILIO Ingelheim am Rhein

74. **APODERADO** Eliana María Reyes

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-024772- -00013-0000

Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-024772- -00000-0000

Fecha: 2010-03-05 11:17:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios 250

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-096189- -00000-0000

Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE

PC

ENTRADA FAS

1 SOLIC

☒ Patente de Invención
☐ Capitulo I.
☐ [illegible]
☒ Capitulo II.

2 **SOLICITANTE (71)**	**Nombre:** Spirogene Pty Ltd **Dirección:** Building 191, Campus Drive, Murdoch University, South Street, Murdoch, W.A. (AU) **Nacionalidad o Domicilio:** Australiana **Lugar de Constitución:** Australia **Tel:** 571- 2864051 **Fax:** **E-mail:** info@brlatina.com	**IDENTIFICACIÓN** ☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro **Cual**_____ **Número** _____
3 **REPRESENTANTE O APODERADO**	**Nombre:** Martha BONILLA CASTRO **Dirección:** Calle 26 No 4A-45 Piso 11 Bogotá, Colombia **Tel:**2864051 **Fax:** **Email:** info@brlatina.com	**IDENTIFICACIÓN** ☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro **Número: 41.566.976** **T.P:** 41.527
4 **INVENTOR (ES) (72)**	**Nombre:** BELLGARD, Matthew **Dirección:** Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU **Nacionalidad o Domicilio:** Australiana **Nombre:** HAMPSON, David John **Dirección:** Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU **Nacionalidad o Domicilio:** Australiana **Nombre:** LA, Tom **Dirección:** Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU **Nacionalidad o Domicilio:** Australiana	

PCT (86)

5 **Solicitud Internacional No.** PCT/EP2007/058049 **Fecha:** Agosto 03 de 2007

Publicación Internacional No. WO/2008/017636 **Fecha:** Febrero 14 de 2008

6 **Titulo (54)** NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE Y EL USO DE LOS MISMOS

7 **Clasificación Internacional (51)** ***C07K 14/20*** (2006.01), ***A61K 39/02*** (2006.01), ***A61K 39/40*** (2006.01), ***A61K 48/00*** (2006.01), ***C12N 1/21*** (2006.01), ***C12N 15/31*** (2006.01), ***C12N 15/63*** (2006.01), ***C12Q 1/68*** (2006.01), ***G01N 33/569*** (2006.01)

8 **Prioridad**	**(33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de solicitud**
☒ SI ☐ NO		Agosto 03 de 2007	PCT/EP2007/058049

9 Comprobante de pago No. 10-14593 10-14594 Fecha: Febrero 23 de 2010

2

10 ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante es persona jurídica
- [ ] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [x] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [ ] Otros

11 FIGURA CARACTERÌSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente
Nombre: Martha BONILLA CASTRO

Firma:

C.C. 41.566.976
T.P. 41.527

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-024772- -00013-0000

Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5

No. 13-096189- -00000-0000

Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Doctor
JOSE LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director Nuevas Creaciones
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COM
E. S. D.

Paola V. Clonsuelo

Referencia: Expediente No 10-024772
Nueva Solicitud de División de Patente de Invención para: "Nuevos Genes y Proteínas de Brachyspira Hyodysenteriae y el Uso de los Mismos",
Solicitante: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Eliana María Reyes Fernández, mayor de edad y vecina de Bogotá, D.C., identificada con cédula de ciudadanía No. 1.032.417.130 de Bogotá, D.C. abogada titulada, con tarjeta profesional No. 203.200 del Consejo Superior de la Judicatura, actuando en mi calidad de apoderada sustituta de la sociedad **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH,** solicito una nueva división de patente de invención en la cual las reivindicaciones son modificadas y disminuidas, de las cuarenta y cuatro inicialmente presentadas a dieciséis.

Para tal efecto, adjunto formulario de división a solicitud, el texto con reivindicaciones de la solicitud divisional, una copia de la descripción y secuencias, un CD el cual se relacionan todos los anteriores documentos, recibo de pago oficial de solicitud de división de patente con número 13-0034801 y el recibo de pago oficial por seis reivindicaciones adicionales con número 13-0034815.

Atentamente,

ELIANA MARÍA REYES FERNÁNDEZ
C.C. No. 1.032.417.130 de Bogotá D.C.
TP No. 203.200 del C.S. de la J.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 13-096189- -00000-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

DIRECCIÓN DE NU
CONVERSIÓN, DIVISIÓN '

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-024772- -00013-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

1. Identificación del Tramite

[ ] Conversión [X] Div

[X] Patente de Invención

[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

[ ] Persona Natural [X] Persona Juridica

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Gerard Behrens

Nombre del representante legal

Tipo de empresa [ ] Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [X] Otra

Documento de Identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [X] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Alemania	Binger Strasse 173, 55216	Ingelheim am Rein
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
info@brlatina.com	3230234	3230233

[X] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

REYES FERNÁNDEZ, Eliana María	C.C. 1.032.417.130 de Bogotá D.C.	T.P. 203.200 del C.S.J.
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 13 No 29-41 Of. 241 Bogotá D.C.	Binger Strasse 173, 55216	Ingelheim am Rein
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
info@brlatina.com	3230234	3230233

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente No.	Expediente No. 10-024772	Expediente No.
De:	No. de divisionales 1	Expediente No.
A:		

5. Comprobante de Pago No 13-0034801 y 13-0034815 **Fecha** 15 | 4 | 2013

6. Anexos

X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
X	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
X	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
X	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Eliana María REYES FERNÁNDEZ
Nombre y apellidos

Firma

1.032.417.130 de Bogotá D.C.
C.C.

T.P. 203.200 del C.S.J.
Tarjeta Profesional

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0034801

Bogotá D.C., Abril 15 de 2013 - 12:35:03

RECIBIDO DE : B&R LTDA NI 830.122.790

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197805414	15/04/2013	3.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. 10-24772

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 13-096189- -00000-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-024772- -00013-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

6

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0034815

Bogotá D.C., Abril 15 de 2013 - 13:09:18

RECIBIDO DE : B&R LTDA NI 830.122.790

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197804935	15/04/2013	180.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	180.000.00
				$180.000.00

SON: **CIENTO OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. 10-24772

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-096189- -00000-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-024772- -00013-0000
Fecha: 2013-04-15 14:10:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 8

7

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado seleccionado de ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 59, 49, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, y 65.

2. Una molécula de ADN aislada para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% idéntica a un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 en toda la longitud de secuencia de la secuencia de nucleótidos de dicho polinucleótido.

3. Un polipéptido aislado codificado por un polinucleótido seleccionado del ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el polinucleótido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66.

4. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Un plásmido que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, o una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 2.

6. Un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho plásmido es un vector de expresión.

7. Una célula que contiene un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.

8. Una proteína aislada para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% idéntica al polipéptido de la reivindicación 3 en toda la longitud de la secuencia de la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido.

9. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una composición de vacuna para la prevención de la infección por *Brachyspira* que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8.

11. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal.

12. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para prevenir una enfermedad causada por una infección por *Brachyspira* en un animal.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la infección por *Brachyspira* es una infección con *Brachyspira hyodysenteriae*.

14. Un método de diagnóstico de la infección por *Brachyspira* que comprende:

(a) proporcionar una muestra obtenida de un animal sospechoso de estar infectado con *Brachyspira*;

(b) poner en contacto la muestra con uno o más polipéptidos codificados por un polinucleótido seleccionado de ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el uno o más polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 , 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66,

(c) incubar la muestra y el polipéptido bajo condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno; y

(d) determinar si un complejo anticuerpo-antígeno con uno o más polipéptidos se forma, en donde la formación de un complejo anticuerpo-antígeno indica que el animal está infectado con *Brachyspira*.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la infección por *Brachyspira* es una infección con *Brachyspira hyodysenteriae*.

16. Un kit para el diagnóstico de una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido seleccionado del ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde la secuencia de aminoácidos se seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia: 2020	Fecha: 15 / 04 / 2013 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☑ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	10-24772	13	
2	13-96189	0	
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
ANEXA CD

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

[ ] Conversión [X] División [ ] Fusión

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

[ ] Persona Natural [X] Persona Juridica

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Gerard Behrens
Nombre del representante legal

Tipo de empresa [ ] Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [X] Otra

Documento de Identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [X] Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Alemania	Binger Strasse 173, 55216	Ingelheim am Rein
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
info@brlatina.com	3230234	3230233

[X] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

REYES FERNÁNDEZ, Eliana María	C.C. 1.032.417.130 de Bogotá D.C.	T.P. 203.200 del C.S.J.
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 13 No 29-41 Of. 241 Bogotá D.C.	Binger Strasse 173, 55216	Ingelheim am Rein
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
info@brlatina.com	3230234	3230233

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite:

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente No. _____	Expediente No. 10-024772	Expediente No. _____
De: _____	No. de divisionales 1	Expediente No. _____
A: _____		

5. Comprobante de Pago No 13-0034801 y 13-0034815 **Fecha** 15 | 4 | 2013

6. Anexos

X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
X	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
X	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
X	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Eliana María REYES FERNÁNDEZ
Nombre y apellidos

Firma

1.032.417.130 de Bogotá D.C.
C.C.

T.P. 203.200 del C.S.J.
Tarjeta Profesional

TITULO: NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* Y EL USO DE LOS MISMOS

RESUMEN

Se describen el nuevo Polinucleótido y los aminoácidos de Brachyspira hyodysenteriae. Estas secuencias son útiles para el diagnóstico de la enfermedad de B. hyodysenteriae en animales y útiles como un tratamiento terapéutico o profiláctico de la enfermedad de B. hyodysenteriae en animales. Estas secuencias pueden también ser útiles para el diagnóstico y para el tratamiento terapéutico y / o profiláctico de enfermedades de los animales causada por Brachyspira en otras especies, incluyendo B. intermedia, B. suantatina, B.alvinipulli B. aalborgi, B.Innocens, B.murdochii, y B. pilosicoli.

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención hace referencia a los nuevos genes en Brachyspira hyodysenteriae y a las proteínas codificadas en el mismo. Esta invención se relaciona con el uso de estos nuevos genes y con las proteínas para el diagnóstico de la enfermedad B. hyodysenteriae y vacunas contra B. hyodysenteriae para la detección de compuestos que maten B hyodysenteriae o bloqueen los efectos patógenos de B hyodysenteriae. Estas secuencias pueden también ser útiles para el diagnóstico terapéutico y / o el tratamiento profiláctico de enfermedades de los animales causados por otras especies Brachyspira incluyendo B.suanatina, B. intermedia, B. alvinipulli B. aalborgi, B.lìnnocens, B.murdochii, y B. pilosicoli.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La disentería porcina es una delicada enfermedad endémica de los cerdos principalmente en Australia y en todo el mundo. La disentería porcina es una enfermedad contagiosa dentro de las enfermedades diarreicas muco-hemorrágicas, caracterizada por una extensa inflamación y necrosis de la superficie epitelial del intestino grueso. La disentería porcina genera pérdidas económicas debido al retraso del crecimiento, los costos de los medicamentos y la mortalidad. El agente causal de la disentería porcina fue identificado como una espiroqueta anaerobia (Treponema hyodysenteriae) en 1971, y recientemente fue reasignado a la Brachyspira hyodysenteriae género como B. En el caso de disentería porcina establecida en pocilga, el espectro de la enfermedad puede variar desde leves, transitorias o no evidentes, a ser grave e incluso mortal. Las estrategias de medicación en pocilgas individuales pueden enmascarar los signos clínicos y en algunas granjas la enfermedad puede pasar desapercibida o sólo puede que pase como una sospecha. Sea o no el caso de la enfermedad B. hyodysenteriae puede persistir en los cerdos infectados, o en algunos huéspedes tales como roedores o el medio ambiente. Todas estas fuentes representan el potencial para la transmisión de la enfermedad a las piaras no infectadas. Las aves de corral comerciales también pueden ser colonizados por B. hyodysenteriae, aunque no está claro cómo ocurre bajo condiciones de campo.

La colonización por B. hyodysenteriae, provoca una fuerte respuesta inmunológica contra la espiroqueta. Por ese motivo, las pruebas indirectas de exposición a la espiroqueta, pueden ser obtenidas mediante medición de niveles de anticuerpos que circulan en la sangre de animales infectados. Estos anticuerpos deben ser mantenidos en niveles bajos incluso en los animales que se han recuperado de la disentería porcina. En ese sentido, las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos tienen un potencial considerable para la detección de infecciones subclínicas en cerdos recuperados portadores que tienen cantidades indetectables en sus largos intestinos. Una variedad de técnicas se han desarrollado para demostrar la presencia de anticuerpos circulantes en contra de B. hyodysenteriae. Estas técnicas incluyen pruebas de inmunofluorescencia indirecta, pruebas de hemaglutinación, pruebas de aglutinación de microtitulación, pruebas de fijación del complemento y ELISA utilizando tanto lipopolisacárido o todo las espiroquetas sónicas como antígeno. Todas estas pruebas han sufrido de problemas de especificidad tales como el caso de intestinos no patógenos espiroquetos que pueden inducir a una reacción cruzada de anticuerpos.

Estas pruebas son útiles para la detección de piaras en los que es evidente la presencia de la enfermedad y los altos anticuerpos circulantes, pero donde es difícil la detección de piaras infectadas subclínicamente de los cerdos individuales infectados. Por consiguiente, hasta la fecha, no hay ensayos sensibles y específicos disponibles para la detección de anticuerpos contra B. hyodysenteriae. La falta de pruebas de diagnóstico adecuadas ha dificultado el control de la disentería porcina.

Varios métodos se han empelado para el control de la disentería porcina, que van desde el uso profiláctico de agentes antimicrobianos, para lograr la reducción de infecciones dentro de las piaras infectadas, hasta la prevención de la reintroducción de cerdos portadores infectados. Todas estas opciones son costosas y para que sean totalmente eficaces, se requiere uso de sofisticadas pruebas de diagnóstico para monitorear el progreso. Actualmente, la detección de la disentería porcina en piaras con infecciones subclínicas y en animales portadores sanos, sigue siendo un problema importante que obstaculiza la implementación de medidas de control eficaces. El diagnóstico definitivo de la disentería porcina tradicionalmente ha requerido el aislamiento y la identificación de B. hyodysenteriae de las heces

o la mucosa de los cerdos enfermos. Los principales problemas se encuentran en el crecimiento lento y en los exigentes requerimientos nutricionales de estas bacterias anaeróbicas y las confusiones que se presentan debido a la presencia de espiroquetas morfológicamente similares en la flora normal del intestino del cerdo.

Una mejora significativa en el diagnóstico de cada uno de los cerdos afectados se logró con el desarrollo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), en los ensayos para la detección de las espiroquetas de las heces. Desafortunadamente, en las aplicaciones prácticas del límite de detección de PCR se hacía imposible detectar los animales portadores de infecciones subclínicas. Como consecuencia de estos problemas de diagnóstico, existe una clara necesidad de desarrollar una herramienta de diagnóstico simple y eficaz, capaz de detectar la infección por B. hyodysenteriae en las piaras de cerdos y en los cerdos individuales. Una respuesta inmunológica fuerte ha sido inducida en contra de la colonización siguiente de la espiroqueta con hyodysenteriae B. y los cerdos recuperados de la disentería porcina están protegidos contra la re-infección. A pesar de ello, los intentos de desarrollar vacunas para el control de la disentería porcina han tenido un éxito muy limitado. Ya sea porque han proporcionado una protección inadecuada en las piaras, o porque ha sido demasiado costoso y difícil de producir para que sean comercialmente viables. Las vacunas Bacterin proporcionan un cierto nivel de protección, pero tienden a ser serogrupo lipopolisacárido específico, el cual requiere el uso de bacterianas polivalentes. Además, son difíciles y costosos de producir a gran escala debido a las exigentes necesidades de crecimiento anaerobio de la espiroqueta. Varios intentos se han hecho para desarrollar vacunas vivas atenuadas para la disentería porcina. Este enfoque tiene la desventaja de que las cepas atenuadas muestran una reducción de la colonización, y por lo tanto, causan una reducción de la estimulación inmune. También hay una renuencia por parte de los productores y veterinarios para el uso de vacunas vivas de la disentería porcina, debido a la posibilidad de reversión a la virulencia, especialmente en lo que se conoce acerca de la regulación genética y la organización de hyodysenteriae B.

El uso de vacunas en subunidades recombinantes es una alternativa atractiva, ya que los productos serían bien definidos (esencial para el

registro), y relativamente fácil de producir en gran escala. Hasta la fecha el primer empleo informado de una proteína recombinante de B. hyodysenteriae como un candidato de vacuna (a 38 kilodalton proteína flagelo), no pudo prevenir la colonización en los cerdos. Este fracaso es probable que se deba específicamente a la proteína recombinante particular utilizada, así como a otras cuestiones de flujo de sistemas de suministro y a las rutas, las tasas de dosis, la elección de los adyuvantes, etc (Gabe, JD, Chang RJ, Slomiany, R , Andrews, WH y McCaman, MT (1995). El aislamiento de proteínas de B204 extracitoplásmico Serpulina hyodysenteriae y la clonación molecular del gen que codifica una flaB1 proteína flagelar 38-kilodalton. Infección e Inmunidad 63:142-148). El primer recombinante B. parcialmente utilizado para la vacunación fue un 29,7 kDa, lipoproteína de membrana externa (Bhlp29.7, también conocido como BmpB y BlpA), el cual tenía homología con las uniones de metionina de las lipoproteínas de varias bacterias patógenas. El uso de la proteína Bhlp29.7 recombinante para la vacunación de los cerdos, seguidos por un desafío experimental con B. hyodysenteriae, se tradujo en 17-40% de los cerdos vacunados que desarrollaron la enfermedad, comparado con el 50-70% de los cerdos no vacunados, controlados de desarrollar la enfermedad . Dado que la incidencia de la enfermedad para el Bhlp29.7 en cerdos vacunados fue significativamente (P = 0,047) menor que el de los cerdos control, Bhlp29.7 parecía tener potencial como un componente de la vacuna contra la disentería porcina (La, T, Phillips, ND, Reichel MP y Hampson DJ (2004). Protección de los cerdos de la disentería porcina mediante la vacunación con BmpB recombinante, un 29, 7 kDa lopoproteína de la membrana externa de Brachyspira hyodysenteriae. Veterinary Microbiology 102: 97 – 109). Una serie de otros intentos se han realizado para identificar las proteínas que envuelven el exterior de B. hyodysenteriae que podrían ser utilizados como componentes de la vacuna recombinante, pero de nuevo, ninguna vacuna eficaz se ha encontrado todavía. Un enfoque mucho más global es necesario para la identificación de proteínas inmunogénicas recombinantes de B. hyodysenteriae potencialmente útiles.

Hasta la fecha, sólo un estudio utilizando el ADN para la vacunación ha sido reportado. En este estudio, el gen B. hyodysenteriae ftnA, que codifica una ferritina putativa, fue clonado en un plásmido de E. coli y el ADN plásmido utilizado para envolver cilindros de oro para vacunación balística. Un modelo

murino de la disentería porcina se utilizó para determinar el carácter protector de la vacunación con ADN y / o de proteínas recombinantes. La vacunación con proteínas recombinantes indujo una respuesta sistémica bien contra ferritina sin embargo la vacunación con ADN inducidas sólo indujo una respuesta sistémica detectable. La vacunación con ADN seguido de un impulso con la proteína recombinante induce una respuesta inmune sistémica a la ferritina sólo después de impulsar con la proteína. Sin embargo, ninguno de los regímenes de vacunación de la prueba fue capaz de proporcionar a los ratones con la protección contra la colonización B. hyodysenteriae y las lesiones asociadas. Curiosamente, la vacunación de los ratones con ADN sólo resultó en la exacerbación significativa de la enfermedad (Davis, AJ, Smith, SC, y Moore, RJ (2005). El gen Brachyspira hyodysenteriae ftnA: la vacuna de ADN y la cuantificación real de PCR en tiempo de bacterias en un ratón modelo de la enfermedad. Microbiología actual 50: 285-291).

OBJETO DE LA INVENCIÓN

Es objeto de la presente invención es tener nuevos genes de B. hyodysenteriae y las proteínas codificadas por esos genes. Es un objeto adicional de esta invención que los nuevos genes y las proteínas codificadas por esos genes puedan ser utilizados con fines terapéuticos y de diagnóstico. Uno puede utilizar los genes y / o las proteínas en una vacuna contra el B. hyodysenteriae y para diagnosticar las infecciones B. hyodysenteriae.

Es un objeto de esta invención tener nuevos genes de B hyodysenteriae. que tienen la secuencia de nucleótidos que figuran en los números de identificación de secuencias NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65. También es un objeto de esta invención tener secuencias de nucleótidos que son idénticos con los NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, donde el porcentaje de identidad puede ser al menos del 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% (y todo entero dentro del 100 a 70). Esta invención también incluye una vacuna de ADN o composición inmunogénica de DNA que contiene la secuencia de nucleótidos NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49,

51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, y 65 y las secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85% , el 80%, 75% y 70% idénticas (y todo entero dentro del 100 a 70) a estas secuencias. Esta invención incluye además una prueba de diagnóstico de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, y 65 y las secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80 %, 75% y 70% idénticos (y todo entero 100 a 70) a estas secuencias.

También es un objeto de esta invención tener plásmidos que contienen el ADN con los números de secuencia de NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 , 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65; ADN procariotas y / o vectores de expresión eucarióticos que contiene la secuencia NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 , 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, y una célula que contiene los plásmidos que contienen ADN con la secuencia de los números NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11 , 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 , 63 y 65.

Es un objeto de esta invención tener nuevas proteínas B. hyodysenteriae que contienen la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 , 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Es otro objeto de esta invención tener proteínas que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. También es un objeto de la invención una vacuna o composición inmunogénicas que contienen las proteínas con la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 , 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66, o las secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Se trata de un aspecto de esta invención tener un kit de diagnóstico que

contengan una o más proteínas que tienen una secuencia de las que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 , 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o que sean al menos el 95% , el 90%, 85%, 80%, 75% y 70% (y todo entero entre 100-70) homólogas a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 , 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66.

Es otro aspecto de esta invención tener secuencias de nucleótidos que codifiquen las proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66, y que codifiquen las secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12 , 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 , 64 y 66. La invención también cubre los plásmidos, vectores de expresión eucariotas y procariotas, y las vacunas de ADN, que contienen ADN con una secuencia que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, , y 66, y que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en las NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Células que contienen estos plásmidos y vectores de expresión se incluyen en esta invención.

Esta invención incluye anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o se unen a las proteínas que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homologas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Los Kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos monoclonales que se unen a las

proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 , 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o que se unen a las proteínas que son al menos el 95%, 90% , 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 , 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 se incluyen en esta invención. Estos kits de diagnóstico pueden detectar la presencia de B. hyodysenteriae en un animal. El animal puede ser cualquier mamífero y ave, preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono y humano.

La invención también contempla el método de prevención o tratamiento de una infección de B. hyodysenteriae en un animal mediante la administración a un animal de una vacuna de ADN que contiene una o más secuencias de nucleótidos que figuran en los números NUM ID SEC 1, 3, 5, 7, 9, 11 , 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 , 63, y 65 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% idénticos (y todo entero entre 100-70) a estas secuencias. Esta invención también incluye un método de prevención o tratamiento de una infección de B. hyodysenteriae en un animal mediante la administración a un animal de una vacuna que contiene una o más proteínas que la secuencia de aminoácidos que contienen en los números NUM SEC ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a estas secuencias. El animal puede ser cualquier mamífero y ave, preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos.

La invención también contempla el método para generar una respuesta inmune en los animales mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contiene una o más secuencias de nucleótidos que figuran en los números NUM SEC ID: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%,

75% y 70% idénticos (y todo entero 100-70) a estas secuencias. Esta invención también incluye un método para generar una respuesta inmune en los animales mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contiene una o más proteínas de la secuencia de aminoácidos que contiene los números de NUM SEC ID: 2,4,6,8,10,12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homóloga (y todo entero 100-70) a estas secuencias. El animal es preferible de cualquier mamífero y ave, más preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos.

RESUMEN DETALLADO DE LA INVENCIÓN.

Los artículos "a" y "una" aquí se utilizan para referirse a uno o más de uno (a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, un "elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término “aminoácidos” pretende abarcar todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad de aminoácidos y que son susceptibles de ser incluidos en un polímero de origen natural aminoácidos. Los aminoácidos ejemplares son los aminoácidos de origen natural; análogo, derivados y congéneres de la misma; aminoácidos análogos del ácido con las cadenas laterales de la variante y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores.

Un animal puede ser cualquier mamífero o un ave. Algunos ejemplos de mamíferos incluyen perros, gatos, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos. Ejemplos de las aves incluyen pollo, ganso, pato, pavo, y el perico.

El término "residuo de conservación" se refiere a un aminoácido que es un miembro de un grupo de aminoácidos que posean ciertas características comunes. El término "conservador sustitución de aminoácidos" se refiere a la sustitución (conceptual o no) de un aminoácido de uno de estos grupos con un aminoácido diferente del mismo grupo. Una manera funcional para definir las propiedades comunes entre los distintos aminoácidos es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de los organismos homólogos (Schulz, GE y RH Schinner.,

Principios de la estructura proteica, Springer-Verlag). Según esos análisis, los grupos de aminoácidos se pueden definir en los aminoácidos dentro de un grupo de intercambio preferencial entre sí, y por lo tanto se asemejan más en su impacto sobre la estructura de la proteína total (Schulz, GE y RH Schirmer, Principios de la estructura proteica , Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen: (i) un grupo cargado positivamente que contengan Lys, Arg, (ii) un grupo con carga negativa que contiene Glu y Asp, (iii) un grupo de aromáticos con Phe, Tyr y Trp, (iv) un grupo de anillos que contienen nitrógeno y su Trp, (v) un gran grupo alifáticos no polares que contienen Val, Leu y de, (vi) un poco-grupo polar que contiene Met y Cys, (vii) un grupo de residuos de pequeña con Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, la ginebra y Pro, (viii) un grupo de alifáticos contiene Val, Leu, De, Met y Cys, y (ix) un pequeño grupo hidroxilo con Ser y Thr.

Una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a una proteína quimérica como se conoce en el arte y puede ser construido utilizando los métodos ya conocidos en el arte. En muchos ejemplos de proteínas de fusión, hay dos secuencias polipeptídicas diferentes, y en algunos casos, puede haber más. Las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína de fusión pueden estar unidas operativamente en el marco, de modo que la proteína de fusión pueda ser traducida correctamente. Una proteína de fusión puede incluir secuencias polipeptídicas de la misma especie o de especies diferentes. En varias realizaciones, el polipéptido de fusión puede contener una o más secuencias de aminoácidos ligados a un polipéptido de primera. En caso de que más de una secuencia de aminoácidos se funda a un polipéptido, en primer lugar, las secuencias de fusión pueden ser varias copias de la misma secuencia o alternativamente, pueden ser diferentes secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos de fusión pueden ser fusionadas con el N-terminal, el C-terminal, o por la N-y C-terminal del polipéptido en primer lugar. Las proteínas de fusión ejemplar incluyen polipéptidos que contienen una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST-tag), la etiqueta, histidina (His-tag), un dominio de inmunoglobulina o una inmunoglobulina dominio de unión.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido, realizaciones determinadas preparaciones a partir de ADN recombinante o ARN, o de

terminal o carboxilo-terminal del polipéptido de referencia, o bien ambas cosas. Los fragmentos suelen ser, al menos, 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de largo, por lo menos 14 aminoácidos de largo, al menos, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de largo, al menos 75 aminoácidos, o por lo menos 100, 150, 200, 300, 500 o más aminoácidos de largo. Un fragmento puede mantener una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un fragmento puede comprender un dominio con la actividad biológica que desee y opcionalmente, los aminoácidos adicionales en uno o ambos lados del dominio. Estos aminoácidos adicionales pueden ser de número 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 , o hasta 100 o más residuos. Además, los fragmentos pueden incluir un sub-fragmento de una región específica, sub-fragmento que conserva una función de la región de la que se deriva. En otra realización, un fragmento puede tener propiedades inmunogénicas.

El término "polipéptido de la invención" se refiere a un polipéptido que contiene un sujeto de secuencia de aminoácidos, un equivalente, o un fragmento de la misma. Los polipéptidos de la invención contienen la totalidad o una parte de la secuencia de un sujeto de aminoácidos de 1 hasta alrededor de 2,3,4,5,7,10,15,20,30,50,75 o más conservativos de sustituciones de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga a un sujeto de secuencia de aminoácidos (y cada número entero entre 60 y 100), y a los fragmentos funcionales de la misma. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, ortólogos y paralogos, de la secuencia de un sujeto de aminoácidos.

También es posible modificar la estructura de los polipéptidos de la invención con fines tales como la mejora de la eficacia o la estabilidad terapéutica o profiláctica; (por ejemplo, ex vivo, la vida útil, resistencia a la degradación proteolítica en vivo, etc.) Tales polipéptidos modificados, cuando están diseñados para mantener al menos una actividad de la forma que ocurren naturalmente de la proteína, se consideran "equivalentes funcionales" de los polipéptidos descritos en más detalle en este documento. Tales polipéptidos modificados pueden ser producidos, por ejemplo, por sustitución de un aminoácido, por la supresión o adición que puede consistir en la sustitución total o parcialmente por las sustituciones conservativas de aminoácidos.

90%, 95%, 98%, 99% o más de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos (y todo número entero entre 60 y 100), las secuencias de nucleótidos que difieren entre un 1 y un 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o supresiones, como las variantes alélicas de un sujeto de secuencias de ácidos nucleícos, derivados de los ácidos nucleícos y evolutivamente relacionados con la secuencia del ácido nucleico de un sujeto. Complementos de las secuencias de nucleótidos resultantes de la degeneración del código genético, para todos los ácidos nucléicos anteriores y otras de la invención. Los ácidos nucléicos de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, ortólogos y paralogos, de la secuencia de un sujeto de ácido nucleico así como las variantes de la secuencia de un sujeto de ácido nucleico codón que han sido optimizados para la expresión en un organismo en particular (por ejemplo, la célula huésped).

El término "operativamente vinculado", al describir la relación entre las dos regiones de ácido nucleico, se refiere a una yuxtaposición en el que las regiones están en una relación que les permita funcionar en la forma prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente vinculado" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se realiza en condiciones compatibles con las secuencias de control, como cuando por ejemplo, las moléculas apropiadas (inductores y polimerasas) son vinculadas al control o la secuencia reguladora (s).

El término "polipéptido", y los términos "proteínas" y "péptido", que se utilizan indistintamente en este documento, se refiere a un polímero de aminoácidos. Ejemplar polipéptidos incluyen productos de los genes, las proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, paralogos, fragmentos, y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

Los términos "polipéptido fragmento" o "fragmento", cuando se utilizan en referencia a un polipéptido de referencia, se refieren a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos se suprimen, en comparación con la referencia al mismo polipéptido, pero que en el resto de la secuencia de aminoácidos, es generalmente idéntico al las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Dichas eliminaciones pueden ocurrir en el amino-

origen sintético o de origen natural, o alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociada con las proteínas que normalmente se encuentra en la naturaleza, (2) se separa de la celda en la que normalmente se produce, (3) está libre de otras proteínas de la misma fuente celular, (4) se expresa por una célula de una especie diferente, o (5) no se produce en la naturaleza. Es posible que exista un polipéptido aislado, pero no califica como un polipéptido purificado.

El término "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido si el ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, IRNA, o un polinucleótido obtenido de un orgánulo las mitocondrias celulares (como el de cloroplasto), o si de síntesis origen, que (1) no se asocia a la celda en la que el "aislamiento de ácidos nucleicos" se encuentra en la naturaleza, o (2), unido operativamente a un polinucleótido que no está vinculado en la naturaleza. Es posible que un polinucleótido aislado exista, pero no califica como un polinucleótido purificado.

El término "ácido nucleico" y "polinucleótidos" se refiere a una forma de polímeros de nucleótidos, o bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótidos. Debe también entenderse que se incluyen como equivalentes, las condiciones de los análogos de cualquiera de ARN o ADN a partir de los análogos de nucleótidos, y según como proceda a la realización se describe, de cadena sencilla (como el sentido o antisentido) y de doble cadena polinucleótidos. El término "ácido nucleico de la invención" y "polinucleótido de la invención" se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Un polinucleótido de la invención puede comprender la totalidad o una parte de un sujeto secuencia de ácido nucleico, una secuencia de nucleótidos que al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % idéntico a la secuencia de ácido nucleico (y cada número entero entre 60 y 100), una secuencia de nucleótidos que híbrida en condiciones estrictas a la secuencia de ácido nucleico de un sujeto; secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a polipéptidos de la invención; secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos al menos un 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga o idéntica a una secuencia de aminoácidos (y cada número entero entre 60 y 100); secuencias de nucleótidos que codifica polipéptidos que tengan una actividad de un polipéptido de la invención, de al menos un 60%, 70%, 80%, 85%,

Por ejemplo, es posible esperar que un conservador aislado de sustitución de un aminoácido, tal como la sustitución por una leucina, isoleucina por una o valina, un aspartato por un glutamato, una serina por treonina, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido en los resultados de un homólogo funcional, puede ser fácilmente determinado gracias a la evaluación de la capacidad de la variante de polipéptidos para producir una respuesta similar a la de la proteína de tipo salvaje. Los polipéptidos en el que más de una renovación haya tenido lugar fácilmente pueden ser probado en la misma manera.

El término "purificado" se refiere a una especie de objeto que es la especie predominante presente (es decir, en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). Una "fracción purificada" es una composición donde la especie del objeto es de por lo menos un 50 por ciento (en base molar) de todas las especies presentes. Al hacer la determinación de la pureza o de una especie en solución o dispersión, el disolvente o la matriz en la que la especie se disuelve o dispersa, no suele ser incluido en dicha determinación. Al contrario sólo las especies (incluida la de interés) disueltas o dispersas son tenidas en cuenta. Generalmente, una composición purificada tendrá una especie que es más de alrededor de 80% de todas las especies presentes en la composición, más de un 85%, 90%, 95%, 99% o más del total de todas las especies presentes. Las especies pueden ser purificadas hasta alcanzar una homogeneidad esencial (las especies de contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales) donde la composición es esencialmente de una sola especie.

Un hombre versado de la materia puede purificar un polipéptido de la invención utilizando técnicas estándar para la purificación de proteínas. La pureza de un polipéptido puede ser determinado por una serie de métodos conocidos por los expertos, como por ejemplo, amino-terminal, secuencia de análisis de amino ácido, electroforesis en gel, análisis de espectrometría de masas y los métodos aquí descritos. Los términos "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" se refieren a un polipéptido que se produce por técnicas recombinantes de ADN. Un ejemplo de estas técnicas incluye el caso cuando el ADN que codifica la dicha proteína, se inserta en un vector de

expresión adecuado que a su vez es utilizado para transformar una célula huésped para producir la proteína o polipéptido codificado por el ADN. El término "secuencia regulatoria" es un término genérico utilizado en las especificaciones para hacer referencia a las secuencias de polinucleótidos, tales como las señales iniciales, los potenciadores, los reguladores y promotores que son necesarios o convenientes para afectar la expresión de secuencias de codificación y de no- codificación a los que están vinculados operativamente. Como ejemplo, las secuencias reguladoras se describen en Goeddel; Expresión Génica Tecnología: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990), e incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos del SV40, adenovirus o citomegalovirus. El sistema ALC, el sistema PRT, el TAC o el sistema de la CVR, el promotor de T7, cuya expresión está dirigida por la RNA polimerasa T7, el operador de las principales regiones y el promotor de fago lambda, las regiones de control de la cubierta proteica fd, el promotor para el 3-fosfoglicerato quinasa, otras enzimas glucolítica, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los factores promotores de apareamiento levadura-α, el promotor del poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de las células procariotas y eucariotas, de sus virus y varias combinaciones de la misma. La naturaleza y el uso de secuencias de control pueden diferir dependiendo del organismo hospedador. Tanto en los procariotas, como las secuencias reguladoras, generalmente se incluyen un promotor, sitio de unión ribosomal, y las secuencias de terminación de la transcripción.

El término “secuencia regulatoria” tiene la intención de incluir, como mínimo, los componentes cuya presencia pueda influir en su expresión. También pueden incluir los componentes adicionales cuya presencia es una ventaja en las secuencias líderes y en las secuencias de fusión. En algunas realizaciones, la transcripción de una secuencia de polinucleótidos se encuentra bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora), que controla la expresión del polinucleótido en una celda tipo en la que se destina la expresión. Asimismo, se entenderá que el polinucleótido puede estar bajo el control de las secuencias reguladoras que son las mismas o diferentes de aquellas secuencias controlan la expresión de la forma natural de realización del polinucleótido.

El término "homología de secuencia" se refiere a la proporción de encuentros en la base entre dos secuencias de ácido nucleído o la proporción de encuentros de aminoácidos entre dos secuencias de aminoácidos. Cuando la homología de secuencia se expresa como un porcentaje, por ejemplo, el 50%, el porcentaje representa la proporción de pares en la longitud de la secuencia de una secuencia deseada que se compara con alguna otra secuencia. Están permitidos intervalos (en cualquiera de las dos secuencias) para maximizar la concordancia; se suelen utilizar intervalos de 15 bases de longitud o menos, se utilizan con más frecuencia de 6 bases o menos y son utilizados más frecuentemente de 2 bases o menos. El término "identidad de la secuencia" significa que las secuencias son idénticas (es decir, en base a un nucleótido por nucleótido para los ácidos nucleicos o, en base a aminoácido por aminoácido para polipéptidos) en una ventana de comparación.

El término "porcentaje de identidad de la secuencia" se calcula por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en el que son idénticos los aminoácidos o nucleótidos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos para el cálculo de identidad de la secuencia son conocidos por una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica y son descritas en detalle más adelante.

El término "soluble", como se usa aquí, hace referencia a un polipéptido de la invención u otras proteínas, una vez expresado en cultivos celulares, en la que al menos una parte del polipéptido o de la proteína expresada, permanece en la fracción citoplasmática de la célula y no se fracciona con los restos celulares en la lisis y la centrifugación del lisado. La solubilidad de un polipéptido podrá incrementarse con una variedad de métodos reconocidos del arte, incluida la fusión a una secuencia heteróloga de aminoácido, la eliminación de residuos de aminoácidos, la sustitución de aminoácidos (por ejemplo, enriqueciendo la secuencia con residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas), y modificación química (por ejemplo, la adición de grupos hidrófilos).

La solubilidad de los polipéptidos se puede medir usando una variedad de técnicas reconocidas en el estado arte, incluyendo, dispersión de luz dinámica para determinar el estado de agregación, la absorción de los rayos UV, centrifugación para separar materiales agregados de no agregados, y la electroforesis en gel de SDS (por ejemplo, la cantidad de proteína en la fracción soluble se compara con la cantidad de proteína en las fracciones solubles e insolubles combinadas). Cuando se expresan en una célula huésped, los polipéptidos de la invención pueden ser por lo menos el 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más solubles, por ejemplo, al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del total de la proteína expresada en la célula se encuentra en la fracción citoplasmática. En algunas realizaciones, un litro de un cultivo de células que expresan un polipéptido de la invención producirá por lo menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 miligramos o más de la proteína soluble. En un ejemplo de realización, un polipéptido de la invención es al menos un 10% soluble y va a producir por lo menos alrededor de 1 miligramo de proteína a partir de un litro de cultivo de la célula.

El término "específicamente híbrida" se refiere a la unión específica y detectable de ácido nucleico. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la invención de manera selectiva hibridan con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que reduzcan al mínimo las cantidades apreciables de uniones detectables con ácidos nucleicos inespecíficos. Las condiciones estrictas, pueden ser utilizadas para lograr unas condiciones de hibridación selectiva como se conocen en el arte y que aquí se analizan. En general, la identidad de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% , 90%, 95%, 98%, 99% o más (y cada número entero entre 30 y 100). En algunos casos, la hibridación y las condiciones de lavado se realizan bajo condiciones estrictas de acuerdo a los procedimientos convencionales de hibridación y como se describe más adelante.

Los términos "condiciones estrictas" o "condiciones estrictas de hibridación" se refieren a las condiciones que promueven la hibridación específica entre dos cadenas de polinucleótidos complementarios a fin de formar un dúplex.

Las condiciones estrictas, pueden ser establecidas para estar cerca de 5 ° C más bajas que el punto de fusión térmica (TM) para un determinado dúplex de polinucleótidos, bajo una determinada fuerza iónica y bajo un pH definido. La longitud de las cadenas de polinucleótidos complementarios y su contenido GC determinará la TM del dúplex, y por lo tanto las condiciones de hibridación necesarios para la obtención de la hibridación especifica deseada. La TM es la temperatura (bajo una determinada fuerza iónica y pH) en la que el 50% de una secuencia de polinucleótidos híbrida con una cadena complementaria en perfecta combinación. En algunos casos puede ser conveniente aumentar el rigor de las condiciones de hibridación para ser casi iguales a la TM de un dúplex en particular.

Una variedad de técnicas para la estimación de la TM están disponibles. Típicamente, los pares de bases GC en un dúplex se estima que contribuyen con alrededor de 3 ° C a la TM, mientras que los pares de bases AT se estima que contribuyen con alrededor de 2° C, hasta un máximo teórico de unos 80-100 ° C.

Sin embargo, los modelos más sofisticados de TM disponibles en los cuales las interacciones de apilamiento GC, los efectos del disolvente, la temperatura de ensayo deseada y similares son tenidas en cuenta. Por ejemplo, las sondas pueden ser diseñadas para tener una temperatura de disociación (Td) de aproximadamente 60 ° C, según la fórmula: Td = (((3 x # GC) + (2 x # AT)) x 37) - 562) / # BP) - 5; donde #GC, # AT, y #BP son el número de pares de bases guanina-citosina, el número de pares de bases adenina-timina, y el número de pares de bases totales, respectivamente, que participan en la formación del dúplex.

La hibridación puede ser llevada a cabo en 5x SSC, 4x SSC, SSC 3x, 2x SSC, 1x SSC o 0.2x SSC por al menos 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas o 24 horas. La temperatura de la hibridación puede ser mayor para ajustar el rigor de la reacción, por ejemplo, pasando de unos 25 ° C (temperatura ambiente), a unos 45 ° C, 50 ° C, 55 ° C, 60 ° C o 65 ° C. La reacción de hibridación también puede incluir otro agente que afecte la rigurosidad, por ejemplo, la hibridación puede ser llevada a cabo en presencia de formamida al 50% lo que aumenta el rigor de la hibridación a una temperatura definida.

La reacción de hibridación puede ser seguida por un paso de lavado único, o dos o más pasos de lavado, que pueden estar en el mismo o en diferente nivel de salinidad y de temperatura. Por ejemplo, la temperatura del lavado puede aumentarse, para ajustar el rigor, de unos 25 ° C (temperatura ambiente), a unos 45 ° C, 50 ° C, 55 ° C, 60 ° C, 65 ° C, o superior. El paso de lavado puede realizarse en presencia de un detergente, por ejemplo, 0,1 o 0,2% de SDS. Por ejemplo, la hibridación puede ser seguida por dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 2x SSC, SDS 0,1%, y opcionalmente de dos pasos de lavado adicional a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 0.2x SSC, 0.1% SDS.

Ejemplos de condiciones estrictas de hibridación, incluyen la hibridación durante la noche a 65 ° C en una solución que contiene 50% formamida, 10x Denhardt (0,2% Ficoll, 0,2%, polivinilpirrolidona 0,2% de albúmina de suero bovino) y 200 ug / ml de ADN portador desnaturalizado, por ejemplo, el ADN del esperma de salmon esquilado, seguido de dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 2x SSC, SDS 0,1%, y dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 0.2x SSC, SDS 0,1%.
La hibridación puede consistir en la hibridación de dos ácidos nucleicos en una solución, o un ácido nucleico en solución a un ácido nucleico en un soporte sólido, por ejemplo, un filtro. Cuando un ácido nucleico está sobre un soporte sólido, un paso prehibridación puede llevarse a cabo antes de la hibridación. La prehibridación puede llevarse a cabo durante al menos 1 hora, 3 horas o 10 horas en la misma solución y en la misma temperatura que la solución de hibridación (sin la cadena de polinucleótidos complementarios).

Las condiciones de rigor adecuadas son conocidas por los técnicos en la materia o pueden determinarse experimentalmente por el artesano calificado. Véase, por ejemplo, los protocolos actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-12.3.6; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY; Agrawal, S. (ed.) Methods in Molecular Biology, volumen 20; Tijssen (1993) Técnicas de Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular - hibridación con sondas de ácidos nucleicos, por ejemplo, el capítulo I, parte 2 "Resumen de los principios de la hibridación y la estrategia de ensayos de sonda de ácido

nucleico ", Elsevier, Nueva York, y Tibanyenda, N. et al., EUR. J. Biochem. 139:19 (1984) y Ebel, S. et al., Biochem. 31:12083 (1992).

El término "vector" se refiere a un ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico con el que se le ha relacionado. Un tipo de vectores que pueden ser utilizados de acuerdo con la invención es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de reproducirse extra-cromosómicamente. Otros vectores son los que son capaces de replicación autónoma y de expresión de los ácidos nucleicos con los que están vinculados. Vectores capaces de dirigir la expresión de genes a las que están vinculados operativamente se llamaran aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante tienen a menudo forma de plásmidos, que se refieren a moléculas de ADN circular de doble cadena que, en su forma vectorial no están vinculados al cromosoma. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se utilizan indistintamente siendo el plásmido la forma más usual de vector. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir como otras formas de vectores de expresión, que cumplen funciones equivalentes, y que se conocen en el arte, o que pueden conocerse posteriormente.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser utilizados como reactivo de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de la secuencias buscadas de ADN o ARN a las que se unen específicamente, como para determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico de la invención. En un aspecto, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de un ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en una muestra, el método de los pasos de: (a) facilitar un oligonucleótido de al menos ocho nucleótidos de longitud, el oligonucleótido siendo complementario a una parte de un ácido nucleico de la invención, (b) poner en contacto el oligonucleótido con una muestra que contenga al menos un ácido nucleico en condiciones que permitan la hibridación de los oligonucleótidos con un ácido nucleico de la invención o una parte de ella, y c) detectar la hibridación del oligonucleótido a un ácido nucleico en la muestra, con lo que se detecta la presencia de un ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en la muestra.

En otro aspecto, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de un ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en una muestra, (a) proporcionando un par de oligonucleótidos de una sola cadena, cada uno de ellos de al menos ocho nucleótidos en longitud, complementarios con las secuencias de ácido nucleico de la invención, y en donde las secuencias de los oligonucleótidos que son complementarios tienen por lo menos diez nucleótidos de separación, y (b) contactando los oligonucleótidos con una muestra que contenga al menos un ácido nucleico en condiciones de hibridación; (c) ampliando la secuencia de nucleótidos entre los dos oligonucleótidos, y (d) detectando la presencia de una secuencia amplificada, con lo que se detecta la presencia de un ácido nucleico de la invención, o de una parte de éstos, en la muestra.

En otro aspecto de la invención, el polinucleótido de la invención se da en un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención y operativamente vinculado a al menos una secuencia reguladora. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para ser transformada y / o el tipo de proteína que se desea expresar. El número de copias del vector, la capacidad de controlar el número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores de antibióticos, deben ser considerados.

Un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención puede ser utilizado como un agente farmacológico para el tratamiento de un animal infectado con B. hyodysenteriae o como vacuna (también es un agente farmacológico) **para evitar que un animal infectado de B. hyodysenteriae**, o para reducir los síntomas y el curso de la enfermedad si el animal se infecta. Una forma de utilización de un vector de expresión como un agente farmacéutico es la de administrar una vacuna de ácido nucleico al animal en riesgo de estar infectado o al animal después de ser infectada. La tecnología de la vacuna de ácido nucleico está bien descrita en el arte. Algunas descripciones se pueden encontrar en las Patentes EE.UU. 6.562.376 (Hooper et al.) Patente EE.UU. 5.589.466 (Felgner, et al.) Patente EE.UU. 6.673.776 (Felgner, et al.), y en las patentes EE.UU. 6.710.035 (Felgner, et al.). Vacunas de ácido nucleico pueden ser inyectadas en un músculo o por vía intradérmica, pueden ser electroporadas en el animal (véase la WO

01/23537, King et al., Y WO 01/68889, Malone et al.), a través de composiciones de lípidos (véase Patente EE.UU. 5.703.055, Felgner, et al), o de otros mecanismos conocidos en el campo del arte.

Vectores de expresión también **pueden** ser transfectados en una bacteria que puede ser administrada a los animales seleccionados para inducir una respuesta inmune a la proteína codificada por los nucleótidos de la presente invención contenida en el vector de expresión. El vector de expresión puede contener secuencias de expresión eucarióticos de tal manera que los nucleótidos de la presente invención son transcritos y traducidos en el animal huésped. Alternativamente, el vector de expresión puede ser transcrito en la bacteria y luego se traducen en el animal huésped. La bacteria que se utiliza como soporte del vector de expresión debe ser atenuada, pero aún invasiva. Uno puede usar Shigella spp., Salmonella spp. Spp coli., y Aeromonas spp., sólo para nombrar unas pocas, que han sido atenuadas, pero aún son invasivas. Ejemplos de estos métodos se pueden encontrar en las Patente EE.UU: 5.824.538 (Branstrom et al); 5.877.159 (Powell, et al.) 6.150.170 (Powell, et al.) 6.500.419 (Hone, et al.) 6682729 y (Powell, et al.).

Alternativamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser colocados en ciertos virus que actúan de vector. Los vectores virales pueden expresar las proteínas de la presente invención sobre la superficie del virus, o llevar a los polinucleótidos de la presente invención a una célula animal, donde el polinucleótido es transcrito y traducido en una proteína. El animal infectado con los vectores virales puede desarrollar una respuesta inmune a las proteínas codificadas por los polinucleótidos de la presente invención. De esta manera se puede aliviar o prevenir una infección por B. hyodysenteriae en el animal que recibió los vectores virales. Ejemplos de vectores **virales se pueden** encontrar en: Patente EE.UU. 5.283.191 (Morgan et al.); Patente EE.UU. 5.554.525 (Sondermeijer et al) y la Patente EE.UU. 5.712.118 (Murphy).

El polinucleótido de la invención puede utilizarse para provocar la expresión y, la sobre-expresión de un polipéptido de la invención, en las células que se propagan en un cultivo, por ejemplo, para producir proteínas o polipéptidos, incluyendo proteínas de fusión o polipéptidos.

La presente invención se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante, a fin de expresar un polipéptido de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser expresado en las células bacterianas, como la E. coli, células de insecto (baculovirus), levadura, plantas, o células de mamífero. En aquellos casos en que la célula huésped sea humana, puede o no ser en un sujeto vivo. Otras células de acogida adecuadas son conocidas por los expertos en la materia. Además, la célula huésped podrá completarse con las moléculas de ARNt, que no suelen encontrarse en el huésped, a fin de optimizar la expresión del polipéptido. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos puede ser modificada para optimizar la expresión en la célula huésped, sin embargo, la proteína producida tendría alta homología a la proteína codificada originalmente. Otros métodos adecuados para maximizar la expresión del polipéptido se darán a conocer a las personas del arte.

La presente invención se refiere a los métodos de producción de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de la invención puede ser cultivada en condiciones adecuadas para permitir que la expresión del polipéptido que se produzca. El polipéptido puede ser segregado y aislado de una mezcla de células y medios que contengan el polipéptido. Alternativamente, el polipéptido se podrá mantener en el citoplasma y las células cultivadas," lisiadas" y la proteína aislada.

Un cultivo celular incluye las células huésped, los medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo de células son bien conocidos en el arte. El polipéptido se puede aislar del medio de cultivo celular, de las células del huésped, o de ambos, mediante técnicas conocidas en la técnica de purificación de proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, electroforesis, y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de un polipéptido de la invención.

Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica la totalidad o una parte seleccionada de polipéptidos de la invención, puede ser utilizado para producir una forma recombinante de la proteína a través de procesos

microbianos o celulares eucariotas. Ligar la secuencia en la construcción de un polinucleótido, como un vector de expresión y transformar o transfectarlos en huespedes, ya sea células eucariotas (hongos, aves, insectos o mamíferos) o procariotas (células bacterianas), son procedimientos habituales. Los procedimientos similares, o modificaciones de los mismos, pueden ser utilizados para preparar polipéptidos recombinantes de la invención por medio de tejidos microbianos o alta tecnología.

Los vectores adecuados para la expresión de un polipéptido de la invención incluyen plásmidos de los siguientes tipos: pTrcHis derivados de plásmidos, PET derivado de plásmidos, pBR322 derivados de plásmidos, pEMBL derivados de plásmidos, PEX-derivados plásmidos, pBTac derivados de plásmidos y PUC-derivados plásmidos de expresión en las células procariotas, como la E. coli. Los distintos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos de acogida son bien conocidos en la materia. Para otros sistemas de expresión adecuados, tanto para las células procariotas y eucariotas, así como procedimientos generales recombinantes, se recomienda ver: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 ª ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) los capítulos 16 y 17.
Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) los capítulos 16 y 17. Las secuencias codificadas para un polipéptido de interés pueden ser incorporadas como parte de un gen fusión incluyendo una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido diferente. La presente invención contempla un polinucleótido aislado que contiene un ácido nucleico de la invención y al menos una secuencia heteróloga que codifica un péptido heterólogo vinculado en el marco de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la invención con el fin de codificar una proteína de fusión que contiene el polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede estar unido a (a) C-terminal del polipéptido de la invención, (b) al terminal N del polipéptido de la invención, o (c) al C-terminal y el N-terminal del polipéptido de la invención. En algunos casos, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido que permite la detección, aislamiento, solubilidad y / o estabilización del polipéptido al cual se funde. Aún en otras realizaciones, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido, como una etiqueta de poli His tag, myc, HA, GST, proteína A, proteína G, la calmodulina de unión del péptido, tiorredoxina, maltosa proteína de unión, poli arginina, su poli-Asp,

FLAG, una porción de una proteína de inmunoglobulina, y un péptido transcitosis.

Los sistemas de expresión de fusión pueden ser útiles cuando se desea producir un fragmento inmunogénico de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, la proteína VP6 cápside de rotavirus puede ser utilizada como transporte inmunológico para porciones de polipéptido ya sea en forma monomérica o en forma de una partícula viral.

Las secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a la porción de un polipéptido de la invención en la que los anticuerpos serán incluidos, pueden ser incorporados en un gen de fusión construcción que incluye las secuencias codificadoras de una proteína virus vaccinia estructural para producir un grupo de virus recombinantes que expresan proteínas fusión y que comprende una porción de la proteína, como parte del virión. El antígeno de superficie de la Hepatitis B también puede ser utilizado en esta función. Del mismo modo, las construcciones quiméricas que codifican las proteínas de fusión que contiene una porción de un polipéptido de la invención y la proteína de la cápside del poliovirus pueden ser creadas para mejorar la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, EP Publicación N º: 0259149, y Evans et al., (1989) Naturaleza 339:385; Huang et al., (1988) J. Virol. 62:3855, y Schlienger et al., (1992) J. Virol. 66:2).339:385; Huang et al., (1988) J. Virol. 62:3855, y Schlienger et al., (1992) J. Virol. 66:2).

Las proteínas de fusión pueden facilitar la expresión y / o la purificación de proteínas. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser generado como glutatión S-transferasa (GST), proteína de fusión. Estas proteínas de fusión GST pueden ser usadas para simplificar la purificación de un polipéptido de la invención, por ejemplo mediante el uso de matrices de glutatión derivatizada (véase, por ejemplo, los protocolos actuales en Biología Molecular, eds. Ausubel et al., (NY: John Wiley & Sons, 1991). En otra realización, un gen fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia de poli-(Hi) / enteroquinasa punto de corte en la N-terminal de la parte deseada de la proteína recombinante, puede permitir la purificación de la proteína fusión expresada mediante la afinación de la cromatografía, usando una resina Ni2 + metal. En ese sentido, la secuencia líder de purificación puede ser posteriormente eliminada gracias al

tratamiento con enteroquinasa para proporcionar la proteína purificada (por ejemplo, ver Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411: 177; y Janknecht et al. PNAS EE.UU. 88:8972).

Las técnicas para la toma de genes fusión son bien conocidas. En esencia, la unión de diferentes fragmentos de ADN codificada por diferentes secuencias polipeptídicas, se realiza de acuerdo con las técnicas convencionales, empleando los extremos romos o extremos escalonados para las uniones terminales, restricción de la enzima de digestión para establecer terminales adecuados, extremos cohesivos, tratamiento del alcalino fosfato para evitar las uniones no deseadas y para la ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede ser sintetizado por técnicas convencionales como sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación PCR para fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando los cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, los protocolos actuales en Biología Molecular, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

En otras realizaciones, la invención proporciona los ácidos nucleicos de la invención inmovilizados sobre una superficie sólida, incluyendo, planchas, placas de microtitulación, diapositivas, granos, esferas, películas, hilos, precipitados, geles, láminas, tubos, contenedores, tubos capilares, almohadillas, rodajas, etc. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser inmovilizados en un chip, como parte de una matriz. La matriz puede contener uno o más polinucleótidos de la invención como se describe en este documento. En una realización, el chip contiene uno o más polinucleótidos de la invención como parte de una serie de secuencias de polinucleótidos de la misma especie patógena en tales polinucleótido (s). En la forma preferida de la invención, se proporciona polipéptidos B. hyodysenteriae aislados como se describe aquí y también las secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. Es más deseable los polipéptidos B. hyodysenteriae que se proporcionan en forma sustancialmente purificada.

Los polipéptidos preferidos de la invención tendrán una o más propiedades biológicas (por ejemplo, in vivo, in vitro o propiedades inmunológicas) que de

polipéptido nativo de cuerpo entero. Los polipéptidos no funcionales se incluyen también en el ámbito de aplicación de la invención, ya que pueden ser útiles, por ejemplo, como los antagonistas de los polipéptidos funcionales. Las propiedades biológicas de los análogos, fragmentos o derivaciones en relación con el tipo salvaje, pueden ser determinadas por ejemplo, por medio de ensayos biológicos.

Los polipéptidos, incluyendo los análogos, los fragmentados y los derivados, pueden ser preparados de forma sintética (por ejemplo, utilizando las técnicas conocidas de la fase sólida o de síntesis de péptidos solución). Preferiblemente, se emplean técnicas de síntesis en fase sólida. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden ser preparados con conocidas técnicas de ingeniería genética, como se describe infra. En otra realización, los polipéptidos pueden ser purificados (por ejemplo, la purificación de inmunoafinidad) a partir de un fluido biológico, tales como mas no limitados a: plasma, heces, suero o orina de los animales, incluyendo mas no limitado: a, cerdo, pollo, de ganso, pato, pavo, perico, el mono humano, perro, gato, caballo, hámster, jerbo, conejo, hurones, caballos, ganado y ovejas. Un animal puede ser cualquier mamífero o un ave.

Los análogos del polipéptido B. hyodysenteriae incluyen los polipéptidos de la secuencia de aminoácidos, en el cual uno o más de los aminoácidos son sustituidos por otro aminoácido donde las sustituciones no alteran sustancialmente la actividad biológica de la molécula.

Según la invención, los polipéptidos de la invención producidos recombinantemente o por síntesis química y los fragmentos, otros derivados u otros análogos, incluyendo proteínas de fusión, pueden ser utilizados como inmunógenos para generar anticuerpos que reconozcan los polipéptidos.

Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígenos del sistema inmunitario, tales como inmunoglobulinas (anticuerpos) o de células T del receptor de antígeno. Un secuencia antigénica de aminoácidos contiene al menos un 5, y de preferencia, al menos unos 10, los aminoácidos. Una porción antigénica de una molécula puede ser la parte que es inmunodominante al anticuerpo o al receptor de reconocimiento T de las

células, o puede ser una parte utilizada para generar un anticuerpo contra la molécula mediante la conjugación de la porción antigénica a una molécula transportadora para la inmunización. Una molécula que es antigénica no tiene que ser auto inmunogénica, es decir, capaz de provocar una respuesta inmune sin un portador.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos y fragmentos de éstos, que se une a un epítopo específico. El término abarca policlonales, monoclonales, y los anticuerpos quiméricos, los últimos mencionados se describen en mayor detalle en los números Patente EE.UU. 4.816.397 y 4.816.567, así como partes de la unión del antígeno de los anticuerpos, como Fab, F (ab ') 2 y F (v) (incluyendo los anticuerpos de cadena simple). Por consiguiente, la frase "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales utilizadas en la presente invención, contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta y una parte activa inmunológicamente de una molécula de inmunoglobulina que contiene un sitio de combinación de anticuerpos. Un "sitio de combinación de anticuerpos" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo formada por la variable de la cadena pesada y ligera y regiones hipervariables que específicamente se une a un antígeno.

Los modelos ejemplares de moléculas de anticuerpos son: las moléculas de inmunoglobulina intactas, las moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen paratopo, incluyendo las partes conocidas en el arte como Fab, Fab, F (ab ') 2 y F (V), cuyas porciones son las preferidas para utilizarse en los métodos terapéuticos aquí descritos.

Las porciones Fab y F (ab ') 2 de las moléculas de anticuerpos son preparadas por la reacción proteolítica de la papaína y la pepsina, respectivamente, por métodos que son bien conocidos en moléculas de anticuerpos sustancialmente intactas. Véase, por ejemplo, EE.UU. Patent No. 4,342,566 para Theofilopolous et al. Las porciones Fab' de las moléculas anticuerpos también son bien conocidas y son producidas a partir de porciones de F(ab')2 seguidas por reducción con mercaptoetanol de los puentes de disulfuro que unen las dos partes pesadas de la cadena, y seguido por la alquilación de la proteína mercaptans resultante con un

reactivo como yodoacetamida. Un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpos intactos se prefiere aquí.

La expresión "anticuerpos monoclonales", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a un anticuerpo que tiene solo un sitio de combinación de anticuerpo capaz de immunoreaccionar con un antígeno en particular. Un anticuerpo monoclonal lo que normalmente muestra es una afinidad única para unirse con el antígeno con el que immunoreaciona. Un anticuerpo monoclonal, puede sin embargo contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno de inmunoespecífico para un antígeno diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal Biespecíficos (quimérico).

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un tejido de depósito que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que no mejora específicamente la respuesta inmunitaria [Hood et al., En Inmunología, p. 384, segunda ed., Benjamin Cummings, Menlo Park, California (1984)]. A menudo, un reto principal con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, es que dejará de provocar una respuesta humoral o inmune celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activas, como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, aceite o emulsiones de hidrocarburos, hemocyanins lapa, dinitrofenol , y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como la BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum. Preferentemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos policlonales para los polipéptidos de la invención. Para la producción de anticuerpos, los diferentes animales de acogida pueden ser inmunizados por inyección con el polipéptido de la invención, incluyendo pero no limitado a los conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc En una realización, un polipéptido de la invención puede ser conjugado a un portador inmunogénico, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa (KLH). Varios adyuvantes se pueden utilizar

para aumentar la respuesta inmunológica dependiendo de la especie huésped, incluyendo pero no limitado a, Freund (completa o incompleta), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activas, como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocyanins lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como la BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos a un polipéptido de la invención, cualquier técnica de producción de moléculas de anticuerpos por medio de líneas continuas de células en cultivo puede ser utilizadas. Estas incluyen pero no se limita a, la técnica de los hibridomas desarrollada originalmente por Kohler et al., (1975) Nature, 256:495 497, la técnica trioma, la técnica de los hibridomas de la célula humano de B [Kozbor et al., (1983) Immunology Today , 4:72], y la técnica de los hibridomas VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., (1985) en los anticuerpos monoclonales y la terapia del cáncer, pp. 77 96, Alan R. Liss, Inc.]. Las líneas de células inmortales productoras de anticuerpos pueden ser creadas por otras técnicas diferentes de la fusión, como la transformación directa de los linfocitos B con ADN oncogénico, o de la transfección con virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, EE.UU. Patent Nos. 4.341.761; 4.399.121, 4.427.783, 4.444.887, 4.451.570, 4.466.917, 4.472.500, 4.491.632 y 4.493.890.

En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en animales libres de gérmenes utilizando tecnologías recientes. Según la invención, anticuerpos de pollo o cerdo pueden ser utilizados y se puede obtener a base de hibridomas pollo o cerdo o mediante la transformación de las células B con el virus EBV in vitro. De hecho, según la invención, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison et al., (1984) J. Bacteriol. 159, 870; Neuberger et al., (1984) Nature, 312:604 608; Takeda et al., (1985) Nature, 314:452 454] por empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específico para un polipéptido de la invención junto con los genes de una molécula de anticuerpo de actividad biológica adecuada puede ser utilizada; estos anticuerpos se encuentran dentro del alcance de esta invención. Estos anticuerpos quiméricos son los preferidos para uso en la

terapia de enfermedades o trastornos intestinales (descrita más adelante), ya que los anticuerpos son mucho menos probables que los anticuerpos xenogénicos para inducir una respuesta inmune, en particular, una respuesta alérgica.

Según la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente EE.UU. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos específicos de cadena única para un polipéptido de la invención. Una modalidad adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab [Huse et al., (1989) Science, 246:1275 1281] para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de la invención.

Los fragmentos de anticuerpos, que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo, pueden ser generados por las técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen pero no están limitados a: el fragmento F (ab ') 2 que puede ser producido por la digestión de la pepsina de la molécula de anticuerpo, fragmentos Fab', que pueden ser generados por la reducción de los puentes disulfuro de fragmentos de F(ab')2, y fragmentos Fab que pueden ser generados por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, la detección de los anticuerpos deseados se puede realizar mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, análisis radioinmuno, ELISA, análisis inmuno "sándwich", análisis inmunorradiométricos, reacciones de precipitación en gel de difusión, análisis de inmunodifusión, análisis de inmunidad in situ (con oro coloidal , etiquetas de enzimas o radioisótopos, por ejemplo) Western blot, reacciones de precipitación, análisis de aglutinación (por ejemplo, análisis de aglutinación del gel, análisis de la hemaglutinación), pruebas de fijación de complemento, pruebas de inmunofluorescencia, pruebas de proteína A, las pruebas de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, el anticuerpo vinculante se detecta mediante la detección de una etiqueta sobre el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En otra realización, se etiqueta el anticuerpo secundario. Muchos medios son

conocidos en la técnica para la detección de una unión en un inmunoensayo y están dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítopo específico de un polipéptido de la invención, se pueden generar hibridomas de un producto que se une a un fragmento de un polipéptido de la invención que contiene este epítopo.

La invención abarca también los métodos de diagnóstico y pronóstico para detectar la presencia de B. hyodysenteriae con un polipéptido de la invención y / o anticuerpos que se unen al polipéptido de la invención y kits de útiles para el diagnóstico y pronóstico de las infecciones por B. hyodysenteriae.
Los métodos de diagnóstico y pronóstico en general, se llevarán a cabo utilizando una muestra biológica obtenida de un animal, como el pollo o el cerdo. Una "muestra" se refiere a los tejidos de un animal o de fluidos sospechosos de contener una especie de Brachyspira, como B. hyodysenteriae, o sus polinucleótidos o sus polipéptidos. Ejemplos de tales tejidos o fluidos incluyen, pero no se limitan a, plasma, suero, materia fecal, orina, pulmón, corazón, músculo esquelético, estómago, intestinos, y en componentes de cultivo in vitro de células.

La invención proporciona métodos para detectar la presencia de un polipéptido de la invención en una muestra, con los siguientes pasos: (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un polipéptido de la invención con un anticuerpo (de preferencia vinculado a un soporte sólido) que se une específicamente al polipéptido de la invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos de reacción incluyendo el anticuerpo y el polipéptido de la invención, y (b) la detección de la formación de complejos de reacción que comprende el anticuerpo y el polipéptido de la invención en la muestra, en la que la detección de la formación de complejos de reacción indica la presencia del polipéptido de la invención en la muestra.
Preferiblemente, el anticuerpo utilizado en este método se deriva de un anticuerpo policlonal de afinidad purificado, y preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además, es preferible que las moléculas del **anticuerpo que se usan aquí estén** en forma de porciones de Fab, Fab', F(ab')2 o F(v) o las moléculas de anticuerpo enteras.

Los métodos preferidos particularmente para la detección de B. hyodysenteriae basados en el método anterior incluyen análisis de inmunoabsorción ligada a la enzima, pruebas radioinmunes, pruebas inmunoenzimáticas y pruebas inmunorradiométricas, incluyendo, pruebas sandwich utilizando anticuerpos monoclonales y / o anticuerpos policlonales. Tres de estos procedimientos, son especialmente útiles ya sea para utilizar polipéptido de la invención (o un fragmento de la misma) marcado con una etiqueta detectable, Ab1 anticuerpo marcado con una etiqueta detectable o para Ab2 anticuerpo marcado con una etiqueta detectable. Los procedimientos pueden resumirse en las siguientes ecuaciones en donde el asterisco indica que la partícula se etiqueta y "AA" significa el polipéptido de la invención:

AA A. * + Ab1 = AA * Ab1 AA

B + AB * 1 = Ab1 AA * AA +

C. Ab1 + Ab2 * = Ab2 AA Ab1 *

Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en el arte y en consecuencia pueden ser utilizadas en el ámbito de aplicación de la presente invención. La "competitividad" en el procedimiento, procedimiento A, se describe en las Patentes EE.UU. números 3.654.090 y 3.850.752. El procedimiento B es representativo de técnicas bien conocidas en el método competitivo. El procedimiento C, de "sándwich", se describe en la Patente EE.UU. RE Nos. 31.006 y 4.016.043. Sin embargo otros procedimientos son conocidos, como los procedimientos que pueden ser utilizados para los anticuerpos de la "doble" o "DASP".

En cada caso, el polipéptido de la invención forma complejos con uno o más de los anticuerpos (es) o de los socios de unión y un miembro del complejo está marcado con una etiqueta detectable. El hecho de que se ha formado un complejo y, si lo desea, el importe de las mismas, puede ser determinada por métodos conocidos de aplicación a la detección de etiquetas.

Se desprende de lo anterior, que una propiedad característica de Ab2 es que va a reaccionar con AB1. Esta reacción se debe a que AB1, planteadas en una especie de mamífero, se ha utilizado en otras especies como antígeno para aumentar el anticuerpo, AB2. Por ejemplo, AB2 pueden plantearse en caprinos utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab2 sería, por tanto anticuerpos de conejo planteadas en las cabras. Para efectos de esta

descripción y reivindicaciones, Ab1 se conoce como un anticuerpo primario, y Ab2 se conoce como un anticuerpo anti-Ab1 secundario. Las etiquetas más comúnmente empleadas para estos estudios son los elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que presentan fluorescencia cuando son expuestos a la luz ultravioleta, y otros. Ejemplos de materiales fluorescentes capaces de ser utilizados como etiquetas son la fluoresceína, la rodamina y la auramina. Un material en particular es la detección de anticuerpos de conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína, a través de un isotiocianato. Ejemplos de isótopos preferidos: 3H, 14C, 32P, 35S, 36Cl, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 90Y, 125I, 131I, y 186Re. Las etiquetas de radiactivos pueden ser detectadas por cualquiera de las disponibles en la actualidad en los procedimientos anteriores. Muchas enzimas pueden ser utilizadas, por ejemplo, la glucuronidasa, la peroxidasa, ß, ß D glucosidasa, ß-galactosidasa D, de ureasa, además de la glucosa oxidasa peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Las enzimas están conjugadas en partículas seleccionadas por la reacción con las moléculas de transición, como las Carbodiimidas, los disocianatos, los glutaraldehído y similares. Las etiquetas de enzimas pueden ser detectadas por cualquiera de las técnicas utilizadas actualmente como los colorimétricos, espectrofotométricos, fluorospectrophotometricos, amperométrica o gasométricos. N º Patente EE.UU. 3.654.090, 3.850.752 y 4.016.043. Estas se refieren al modo de ejemplo para su divulgación de material de etiquetado y los métodos alternativos.

La invención también proporciona un método de detección de anticuerpos a un polipéptido de la invención en muestras biológicas, utilizando los pasos siguientes: (a) proporcionar un polipéptido de la invención o un fragmento de la misma, (b) incubación de una muestra biológica con dicho polipéptido de la invención bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, y (c) determinar si un complejo antígeno-anticuerpo con el polipéptido de la invención que está formado.

En otra realización de la invención se proporcionan los métodos in vitro para evaluar el nivel de anticuerpos a un polipéptido de la invención en una muestra biológica, utilizando los pasos siguientes: (a) la detección de la formación de complejos de reacción en una muestra biológica con arreglo al

método que se ha señalado anteriormente, y (b) la evaluación de la cantidad de complejos de reacción formados, cuya cantidad de complejos de reacción se corresponde con el nivel de polipéptido de la invención en la muestra biológica.

Además se proporcionan métodos in vitro para la vigilancia del tratamiento terapéutico de una enfermedad asociada a B. hyodysenteriae en un huésped animal, mediante la evaluación, como se describe arriba, los niveles de anticuerpos a un polipéptido de la invención de una serie de muestras biológicas obtenidas en el momento de diferentes puntos de un huésped animal sometidos a tal tratamiento terapéutico.

En la presente invención se dispone, además, los métodos para detectar la presencia o ausencia de B. hyodysenteriae en una muestra biológica: (a) acercar la muestra biológica en contacto con una sonda de polinucleótidos o cartilla de polinucleótidos de la invención bajo condiciones adecuadas hibridación, y (b) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o la imprimación y de ácidos nucleicos en la muestra.

Según una realización de la invención, la detección de B. hyodysenteriae puede realizarse directamente de amplificación de secuencias de polinucleótidos de la muestra biológica, utilizando técnicas conocidas para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos de la invención.
En una forma de la invención, el objetivo de la secuencia de ácidos nucleicos es amplificada por PCR y detectados utilizando cualquiera de los métodos específicos mencionados anteriormente. Otras técnicas de diagnóstico útiles para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos se incluyen, mas no están limitados a: 1) alelo-PCR específico, 2) el análisis de conformación de cadena simple, 3) La electroforesis en gel con gradiente, 4) los ensayos de protección de RNasa, 5) el uso de las proteínas que reconocen los desajustes de nucleótidos, como la E. coli de proteínas mutS; 6) oligonucleótidos específicos de alelo, y 7) la hibridación fluorescente in situ.
Además de las secuencias anteriores métodos de polinucleótidos se puede detectar el uso de sondas convencionales. Cuando las sondas se utilizan para detectar la presencia de las secuencias de polinucleótidos que se desean, las muestras biológicas para ser analizadas, tales como sangre o suero, pueden ser tratados si se desea, para extraer los ácidos nucleicos.

Las secuencias de polinucleótidos de la muestra se pueden preparar de varias maneras para facilitar la detección de la secuencia objetivo, por ejemplo, la desnaturalización, la digestión de restricción, la electroforesis o punto secante. La región de orientación de la secuencia de polinucleótidos de la muestra, por lo general debe ser al menos parcialmente, de cadena simple para formar híbridos con la secuencia de la orientación de la sonda. Si la secuencia es, naturalmente, una sola cadena, la desnaturalización no será necesaria. Sin embargo, si la secuencia es de doble cadena, la secuencia, probablemente tendrá que ser desnaturalizado. La desnaturalización se puede realizar mediante diversas técnicas conocidas en el arte.

Las secuencias de polinucleótidos y las sondas de la muestra, se incuban en condiciones que promuevan la creación de un híbrido estable de la secuencia diana en la sonda con la secuencia de la supuesta polinucleótido deseado en la muestra. Preferentemente, las condiciones de alta severidad se utilizan para evitar falsos positivos.

La detección de los híbridos resultantes, se realiza normalmente mediante el uso de sondas marcadas. Como alternativa, la sonda puede estar sin etiqueta, pero puede ser detectable por la unión específica con un ligado que se etiqueta, ya sea directa o indirectamente. Un etiquetado adecuado y los métodos de sondas de etiquetado y ligados que se conocen en la materia incluyen, por ejemplo, las etiquetas radiactivo que pueden ser incorporadas por los métodos ya conocidos (por ejemplo, Nick traducción, cebado al azar o kinasing), biotina, grupos fluorescentes, los grupos de quimioluminiscencia (por ejemplo, dioxetanes, en particular disparado dioxetanes), enzimas, anticuerpos, etc. Las variaciones de este esquema básico se conocen en el arte, e incluyen las modificaciones que facilitan la separación de los híbridos para ser detectados a partir de materias extrañas y / o que amplifican la señal de la fracción etiquetados.

También se contempla dentro del ámbito de aplicación de la presente invención, que los ensayos de la sonda de ácido nucleico pueden emplear un cóctel de sondas de ácido nucleico capaz de detectar las secuencias de polinucleótidos deseadas de esta invención. Así, en un ejemplo para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos de la presente invención en una muestra de células, más una sonda complementaria a las secuencias de

polinucleótidos empleada y, en particular el número de sondas diferentes, alternativamente, 2, 3, ó 5 de ácido nucleicos diferentes secuencias de la sonda.

Las secuencias de polinucleótidos descritos en este documento (preferiblemente en forma de prueba) también pueden ser inmovilizadas en un soporte en fase sólida para la detección de especies Brachyspira, incluyendo, mas no limitando a B. hyodysenteriae., B. intermedia, B. alvinipulli, B.aalborgi, Innocens B., murdochii B. y B. pilosicoli. Alternativamente, las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento formarán parte de una biblioteca de moléculas de ADN que pueden ser utilizadas para detectar simultáneamente un número de genes de diferentes especies como B. Brachyspira, hyodysenteriae. En una alternativa adicional de la invención de las secuencias de polinucleótidos descritos en este documento, junto con otras secuencias de polinucleótidos (como el de otras bacterias o virus) puede ser inmovilizado en un soporte sólido de tal manera que permita la identificación de la presencia de una especie como B. Brachyspira, hyodysenteriae y / o cualquiera de las otras secuencias de polinucleótidos envueltas en el soporte sólido.

Las técnicas para la producción de colecciones de moléculas de ADN inmovilizadas han sido descritas en la materia. En general, los métodos anteriores en el arte para describir la síntesis de cadena simple molécula de ácido nucleico de las bibliotecas, se realiza utilizando por ejemplo, las técnicas de ocultación para crear diversas combinaciones de las secuencias en las distintas posiciones discretas en el sustrato sólido. En la Patente EE.UU. n º 5.837.832 se describe un método mejorado para la producción de arrays de ADN inmovilizado basado en sustratos de silicio en gran escala de la tecnología de integración. En particular, la Patente EE.UU. n º 5.837.832 describe una estrategia denominada "mosaico" para sintetizar un conjunto específico de sondas en las ubicaciones espacialmente definidas en un sustrato que pueden ser utilizadas para producir las bibliotecas de ADN inmovilizadas de la presente invención. La Patent No. 5,837,832 también proporciona referencias para técnicas anteriores, que también pueden ser utilizadas. Por lo tanto, las sondas de secuencias de polinucleótido pueden ser sintetizadas in situ en la superficie del sustrato.

Alternativamente, las moléculas en cadena simples deben ser sintetizadas fuera del sustrato sólido y aplicado a cada secuencia pre-formadas en una posición discreta en el sustrato sólido. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden imprimir directamente sobre el sustrato mediante dispositivos de robótica equipado bien sea con pernos o pinzas como dispositivos eléctricos.

Las secuencias de la biblioteca son normalmente inmovilizadas sobre las regiones discretas del sustrato sólido. El sustrato debe ser poroso para permitir la inmovilización del sustrato o sustancialmente no porosa, en cuyo caso las secuencias de la biblioteca son típicamente inmovilizadas en la superficie del sustrato. El sustrato sólido puede ser de cualquier material al que los polipéptidos puedan unirse, ya sea directa o indirectamente. Ejemplos de sustratos sólidos adecuados son el vidrio plano, las obleas de silicio, mica, cerámicas y polímeros orgánicos tales como plásticos, incluyendo poliestireno y polimetacrilato. También puede ser posible usar membranas semipermeables, como las membranas de nitrocelulosa o nylon, que están ampliamente disponibles.
Las membranas semipermeables deben ser colocadas sobre una superficie sólida robusta como el vidrio. Opcionalmente, las superficies pueden estar recubiertas por una capa de metal, como oro, platino o de metales de transición.

Preferiblemente, el sustrato sólido es generalmente un material que permite una superficie rígida o semi-rígida. En realizaciones preferenciales, al menos una superficie del sustrato deberá ser prácticamente plana. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser conveniente separar físicamente las regiones de síntesis de los polímeros diferentes, por ejemplo, regiones replanteadas o agujeros grabados. También es preferible que el sustrato sólido sea adecuado para la aplicación de alta densidad de secuencias de ADN estar en zonas discretas de 50 a 100 micras, con una densidad de 10000 a 40000 dots/cm-2.

Es conveniente dividir el sustrato sólido en secciones. Esto puede lograrse mediante técnicas como el fotograbado, o por la aplicación de tintas hidrofóbico, por ejemplo, teflón tintas de base (Cel-line, EE.UU.).

Posiciones discretas, en las que se encuentran los diferentes miembros de conjuntos de datos, pueden tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, con forma de cuña, etc...

La unión de las secuencias de polinucleótidos al sustrato puede ser por medio de covalentes o no covalentes. Las secuencias de polinucleótidos pueden asociarse al sustrato a través de una capa de moléculas a las que la base de datos está unida. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden ser etiquetados con la biotina y el sustrato recubierto con avidina o estreptavidina. Una característica conveniente de usar las secuencias de polinucleótidos biotina es que la eficiencia de acoplamiento con el sustrato sólido que se puede determinar fácilmente. Dado que las secuencias de polinucleótidos no se unen de la mejor manera a algunos sustratos sólidos, a menudo es necesario proporcionar una interfaz química entre el sustrato sólido (como en el caso del vidrio) y las secuencias de ácido nucleico. Ejemplos de interfaces de químicos adecuados incluyen glicol hexaethylene. Otro ejemplo es el uso de vidrio recubierto de polilisina, luego de ser modificado químicamente mediante el procedimiento habitual para introducir un ligando de afinidad. Otros métodos para fijar las moléculas a las superficies del sustrato sólido mediante el uso de agentes de acoplamiento se conocen en el arte, véase, por ejemplo WO98/49557.

La unión de las secuencias de polinucleótidos complementarias para inmovilizar la base de datos de los ácidos nucleicos, puede ser determinada por una variedad de medios tales como cambios en las características ópticas de la secuencia de polinucleótidos envuelta (es decir, por el uso de bromuro de etidio) o por el uso de la etiqueta los ácidos nucleicos, como los polipéptidos marcados con fluorocromos. Otras técnicas de detección que no requieren el uso de etiquetas incluyen técnicas ópticas, como optoacoustics, reflectometría, elipsometría y la resonancia de plasmones de superficie (ver WO97/49989).

Por lo tanto, la presente invención proporciona un sustrato sólido que inmoviliza al respecto por lo menos un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente dos o más secuencias de polinucleótidos diferentes de la presente invención.

La presente invención también puede utilizarse como profiláctico o terapéutico, que puede ser utilizado para el propósito de estimular la respuesta inmune humoral y celular en los animales, como pollos y cerdos, proporcionando así la protección contra la colonización con especies Brachyspira, incluyendo mas no limitando a, B. hyodysenteriae, B.suanatina B. . intermedia, B. alvinipulli, B. aalborgi, B. Innocens B, murdochii B. y B. pilosicoli. La infección natural con una especie de Brachyspira, como la B. hyodysenteriae induce los anticuerpos circulantes contra las proteínas descritas en este documento. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos descritos en este documento o sus partes, tienen el potencial para formar la base de una forma sistémica o por vía oral profilácticos o terapéuticos para proporcionar protección contra spirochaetosis intestinal.

Como consecuencia, en una realización de la presente invención, se proporcionan las secuencias de aminoácidos aquí descritos o fragmentos de los anticuerpos que se unen las secuencias de aminoácidos o las secuencias de polinucleótidos también aquí descritos en una cantidad terapéuticamente efectiva mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza aquí para hacer referencia a una cantidad suficiente para reducir en al menos un 15%, 50%, y aún más preferible en un 90%, y más preferiblemente evitar un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y la respuesta del huésped animal. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr una mejora en una condición clínicamente significativa en el animal huésped.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir una reacción alérgica o reacciones adversas similares, tales como molestias gástricas y similares, cuando se le administra al animal. El término "porteador" se refiere a un diluyente, coadyuvantes, excipiente o conductor con el que se administra el compuesto. Estos conductos farmacéuticos de líquidos pueden ser estériles. Por ejemplo el agua y aceites, incluyendo el petróleo animal o vegetal o los de origen sintético, como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. El agua o las

soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y las soluciones acuosas de glicerol, son preferentemente empleados como conductores, en particular para soluciones inyectables. Las adaptaciones a los conductores farmacéuticas se describen en: Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

En una forma más específica de la invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen cantidades terapéuticamente efectivas de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento o un análogo, fragmento o un producto derivado de ellos o los anticuerpos correspondientes, junto con diluyente farmacéuticamente aceptable, conservantes, solubilización, emulsionantes, aditivos y / o conductores. Dichas composiciones son diluyentes de los diferentes contenidos de amortiguación (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fuerza de fosfato), el pH y iónicos y otros aditivos, como por ejemplo, los detergentes y agentes solubilizantes (Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias volumen (por ejemplo, la lactosa, manitol). El material debe ser incorporado en los preparativos de partículas de compuestos de polímeros, como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. El ácido Hylauronic también debe ser utilizado. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación en vivo, y la tasa de aclaramiento en vivo de las proteínas presentes y derivados. Véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) 1435 1712 páginas que se incorporan por referencia en este documento. Las composiciones deben ser preparados en forma líquida, o puede ser en polvo seco, como forma de liofilizado.

Alternativamente, los polinucleótidos de la invención pueden ser optimizados por la expresión en las plantas (por ejemplo, el maíz). La planta puede ser transformada con plásmidos que contienen los polinucleótidos optimizados. Entonces, la planta se cultiva y las proteínas de la invención se expresan en la planta, o la versión optimizada de la planta se expresa. La planta es más tarde cosechada y la sección de la planta que contiene las proteínas de la invención es procesada para la alimentación de los animales. Esta alimentación de los animales impartirá la inmunidad contra B. hyodysenteriae

cuando es comida por el animal. Ejemplos de la técnica en detalle estos métodos se pueden encontrar en U. S. Patent 5,914,123 (Arntzen, et al.), U. S. Patent 6,034,298 (Lam et al.), U. S. Patent 6,136,320 (Arntzen, et al.).

Se puede apreciar que las composiciones farmacéuticas siempre de acuerdo a la invención pueden ser administradas por cualquier medio conocido en el arte. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para la administración son administradas por inyección, por vía oral, pulmonar, o por vía nasal. Las secuencias de aminoácidos que se describen en este documento o anticuerpos derivados de los mismos son preferiblemente administrados por vía intravenosa, vía intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos descritos en este documento o anticuerpos derivados de los mismos, bien definidas, puede ser administrado por vía nasal u oral.

Se incluye también en la presente invención el uso de secuencias de polinucleótidos de la invención, así como el antisentido y las secuencias de polinucleótidos ribozima hybridisable a una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos según la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con B. hyodysenteriae.

Las secuencias de polinucleótidos que codifica las secuencias antisentido son construidas o ribozimado para su uso en métodos terapéuticos son deseablemente administrados directamente como un ácido nucleico desnudo. La captación de ácido nucleico desnudo construido por las células bacterianas, se ve reforzada por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplo de estos agentes son los agentes catiónicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectants. Normalmente, el ácido nucleico de las construcciones, se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

Alternativamente, los antisentidos construidos o ribozimados pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable diluyente para producir una composición farmacéutica. Los conductores convenientes y diluyentes incluyen la solución salina isotónica, por ejemplo, la solución salina de fosfato tamponado. La composición puede formularse para la

administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica. Las vías de administración descritas están destinadas sólo como una guía, ya que un médico experto podrá determinar fácilmente la ruta óptima de administración así como la dosis de cualquier animal en particular y el estado.

La invención también incluye los kits para la detección en los animales que sospechosamente pueden estar infectados con una especie Brachyspira, como B. hyodysenteriae o confirmar que un animal está infectado con una especie Brachyspira, como B. hyodysenteriae. En una realización de esta invención, los equipos adecuados para su uso por un especialista puede estar preparado para determinar la presencia o ausencia de especies Brachyspira, incluyendo pero no limitado a B. hyodysenteriae, B. suanatina, B. intermedia, B. alvinipulli, B aalborgi, B. Innocens B. murdochii. y B. pilosicoli ante la sospecha de animales infectados o para medir cuantitativamente una especie Brachyspira, incluyendo mas no limitado a hyodysenteriae B., B suanatina, B. intermedia, B. alvinipulli, B. aalborgi infección B. pilosicoli. De conformidad con las técnicas de prueba que se mencionaron anteriormente, estos kits pueden contener al menos una versión de la etiqueta de una de las secuencias de aminoácidos aquí descritas o de su pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico al respecto y las direcciones en función del método seleccionado, por ejemplo, " competitivo "," sandwich "," DASP "y similares. Como alternativa, estos kits pueden contener, al menos una secuencia de polinucleótidos complementarios a una porción de una de las secuencias de polinucleótidos descritos en este documento, junto con instrucciones para su uso. Los kits también pueden contener reactivos de periféricos, tales como amortiguadores, estabilizadores, etc.

Como consecuencia, un kit de prueba para la demostración de la presencia de una especie Brachyspira, incluyendo mas no limitando a B. hyodysenteriae, B,suanatina B., B.intermedia, B. alvinipulli, B. aalborgi, B. Innocens., B.murdochii y B. pilosicoli, debe contener lo siguiente:

(a) una cantidad determinada de al menos un reactivo marcado inmuniquímicamente obtenido por la fijación directa o indirecta de una de las secuencias de aminoácidos que se describen en este documento o de una pareja de unión específica al mismo, en una etiqueta detectable;

(b) otros reactivos, y

(c) las instrucciones para el uso de dicho kit.

Más concretamente, el kit de prueba de diagnóstico puede incluir:

(a) una cantidad conocida de una de las secuencias de aminoácidos que aquí se describen como se describió anteriormente (pareja o un enlace), generalmente ligado a una fase sólida para formar un inmunoensayo, o como alternativa, unida a una etiqueta adecuada, o bien habrá una pluralidad de productos finales, tales, etc;

(b) si es necesario, otros reactivos, y

(c) las instrucciones para el uso de dicho equipo para la prueba.

En una variante más, el kit de prueba puede contener:

(a) un componente etiquetado que ha sido obtenido por un acoplamiento de las secuencias de aminoácidos que aquí se describen a una etiqueta detectable;

(b) uno o más reactivos de inmunoquímica adicional de que al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, que ligando es seleccionado del grupo consistente en:

(i) un ligado capaz de unirse con el componente de etiquetado (a);

(ii) un ligado capaz de unirse con una pareja de unión de los componentes etiquetados (a);

(iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componente (s) que se determinen, o

(iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los socios de la unión de al menos uno de los componente (s) que se determinen,

y

(c) las instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y / o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre una de las secuencias de aminoácidos que se describe en este documento y una pareja de unión específica al mismo.

Preparación de la biblioteca genómica

Una biblioteca genómica se prepara utilizando un campo aislado de la especie porcina de Australia hyodysenteriae B. (WA1 cepa). Esta variedad ha sido bien caracterizada y demostrada ser virulenta y ser el desafío

experimental de cerdos. El método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se utiliza para preparar el ADN cromosómico de alta calidad adecuada para la preparación de las bibliotecas de ADN genómico. B. hyodysenteriae se cultiva en 100 ml de tripticasa anaeróbica de cultivo de soja a una densidad celular de 109 células / ml. Las células se cosechan a 4.000 xg durante 10 minutos, el sedimento celular es resuspendido en 9,5 ml de buffer TE. SDS. Posteriormente se añade a una concentración final de 0,5% (w / v), y las células lisis a 37 ° C durante 1 hora con 100 mg de proteinasa K. Se añade el NaCl a una concentración final de 0,7 M y 1,5 ml de CTAB / NaCl (solución al 10% w / v CTAB, 0,7 M NaCl), antes de incubar la solución a los 65 ° C durante 20 minutos. El lisado se extrae con un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamílico, y el tubo se centrifuga a 6.000 xg durante 10 minutos para separar las fases. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se añaden 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN de alto peso molecular. El precipitado de ADN se recoge mediante una varilla de vidrio conectado y transferido a un tubo que contiene 1 ml de 70% (v / v) de etanol. El tubo se centrifuga a 10.000 xg y el ADN en pelotas se redisuelven en 4 ml de TE de la noche a la mañana. Un gradiente de cloruro de cesio que contiene 1,05 g / ml CsCl y 0,5 mg / ml de bromuro de etidio se prepara utilizando la solución de ADN redisuelto. El gradiente se transfiere a tubos herméticos de 4 ml y se centrifuga a 70.000 xg durante la noche a 15 ° C. El ADN separado se visualiza bajo una luz ultravioleta, y el ADN de alto peso molecular se retira del gradiente usando una aguja de 15-g. El bromuro de etidio se extrae el ADN mediante extracción secuencial con isopropanol saturado de CsCl. El ADN cromosómico purificado es dializado con 2 litros de TE y se precipita con isopropanol. El DNA genómico resuspendido se corta con una tijera de genes (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI), y el ADN cortado usando polimerasa Klenow de ADN para generar fragmentos de punta roma. Un centenar de ng de fragmentos deADN de punta roma se liga con 25 ng de vector VC pSMART (Lucigen, Meddleton, WI) usando ligasa de ADN CloneSmart. El ADN ligado es a continuación electroporado en células de E. coli. Una inserción de una pequeña (2-3 kb) biblioteca y una inserción de una mediana (3-10 kb) biblioteca se construye en la versión de copia baja del vector VC pSMART.

Secuenciación de genomas

Después que se obtiene la biblioteca genómica, son recogidos clones individuales de E. coli que contiene el vector de CV pSMART. El ADN plásmido es purificado y secuenciado. Los plásmidos purificados son sometidos a secuenciación directa automatizada del vector VC pSMART con el avance y retroceso cebadores específicos para el vector de CV pSMART. Cada reacción de secuenciación se lleva a cabo en un volumen de 10 μl compuesto de 200 ng de ADN plásmido, 2 pmol de cebador, y 4 μl de la ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones cíclicas incluyen 2 minutos de desnaturalización a 96 ° C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C durante 10 segundos, y una combinación de cebador y un paso de extensión a 60 ° C durante 4 minutos. Los Terminadores de tinte residuales se eliminan de los productos de secuenciación por precipitación con un 95% (v / v) de etanol que contiene 85 mM de acetato de sodio (pH 5,2), 3 mm de EDTA (pH 8), y **secada** al vacío. Los plásmidos se ordenan por duplicado utilizando cada cebador. Los productos de secuenciación se analizan utilizando un secuenciador de ADN ABI 373A (PE Applied Biosystems).

Anotación

Las secuencias parciales del genoma de B. hyodysenteriae se ensamblan y se anotan usando una serie de herramientas de bioinformática de dominio público para analizar y volver a analizar las secuencias como parte de un procedimiento de aseguramiento de calidad en el análisis de datos. Los marcos de lectura abierta (ORF) son previstos utilizando una variedad de programas, incluyendo GeneMark, Glimmer, Orfeo, SELFID y GetORF. ORF Putativos se examinan en busca de homología (ADN y proteínas) con bases de datos internacionales existentes mediante búsquedas incluyendo BLAST y FASTA. Todos los ORF previstos se analizan para determinar su localización celular mediante programas que incluyen PSI-BLAST, FASTA, motivos, FINDPATTERNS, PHD, SignalP y PSORT. Se utilizan bases de datos incluidas, Interpro, Prosite, PRODOM, Pfam y Blocks para predecir la superficie de las proteínas asociadas tales como los dominios

transmembrana, los péptidos líder, homologías a las proteínas de superficie conocidas, la firma de lipoproteínas, los motivos de anclaje de la membrana externa y dominios de unión de la célula huésped. Los análisis Filogenéticos y de evolución molecular se realizan con genes identificados y con otras especies para ayudar en la asignación de la función. El análisis in silicio de ambos genomas secuenciados produce una lista completa de todos los ORFs presentes en la secuencia de datos disponibles. Cada ORF es interrogado por información descriptiva, como el peso molecular previsto, punto isoeléctrico, hidrofobicidad, y la localización subcelular que permitan su correlación con las propiedades in vitro del producto del gen nativo. Los genes previstos que codifican proteínas similares a la superficie de los componentes localizados y / o factores de virulencia en otras bacterias patógenas son seleccionados como objetivos potenciales de la vacuna.

Resultados Bioinformáticos

La secuenciación del genoma de B. hyodysenteriae resulta en 94,6% (3.028,6 KB de 3200 kb previstos) del genoma que ha sido secuenciado. La secuencia de B. hyodysenteriae se compone de 294 contigs con un tamaño promedio de 10,3 kb. Para la B.hyodysenteriae, 2.593 marcos de lectura abierta (ORF) se preveen de los 294 contigs. La comparación de los ORF previstos con genes presentes en el ácido nucleico y bases de datos de proteínas indican que aproximadamente el 70% de los ORFs tienen una homología con genes contenidos en las bases de datos públicas. No se conoce la identidad del 30% restante de los ORF previstos.

Candidatos a Vacunas

Para ayudar a reducir el número de ORFs que pueden ponerse a prueba como candidato a vacuna, las ORF que muestren una homología razonable (E-valor inferior a E-15) con proteínas de superficie exterior, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, presentes en las bases de datos públicas son seleccionadas como posibles candidatas a vacunas. De los 2.593 ORFs obtenidos en la secuenciación genómica, muchos pasaron este examen, pero los resultados de treinta y tres genes se presentan aquí. El cuadro 1 muestra treinta y tres genes seleccionados como blanco

potencial de la vacuna y su similitud con otras secuencias de aminoácido conocidas, obtenidas de la base de datos SWISS-PROT. Cabe señalar que la identidad de los aminoácidos no llega a más de 58%, mientras que la similitud u homología de aminoácidos sigue siendo menos del 71%, lo que indica que estos ORFs son únicos.

Cuadro 1

Gen	Identidad de la proteína con más alta homología	Identidad (amino ácidos)	Similaridad (amino ácidos)	Número de accesión
NAV-H54	Proteína de superficie Variable(VspD) de *Brachyspira hyodysenteriae*	106/223 (47%)	136/223 (60%)	O68157
NAV-H55	Proteína Flagelar B de *Leptospira interrogans*	58/213 (27%)	108/213 (50%)	Q72SJ3
NAV-H56	Antigeno mayor de la cuasi miosina	288/1509 (19%)	609/1509 (40%)	P21249
NAV-H57	Transglycosylato Lítico de murein (membrana externa, posiblemente)	97/318 (25%)	158/318 (41%)	Q6F7W9
NAV-H58	Proteína exterior de la membrane de *Treponema pallidum*	57/175 (32%)	90/175 (51%)	P96127
NAV-H59	Antigeno mayor de la cuasi miosina	204/1012 (20%)	432/1012 (42%)	P21249
NAV-H60	Proteína de membrane exterior y liproproteína de peptidoglycan asociada	46/139 (33%)	68/139 (48%)	COG2885
NAV-H61	Lipoproteína putative de *Treponema denticola*	336/805 (41%)	483/805 (60%)	Q73NT0
NAV-H62	NlpA lipoproteína de *Streptococcus suis*	92/269 (34%)	151/269 (56%)	Q303L3
NAV-H63	NlpA lipoproteína de *Streptococcus suis*	106/312 (33%)	167/312 (53%)	Q303L3
NAV-	NlpA lipoproteína de	112/337	198/337	Q303L3

H64	*Streptococcus suis*	(33%)	(58%)	
NAV-H65	Proteína putativa secretada de *Streptomyces violaceoruber*	50/127 (39%)	68/127 (53%)	Q849M9
NAV-H66	Toxina (YoeB) de *Escherichia coli*	42/85 (58%)	60/85 (76%)	P69349
NAV-H67	Proteína de membrane exterior (TolC)	80/350 (20%)	171/350 (39%)	Q2Z054
NAV-H68	Proteína probablemente relacionada con la hemolysina *Dehalococcoides* sp.	121/415 (29%)	204/415 (49%)	Q3ZYX1
NAV-H69	Proteína de superficie externa de *Bacillus cereus*	193/357 (54%)	256/357 (71%)	Q4MWS0
NAV-H70	Lipoproteína de membrana asociada a *Vibrio vulnificus*	146/417 (35%)	203/417 (48%)	Q2SRL9
NAV-H71	Proteína de capa de superficie de *Methanosarcina barkeri*	72/201 (36%)	112/201 (49%)	Q8TJE3
NAV-H72	Transglycosylato Lítico de murein (membrana externa, posiblemente)	51/141 (36%)	6/141 (53%)	P44049
NAV-H73	Toxina (YoeB) de Escherichia coli	42/84 (50%)	62/84 (73%)	P69349
NAV-H74	Proteína de membraba exterior/antigen protectivo	210/833 (25%)	339/833 (40%)	COG4775
NAV-H22	Proteína de superficie variable (VspH) de Brachyspira hyodysenteriae	29% (133/454)	43% (199/454)	AAK14803.1
NAV-H23	Lipoproteína asociada a la membrana de Mycoplasma mycoides	43% (114/263)	60% (159/263)	AAF27178.1
NAV-	Lipoproteína de	32%	53%	ZP00300921.1

H24	membraba externa de Geobacter metallireducens	(46/142)	(76/142)	
NAV-H30	Antigen de superficie (BspA) de Bacteroides forsythus	38% (83/216)	55% (120/216)	AAC82625.1
NAV-H32	Proteína hemolítica (HlpA) de Nostoc sp.	35% (49/137)	56% (77/137)	NP488469.1
NAV-H33	Proteína hemolítica de Prevotella intermedia	54% (64/117)	70% (83/117)	AAC05836.1
NAV-H37	Proteína de mediación virulenta (VirC) de Vibrio parahaemolyticus	36% (58/159)	63% (101/159)	NP800579.1
NAV-H40	transglycosylaso litícco de murein (contiene LysM/dominios invasivos)	26% (120/449)	41% (185/449)	ZP00146104.1
NAV-H41	Antigen de superifice BspA de Bacteroides forsythus	41% (84/201)	57% (115/201)	AAC82625.1
NAV-H43	Hemolysinas y proteínas relacionadas de Anabaena variabilis	35% (150/425)	56% (242/425)	ZP00162711.2
NAV-H44	Membrana exterior de Leptospira interrogans	20% (79/393)	41% (163/393)	YP001419.1
NAV-H45	Proteína de factor de virulancia (MviN) de Geobacter sulfurreducens	32% (153/469)	49% (231/469)	NP952225.1

El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H54 se encuentran en los números ID SEC: 1 y 2, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H55 se encuentran en los números ID SEC: 3 y 4, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H56 se encuentran en los números ID SEC: 5 y 6, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H57 se encuentran en los números ID SEC: 7 y 8, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H58 se encuentran en los números ID SEC: 9 y 10, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H59 se encuentran en los

números ID SEC: 11 y 12, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H60 se encuentran en los números ID SEC: 13 y 14, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H61 se encuentran en los números ID SEC: 15 y 16, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H62 se encuentran en los números ID SEC: 17 y 18, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H63 se encuentran en los números ID SEC: 19 y 20, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H64 se encuentran en los números ID SEC: 21 y 22, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H65 se encuentran en los números ID SEC: 23 y 24, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H66 se encuentran en los números ID SEC: 25 y 26, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H67 se encuentran en los números ID SEC: 27 y 28, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H68 se encuentran en los números ID SEC: 29 y 30, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H69 se encuentran en los números ID SEC: 31 y 32, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H70 se encuentran en los números ID SEC: 33 y 34, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H71 se encuentran en los números ID SEC: 35 y 36, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H72 se encuentran en los números ID SEC: 37 y 38, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H73 se encuentran en los números ID SEC: 39 y 40, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H74 se encuentran en los números ID SEC: 41 y 42, respectivamente.

El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H22 se encuentran en los números ID SEC: 43 y 44, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H23 se encuentran en los números ID SEC: 45 y 46, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H24 se encuentran en los números ID SEC: 47 y 48, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H30 se encuentran en los números ID SEC: 49 y 50, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H32 se encuentran en los números ID SEC: 51 y 52, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H33 se encuentran en los números ID SEC: 53 y 54, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H37 se encuentran en los números ID SEC: 55 y 56, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H40 se

encuentran en los números ID SEC: 57 y 58, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H41 se encuentran en los números ID SEC: 59 y 60, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H43 se encuentran en los números ID SEC: 61 y 62, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H44 se encuentran en los números ID SEC: 63 y 64, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H45 se encuentran en los números ID SEC: 65 y 66, respectivamente.

Para reducir aún más el número de ORFs que se pondrán a prueba como una vacuna, son abandonados los productos de genes, previstos por el análisis en silicio, que se localicen en el citoplasma o en la membrana interna de la espiroqueta. Como resultado, veinte de los treinta y tres genes presentan en la Tabla 1 se analiza con mayor profundidad. Estos incluyen NAV-H58, H60-NAV, NAV-H62, H64-NAV, NAV-H66, NAV-H67, H69-NAV, NAV-H71, H73-NAV, NAV-H22, H23-NAV, NAV-H24, NAV-H30, NAV-H32, H33-NAV, NAV-H37, H40-NAV, NAV-H41, NAV-H43, H44-NAV, y NAV-H45.

Análisis de la distribución de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Uno o dos primeros pares que se ajustan fuertemente a las diferentes regiones del gen objetivo de la región codificada están diseñados y optimizados para la detección PCR. Los primeros individuales están diseñados utilizando Oligo Explorer 1.2 y son seleccionados los primeros grupos con temperaturas calculadas de fusión de aproximadamente 55-60 ° C. Estos primeros grupos son también seleccionados para generar productos PCR superiores a 200 pb. Una primera temperatura de 50 ° C para un refuerzo de un medio –rígido, es seleccionada para el análisis de PCR de distribución. Las condiciones del medio- rígido permitirán a las posibles secuencias menores no coincidentes (debido a diferencias de tensión) y que ocurren en los primeros sitios de unión, no afectar las primeras uniones. El análisis de la distribución del objetivo de los genes de veintiún B. hyodysenteriae se realizan en 23 cepas de B. hyodysenteriae; incluyendo dos cepas que hayan demostrado ser virulentas. El análisis PCR se realiza en un volumen total de 25 μ L utilizando una Taq de polimerasa de ADN (Biotech International, Thurmont, MD). La mezcla de amplificación consta de

1x tampón PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl2), 1 U de Taq ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 0,5 μ M del primer par, y 1 μ l purificado plantilla de ADN cromosómico. Las condiciones cíclicas implican un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 50 ° C durante 15 segundos, y una primer extension a 68 ° C durante 4 minutos. Los productos PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón 1x TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), se tiñeron con un 1 μ g / ml de solución de bromuro de etidio y la visión sobre la luz UV. Los iniciadores utilizados para los genes de los dieciocho (de los veinte uno) se indican en la Tabla 2. De estos genes de dieciocho años, tres de ellos (NAV-H23, NAV-NAV-H41 y H71) están presentes en el 83% de las cepas de B. hyodysenteriae de prueba, tres de ellos (NAV-H24, NAV-NAV-H30 y H73) están presentes en el 87% de las cepas estudiadas, siete de ellos (NAV-H22, NAV-H32, H33-NAV, NAV-H37, H43-NAV, NAV-NAV-H64 y H69) están presentes en el 91% de las cepas de prueba, y tres de ellos (NAV-H40, NAV-H44, H45 y NAV-) están presentes en el 100% de las cepas analizadas. Los otros tres genes están presentes en menos del 80% de las cepas de B. hyodysenteriae prueba. La mala distribución de estos genes hace menos útiles como una subunidad de la vacuna. Por esta razón, el nuevo análisis de estos genes se ha abandonado.

Cuadro 2

Gen	Primer nombre	Primer Sequencia (5'-3')
NAV-H22	H22-F4	AAACGTTTATATTTTATTTTATC (SEQ ID NO: 67)
	H22-R1308	AAACTTCCAAGTGATACC (SEQ ID NO: 68)
NAV-H23	H23-F4	AAATATAAACCTACAAGCAG (SEQ ID NO: 69)
	H23-R2366	AATATTTCAGTTAATCTAAAATC (SEQ ID NO: 70)
NAV-H24	H24-F19	ACTTTAATCTTTGTATTAATTTTG (SEQ ID NO: 71)
	H24-R729	TTGTTTTAATTTGATAATATCAG (SEQ ID NO: 72)

Cuadro 2 (continúa)

Gen	Primer nombre	Primer Sequencia (5'-3')
NAV-H30	H30-F4	AAAAAAATTATTTTATTAATATTTATATT (SEQ ID NO: 73)
	H30-R969	TTCTCTTATAATCTTTACAGTTG (SEQ ID NO: 74)
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC (SEQ ID NO: 75)
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTTATTTG (SEQ ID NO: 76)
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT (SEQ ID NO: 77)
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA (SEQ ID NO: 78)
NAV-H37	H37-F4	AATGATATTATTAAAGTGATAAA (SEQ ID NO: 79)
	H37-R825	AAAATCTAATATAACGGATT (SEQ ID NO: 80)
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG (SEQ ID NO: 81)
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAC (SEQ ID NO: 82)
NAV-H41	H41-F19	TATATTTTCATTATATATTTATTAG (SEQ ID NO: 83)
	H41-R1067	CTAGGCATAGATTTTCCA (SEQ ID NO: 84)
NAV-H43	H43-F46	TTTGCCATGTCGGAAATTGCAG (SEQ ID NO: 85)
	H43-R1236	TATTCTAGCACCGTCCATATC (SEQ ID NO: 86)
NAV-H44	H44-F43	GTATGTTTATATGCTCAGGATAC (SEQ ID NO: 87)
	H44-R2931	AACAGCAGCACTATCTTGTAA (SEQ ID NO: 88)
	H44-F80	CAGCAGCAACAAATAATACTACTG (SEQ ID NO: 89)

	H44-R929	TGAATATAAACACCTTCTCTCAAAG (SEQ ID NO: 90)
NAV-H45	H45-F52	AAAATGTCATTGGTAACTACTGTAAG (SEQ ID NO: 91)
	H45-R1595	CTTGATAATCTGCCTTTAAACATAC (SEQ ID NO: 92)
NAV-H62	H62-F69	ATGTGAGGAAAAAACAGAAAG (SEQ ID NO: 93)
	H62-R866	TCATTACCAGAAAACCATACTC (SEQ ID NO: 94)
NAV-H64	H64-F69	AGGAAATAAAGCTCCTGCTGCTTCAGC (SEQ ID NO: 95)
	H64-R253	GCATAGCAGCAACTTCAGAAGGTCCA (SEQ ID NO: 96)
NAV-H66	H66-F114	CTTATTAATTGGTATAGGAAAACC (SEQ ID NO: 97)
	H66-R200	AATCTATGTTCTTGATTTATTAGCC (SEQ ID NO: 98)
NAV-H69	H69-F546	AGAAGCTACTTTTGGACCTTGGCCTGT (SEQ ID NO: 99)
	H69-R662	ACACAGTCAACACCAAGAGC (SEQ ID NO: 100)
NAV-H71	H71-F568	AAACAGCAGACTAGCTGGTG (SEQ ID NO: 101)
	H71-R773	TGACCATTACTTACACCGGATACCCCA (SEQ ID NO: 102)
	H71-F37	TTAATGACTATATCGCTTTCATACACTTTC (SEQ ID NO: 103)
	H71-R1241	TCAATTCTTCCAGACATAAAATCAGTAAG (SEQ ID NO: 104)
NAV-H73	H73-F37	TATATAGAGTGGGTATCAGAAG (SEQ ID NO: 105)
	H73-R254	TCATAATGGTATTTACAAGATG (SEQ ID NO: 106)

Extracción del plásmido pTrcHis

Los clones Escherichia coli clones JM109 que albergan el plásmido pTrcHis plásmido (Invitrogen, Carlsbad, CA) son alineados fuera del almacenamiento del glicerol Luria-Bertani (LB) dentro de la placas de agar completado con 100 mg / l de ampicilina y encubado a 37 ° C durante 16 horas. Una sola colonia se utiliza para inocular 10 ml de caldo LB completado con 100 mg / l de ampicilina, y el caldo de cultivo se incuba a 37 ° C durante 12 horas con agitación. El cultivo nocturno se centrifuga a 5.000 xg durante 10 minutos, y el plásmido contenido en las células, se obtiene mediante los QIAprep Miniprep Spin Kit (Qiagen, Doncaster VIC). Las células granuladas son resuspendidas a 250 µl buffer P1 celular y luego se seccionan con la adición de 250 lisis µl buffer P2 celular. Las células lisas son neutralizadas con 350 de N3 de neutralización µl, y los restos de las células granuladas se centrifugan 20.000 xg durante 10 minutos. El sobrante se transfiere a una columna giratoria y se centrifuga a 10.000 xg durante 1 minuto. Después de descartar el flujo 500 se utiliza el tampón de lavado a la columna y se centrifuga como el paso anterior. El flujo se descarta y la columna se seca con centrifugación a 20.000 xg durante 3 minutos. El plásmido de ADN es eluído de la columna con 100 de elución µl EB. El plásmido purificado se cuantificará mediante un fluorímetro Dynaquant ADN (Hoefer, San Francisco, CA), y la concentración de ADN se ajusta a 100 µ g / ml por dilución con tampón TE. El plásmido pTrcHis purificado se almacena a -20 ° C.

Preparación del Vector

Dos µ g del plásmido purificado de pTrcHis es digerido a 37 ° C durante 1-4 horas en un volumen total de 50 µ L con 5 U de dos enzimas de restricción en 100 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM de MgCl2, 1 mM de DTT y 100 µ g / ml de BSA. El primer par de enzimas para la restricción que se usan depende de la secuencia de las primeras y de la secuencia ORF. El objetivo es utilizar cebos que no se extraen de la ORF. El vector restringido es verificado por electrophoresing 1 µ l de la reacción de la digestión a través de un 1% (w / v) de gel de agarosa en buffer TAE 1X a 90 V durante 1 hora.

La electroforesis de DNA se tiñe con bromuro de 1 μ g / ml de etidio para que se vea mejor con los rayos ultravioleta (UV).

El vector Linealizado pTrcHis es purificado con ayuda de la Limpieza PCR UltraClean-up Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). En resumen, la reacción de restricción (50 microlitro) se mezcla con el B1 250 µl SpinBind de amortiguamiento, y el volumen total se agrega a una columna giratoria. Después de la centrifugación a 8.000 xg durante 1 minuto, el flujo continuo se descarta y se añaden 300 µl B2 búfer SpinClean a la columna. La columna se centrifuga como antes y el flujo es descartado antes del secado de la columna a 20.000 xg durante 3 minutos. El vector purificado es eluido de la columna con 50 µl buffer TE. El Vector lineal purificado se evalúa mediante un fluorímetro, y la concentración de ADN se ajusta a 50 μ g / ml por dilución con un tampón TE. El vector purificado restringido se almacena a -20 ° C.

Primer diseño de para la preparación insertada:

Los primeros pares están diseñados para ampliar lo máximo posible la región codificada del gen objetivo utilizando el ADN genómico como punto de partida. Todas las primeras secuencias incluyen sitios de enzima terminal para permitir la cohesión final como resultado del pTrcHis. Los primeros, se analizarán con el Amplify 1,2 (Universidad de Wisconsin, Madison, WI) y la secuencia de ampliación teórica se inserta en la posición adecuada en la secuencia de vectores pTrcHis. Esta translación deducida de la expresión quimérica, se realiza utilizando la versión del Vector NTI 6 (Informax), a fin de confirmar que el gen se inserta en el marco de lectura correcto. El Cuadro 3 también proporciona el tamaño del gen, el tamaño de la proteína, la predicción de peso molecular de la proteína nativa en daltons y el IP predicho de la proteína. Cabe señalar que la histidina-fusión de la proteína recombinante añade aproximadamente 4 kDa de peso molecular para la proteína nativa predicha.

Cuadro 3

Gen	Tamaño del Gen (bp)	Tamaño de la Proteina (aa)	Proteína nativa MW predictada (Da)	pI predictada
NAV-H40	1815	605	97,733	9.4853
NAV-H41	1068	356	39,870	5.2168
NAV-H44	2940	980	113,722	5.1864
NAV-H62	1014	338	37642	4.3944
NAV-H64	1011	337	36468	4.4953
NAV-H66	264	88	10629	9.3027
NAV-H69	1080	360	41525	5.7123
NAV-H73	258	86	10527	9.5920

La amplificación del gen insertado:

Utilizando el ADN genómico, todos los genes insertados se amplifican por el PCR en un volumen total de 100 μ L, usando la polimerasa Taq polimerasa de ADN (Biotech International) y la polimerasa Pfu DNA (Promega, Madison, WI). La mezcla de amplificación consta de 1x de PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl2), 1 U de Taq polimerasa de ADN, 0,01 U Pfu ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 0,5 μ M de la pareja de imprimación adecuada y 1 μ l de ADN cromosómico purificada. El ADN cromosómico se prepara de la misma B. hyodysenteriae utilizado para la secuenciación del genoma. Las condiciones cíclicas implican un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 50 ° C durante 15 segundos, y primer extension a 68 ° C durante 4 minutos. Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón TAE 1x, se tiñen con un 1 μ g / ml de solución de bromuro de etidio y de esa manera se podrán apreciar mejor a la luz UV. Después de verificar la presencia y el tamaño correcto del producto PCR, la reacción de PCR se purifica mediante la PCR UltraClean Clean-up Kit (Mo Bio Laboratorios, Carlsbad, CA). La reacción de PCR (100 microlitro) se mezcla con el B1 500 μl SpinBind de amortiguamiento y el volumen total se agrega a una columna

giratoria. Después de la centrifugación a 8.000 xg durante 1 minuto, el flujo continuo se descarta, y 300 µl B2 de búfer SpinClean se añade a la columna. La columna se centrifuga como antes y el flujo es descartado antes del secado de la columna a 20.000 xg durante 3 minutos. El vector purificado es eluido columna con 100 µl buffer TE.

Digestión de la enzima de restricción del gen insertado

Treinta µl de producto PCR purificado es digerido en un volumen total de 50 ul con 1 U de cada enzima de restricción compatible con la restricción terminal de sitio endonucleasa determinado mediante la clonación del primer olinucleótido. La reaccíon de la restricción contiene 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA con 1 U de cada enzima de restricción a 37°C for 1-4 horas. El DNA digerido insertado es purificado mediante el uso de UltraClean PCR Clean-up Kit (ver abajo). EL DNA digerido purificado es cuantificado usando el fluorimetro. La concentración de DNA se ajusta 20 µg/ml con el mediante la dilución con el TE buffer. EL DNA restringido purificado es usado inmediatamente por el vector de ligación.

Ligación del gen insertado en el vector pTrcHis

Las reacciones de ligación son todas realizadas en un volumen total de 20 µl. 100 ng de pTrcHis linearisados se encuban con 20 ng con inserciones restringidas a 16°C por 16 horas in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT y 1 mM ATP conteniendo 1 U de T4 DNA (Promega). Una ligación idéntica que contenga DNA no insertado, también se incluye como vector de control negativo de re-circulación. Las enzimas apropiadas son usadas para cada reacción.

Transformación de las ligaciones pTrcHis en células *E. coli*

Las células *E. coli* JM109 (Promega) competentes son descongeladas a -80°C, almacenados en hielo y posteriormente 50 µl de las células son transformadas en tubos microfugados de 1.5 ml de hielo frío que contienen 5 µl de las reacciones de ligación nocturna (equivalentes a 25 ng del vector pTrcHis). Los tubos son mezclados mediante un suave movimiento de la

punta de cada tubo en la rejilla. Esto se deja en hielo por 30 minutos. Las células son posteriormente golpeadas por el calor metiendo los tubos en un baño de agua 42°C por 45 segundos antes de devolver los tubos al hielo durante 2 minutos. Las células transformadas son recompuestas en 1 ml LB de cultivo por una hora a 37°C mediante una mezcla suave. Las células recompuestas se cultivan a 2,500 x *g* por 5 minutos. Las células son re suspendidas en 50 µl de LB cultivo fresco. Todo el contenido de 50 µl de células recompuestas se esparce incluso dentro del plato agar LB que contiene 100 mg/l de ampicilina, usando un vidrio esterilizado cultivo. Los platos son incubados a 37°C por 16 horas.

La detección de pTrcHis recombinante en construcciones de E. coli por el PCR

Doce colonias transformantes únicas para cada construcción son alineadas en LB frescos con 100 mg / l de ampicilina. Estos últimos deben ser incubados a 37 ° C durante 16 horas. Una sola colonia de cada evento de transformación se resuspende en 50 µ l de TE y se hierve durante 1 minuto. Dos µ l de agua de células hervidas se utilizan como plantilla para la PCR. La mezcla de amplificación consta de 1x tampón PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl2), 1 U de Taq ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µ M de la pTrcHis de primeros F (5' - CAATTTATCAGACAATCTGTGTG-3 ', SEQ ID NO: 107) y 0,5 µ M de la pTrcHis imprimador R (5'-TGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCG-3 ', SEQ ID NO: 108). Las condiciones cíclicas implican un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 60 ° C durante 15 segundos, y una extensión de imprimación a 72 ° C durante 1 minuto . Los productos PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón TAE 1x, se tiñen con un 1 µ g / ml de solución de bromuro de etidio y se ven más de la luz UV. La clonación de los insertos en los distintos vectores de expresión recombinante produce construcciones de pTrcHis de diferentes tamaños.

Expresión piloto de proteínas recombinantes His-agregadas

De cinco a diez colonias aisladas de pTrcHis recombinante construidas en E. coli JM109 se inoculan LB 3 ml de caldo en un tubo de 5 ml con 100 mg / l de ampicilina y 1 mM IPTG. Se incuba a 37 ° C durante 16 horas con agitación. Las células se cultivan por centrifugación a 5.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se desecha, y cada pastilla se resuspende con 10 µl de Ni-NTA desnaturalización tampón de lisis (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 8,0). Después de la agitación del tubo durante 1 minuto, los restos celulares son granulados por centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se almacenan a -20 ° C hasta su análisis.

Electroforesis del gel poliacrilamida de Sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE)

El análisis SDS-PAGE de la proteína se realiza mediante un sistema discontinuo Tris buffer de glicina. Treinta µ l de la muestra de proteínas se mezclan con 10 µ l de 4x para el tratamiento de la muestra (250 mM Tris-HCl (pH 6,0), 8% (w / v) SDS, 200 mM DTT, 40% (v / v) de glicerol y de 0,04% (w / v) de azul de bromofenol). Las muestras se hierven durante 5 minutos inmediatamente anteriores a la carga 10 µl de la muestra en los pocillos del gel. El gel consta de un gel de apilamiento (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% w / v acylamide, 0,15% w / v bis-acrilamida y 0,1% w / v SDS) y un gel de separación (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% w / acylamide V, 0,31% w / v bis-acrilamida y 0,1% w / v SDS). Estos geles son polimerizados por la adición de 0,1% (v / v) y TEMED 0,05% (w / v) recién preparada una solución de sulfato de amonio y adicionado a las células de doble placa mini-proteica (Bio-Rad, Hercules, California). Las muestras se ejecutan a 150 V a temperatura ambiente (RT) hasta que el colorante azul de bromofenol alcanza el fondo del gel. Los estándares de peso de pre-teñido molecular son sometidos al proceso de electroforesis paralelamente con las muestras, a fin de permitir las estimaciones del peso molecular. Inmediatamente después de la electroforesis, el gel se tiñe con Coomassie G250 (Bio-Rad) azul brillante o es sometido a una electro-transferencia en la membrana de nitrocelulosa para el borrado Western.

Análisis de Western blot

La transferencia de electroforéticos de proteínas separadas desde el gel de SDS-PAGE para la membrana de nitrocelulosa se realiza mediante la transferencia del sistema Towbin. Después de la electroforesis, el gel se equilibra en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v / v de metanol, pH 8,3) durante 15 minutos. Las proteínas en el gel son electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN, Schleicher y Schuell BioScience, Inc., Keene, NH), utilizando el mini-aparato proteico transblot (Bio-Rad) a 30 V durante la noche a 4 ° C. La membrana de nitrocelulosa recién transferida que contiene las proteínas separadas se bloquea con 10 ml de solución salina tamponada de Tris (TBS) con 5% (w / v) de leche desnatada en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava con TBS el cual contiene 0,1% (v / v) de Tween 20 (TBST) y luego se incuba con 10 ml de anticuerpo anti- his de ratón (diluidos 5.000 veces, con TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar tres veces durante 5 minutos con TBST, la membrana se incuba con 10 ml de anti- mouse IgG de cabra (molécula completa)-AP diluidos 5.000 veces en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se desarrolla utilizando el sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La reacción de desarrollo es detenida por el lavado de la membrana con agua destilada. La membrana se seca y se analizan en busca de presentación.

Verificación de la lectura del marco pTrcHis recombinante construido mediante el análisis de secuencia directa

Dos clones transformantes para cada construcción que producen la medida correcta PCR se inoculan en 10 ml de caldo de LB con 100 mg / l de ampicilina y se incuban a 37 ° C durante 12 horas con agitación. Los cultivos nocturnos se centrifugan a 5.000 xg durante 10 minutos, y el plásmido que figuran en las células se extraen utilizando el QIAprep Miniprep Spin Kit como se describió anteriormente. El plásmido purificado se cuantificará mediante un fluorímetro. Ambos plásmidos purificados son sometidos a secuenciación directa automática de lapTrcHis utilizando el pTrcHis-F y pTrcHis primers R. Cada reacción de secuenciación se lleva a cabo en un volumen de 10 l µ compuesta de 200 ng de ADN plásmido, 2 pmol de cebador, y 4 µ l de la ABI PRISM ™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE

Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones cíclicas requieren de 2 minutos de desnaturalización a 96 ° C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C durante 10 segundos, y un primer combinado más un paso de extensión a 60 ° C durante 4 minutos. Los residuos finales de tinta se eliminan de los productos de secuenciación por precipitación con un 95% (v / v) de etanol que contienen acetato de sodio 85 mM (pH 5,2), 3 mm de EDTA (pH 8), y se secan al vacío. Los plásmidos se ordenan por duplicado utilizando cada primer. Los productos de secuencia se analizan utilizando un secuenciador de ADN ABI 373A (PE Applied Biosystems). La secuenciación de nucleótidos de la pTrcHis se realiza para verificar que la expresión está en el marco de lectura correcto para cada una de las construcciones.

Expresión y purificación del marcado-His recombinante

Una colonia sola del pTrcHis recombinante es construida en células E. coli JM109. Se inocula en 50 ml de caldo de LB en un matraz cónico de 250 ml con 100 mg / l de ampicilina y se incuba a 37 ° C durante 16 horas con agitación. En un erlenmeyer de 2 litros con 1 l de caldo de LB lleno con 100 mg / l de ampicilina se inocula con 10 ml del cultivo durante la noche y se incuba a 37 ° C, hasta que la densidad óptica de las células a 600 nm sea de 0,5 (aproximadamente 3-4 horas). El cultivo es inducido gracias a la adición de IPTG a una concentración final de 1 mm, y las células se devuelven a 37 ° C con agitación. Después de 5 horas de inducción, el cultivo se transfiere a botellas de 250 ml de centrifugación. Estas botellas se centrifugan a 5.000 xg durante 20 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se desecha, y cada pastilla se desnaturaliza con 8 ml Ni-NTA de lisis (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 8,0). Las células resuspendidas se almacenan a -20 ° C durante la noche.

La suspensión celular se retira del almacenamiento a -20 ° C para ser descongeladas en hielo. Entonces, el lisado de células se realiza sobre hielo 3 veces durante 30 segundos y 1 minuto de incubación en hielo entre las rondas de sonicación. La lisis de las células se retira por centrifugación a 20.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C, y el sobrenadante se transfiere a una columna de 15 ml que contiene una cuneta de 0,5 ml de volumen de resina

agarosa Ni-NTA (Qiagen). La proteína His6 recombinante puede ahora unirse a la resina durante 1 hora a 4 ° C extremo a extremo de la mezcla. La resina se lava con 30 ml de Ni-NTA de lavado de desnaturalización (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 6,3) antes de elución con 12 ml de Ni-NTA elución desnaturalización (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 4,5). Cuatro fracciones de 3 ml del eluido se recogen y se almacenan a 4 ° C. Treinta μ l de cada eluido se trata con 10 μ l de 4x tratamiento de la muestra y se hierve durante 5 minutos. Las muestras son sometidas a SDS-PAGE y se tiñen con Coomassie G250 (Bio-Rad) azul brillante. El gel teñido se equilibra en agua destilada durante 1 hora y se seca entre dos láminas de celulosa durante la noche a temperatura ambiente. La expresión de los clones recombinantes seleccionados E. coli se realiza en un medio de escala para generar proteínas recombinantes suficiente para la vacunación de ratones (véase más abajo).

Diálisis y liofilización de la proteína recombinante His-marcada.

Las proteínas se agrupan y se eluyen y se transfieren a un tubo de diálisis hidratado (Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) con un corte de peso (MWCO) de 3.500 Da. Una parte de 200 μ L del eluido combinados se toma y se cuantifica mediante un ensayo comercial de proteínas (Bio-Rad). Las proteínas son dializados frente a 2 l de agua destilada a 4 ° C con agitación. El buffer de diálisis se cambia 8 veces en intervalos de 12 horas. Las proteínas de diálisis se transfieren desde el tubo de diálisis en un tubo de centrifugación de 50 ml (40 ml de volumen máximo) y se colocan -80 ° C durante la noche. Los tubos se colocan en una congelación MAXI-secadora (HETO-Holten, Allerod, Dinamarca), se liofilizan y se secan. Las proteínas son entonces liofilizadas rehidratadas con PBS hasta una concentración calculada de 2 mg / ml y almacenadas a -20 ° C. Después de la diálisis y liofilización, antígeno recombinante estable, es producido con éxito.
Ocho de los genes de dieciocho años tienen clonado con éxito en la expresión de E. coli del sistema y de la proteína recombinante puede ser expresado establemente de estos clones.

Serología usando proteína recombinante purificada

Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga en un 7 cm IEF bien, a través de electroforesis un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y son electro-transferidas a las membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS descremada (5% w / v) y se ensamblan en un aparato multi-pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 μ l de suero de cerdo diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. El suero de cerdo se obtiene de cerdos de alto estatus de salud (n = 3), cerdos con SD (n = 5), clínicos, cerdos seroconverting infectados naturalmente (n = 5), y cerdos recuperados de una infección natural (n = 4). La membrana luego se quita del aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG porcina (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST antes de que se desarrolle el color utilizando sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente cuando el desarrollo se haya producido, se seca y se escanea para su presentación.

La reactividad del suero de cerdos obtenidos de animales en diferentes estados de salud se muestra en la tabla de abajo. Todas las proteínas son reconocidas por el 100% del grupo de suero lo que indica que los genes se expresan en vivo y que son capaces de inducir una respuesta inmune sistémica tras la exposición a la espiroqueta.

Tabla 4. La distribución de genes y la reactividad serológica de los ocho expresada con éxito vacunas B. hyodysenteriae.

La distribución de genes por PCR se analizó utilizando un panel de 23 cepas diferentes. La serología se realizó con 19 muestras de suero de cinco categorías diferentes de la enfermedad.

Gen	Distribución (%)	Serologia (%)
NAV-H40	100	100%
NAV-H41	83	100%
NAV-H44	100	100%
NAV-H62	96	100%
NAV-H64	91	100%
NAV-H66	96	100%
NAV-H69	91	100%
NAV-H73	87	100%

La vacunación de ratones utilizando proteínas recombinantes purificads His-marcadas.

Por cada una de las proteínas recombinantes purificadas su-puso proteínas, diez ratones son inmunizados por vía oral y sistémica, para determinar si la proteína recombinante sería inmunogénica. La proteína recombinante se emulsiona con el 30% (v / v) de agua en adyuvante oleoso y se inyecta por vía intramuscular en el músculo cuádriceps de diez ratones (Balb / CJ: 5 semanas de edad los varones). Todos los ratones reciben 100 mg de proteínas en un volumen total de 100 microlitros. Tres semanas después de la primera vacunación, todos los ratones, reciben segunda vacuna idéntica de la primera vacunación por vía intramuscular. Todos los ratones se matan a las dos semanas después de la segunda vacunación. Los sueros se obtienen a partir del corazón post-mortem y probados en el análisis de Western blot para detectar anticuerpos contra los extractos celulares de B. hyodysenteriae.

Análisis de Western blot

Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga en un 7 cm IEF bien, a través de electroforesis un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS descremada (5% w / v) y ensamblados en el aparato multi-pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 µ l de suero de ratón diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se quita del aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG de ratón (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST desarrollando el color antes de utilizar un sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente y cuando el desarrollo se ha producido, se seca y se escanea para su presentación.

El análisis de Western blot muestra un aumento significativo en la reactividad de anticuerpos en los ratones a los antígenos de la vacuna recombinante tras la vacunación. Todos los ratones reconocen proteínas recombinantes, que son similares en peso molecular a la Coomassie azul manchada de las

proteínas recombinantes purificadas. Estos experimentos proporcionan evidencia de que las proteínas recombinantes son inmunogénicas cuando se usan para vacunar a los ratones y que el protocolo de vacunación empleado puede inducir títulos de anticuerpos circulantes específicos frente al antígeno. Los resultados indican que las proteínas recombinantes pueden ser útiles en una vacuna eficaz para la especie animal de ser colonizada por B. hyodysenteriae.

La vacunación de los cerdos con proteínas His- marcadas recombinantes purificadas.

Por cada una de las proteínas His-marcadas recombinantes purificadas, se inyectan diez cerdos sero-negativos por vía intramuscular con 1 mg de antígeno en particular en el volumen 1 ml de vacuna. El antígeno se emulsiona con un volumen igual de agua en adyuvante oleoso. Los cerdos fueron vacunados en tres semanas de edad y de nuevo a las seis semanas de edad. Un segundo grupo de diez cerdos sero-negativo se utilizaron como controles negativos y se quedan sin vacunar. Todos los cerdos son ensayados con 100 ml de una cultivo activo B. hyodysenteriae (~ 109 células / ml) a las ocho semanas de edad. Los cerdos se observan para señales clínicas de disentería porcina, durante el experimento (hasta el puesto de seis semanas-de ensayo) y en el examen post-morten.

Kit de diagnóstico:

El suero se obtiene de cerdos en pocilga con infección conocida de B. hyodysenteriae, de cerdos de los que se sabe que no han sido infectados con B. hyodysenteriae y de cerdos en pocilga con un infección desconocida de B. hyodysenteriae. Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga bien en un 7 cm IEF, a través de electroforesis con un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y son -transferidas a membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS-leche descremada (5% w / v) y ensamblados en el aparato multi-pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 µ l de suero de cerdo diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana luego se quita el aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG porcina (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a

temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST antes de que se desarrolle el color utilizando sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente para el desarrollo cuando se ha producido, se seca y escaneado para su presentación. Uno puede determinar si los cerdos están infectados con B. hyodysenteriae comparando los resultados con el control positivo y negativo.

Aunque esta invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas, será obvio para aquellos con competencias normales en la materia que las variaciones en estos métodos y composiciones pueden ser utilizados y que está previsto que la invención puede ser practicada de otra manera que como específicamente aquí se describen. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas dentro del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Aunque esta invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas, será obvio para aquellos con competencias normales en la materia, que las variaciones en estos métodos y composiciones pueden ser utilizadas y practicadas de otra manera como específicamente aquí se describen. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas dentro del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado seleccionado de ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 59, 49, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, y 65.

2. Una molécula de ADN aislada para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% idéntica a un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 en toda la longitud de secuencia de la secuencia de nucleótidos de dicho polinucleótido.

3. Un polipéptido aislado codificado por un polinucleótido seleccionado del ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el polinucleótido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66.

4. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Un plásmido que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, o una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 2.

6. Un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho plásmido es un vector de expresión.

7. Una célula que contiene un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.

8. Una proteína aislada para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% idéntica al polipéptido de la reivindicación 3 en toda la longitud de la secuencia de la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido.

9. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una composición de vacuna para la prevención de la infección por *Brachyspira* que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8.

11. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a una infección por *Brachyspira* en un animal.

12. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una proteína de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para prevenir una enfermedad causada por una infección por *Brachyspira* en un animal.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la infección por *Brachyspira* es una infección con *Brachyspira hyodysenteriae*.

14. Un método de diagnóstico de la infección por *Brachyspira* que comprende:

(a) proporcionar una muestra obtenida de un animal sospechoso de estar infectado con *Brachyspira*;

(b) poner en contacto la muestra con uno o más polipéptidos codificados por un polinucleótido seleccionado de ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde el uno o más polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 , 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66,

(c) incubar la muestra y el polipéptido bajo condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno; y

(d) determinar si un complejo anticuerpo-antígeno con uno o más polipéptidos se forma, en donde la formación de un complejo anticuerpo-antígeno indica que el animal está infectado con *Brachyspira*.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la infección por *Brachyspira* es una infección con *Brachyspira hyodysenteriae.*

16. Un kit para el diagnóstico de una infección por *Brachyspira* en un animal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido seleccionado del ORFs de *Brachyspira hyodysenteriae* que muestran homología razonable (Valor E menor que e^{-15}) con proteínas conocidas de la superficie externa, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, en donde el porcentaje de identidad de aminoácidos no aumenta por encima de 58% mientras que el porcentaje de similitud u homología de aminoácidos se mantiene a menos de 71% en comparación con otras secuencias de aminoácidos conocidas obtenidas a partir de la base de datos SWISS-PROT, y en donde la secuencia de aminoácidos se seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 60, 50, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, y 66.

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG
Murdoch University
David Hampson
Tom La
Matthew Bellgard

<120> Novel Genes and Proteins of Brachyspira hyodysenteriae and Uses Thereof

<130> 50346

<160> 94

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 600
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 1
atgggtatta gtttagatcc tcaaatcaga tactatacag gaatagattt gctcaatcaa 60
gtaagattaa tagttaaata tggtatgaat caaactaaaa ctgcatcaga aacatataca 120
gcttcttctt ttggttttga tttcagatta tatttcggag ctatggttgg aaatgttact 180
cttaatcctt tcatcaaagt aacttatgat acttctttag gtgctaaagg taaatctact 240
ggaagttatg aagtattatc agacagtgtt gttattccta caacaactgc agctgattta 300
cttgatagag aaacttatac tttatctata cttcctactt tagctttaga ggcaagcagt 360
gatgtagttt ctctttattt agagcctgga ttaggttatt ctatttatga tgatggtaga 420
aaaggttcta aacttaatca ttctttagct tggtcagctt atgcagaact ttatattact 480
cctgttgaag atttagaatg gtattttgag atggatgtaa ataatgaggg aggagttcct 540
attagctttg catctactac aggtattact tggtacttgc cttctttcgg agcagcagag 600

<210> 2
<211> 200
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 2
Met Gly Ile Ser Leu Asp Pro Gln Ile Arg Tyr Tyr Thr Gly Ile Asp
1 5 10 15
Leu Leu Asn Gln Val Arg Leu Ile Val Lys Tyr Gly Met Asn Gln Thr
20 25 30
Lys Thr Ala Ser Glu Thr Tyr Thr Ala Ser Ser Phe Gly Phe Asp Phe
35 40 45
Arg Leu Tyr Phe Gly Ala Met Val Gly Asn Val Thr Leu Asn Pro Phe
50 55 60
Ile Lys Val Thr Tyr Asp Thr Ser Leu Gly Ala Lys Gly Lys Ser Thr
65 70 75 80
Gly Ser Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ser Val Val Ile Pro Thr Thr Thr
85 90 95
Ala Ala Asp Leu Leu Asp Arg Glu Thr Tyr Thr Leu Ser Ile Leu Pro
100 105 110
Thr Leu Ala Leu Glu Ala Ser Ser Asp Val Val Ser Leu Tyr Leu Glu
115 120 125
Pro Gly Leu Gly Tyr Ser Ile Tyr Asp Asp Gly Arg Lys Gly Ser Lys

```
    130                 135                 140
Leu Asn His Ser Leu Ala Trp Ser Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ile Thr
145                 150                 155                 160
Pro Val Glu Asp Leu Glu Trp Tyr Phe Glu Met Asp Val Asn Asn Glu
                165                 170                 175
Gly Gly Val Pro Ile Ser Phe Ala Ser Thr Thr Gly Ile Thr Trp Tyr
            180                 185                 190
Leu Pro Ser Phe Gly Ala Ala Glu
        195                 200
```

<210> 3
<211> 717
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 3
atgaaactac aaataggaat tttaactata gtaaatttaa tagcatttat accactatta 60
tatatgtttg atatatttgg tgttgttaat tattatactt taatgcgtaa taaaatagca 120
cctaatgtac cgggtttttt aacaagattc actcaaaaac ctagagtaga agatatgact 180
cttttggcta gagaagatct taataaaatg agagaatcat tcaatttaag agaaaaagat 240
ttgcaggctc aggaatcttt aatagcaagc agagcaatag aattgaacac tcaatctgaa 300
ttgatagaac aagacagaca aaatctttta aatgcttggt ctaattatca agctactatg 360
gatgaatctt ctcagtatca attagtatta actgaccttg ctaataaaat caatagtatg 420
cctcctcaaa gctctgtggc attacttaat cagttagctg ctaatggttc tgatgactta 480
atcatagatg tattattaga aatggactct atagctgctg ctgaaggaag aaacagtact 540
acttcttacc ttttaagctt aatggatccg aatgttgctg ctagaatatt agaaaaatat 600
gaagcaagat ctaatcctgg aaataataca gtaccttctt cacctaatga cttccctaat 660
tatatgcctg ataataatga cgctatgtta aatgaaggca taatggatat gggagca 717

<210> 4
<211> 239
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 4
```
Met Lys Leu Gln Ile Gly Ile Leu Thr Ile Val Asn Leu Ile Ala Phe
 1               5                  10                  15
Ile Pro Leu Leu Tyr Met Phe Asp Ile Phe Gly Val Val Asn Tyr Tyr
            20                  25                  30
Thr Leu Met Arg Asn Lys Ile Ala Pro Asn Val Pro Gly Phe Leu Thr
        35                  40                  45
Arg Phe Thr Gln Lys Pro Arg Val Glu Asp Met Thr Leu Leu Ala Arg
    50                  55                  60
Glu Asp Leu Asn Lys Met Arg Glu Ser Phe Asn Leu Arg Glu Lys Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gln Ala Gln Glu Ser Leu Ile Ala Ser Arg Ala Ile Glu Leu Asn
                85                  90                  95
Thr Gln Ser Glu Leu Ile Glu Gln Asp Arg Gln Asn Leu Leu Asn Ala
            100                 105                 110
Trp Ser Asn Tyr Gln Ala Thr Met Asp Glu Ser Ser Gln Tyr Gln Leu
        115                 120                 125
Val Leu Thr Asp Leu Ala Asn Lys Ile Asn Ser Met Pro Pro Gln Ser
    130                 135                 140
Ser Val Ala Leu Leu Asn Gln Leu Ala Ala Asn Gly Ser Asp Asp Leu
145                 150                 155                 160
Ile Ile Asp Val Leu Leu Glu Met Asp Ser Ile Ala Ala Ala Glu Gly
                165                 170                 175
Arg Asn Ser Thr Thr Ser Tyr Leu Leu Ser Leu Met Asp Pro Asn Val
            180                 185                 190
Ala Ala Arg Ile Leu Glu Lys Tyr Glu Ala Arg Ser Asn Pro Gly Asn
```

```
        195                 200                 205
Asn Thr Val Pro Ser Ser Pro Asn Asp Phe Pro Asn Tyr Met Pro Asp
    210                 215                 220
Asn Asn Asp Ala Met Leu Asn Glu Gly Ile Met Asp Met Gly Ala
225                 230                 235
```

<210> 5
<211> 4671
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 5

```
atgtcagatg ttgatgtatt gttaaaagat gaagttaaag ctctatcaag cagattatca 60
gattttgaag agagaataaa agatgatata gtaagagatt tagatgaata ttctatagaa 120
ttaaataatc ttactgataa tgtaggaaaa ttaaattcaa gaatagatga tgttaaatca 180
caaatagaag atagcattaa taaatcttct gaattggaaa ctcttatttc tagtgaaaaa 240
gaagaattag ataataaact atctactatt aaggatgagt tagtatctaa gtctgaaaat 300
gatgatacta tagagaaatt attcactcaa gaaaaagaaa aattaaatga acttttcaat 360
caaataaaag atgataataa agagttcaga tatagattag agaaacgtgt tgcttatttt 420
gaggacactt ggtcagacag cagcagattg aaaaatattt tctcaactga tataagagaa 480
caattggata atatcagaaa tgataatgag attaaatttg aaaattctat aaattatttg 540
aaagataaag tagaatctat agataatgat atatctaatt ggaaagaaaa cactgttgat 600
gaattagtta aacaattagg tgaagctaga gaaagcatat ctaattattt gaatgattca 660
gagataaaag gaaaagaatt agtagataat cttttatcta aaatagatga aaaagaaaat 720
agcatgtatc agactttaga agataaagag aagaacatgt atcaaacttt agatgataaa 780
gaaaagagta tgtatcaaac tctagatgat agagcaagaa acatgtataa atctttagat 840
gaaaaagaaa agtctatata tgaaatctta gataataaag tacaggaaat agaaagcaga 900
ttatctctta ttgattctaa attgaatgat gatataactt ctaacttaga aaatctatat 960
gatatgctaa atgaagcagt agctaaatat gatgaagaga taaaaaatat tgagcattat 1020
agattagatg agaataataa gattttagat gatattgata atgtaggaaa agaaataaga 1080
tcttcttatg aaaattattc taagcttata gaagaggttt ataataattc tcttaattca 1140
ttaaaagatt attctaattc tattaaagat gagatagaaa aatcaagaga agaaacagaa 1200
gaaagacact tgtctagtga gagagaatat attgatgagt atttgaaagg atattcagaa 1260
aaattagaat ctcaagtatc tgataagata aatatattga atgatgctaa aactgattta 1320
gataatatgt taaaatcttc ttttgatgat ttagaagcaa gatttaatga atctatgact 1380
aagtttgaag aatcttcaaa taacagagta ttcaaaactt tacaagatat agagaaaaaa 1440
gctgatgatg taatttatgg aaacaattat atctacaaga tagaagataa agtaaaagac 1500
ttctatggta aaatagatac taaactactt cattttgctg atagatatga tactttagag 1560
aaaaagatat atgatttaga gagcaatcaa aattatatat tcagactcga agataaaatt 1620
agagatttga atgaaaagct agatgataga ataacaaatg ttaatgaaag atatgataat 1680
ttaagaaaat cttttgatga taaatttgtt catatagaaa gtgctgtatt gaataatgag 1740
caagttcaga aattgagaga tgatttcatt attttcaaag atgatgtatt gaaagctaat 1800
agagataata taccagagct attcaataaa gaaaaagaaa aatttgaaga gttatttaat 1860
tcgttcgcta atgatataat atctaaatta gatacttcta atgctaatat agaagagttc 1920
aaaaatacta tgtatgatga aaagaattct atattagaaa atatggaatc atttagatat 1980
gagttagatg aattaaagaa caatgattct attgaagctt tagaagctga gaaagctaga 2040
ttagaagata ctttcaattc tttcagagaa gaatttgaaa gactttatga tttggaaagt 2100
gaagtttata atttgaaaag taatttagat ggtgttgatt ctaatttaag aagcgatgtt 2160
gataaattat ttgatgaagt ttctgagttt aaatatgctt tagaagaaaa aatagatatt 2220
ttagaagata atacagtttc tagagattta tttgatgatg acagagaaaa attatattct 2280
ttatatgatg aacttgaagc aggaaataaa gactttaaag atttaatgga taagagaata 2340
agttattttg aagatacttg gtctgatcct aataaggctt taaaacttta tgaaaatgct 2400
ttaacacctg aagtagataa tttgaaatct gaaatacttt ctaatgtaaa agatcaagta 2460
aatgaaatag aaaagaactt atctgtttgg aaagatgata atttgtctct tcttttagag 2520
caattaaaag aggctaaaga aaatatcgat aactttatag aaagttctaa agacaagaag 2580
aatggtatta ttgccaaaat gatatcttct ataaaagagg aaatattagg caaagaaagt 2640
gagataaata ctcgtcttga agaaaaactt tcttctgtta atgaaagaat tgctgattta 2700
gaaaatagat taacttctga tgttagcaga tttaataata tgatatctga agcagttgat 2760
aaatatgaag atgagcttaa gaatatagaa tcttatagat tagaagaaaa tgaatctata 2820
atgagaaatt tggaagatat tggaagaaat ataatttcaa attatgataa ttattctaaa 2880
```

```
atgctagatt ctgtttatga gaataataaa aatgctttag atgagtattc aaacagctta 2940
agaatagaaa tagaaaaagc tagagttgat actaataaag gttatataga tgaatatttg 3000
agtgaatatt cttctaaagt agaggctgat ataaaagaaa gactagaaga gcttgagaaa 3060
aataaatata atttagatgt tatgataaat gattcattta ataatttgaa tcaaagtatt 3120
aataatgcag tatctaaaat gatagaagat tctgattcta aattaagaga tgttatagat 3180
aatttagaag ttcagataaa tgatcttata gctaataaag aagaagaaat agttagcaga 3240
atatcagctt atgaaacaga tctaaaaaat gaacagtatt cttcacttga agatattaaa 3300
aatgagttat taggtcttta taatgagttt aaagagaatg ttaattatga taatttgaaa 3360
gatatatctg aaaaattaga tagtatagaa acttcattgt tagaagttaa tactcaatta 3420
gaaaataaag ctaaagatat ttctgataga atagatttag aaaaagaaga attatatgct 3480
tctgttaata aattgtcttc agaatttgaa gatttcaaat caaatataga tgacagattc 3540
aaaactcaag taagcgattt tgtatctaat aatgagcata tattatcact ctttggtgaa 3600
tatagtgaga aaatttcttc tgtaactaat atattggaag acatagaaaa tgttaaagta 3660
tctttaattg aagaaataaa taaagtaaaa gaagaaatag ataataaata ttcaagtctt 3720
actaaagatt ttgataaatc aatagatgat ataaaagatg ctgtattaga taagaataat 3780
atacttcaat attatataaa tgaaaaagaa ttgttatgga aagagattga tgctttgaaa 3840
gctacttttg cttcaatgaa agataatata ttgaatgcta atgaagcagt tgctaaatat 3900
gctccttcta tcattgatag tgagaaagtt cgtatacagt ctgttataga cgatgtattt 3960
gaaactttaa gtgctaaaat aaataataat gaagacagta tttctaattt agaatcttct 4020
ttctctgaat ataaatctct tatatcagat gctatagacg gatttaaaga tgaaatttct 4080
tctataagaa atagtaataa ctatgatgat ttaattgaag agagaaatag attggaagaa 4140
tcatttaatt ctcttaaaga tgatttctca aaaatagaag atttggaaaa agatttacat 4200
cttgttaaag ctaagttaaa aggtgatgac agcagcttga ttgatgaagt tatgagactt 4260
tctgatgagc ttgaaatctt gaaagataat gtatcaaata tgaataatac agataataat 4320
gtaaatgata ataatgatat tgatgctatt tatgaagatt tcaaacagtt aaatgaaagt 4380
ttagaatcat tcaaagaaac tgttattcct caattatcta cttttagtaa attggaagat 4440
aagatatcag aaaatagaga ggaaatctat aaatatatca atagtataat gtattcttta 4500
cctgaagctt atataagcag agaagagata tctaatttag aaaataaatt atatgatata 4560
tttaataact tcaatgacgg catagtatct ataaagaatg atttagtttt ctatatagag 4620
aaagacacta aagatttcaa agatagaata gaaaagaaga atagagttct t          4671
```

<210> 6
<211> 1557
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 6

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

```
Asn Trp Lys Glu Asn Thr Val Asp Glu Leu Val Lys Gln Leu Gly Glu
        195                 200                 205
Ala Arg Glu Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Asp Ser Glu Ile Lys Gly
    210                 215                 220
Lys Glu Leu Val Asp Asn Leu Leu Ser Lys Ile Asp Glu Lys Glu Asn
225                 230                 235                 240
Ser Met Tyr Gln Thr Leu Glu Asp Lys Glu Lys Asn Met Tyr Gln Thr
                245                 250                 255
Leu Asp Asp Lys Glu Lys Ser Met Tyr Gln Thr Leu Asp Asp Arg Ala
            260                 265                 270
Arg Asn Met Tyr Lys Ser Leu Asp Glu Lys Glu Lys Ser Ile Tyr Glu
        275                 280                 285
Ile Leu Asp Asn Lys Val Gln Glu Ile Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ile
    290                 295                 300
Asp Ser Lys Leu Asn Asp Asp Ile Thr Ser Asn Leu Glu Asn Leu Tyr
305                 310                 315                 320
Asp Met Leu Asn Glu Ala Val Ala Lys Tyr Asp Glu Glu Ile Lys Asn
                325                 330                 335
Ile Glu His Tyr Arg Leu Asp Glu Asn Asn Lys Ile Leu Asp Asp Ile
            340                 345                 350
Asp Asn Val Gly Lys Glu Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Asn Tyr Ser Lys
        355                 360                 365
Leu Ile Glu Glu Val Tyr Asn Asn Ser Leu Asn Ser Leu Lys Asp Tyr
    370                 375                 380
Ser Asn Ser Ile Lys Asp Glu Ile Glu Lys Ser Arg Glu Glu Thr Glu
385                 390                 395                 400
Glu Arg His Leu Ser Ser Glu Arg Glu Tyr Ile Asp Glu Tyr Leu Lys
                405                 410                 415
Gly Tyr Ser Glu Lys Leu Glu Ser Gln Val Ser Asp Lys Ile Asn Ile
            420                 425                 430
Leu Asn Asp Ala Lys Thr Asp Leu Asp Asn Met Leu Lys Ser Ser Phe
        435                 440                 445
Asp Asp Leu Glu Ala Arg Phe Asn Glu Ser Met Thr Lys Phe Glu Glu
    450                 455                 460
Ser Ser Asn Asn Arg Val Phe Lys Thr Leu Gln Asp Ile Glu Lys Lys
465                 470                 475                 480
Ala Asp Asp Val Ile Tyr Gly Asn Asn Tyr Ile Tyr Lys Ile Glu Asp
                485                 490                 495
Lys Val Lys Asp Phe Tyr Gly Lys Ile Asp Thr Lys Leu Leu His Phe
            500                 505                 510
Ala Asp Arg Tyr Asp Thr Leu Glu Lys Lys Ile Tyr Asp Leu Glu Ser
        515                 520                 525
Asn Gln Asn Tyr Ile Phe Arg Leu Glu Asp Lys Ile Arg Asp Leu Asn
    530                 535                 540
Glu Lys Leu Asp Asp Arg Ile Thr Asn Val Asn Glu Arg Tyr Asp Asn
545                 550                 555                 560
Leu Arg Lys Ser Phe Asp Asp Lys Phe Val His Ile Glu Ser Ala Val
                565                 570                 575
Leu Asn Asn Glu Gln Val Gln Lys Leu Arg Asp Asp Phe Ile Ile Phe
            580                 585                 590
Lys Asp Asp Val Leu Lys Ala Asn Arg Asp Asn Ile Pro Glu Leu Phe
        595                 600                 605
Asn Lys Glu Lys Glu Lys Phe Glu Glu Leu Phe Asn Ser Phe Ala Asn
    610                 615                 620
Asp Ile Ile Ser Lys Leu Asp Thr Ser Asn Ala Asn Ile Glu Glu Phe
625                 630                 635                 640
Lys Asn Thr Met Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Ile Leu Glu Asn Met Glu
                645                 650                 655
Ser Phe Arg Tyr Glu Leu Asp Glu Leu Lys Asn Asn Asp Ser Ile Glu
            660                 665                 670
Ala Leu Glu Ala Glu Lys Ala Arg Leu Glu Asp Thr Phe Asn Ser Phe
```

```
        675                 680                 685
Arg Glu Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Asp Leu Glu Ser Glu Val Tyr Asn
    690                 695                 700
Leu Lys Ser Asn Leu Asp Gly Val Asp Ser Asn Leu Arg Ser Asp Val
705                 710                 715                 720
Asp Lys Leu Phe Asp Glu Val Ser Glu Phe Lys Tyr Ala Leu Glu Glu
                725                 730                 735
Lys Ile Asp Ile Leu Glu Asp Asn Thr Val Ser Arg Asp Leu Phe Asp
            740                 745                 750
Asp Asp Arg Glu Lys Leu Tyr Ser Leu Tyr Asp Glu Leu Glu Ala Gly
        755                 760                 765
Asn Lys Asp Phe Lys Asp Leu Met Asp Lys Arg Ile Ser Tyr Phe Glu
    770                 775                 780
Asp Thr Trp Ser Asp Pro Asn Lys Ala Leu Lys Leu Tyr Glu Asn Ala
785                 790                 795                 800
Leu Thr Pro Glu Val Asp Asn Leu Lys Ser Glu Ile Leu Ser Asn Val
                805                 810                 815
Lys Asp Gln Val Asn Glu Ile Glu Lys Asn Leu Ser Val Trp Lys Asp
            820                 825                 830
Asp Asn Leu Ser Leu Leu Leu Glu Gln Leu Lys Glu Ala Lys Glu Asn
        835                 840                 845
Ile Asp Asn Phe Ile Glu Ser Ser Lys Asp Lys Lys Asn Gly Ile Ile
    850                 855                 860
Ala Lys Met Ile Ser Ser Ile Lys Glu Glu Ile Leu Gly Lys Glu Ser
865                 870                 875                 880
Glu Ile Asn Thr Arg Leu Glu Glu Lys Leu Ser Ser Val Asn Glu Arg
                885                 890                 895
Ile Ala Asp Leu Glu Asn Arg Leu Thr Ser Asp Val Ser Arg Phe Asn
            900                 905                 910
Asn Met Ile Ser Glu Ala Val Asp Lys Tyr Glu Asp Glu Leu Lys Asn
        915                 920                 925
Ile Glu Ser Tyr Arg Leu Glu Glu Asn Glu Ser Ile Met Arg Asn Leu
    930                 935                 940
Glu Asp Ile Gly Arg Asn Ile Ile Ser Asn Tyr Asp Asn Tyr Ser Lys
945                 950                 955                 960
Met Leu Asp Ser Val Tyr Glu Asn Asn Lys Asn Ala Leu Asp Glu Tyr
                965                 970                 975
Ser Asn Ser Leu Arg Ile Glu Ile Glu Lys Ala Arg Val Asp Thr Asn
            980                 985                 990
Lys Gly Tyr Ile Asp Glu Tyr Leu Ser Glu Tyr Ser Ser Lys Val Glu
        995                 1000                1005
Ala Asp Ile Lys Glu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys Asn Lys Tyr Asn
    1010                1015                1020
Leu Asp Val Met Ile Asn Asp Ser Phe Asn Asn Leu Asn Gln Ser Ile
1025                1030                1035                1040
Asn Asn Ala Val Ser Lys Met Ile Glu Asp Ser Asp Ser Lys Leu Arg
                1045                1050                1055
Asp Val Ile Asp Asn Leu Glu Val Gln Ile Asn Asp Leu Ile Ala Asn
            1060                1065                1070
Lys Glu Glu Glu Ile Val Ser Arg Ile Ser Ala Tyr Glu Thr Asp Leu
        1075                1080                1085
Lys Asn Glu Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Asp Ile Lys Asn Glu Leu Leu
    1090                1095                1100
Gly Leu Tyr Asn Glu Phe Lys Glu Asn Val Asn Tyr Asp Asn Leu Lys
1105                1110                1115                1120
Asp Ile Ser Glu Lys Leu Asp Ser Ile Glu Thr Ser Leu Leu Glu Val
                1125                1130                1135
Asn Thr Gln Leu Glu Asn Lys Ala Lys Asp Ile Ser Asp Arg Ile Asp
            1140                1145                1150
Leu Glu Lys Glu Glu Leu Tyr Ala Ser Val Asn Lys Leu Ser Ser Glu
        1155                1160                1165
```

```
Phe Glu Asp Phe Lys Ser Asn Ile Asp Asp Arg Phe Lys Thr Gln Val
    1170                1175                1180
Ser Asp Phe Val Ser Asn Asn Glu His Ile Leu Ser Leu Phe Gly Glu
1185                1190                1195                1200
Tyr Ser Glu Lys Ile Ser Ser Val Thr Asn Ile Leu Glu Asp Ile Glu
                1205                1210                1215
Asn Val Lys Val Ser Leu Ile Glu Glu Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu
            1220                1225                1230
Ile Asp Asn Lys Tyr Ser Ser Leu Thr Lys Asp Phe Asp Lys Ser Ile
        1235                1240                1245
Asp Asp Ile Lys Asp Ala Val Leu Asp Lys Asn Asn Ile Leu Gln Tyr
    1250                1255                1260
Tyr Ile Asn Glu Lys Glu Leu Leu Trp Lys Glu Ile Asp Ala Leu Lys
1265                1270                1275                1280
Ala Thr Phe Ala Ser Met Lys Asp Asn Ile Leu Asn Ala Asn Glu Ala
                1285                1290                1295
Val Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Ser Glu Lys Val Arg Ile
            1300                1305                1310
Gln Ser Val Ile Asp Asp Val Phe Glu Thr Leu Ser Ala Lys Ile Asn
        1315                1320                1325
Asn Asn Glu Asp Ser Ile Ser Asn Leu Glu Ser Ser Phe Ser Glu Tyr
    1330                1335                1340
Lys Ser Leu Ile Ser Asp Ala Ile Asp Gly Phe Lys Asp Glu Ile Ser
1345                1350                1355                1360
Ser Ile Arg Asn Ser Asn Asn Tyr Asp Asp Leu Ile Glu Glu Arg Asn
                1365                1370                1375
Arg Leu Glu Glu Ser Phe Asn Ser Leu Lys Asp Asp Phe Ser Lys Ile
            1380                1385                1390
Glu Asp Leu Glu Lys Asp Leu His Leu Val Lys Ala Lys Leu Lys Gly
        1395                1400                1405
Asp Asp Ser Ser Leu Ile Asp Glu Val Met Arg Leu Ser Asp Glu Leu
    1410                1415                1420
Glu Ile Leu Lys Asp Asn Val Ser Asn Met Asn Asn Thr Asp Asn Asn
1425                1430                1435                1440
Val Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asp Ala Ile Tyr Glu Asp Phe Lys Gln
                1445                1450                1455
Leu Asn Glu Ser Leu Glu Ser Phe Lys Glu Thr Val Ile Pro Gln Leu
            1460                1465                1470
Ser Thr Phe Ser Lys Leu Glu Asp Lys Ile Ser Glu Asn Arg Glu Glu
        1475                1480                1485
Ile Tyr Lys Tyr Ile Asn Ser Ile Met Tyr Ser Leu Pro Glu Ala Tyr
    1490                1495                1500
Ile Ser Arg Glu Glu Ile Ser Asn Leu Glu Asn Lys Leu Tyr Asp Ile
1505                1510                1515                1520
Phe Asn Asn Phe Asn Asp Gly Ile Val Ser Ile Lys Asn Asp Leu Val
                1525                1530                1535
Phe Tyr Ile Glu Lys Asp Thr Lys Asp Phe Lys Asp Arg Ile Glu Lys
            1540                1545                1550
Lys Asn Arg Val Leu
        1555
```

<210> 7
<211> 2256
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 7
atgaaaaata ctattttaaa aatttttaat aaaagagttt taatatttac actttgtttt 60
gaaatcattg ttattgtaat gacatccatg ttgggtgctc aggatatatc attacaaaag 120
aatattatat caaaaaataa aatcaattat ggtacggcat tagaacttca taatagagga 180

aaatatttag aggcttataa tcaatttaca aatatcatga atacagaaga tgatatgatc 240
attagagatt atactatata ttacggagct aaaagtgctt tgctaactaa tatgtataat 300
gaagcaatag atttatatgc cttactaatg aaagaatatc cgcgttcatc attatatcct 360
tatgcagagc aatataaggc tctttctgag ttttatagag atgattatcc tataagcaat 420
ttttttaatg gtaaatctca aaaatggatt aaagaatttg ttggaataag agctttaaga 480
gatactgatg ataccaataa ggctagaatg atagcttatg aacttttaaa cagattcgga 540
ttaagcgaag ctgctatata ttataataat aatttccctg aagatatttc atcttttcca 600
aataatttaa aatttaaaac agcaaccata ctttatgaag caggatatag aaaagcatct 660
ttaaagcatt ttcagtattt atatgataat aatgcttata aagcaagttc tacatattat 720
atggctagaa ttaaacagaa gtctggagac agaagagatg ctgcggcttt attcgatgag 780
tatttatcaa atcttaacaa taaatctcat agaagattag gtctttacta ttctgcagat 840
aattataata gattaaaaaa ttatgaaaaa tcaatagaac tttataatac ttttttgaaa 900
gaatatccta gagatgatta tgttcctaga atatataata gttttgttac tttgagtttg 960
aatagaaata atttagttca ggcaaaaact tatcttacta atgtaatgaa gagatttcct 1020
aaaagcagat atacagagct tgcattaaaa tcatatttaa gaaaggcatt caaattaaat 1080
aataaaacag aaacttattt tgctactaag gctttagaag caagatatcc tagtttcaga 1140
catgattttg cattatcttg gaatatgtgg actgctgaag agtttggaga tattgaaaaa 1200
agagatgaat atttaatgaa aacacttctt acaagtaaaa gccattattt tataaaaggt 1260
gctttgagtc ttgccaataa tgaaatgata gctaatgttc agcttagcaa tacttattat 1320
ttaaatgaag ctaaaagata ttatgctgat tctaatttta ctaaatctat gcagatgctt 1380
aataagatac aatttttaaa ttatattgct acaggtaaag aagataatat aacaagagag 1440
gctagggcat tggctaaaaa tattcttatg cataatagat ttgtaaaaga tttatacgct 1500
aatagaagcg aggatgattt atttaatgaa ttatcacttc agactagaag agaagttaat 1560
aaagcaataa tattatacta ttatggcgat tatgataatg catatactga attcgataaa 1620
atatttaaaa agacacaggt aacatatcct ttatttttatt ttgctgaaaa aatatttaaa 1680
gattcaggaa atacaaaaag gcttatacaa gtatcagcaa atataggaaa atattttgga 1740
tatccttaca gtgataatgt tgatttgctt cctgatgagt ttagaaagag agtttatcct 1800
agatattttg atgaatatgt tgtacctgaa gctaaatatt ataaaatага gcctgctttt 1860
gtatatgcta taatgcgtga agaaagttta tttgatccta aagctaaatc ttgggttgga 1920
gctatgggac ttatgcagtt aatgcctaca acagcagcag ctgaaaataa aaaggcaaga 1980
tatagatata atcctttaga tttaacagat cctaagcaga atattaattt aggagtttct 2040
catttaggct ggttattcag cagtcaaaag gctagcaatt atatattagt agcagcaagt 2100
tataatgcag gttcaggacg cggaagaaga tggaaagcag agtatggtac taataatatg 2160
tatcgtacag gaagattcat tgatattgaa gaaactgaat attatgtaga gagagttatt 2220
aaaagctatg aatattacag caagtattat aaggac 2256

<210> 8
<211> 752
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 8
Met Lys Asn Thr Ile Leu Lys Ile Phe Asn Lys Arg Val Leu Ile Phe
 1   5   10   15
Thr Leu Cys Phe Glu Ile Ile Val Ile Val Met Thr Ser Met Leu Gly
            20   25   30
Ala Gln Asp Ile Ser Leu Gln Lys Asn Ile Ile Ser Lys Asn Lys Ile
        35   40   45
Asn Tyr Gly Thr Ala Leu Glu Leu His Asn Arg Gly Lys Tyr Leu Glu
    50   55   60
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Asn Ile Met Asn Thr Glu Asp Asp Met Ile
65   70   75   80
Ile Arg Asp Tyr Thr Ile Tyr Tyr Gly Ala Lys Ser Ala Leu Leu Thr
                85   90   95
Asn Met Tyr Asn Glu Ala Ile Asp Leu Tyr Ala Leu Leu Met Lys Glu
            100   105   110
Tyr Pro Arg Ser Ser Leu Tyr Pro Tyr Ala Glu Gln Tyr Lys Ala Leu
        115   120   125
Ser Glu Phe Tyr Arg Asp Asp Tyr Pro Ile Ser Asn Phe Phe Asn Gly
    130   135   140
Lys Ser Gln Lys Trp Ile Lys Glu Phe Val Gly Ile Arg Ala Leu Arg

```
145                 150                 155                 160
Asp Thr Asp Asp Thr Asn Lys Ala Arg Met Ile Ala Tyr Glu Leu Leu
                165                 170                 175
Asn Arg Phe Gly Leu Ser Glu Ala Ala Ile Tyr Tyr Asn Asn Asn Phe
            180                 185                 190
Pro Glu Asp Ile Ser Ser Phe Pro Asn Asn Leu Lys Phe Lys Thr Ala
        195                 200                 205
Thr Ile Leu Tyr Glu Ala Gly Tyr Arg Lys Ala Ser Leu Lys His Phe
    210                 215                 220
Gln Tyr Leu Tyr Asp Asn Asn Ala Tyr Lys Ala Ser Ser Thr Tyr Tyr
225                 230                 235                 240
Met Ala Arg Ile Lys Gln Lys Ser Gly Asp Arg Arg Asp Ala Ala Ala
                245                 250                 255
Leu Phe Asp Glu Tyr Leu Ser Asn Leu Asn Asn Lys Ser His Arg Arg
            260                 265                 270
Leu Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asp Asn Tyr Asn Arg Leu Lys Asn Tyr
        275                 280                 285
Glu Lys Ser Ile Glu Leu Tyr Asn Thr Phe Leu Lys Glu Tyr Pro Arg
    290                 295                 300
Asp Asp Tyr Val Pro Arg Ile Tyr Asn Ser Phe Val Thr Leu Ser Leu
305                 310                 315                 320
Asn Arg Asn Asn Leu Val Gln Ala Lys Thr Tyr Leu Thr Asn Val Met
                325                 330                 335
Lys Arg Phe Pro Lys Ser Arg Tyr Thr Glu Leu Ala Leu Lys Ser Tyr
            340                 345                 350
Leu Arg Lys Ala Phe Lys Leu Asn Asn Lys Thr Glu Thr Tyr Phe Ala
        355                 360                 365
Thr Lys Ala Leu Glu Ala Arg Tyr Pro Ser Phe Arg His Asp Phe Ala
    370                 375                 380
Leu Ser Trp Asn Met Trp Thr Ala Glu Glu Phe Gly Asp Ile Glu Lys
385                 390                 395                 400
Arg Asp Glu Tyr Leu Met Lys Thr Leu Leu Thr Ser Lys Ser His Tyr
                405                 410                 415
Phe Ile Lys Gly Ala Leu Ser Leu Ala Asn Asn Glu Met Ile Ala Asn
            420                 425                 430
Val Gln Leu Ser Asn Thr Tyr Tyr Leu Asn Glu Ala Lys Arg Tyr Tyr
        435                 440                 445
Ala Asp Ser Asn Phe Thr Lys Ser Met Gln Met Leu Asn Lys Ile Gln
    450                 455                 460
Phe Leu Asn Tyr Ile Ala Thr Gly Lys Glu Asp Asn Ile Thr Arg Glu
465                 470                 475                 480
Ala Arg Ala Leu Ala Lys Asn Ile Leu Met His Asn Arg Phe Val Lys
                485                 490                 495
Asp Leu Tyr Ala Asn Arg Ser Glu Asp Asp Leu Phe Asn Glu Leu Ser
            500                 505                 510
Leu Gln Thr Arg Arg Glu Val Asn Lys Ala Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr
        515                 520                 525
Gly Asp Tyr Asp Asn Ala Tyr Thr Glu Phe Asp Lys Ile Phe Lys Lys
    530                 535                 540
Thr Gln Val Thr Tyr Pro Leu Phe Tyr Phe Ala Glu Lys Ile Phe Lys
545                 550                 555                 560
Asp Ser Gly Asn Thr Lys Arg Leu Ile Gln Val Ser Ala Asn Ile Gly
                565                 570                 575
Lys Tyr Phe Gly Tyr Pro Tyr Ser Asp Asn Val Asp Leu Leu Pro Asp
            580                 585                 590
Glu Phe Arg Lys Arg Val Tyr Pro Arg Tyr Phe Asp Glu Tyr Val Val
        595                 600                 605
Pro Glu Ala Lys Tyr Tyr Lys Ile Glu Pro Ala Phe Val Tyr Ala Ile
    610                 615                 620
Met Arg Glu Glu Ser Leu Phe Asp Pro Lys Ala Lys Ser Trp Val Gly
625                 630                 635                 640
```

```
Ala Met Gly Leu Met Gln Leu Met Pro Thr Thr Ala Ala Ala Glu Asn
                645                 650                 655
Lys Lys Ala Arg Tyr Arg Tyr Asn Pro Leu Asp Leu Thr Asp Pro Lys
            660                 665                 670
Gln Asn Ile Asn Leu Gly Val Ser His Leu Gly Trp Leu Phe Ser Ser
        675                 680                 685
Gln Lys Ala Ser Asn Tyr Ile Leu Val Ala Ala Ser Tyr Asn Ala Gly
    690                 695                 700
Ser Gly Arg Gly Arg Arg Trp Lys Ala Glu Tyr Gly Thr Asn Asn Met
705                 710                 715                 720
Tyr Arg Thr Gly Arg Phe Ile Asp Ile Glu Glu Thr Glu Tyr Tyr Val
                725                 730                 735
Glu Arg Val Ile Lys Ser Tyr Glu Tyr Tyr Ser Lys Tyr Tyr Lys Asp
            740                 745                 750
```

<210> 9
<211> 723
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 9
atggaaacta gattgcttta caactttgaa acattagacg aatggcaacc aatatcaaat 60
gccagccgct ttatgtttag aggtgataga acaaatgaaa atggtgttgt aatgaaatat 120
cctaatatga gattgttcgc tacaaaacca tatggtatgg gtaaccaaag ttataattca 180
actaattcat tatcagtaag tgtttctttt ttcagaaaat cttataactt ctttgattta 240
gttccaacag tacaaaaaat cataccaggt aaagctcaaa cttttgatgt ttgggtatgg 300
ggtggtaatt atgactatac tatggaaatg atatttgaag attatcgtgg ttatacttat 360
acattacctt taggatctat aagatatata ggttggagaa atatgagtac agcagtgcca 420
tctttcattc ctcaagaaga gccttatgtt cctagagcta aaggtttaag atttatgaat 480
ttccgtttct ggtcatcacc agaggaaaga gcagataact ttgtagtttt attggattac 540
ttccaaacag taacagatac attcagagaa gcttatgacg gatctgatat tgaaactaca 600
ttaggtcagg aagttggcgg aagatcttct gaacaatata cagaaggcgg agctaaagta 660
gtaggtgaag acggcggtaa cgctggagct gctactacag aacagccaca agaagcgcaa 720
caa 723

<210> 10
<211> 241
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 10
```
Met Glu Thr Arg Leu Leu Tyr Asn Phe Glu Thr Leu Asp Glu Trp Gln
 1               5                  10                  15
Pro Ile Ser Asn Ala Ser Arg Phe Met Phe Arg Gly Asp Arg Thr Asn
            20                  25                  30
Glu Asn Gly Val Val Met Lys Tyr Pro Asn Met Arg Leu Phe Ala Thr
        35                  40                  45
Lys Pro Tyr Gly Met Gly Asn Gln Ser Tyr Asn Ser Thr Asn Ser Leu
    50                  55                  60
Ser Val Ser Val Ser Phe Phe Arg Lys Ser Tyr Asn Phe Phe Asp Leu
65                  70                  75                  80
Val Pro Thr Val Gln Lys Ile Ile Pro Gly Lys Ala Gln Thr Phe Asp
                85                  90                  95
Val Trp Val Trp Gly Gly Asn Tyr Asp Tyr Thr Met Glu Met Ile Phe
            100                 105                 110
Glu Asp Tyr Arg Gly Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Leu Gly Ser Ile Arg
        115                 120                 125
Tyr Ile Gly Trp Arg Asn Met Ser Thr Ala Val Pro Ser Phe Ile Pro
    130                 135                 140
Gln Glu Glu Pro Tyr Val Pro Arg Ala Lys Gly Leu Arg Phe Met Asn
```

```
145                 150                 155                 160
Phe Arg Phe Trp Ser Ser Pro Glu Glu Arg Ala Asp Asn Phe Val Val
                165                 170                 175
Leu Leu Asp Tyr Phe Gln Thr Val Thr Asp Thr Phe Arg Glu Ala Tyr
            180                 185                 190
Asp Gly Ser Asp Ile Glu Thr Thr Leu Gly Gln Glu Val Gly Gly Arg
        195                 200                 205
Ser Ser Glu Gln Tyr Thr Glu Gly Gly Ala Lys Val Val Gly Glu Asp
    210                 215                 220
Gly Gly Asn Ala Gly Ala Ala Thr Thr Glu Gln Pro Gln Glu Ala Gln
225                 230                 235                 240
Gln
```

<210> 11
<211> 3129
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 11

```
atgattgaag aagaaagaag acaggttgct gaaatgtttg aaagcataca aaatgattct 60
atagatactg atttgagata tcttacagat tcattcagag atgatatcat aaaagtattt 120
gaagaatcta atgatgagtt cagaaaacgt gtagaagcta gaatagttca ttttgaagat 180
gcttatgctt cacctgatag aataaaagaa ttctataaag atgctatact ttctgaagtg 240
gacagcttga gaagtgatgc agaacagata cttatagatt taaatgataa ggtagaaaat 300
gcaaaagaac agatagaagt attagaaaat gatagagtaa aagacataat caataaaata 360
gatgaagcag aaaatgatat taattcttta ataaatacta taaaagctaa tattaaagaa 420
caagaaaatg agcttagaat gttgagccaa tctcagaaac atatatctca ggaagtagag 480
actgttcgca gagagagaga agctcttatg gatatggtta aaaactctga tataaatata 540
agaaacaagc ttgacagttt aacaagtgct gtatcagaag ctgcagagat tgcttcatct 600
aagatagctg aaaaagaagc agcattcagc agtaaagtta aagaagctga agaatatatt 660
aattcattgt ctgatagaat tacattagaa aataacagtg ctttagataa agctagagaa 720
gatattaata atttagttgc ttctttcaat gaatcagtta taaaagagac taatgatttg 780
gcacctcata taactaatac agttcagaat ttcattaata atgaaatgaa aaaatttgat 840
aaattctcag atgttagaag tgctatagaa ggcattgaga atgatattaa taacaagata 900
actgaagcat tcaataatat gaacaaagaa cttgaagata atattgttga atttagaaag 960
aaaatagata catatcagga agagtttatc agtgaattaa agatgtctgt aaatgtagag 1020
ggtgaaaaag ctgttgatga aattaagtct ttacataatg atgaagttgc taaattaaaa 1080
gagatgtatt taactactga aaaattctat acagatagac aagagaaaaa ccatgaagac 1140
ttctcaaaat tatttgaaga aacttataaa gactataatg aaaaaataga atcattatat 1200
gctcaattag atgatactaa acttcaaata agtacttctg ttgaagatgt tgttgctgat 1260
ttgaagcagg ctttaagcat aaaagatgag ttcttaactt cagttgaaaa taataaagaa 1320
aaacttgaag ctgttgaaga gcaaatgaat aatttacaga atgaatttgc tccttcagta 1380
gaaaaattga aagacataat agaagaaaag gcattagaat tacaagagaa aatcaatgaa 1440
tactctcaag atatagaact tcaaggagat aagttcaatt ctagattgga agagttatct 1500
aataatgcta aatctactat agaagataag gtaactgaat ttgattctat aatagaaaat 1560
atttctaata aaatggatac tttattagaa gaaaagaatt cagagttcga tgcattaaaa 1620
gcacattatg aaggactttc agaatcattg acagcattga aagatactat atcagaagca 1680
gttaatgaaa gaatagaaga agcaaatagc attatagagg aaaatgttca gactatagaa 1740
gaatcagcta atgaaaaata tgaaaaatac atagcaagac ttaattctaa tttagaacaa 1800
acattgtctc ttttaatgaa cgatgctaaa gaacatatac agaaagctaa agatgaaata 1860
attaaagctc atactgataa tttagatgag tatgatcaga gaattacaaa tatgaaagat 1920
attgtttcag ctttagaaga agatataact aaatattctt ctgagataga tgcaagactt 1980
gaaagtatta atttaagcta tgatgaaaaa acaaatgtta tacttaaaga ttttgaaaat 2040
agaactgatg atttgaaatt gaaattaaat gatgcatctg aatctattga caaaatgctt 2100
gatttaaaaa ctaatgatat ttctttagag tatgaggcta tgaaatcaaa aatagatgat 2160
atagctaaag atatagaaaa atacatgaat actgttaaag tatttgataa tgctaaagaa 2220
atggcagatt ctataagaga tgacgtttct aagttgaatg ctttggttga ggatactaaa 2280
gctacaacaa ttgaaatgaa taagactatg tccgaatttg atagcttaaa gaaaatgcat 2340
caggaaatat taggatatgc agaaagtctt aaaaaggaaa aagacagctt gaaagatact 2400
```

```
caggaaaaag taaatatgtt aatggaaatg tctggtgaaa ttcaagagag attcgttaat 2460
atagcagaaa ataatgctat gatagagcat gctgaggaag gaatacaggt tgttatagat 2520
atagcatctc aaatagaaaa taaactttca ttcattaagg ataaggaaga gtatgcagat 2580
gatatattac agcaaataag aaaagctgaa gtagaaaccg aaactatttt agaaagagta 2640
gatagtataa aagaagctat ggttgaagtt gaagatacta gaaagaactt tatggataag 2700
atttattctt tagaaagaga tatggctaaa atagataaga atgataaaaa agttcagttg 2760
tttatttcta aattagaaga gataaatgat ataatagatg ccatacagga tcaaagagaa 2820
aatcttgttc gtatgaagaa tcagtatgat gattatgata agaacatagt taagaatttg 2880
gaaagagctg aatattttgt aagatattta gagactttac tagataatgc tgataaatat 2940
atgtctgata aaggttctaa gacttctaaa aaaggaacag ctgctaaaat agatagtaag 3000
aaagaagagt ttataattag aatgtataaa gaaggttgga aaccagatga gatagttaaa 3060
aatagttcat attcaagaga tgaagttgaa agaactataa aagcatggaa agataagcaa 3120
tccagagga                                                        3129

<210> 12
<211> 1043
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 12
Met Ile Glu Glu Glu Arg Arg Gln Val Ala Glu Met Phe Glu Ser Ile
 1               5                  10                  15
Gln Asn Asp Ser Ile Asp Thr Asp Leu Arg Tyr Leu Thr Asp Ser Phe
            20                  25                  30
Arg Asp Asp Ile Ile Lys Val Phe Glu Glu Ser Asn Asp Glu Phe Arg
        35                  40                  45
Lys Arg Val Glu Ala Arg Ile Val His Phe Glu Asp Ala Tyr Ala Ser
    50                  55                  60
Pro Asp Arg Ile Lys Glu Phe Tyr Lys Asp Ala Ile Leu Ser Glu Val
65                  70                  75                  80
Asp Ser Leu Arg Ser Asp Ala Glu Gln Ile Leu Ile Asp Leu Asn Asp
                85                  90                  95
Lys Val Glu Asn Ala Lys Glu Gln Ile Glu Val Leu Glu Asn Asp Arg
            100                 105                 110
Val Lys Asp Ile Ile Asn Lys Ile Asp Glu Ala Glu Asn Asp Ile Asn
        115                 120                 125
Ser Leu Ile Asn Thr Ile Lys Ala Asn Ile Lys Glu Gln Glu Asn Glu
    130                 135                 140
Leu Arg Met Leu Ser Gln Ser Gln Lys His Ile Ser Gln Glu Val Glu
145                 150                 155                 160
Thr Val Arg Arg Glu Arg Glu Ala Leu Met Asp Met Val Lys Asn Ser
                165                 170                 175
Asp Ile Asn Ile Arg Asn Lys Leu Asp Ser Leu Thr Ser Ala Val Ser
            180                 185                 190
Glu Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ser Lys Ile Ala Glu Lys Glu Ala Ala
        195                 200                 205
Phe Ser Ser Lys Val Lys Glu Ala Glu Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Ser
    210                 215                 220
Asp Arg Ile Thr Leu Glu Asn Asn Ser Ala Leu Asp Lys Ala Arg Glu
225                 230                 235                 240
Asp Ile Asn Asn Leu Val Ala Ser Phe Asn Glu Ser Val Ile Lys Glu
                245                 250                 255
Thr Asn Asp Leu Ala Pro His Ile Thr Asn Thr Val Gln Asn Phe Ile
            260                 265                 270
Asn Asn Glu Met Lys Lys Phe Asp Lys Phe Ser Asp Val Arg Ser Ala
        275                 280                 285
Ile Glu Gly Ile Glu Asn Asp Ile Asn Asn Lys Ile Thr Glu Ala Phe
    290                 295                 300
Asn Asn Met Asn Lys Glu Leu Glu Asp Asn Ile Val Glu Phe Arg Lys
305                 310                 315                 320
Lys Ile Asp Thr Tyr Gln Glu Glu Phe Ile Ser Glu Leu Lys Met Ser
```

```
                   325                 330                 335
Val Asn Val Glu Gly Glu Lys Ala Val Asp Glu Ile Lys Ser Leu His
               340                 345                 350
Asn Asp Glu Val Ala Lys Leu Lys Glu Met Tyr Leu Thr Thr Glu Lys
        355                 360                 365
Phe Tyr Thr Asp Arg Gln Glu Lys Asn His Glu Asp Phe Ser Lys Leu
    370                 375                 380
Phe Glu Glu Thr Tyr Lys Asp Tyr Asn Glu Lys Ile Glu Ser Leu Tyr
385                 390                 395                 400
Ala Gln Leu Asp Asp Thr Lys Leu Gln Ile Ser Thr Ser Val Glu Asp
                405                 410                 415
Val Val Ala Asp Leu Lys Gln Ala Leu Ser Ile Lys Asp Glu Phe Leu
            420                 425                 430
Thr Ser Val Glu Asn Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Val Glu Glu Gln
        435                 440                 445
Met Asn Asn Leu Gln Asn Glu Phe Ala Pro Ser Val Glu Lys Leu Lys
    450                 455                 460
Asp Ile Ile Glu Glu Lys Ala Leu Glu Leu Gln Glu Lys Ile Asn Glu
465                 470                 475                 480
Tyr Ser Gln Asp Ile Glu Leu Gln Gly Asp Lys Phe Asn Ser Arg Leu
                485                 490                 495
Glu Glu Leu Ser Asn Asn Ala Lys Ser Thr Ile Glu Asp Lys Val Thr
            500                 505                 510
Glu Phe Asp Ser Ile Ile Glu Asn Ile Ser Asn Lys Met Asp Thr Leu
        515                 520                 525
Leu Glu Glu Lys Asn Ser Glu Phe Asp Ala Leu Lys Ala His Tyr Glu
    530                 535                 540
Gly Leu Ser Glu Ser Leu Thr Ala Leu Lys Asp Thr Ile Ser Glu Ala
545                 550                 555                 560
Val Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ala Asn Ser Ile Ile Glu Glu Asn Val
                565                 570                 575
Gln Thr Ile Glu Glu Ser Ala Asn Glu Lys Tyr Glu Lys Tyr Ile Ala
            580                 585                 590
Arg Leu Asn Ser Asn Leu Glu Gln Thr Leu Ser Leu Leu Met Asn Asp
        595                 600                 605
Ala Lys Glu His Ile Gln Lys Ala Lys Asp Glu Ile Ile Lys Ala His
    610                 615                 620
Thr Asp Asn Leu Asp Glu Tyr Asp Gln Arg Ile Thr Asn Met Lys Asp
625                 630                 635                 640
Ile Val Ser Ala Leu Glu Glu Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Ser Glu Ile
                645                 650                 655
Asp Ala Arg Leu Glu Ser Ile Asn Leu Ser Tyr Asp Glu Lys Thr Asn
            660                 665                 670
Val Ile Leu Lys Asp Phe Glu Asn Arg Thr Asp Asp Leu Lys Leu Lys
        675                 680                 685
Leu Asn Asp Ala Ser Glu Ser Ile Asp Lys Met Leu Asp Leu Lys Thr
    690                 695                 700
Asn Asp Ile Ser Leu Glu Tyr Glu Ala Met Lys Ser Lys Ile Asp Asp
705                 710                 715                 720
Ile Ala Lys Asp Ile Glu Lys Tyr Met Asn Thr Val Lys Val Phe Asp
                725                 730                 735
Asn Ala Lys Glu Met Ala Asp Ser Ile Arg Asp Asp Val Ser Lys Leu
            740                 745                 750
Asn Ala Leu Val Glu Asp Thr Lys Ala Thr Thr Ile Glu Met Asn Lys
        755                 760                 765
Thr Met Ser Glu Phe Asp Ser Leu Lys Lys Met His Gln Glu Ile Leu
    770                 775                 780
Gly Tyr Ala Glu Ser Leu Lys Lys Glu Lys Asp Ser Leu Lys Asp Thr
785                 790                 795                 800
Gln Glu Lys Val Asn Met Leu Met Glu Met Ser Gly Glu Ile Gln Glu
                805                 810                 815
```

```
Arg Phe Val Asn Ile Ala Glu Asn Asn Ala Met Ile Glu His Ala Glu
            820                 825                 830
Glu Gly Ile Gln Val Val Ile Asp Ile Ala Ser Gln Ile Glu Asn Lys
        835                 840                 845
Leu Ser Phe Ile Lys Asp Lys Glu Glu Tyr Ala Asp Asp Ile Leu Gln
    850                 855                 860
Gln Ile Arg Lys Ala Glu Val Glu Thr Glu Thr Ile Leu Glu Arg Val
865                 870                 875                 880
Asp Ser Ile Lys Glu Ala Met Val Glu Val Glu Asp Thr Arg Lys Asn
                885                 890                 895
Phe Met Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Glu Arg Asp Met Ala Lys Ile Asp
            900                 905                 910
Lys Asn Asp Lys Lys Val Gln Leu Phe Ile Ser Lys Leu Glu Glu Ile
        915                 920                 925
Asn Asp Ile Ile Asp Ala Ile Gln Asp Gln Arg Glu Asn Leu Val Arg
    930                 935                 940
Met Lys Asn Gln Tyr Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Ile Val Lys Asn Leu
945                 950                 955                 960
Glu Arg Ala Glu Tyr Phe Val Arg Tyr Leu Glu Thr Leu Leu Asp Asn
                965                 970                 975
Ala Asp Lys Tyr Met Ser Asp Lys Gly Ser Lys Thr Ser Lys Lys Gly
            980                 985                 990
Thr Ala Ala Lys Ile Asp Ser Lys Lys Glu Glu Phe Ile Ile Arg Met
        995                 1000                1005
Tyr Lys Glu Gly Trp Lys Pro Asp Glu Ile Val Lys Asn Ser Ser Tyr
    1010                1015                1020
Ser Arg Asp Glu Val Glu Arg Thr Ile Lys Ala Trp Lys Asp Lys Gln
1025                1030                1035                1040
Ser Arg Gly
```

<210> 13
<211> 729
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 13
atgataaaaa aaattttaac tttaatcttt gtattaattt tggcagcttc atgttctact 60
aatgataaac atgttgtagt attagctttt agtaaacagc ttcatgctgt actttataat 120
gataatagtc agtctacaaa aacagcatca aaaacatata tacaaaaaga tgatattaca 180
actgtagcag atcctataaa agaaaaaaaa gaatatacaa atactcaagc acaagtaagt 240
aaaaaagcag aagaaaaaaa agaagaactt acaaataacg atgctttaga agaagaaaaa 300
cctcaagtta taaagcaaac tgaggttata cagaaagatg ataatgagat tcttcttact 360
gcaaatataa tatcttttga ttttgattct tatgaattaa aaaatgaata taatgaaggg 420
atagatgaaa tttgcaaata tttaaataat aatcgagata ttaatctaat aatagaagga 480
catagcgaca gtatagggga ctcaaattat aatatatatt tatctgaaaa cagagcaaaa 540
gcgatatttg ataaattagt agataaagga atagataaag atagacttag atatatagga 600
tatggctcta ctcattcatc tgagtataat gataaagaca gaaaatgcca atttgttata 660
ataaataatt cagatgaaga gcaggaatac aaaaaagaaa acgaaactga tattatcaaa 720
ttaaaacaa 729

<210> 14
<211> 243
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 14
```
Met Ile Lys Lys Ile Leu Thr Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Ala Ala
 1               5                  10                  15
Ser Cys Ser Thr Asn Asp Lys His Val Val Val Leu Ala Phe Ser Lys
```

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

<210> 15
<211> 2475
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 15

```
atgaaattga ataataaagt tttatataaa ttcccaatat taatactgtt tataatatta 60
ttatcatgtt ctaatagtca ggaagaaata gagcaaaaag aaatagacag aggcggagca 120
ttaatagata aaataatata tgaagtaaga acagatatga caatagctat taaagatgtg 180
gcagacggca gagcagattt aatggcaagc ggaatagacg gaagtacata tttatcatta 240
ggcgaaagtg atttagagaa acttgatact tatgcagtac cttcaggttc atggtcatta 300
ttgtttaatc ccgtaccaaa taaagctcca tacacagtta caacaagaga cggaaaaact 360
cattttaatc ctctagctat aaaagaagta agatttgcta tgaacttctt aattgataga 420
aaaaagcttg ttgatgaaat tttaagaggg gcaggacagc cttcatttac acaagcaaca 480
ccggggcagc cgggtactta tagatataat cttatacctt caaaaatggg tatgacagaa 540
aacggtaatc aggaaaaagc tcttaatgat ataaataaag ctatggaaaa agctgctaat 600
ttaccagaga atagaggaaa attagtaaaa gaaaatggat ggtggaaata taatggagaa 660
gtagtaacta ttaaatttgt tataagagtt gatgatccta caggaagact tccagctggt 720
aatgcaatat ctgatttaat agaaaaaaca ggaataaaag ttgagaaatt attgtatgac 780
agaaataaat ctactcaagt tgtatacggt tcagacccaa aagattatga atggaatatt 840
ataacagagg cttggggagc aggtgctact cgtgcttggt gggatgttac attaagacag 900
atgtatgtaa gggaaggcaa ttatatgcct ggtgctaatg tatctgagtt ttggaattat 960
gataataaag aagcttcaag aataagcgac aagaattcaa atggctggtt tttgactgcc 1020
gatgaatatt ggaatggtaa tatgcgtttg caggagattg gacttgaaga tgctgtcaga 1080
atatatttaa attctcagac tcagtttttt gtagcgaata aagaaagatt caatagaaga 1140
atgctttacg gagtaggtga cggggttaat gattggtcta taagaagtgc tgatataaaa 1200
ccaaatagaa atggtgaaaa agtattaaga gttcttcagc attctgccca aggttcatta 1260
tttataagtc cttgggatcc tgtaggagta ggaggatttt ctgatgccta ttctgctata 1320
atgataggac cttgttctga tgcaggtgct acatttgaat cgccttccac tgctaagaca 1380
gaattcatac ttggtgaagc tgacaccaac agtttagaaa taggagtgag agcaggaaat 1440
```

aatggaatac ctgttggtac tgttaatgtt cctcaaaatg caataatgta taatccttat 1500
actcagaaat gggaagaggg tttaacagtt aaagttaatg ataaaggcga attagtttac 1560
acaaaatcgg ataatcttac tgcttatgtg aaatgtgatt ttaagcctag aagttttaaa 1620
tggcatcatg gcatagattc atctttggtt gatttgatgt atggaagcgt attcattgct 1680
aatataataa caaagactaa tgaaaacgat aaatattatg attctgctat ggctggaaga 1740
tatctttctg ctatggacgg agctgtagga agcattataa atgaggacgg aagttttact 1800
ttatacggaa attattattg gcctatggat atggacagac aaattgctgt tgctgctgta 1860
agtcctaaaa taggcaatcc taatagaaat actgttattc ctttcgagat aaatgaagct 1920
ataatgaaaa ttgttcttga aggctctaaa tctggaaatg tttatactat ttcacaggat 1980
cagtctttaa cttccataga tgttaaaaat cctacatgtg tatcagatat aaaagaaaaa 2040
ttaatagaaa tgcgtgattc tcagtatata cctgctggaa tagaagattt tataactaaa 2100
gaagatgcag taaagagata tcaagctgcc attgatttta tagataaata cggacatgct 2160
tatatatcaa atggtccttt ctttatttca agaatagatt caaaggcaaa ttatatagaa 2220
ttaacagctt ttaaagatta tagctatact gctgattatt ggatagatag attatctacc 2280
aaaatgagca gaatagaaga tattgatatg cctgctatag caaacagaaa caatgatatg 2340
aatatagata tttatgtttc ttcatataat tatcctgaca atgcattaga aatgccagat 2400
cctaatacaa cagtaaaagt attacttcaa ttacaaatgg agggcgaaaa agaatataat 2460
gcagttttta gaaaa 2475

<210> 16
<211> 825
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 16
Met Lys Leu Asn Asn Lys Val Leu Tyr Lys Phe Pro Ile Leu Ile Leu
 1   5   10   15
Phe Ile Ile Leu Leu Ser Cys Ser Asn Ser Gln Glu Glu Ile Glu Gln
            20   25   30
Lys Glu Ile Asp Arg Gly Gly Ala Leu Ile Asp Lys Ile Ile Tyr Glu
        35   40   45
Val Arg Thr Asp Met Thr Ile Ala Ile Lys Asp Val Ala Asp Gly Arg
    50   55   60
Ala Asp Leu Met Ala Ser Gly Ile Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Ser Leu
65   70   75   80
Gly Glu Ser Asp Leu Glu Lys Leu Asp Thr Tyr Ala Val Pro Ser Gly
                85   90   95
Ser Trp Ser Leu Leu Phe Asn Pro Val Pro Asn Lys Ala Pro Tyr Thr
            100   105   110
Val Thr Thr Arg Asp Gly Lys Thr His Phe Asn Pro Leu Ala Ile Lys
        115   120   125
Glu Val Arg Phe Ala Met Asn Phe Leu Ile Asp Arg Lys Lys Leu Val
    130   135   140
Asp Glu Ile Leu Arg Gly Ala Gly Gln Pro Ser Phe Thr Gln Ala Thr
145   150   155   160
Pro Gly Gln Pro Gly Thr Tyr Arg Tyr Asn Leu Ile Pro Ser Lys Met
                165   170   175
Gly Met Thr Glu Asn Gly Asn Gln Glu Lys Ala Leu Asn Asp Ile Asn
            180   185   190
Lys Ala Met Glu Lys Ala Ala Asn Leu Pro Glu Asn Arg Gly Lys Leu
        195   200   205
Val Lys Glu Asn Gly Trp Trp Lys Tyr Asn Gly Glu Val Val Thr Ile
    210   215   220
Lys Phe Val Ile Arg Val Asp Asp Pro Thr Gly Arg Leu Pro Ala Gly
225   230   235   240
Asn Ala Ile Ser Asp Leu Ile Glu Lys Thr Gly Ile Lys Val Glu Lys
                245   250   255
Leu Leu Tyr Asp Arg Asn Lys Ser Thr Gln Val Val Tyr Gly Ser Asp
            260   265   270
Pro Lys Asp Tyr Glu Trp Asn Ile Ile Thr Glu Ala Trp Gly Ala Gly
        275   280   285

```
Ala Thr Arg Ala Trp Trp Asp Val Thr Leu Arg Gln Met Tyr Val Arg
    290                 295                 300
Glu Gly Asn Tyr Met Pro Gly Ala Asn Val Ser Glu Phe Trp Asn Tyr
305                 310                 315                 320
Asp Asn Lys Glu Ala Ser Arg Ile Ser Asp Lys Asn Ser Asn Gly Trp
                325                 330                 335
Phe Leu Thr Ala Asp Glu Tyr Trp Asn Gly Asn Met Arg Leu Gln Glu
            340                 345                 350
Ile Gly Leu Glu Asp Ala Val Arg Ile Tyr Leu Asn Ser Gln Thr Gln
        355                 360                 365
Phe Phe Val Ala Asn Lys Glu Arg Phe Asn Arg Arg Met Leu Tyr Gly
    370                 375                 380
Val Gly Asp Gly Val Asn Asp Trp Ser Ile Arg Ser Ala Asp Ile Lys
385                 390                 395                 400
Pro Asn Arg Asn Gly Glu Lys Val Leu Arg Val Leu Gln His Ser Ala
                405                 410                 415
Gln Gly Ser Leu Phe Ile Ser Pro Trp Asp Pro Val Gly Val Gly Gly
            420                 425                 430
Phe Ser Asp Ala Tyr Ser Ala Ile Met Ile Gly Pro Cys Ser Asp Ala
        435                 440                 445
Gly Ala Thr Phe Glu Ser Pro Ser Thr Ala Lys Thr Glu Phe Ile Leu
    450                 455                 460
Gly Glu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Glu Ile Gly Val Arg Ala Gly Asn
465                 470                 475                 480
Asn Gly Ile Pro Val Gly Thr Val Asn Val Pro Gln Asn Ala Ile Met
                485                 490                 495
Tyr Asn Pro Tyr Thr Gln Lys Trp Glu Glu Gly Leu Thr Val Lys Val
            500                 505                 510
Asn Asp Lys Gly Glu Leu Val Tyr Thr Lys Ser Asp Asn Leu Thr Ala
        515                 520                 525
Tyr Val Lys Cys Asp Phe Lys Pro Arg Ser Phe Lys Trp His His Gly
    530                 535                 540
Ile Asp Ser Ser Leu Val Asp Leu Met Tyr Gly Ser Val Phe Ile Ala
545                 550                 555                 560
Asn Ile Ile Thr Lys Thr Asn Glu Asn Asp Lys Tyr Tyr Asp Ser Ala
                565                 570                 575
Met Ala Gly Arg Tyr Leu Ser Ala Met Asp Gly Ala Val Gly Ser Ile
            580                 585                 590
Ile Asn Glu Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Gly Asn Tyr Tyr Trp Pro
        595                 600                 605
Met Asp Met Asp Arg Gln Ile Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Lys Ile
    610                 615                 620
Gly Asn Pro Asn Arg Asn Thr Val Ile Pro Phe Glu Ile Asn Glu Ala
625                 630                 635                 640
Ile Met Lys Ile Val Leu Glu Gly Ser Lys Ser Gly Asn Val Tyr Thr
                645                 650                 655
Ile Ser Gln Asp Gln Ser Leu Thr Ser Ile Asp Val Lys Asn Pro Thr
            660                 665                 670
Cys Val Ser Asp Ile Lys Glu Lys Leu Ile Glu Met Arg Asp Ser Gln
        675                 680                 685
Tyr Ile Pro Ala Gly Ile Glu Asp Phe Ile Thr Lys Glu Asp Ala Val
    690                 695                 700
Lys Arg Tyr Gln Ala Ala Ile Asp Phe Ile Asp Lys Tyr Gly His Ala
705                 710                 715                 720
Tyr Ile Ser Asn Gly Pro Phe Phe Ile Ser Arg Ile Asp Ser Lys Ala
                725                 730                 735
Asn Tyr Ile Glu Leu Thr Ala Phe Lys Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Asp
            740                 745                 750
Tyr Trp Ile Asp Arg Leu Ser Thr Lys Met Ser Arg Ile Glu Asp Ile
        755                 760                 765
Asp Met Pro Ala Ile Ala Asn Arg Asn Asn Asp Met Asn Ile Asp Ile
```

```
    770                 775                 780
Tyr Val Ser Ser Tyr Asn Tyr Pro Asp Asn Ala Leu Glu Met Pro Asp
785                 790                 795                 800
Pro Asn Thr Thr Val Lys Val Leu Leu Gln Leu Gln Met Glu Gly Glu
                805                 810                 815
Lys Glu Tyr Asn Ala Val Phe Arg Lys
            820                 825
```

<210> 17
<211> 1014
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 17
gtggtctgca atatgaataa gaagaacatt atattattat tatctattat tatgatgctg 60
attgtatcat gtgaggaaaa aacagaaagt actgtgacaa tacaaaaata tccaataaga 120
gttggatata tgccagattt ttctggaagt tctgctgttg ctatagcaaa agaaaagggt 180
tattttgatg aagaaaattt agatgttaca ttggttgagt ttttagatgg tccttctgaa 240
gtagaggaga tgcttttaaa aaatttagaa tttgcttata taggacatgg tgcacatgct 300
ttagctattg aaggtaaagt taatgtatta tttcctaatg gtttaagcag atctgaacaa 360
attatagtaa gaaatgcttc tcaaatagaa tctattaaag atttaagagg taaaaaagtt 420
ggaacacaat taggaacttc ttcagaaatt ttactttatt tggctcttca gtcattaggt 480
attaaagcag aagaagtaga tattataaat atggatggaa atactatagt atcatctata 540
gctgatggta ctattgatgc tgcttcagtg caagctccat atacttttga aatattaaat 600
aatactgaaa acaatgtaaa gtctatagct acaactgttg attattctga tgtaggttct 660
tttcctagca gctggatagt tacaccttct tatcaaagta ataatacaga tatagttaat 720
agattttcaa gagctatact taaagctatg gactatagac aacttaatat gagtgaagct 780
gtgcaattgg ttgctaacat gaatagtaaa acagttgaag aagttgattt agaaagagaa 840
acaggagtat ggttttctgg taatgagata aagcaagcat atattaatgg tgatgctggt 900
aaatggtata aaacacagca gaatatattt atttatacta aaactattac aaataatatt 960
gatattaata attatgtgca gttaaaatac atggttgata atgtatttaa tgaa 1014

<210> 18
<211> 338
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 18
```
Val Val Cys Asn Met Asn Lys Lys Asn Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ile
 1               5                  10                  15
Ile Met Met Leu Ile Val Ser Cys Glu Glu Lys Thr Glu Ser Thr Val
            20                  25                  30
Thr Ile Gln Lys Tyr Pro Ile Arg Val Gly Tyr Met Pro Asp Phe Ser
        35                  40                  45
Gly Ser Ser Ala Val Ala Ile Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Phe Asp Glu
    50                  55                  60
Glu Asn Leu Asp Val Thr Leu Val Glu Phe Leu Asp Gly Pro Ser Glu
65                  70                  75                  80
Val Glu Glu Met Leu Leu Lys Asn Leu Glu Phe Ala Tyr Ile Gly His
                85                  90                  95
Gly Ala His Ala Leu Ala Ile Glu Gly Lys Val Asn Val Leu Phe Pro
            100                 105                 110
Asn Gly Leu Ser Arg Ser Glu Gln Ile Ile Val Arg Asn Ala Ser Gln
        115                 120                 125
Ile Glu Ser Ile Lys Asp Leu Arg Gly Lys Lys Val Gly Thr Gln Leu
    130                 135                 140
Gly Thr Ser Ser Glu Ile Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Gln Ser Leu Gly
145                 150                 155                 160
Ile Lys Ala Glu Glu Val Asp Ile Ile Asn Met Asp Gly Asn Thr Ile
                165                 170                 175
```

```
Val Ser Ser Ile Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ala Ala Ser Val Gln Ala
            180                 185                 190
Pro Tyr Thr Phe Glu Ile Leu Asn Asn Thr Glu Asn Asn Val Lys Ser
        195                 200                 205
Ile Ala Thr Thr Val Asp Tyr Ser Asp Val Gly Ser Phe Pro Ser Ser
    210                 215                 220
Trp Ile Val Thr Pro Ser Tyr Gln Ser Asn Asn Thr Asp Ile Val Asn
225                 230                 235                 240
Arg Phe Ser Arg Ala Ile Leu Lys Ala Met Asp Tyr Arg Gln Leu Asn
                245                 250                 255
Met Ser Glu Ala Val Gln Leu Val Ala Asn Met Asn Ser Lys Thr Val
            260                 265                 270
Glu Glu Val Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gly Val Trp Phe Ser Gly Asn
        275                 280                 285
Glu Ile Lys Gln Ala Tyr Ile Asn Gly Asp Ala Gly Lys Trp Tyr Lys
    290                 295                 300
Thr Gln Gln Asn Ile Phe Ile Tyr Thr Lys Thr Ile Thr Asn Asn Ile
305                 310                 315                 320
Asp Ile Asn Asn Tyr Val Gln Leu Lys Tyr Met Val Asp Asn Val Phe
                325                 330                 335
Asn Glu
```

<210> 19
<211> 981
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 19

```
atgaaaaaag ttttattagc tgtaacattt atttttatat ttagtttttt aatatcatgc 60
ggtaagaaaa caaatgaaaa tgcaggtaaa ataagagtag catatcaccc aaatgtagga 120
ggagcttctg caataattac aggtatacag cagaattatt ttaaagatga aggtttggat 180
atagaacttg ttaaatttac aagcggacct acagaaatag cagctatggt ttcaggagat 240
atacaaatag gttatatagg ttttggagca catacattgg cagcagaagg aaaagttcaa 300
ataatagcta ctgacggaat agctgttgta gaaggtatta gaacattaaa aacttcaggc 360
ataaactctg ttgaaaaatt aaaaggcaga agtttaataa ctcaattagg tacatcagga 420
gaaactatta tagatcaggt attagcagga acaggagtta ataaaacaga tataaatata 480
cttaatgctg aagtttcaag tgctgttgca tcattcttgg ctaataaagt tgatgctata 540
tctgtatggc ctccttatac tgttgaaata gataatagaa ttggtataga gaatttgtat 600
attataaaac ctcaggatgt aggagttgat tctactgcaa gctggatagt aactcctaac 660
tatttggaag ctaatactga tacagttata aaattcacaa gagcattata taaatcaatg 720
gattatagaa aatcacattt agatgaagct attacaaatg tatcaaatct tataggttta 780
gatatagcta cagtttcaca agagaaatac agttctgact ggatggattc tcaaacaatg 840
aaaagcagaa taaatgacgg aagcataagt aatatttata aaaaacaaat agactatttt 900
gtacagaata atagattaaa ttctgagcct gttcctgtag acaaatatgt aagaatcgac 960
attatagaaa aagcattaaa t                                          981
```

<210> 20
<211> 327
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 20

```
Met Lys Lys Val Leu Leu Ala Val Thr Phe Ile Phe Ile Phe Ser Phe
 1               5                  10                  15
Leu Ile Ser Cys Gly Lys Lys Thr Asn Glu Asn Ala Gly Lys Ile Arg
            20                  25                  30
Val Ala Tyr His Pro Asn Val Gly Gly Ala Ser Ala Ile Ile Thr Gly
        35                  40                  45
Ile Gln Gln Asn Tyr Phe Lys Asp Glu Gly Leu Asp Ile Glu Leu Val
```

```
    50                  55                  60
Lys Phe Thr Ser Gly Pro Thr Glu Ile Ala Ala Met Val Ser Gly Asp
65                  70                  75                  80
Ile Gln Ile Gly Tyr Ile Gly Phe Gly Ala His Thr Leu Ala Ala Glu
                85                  90                  95
Gly Lys Val Gln Ile Ile Ala Thr Asp Gly Ile Ala Val Val Glu Gly
            100                 105                 110
Ile Arg Thr Leu Lys Thr Ser Gly Ile Asn Ser Val Glu Lys Leu Lys
        115                 120                 125
Gly Arg Ser Leu Ile Thr Gln Leu Gly Thr Ser Gly Glu Thr Ile Ile
    130                 135                 140
Asp Gln Val Leu Ala Gly Thr Gly Val Asn Lys Thr Asp Ile Asn Ile
145                 150                 155                 160
Leu Asn Ala Glu Val Ser Ser Ala Val Ala Ser Phe Leu Ala Asn Lys
                165                 170                 175
Val Asp Ala Ile Ser Val Trp Pro Pro Tyr Thr Val Glu Ile Asp Asn
            180                 185                 190
Arg Ile Gly Ile Glu Asn Leu Tyr Ile Ile Lys Pro Gln Asp Val Gly
        195                 200                 205
Val Asp Ser Thr Ala Ser Trp Ile Val Thr Pro Asn Tyr Leu Glu Ala
    210                 215                 220
Asn Thr Asp Thr Val Ile Lys Phe Thr Arg Ala Leu Tyr Lys Ser Met
225                 230                 235                 240
Asp Tyr Arg Lys Ser His Leu Asp Glu Ala Ile Thr Asn Val Ser Asn
                245                 250                 255
Leu Ile Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Ser Gln Glu Lys Tyr Ser Ser
            260                 265                 270
Asp Trp Met Asp Ser Gln Thr Met Lys Ser Arg Ile Asn Asp Gly Ser
        275                 280                 285
Ile Ser Asn Ile Tyr Lys Lys Gln Ile Asp Tyr Phe Val Gln Asn Asn
    290                 295                 300
Arg Leu Asn Ser Glu Pro Val Pro Val Asp Lys Tyr Val Arg Ile Asp
305                 310                 315                 320
Ile Ile Glu Lys Ala Leu Asn
                325
```

<210> 21
<211> 1011
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 21

```
atgaaaaaaa ctatgtttat ttctatttta tcaatggcag tgatatcttt aataatatcc 60
tgttcaggag gaaataaagc tcctgctgct tcagcagatg gtacacttga taaaataaga 120
gttgcttatc ttgcagattt tgcaggaact tcttctgttg ctatagctca ggaaaaaggt 180
ttttttaaag aagaaaattt agatgttgaa ttagttaaat ttttaaatgg accttctgaa 240
gttgctgcta tgctctctgg agatatacaa tttgcatata taggacatgg tgcacattct 300
ctagctattc aaggtaaagt taatgtatta tttcctaatg gtttaggtaa atctgaagaa 360
attatagttg gtaaatgggc caatgttaat gatttagcag gattaaaagg aaaaactata 420
ggtactcagc ttggtacttc tggagatata gtattggata ttgcattaag aaaagttgga 480
ctttccaaag aagatgttaa tgttgtcaat atggatgtaa gcggaatagt atcttctatg 540
attggtaaaa aagtagatgc agtttcttta tgggctcctt atacttttga aataactaaa 600
cagcttggag atgaagctgt tgtaattgct tctattacaa attatttaga tgaagctgta 660
tttcctagca gttggatagt tactcctgat tatcaaaata ataatcaaga catagtgaat 720
agattctcta aagctatatt taaagctatg gattatagaa gtgagaatat ggatgaggct 780
gttgaaattg tagctaaatt aaatggaact cctgttgatt ctgttgcttt agaaaaagaa 840
actgctatat ggcttagttc ttctgatata aaaaattctt atactgatgg aacagctgct 900
aaatggtatc aagctcagca gaaaatattt ttaaactcag aagtagttac tgaagaagta 960
gatgttaata attatgtaca gataaattat ataattgata atgtgcttaa a          1011
```

<210> 22
<211> 337
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 22

```
Met Lys Lys Thr Met Phe Ile Ser Ile Leu Ser Met Ala Val Ile Ser
 1               5                  10                  15
Leu Ile Ile Ser Cys Ser Gly Gly Asn Lys Ala Pro Ala Ala Ser Ala
            20                  25                  30
Asp Gly Thr Leu Asp Lys Ile Arg Val Ala Tyr Leu Ala Asp Phe Ala
        35                  40                  45
Gly Thr Ser Ser Val Ala Ile Ala Gln Glu Lys Gly Phe Phe Lys Glu
    50                  55                  60
Glu Asn Leu Asp Val Glu Leu Val Lys Phe Leu Asn Gly Pro Ser Glu
65                  70                  75                  80
Val Ala Ala Met Leu Ser Gly Asp Ile Gln Phe Ala Tyr Ile Gly His
                85                  90                  95
Gly Ala His Ser Leu Ala Ile Gln Gly Lys Val Asn Val Leu Phe Pro
            100                 105                 110
Asn Gly Leu Gly Lys Ser Glu Glu Ile Ile Val Gly Lys Trp Ala Asn
        115                 120                 125
Val Asn Asp Leu Ala Gly Leu Lys Gly Lys Thr Ile Gly Thr Gln Leu
    130                 135                 140
Gly Thr Ser Gly Asp Ile Val Leu Asp Ile Ala Leu Arg Lys Val Gly
145                 150                 155                 160
Leu Ser Lys Glu Asp Val Asn Val Val Asn Met Asp Val Ser Gly Ile
                165                 170                 175
Val Ser Ser Met Ile Gly Lys Lys Val Asp Ala Val Ser Leu Trp Ala
            180                 185                 190
Pro Tyr Thr Phe Glu Ile Thr Lys Gln Leu Gly Asp Glu Ala Val Val
        195                 200                 205
Ile Ala Ser Ile Thr Asn Tyr Leu Asp Glu Ala Val Phe Pro Ser Ser
    210                 215                 220
Trp Ile Val Thr Pro Asp Tyr Gln Asn Asn Asn Gln Asp Ile Val Asn
225                 230                 235                 240
Arg Phe Ser Lys Ala Ile Phe Lys Ala Met Asp Tyr Arg Ser Glu Asn
                245                 250                 255
Met Asp Glu Ala Val Glu Ile Val Ala Lys Leu Asn Gly Thr Pro Val
            260                 265                 270
Asp Ser Val Ala Leu Glu Lys Glu Thr Ala Ile Trp Leu Ser Ser Ser
        275                 280                 285
Asp Ile Lys Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Thr Ala Ala Lys Trp Tyr Gln
    290                 295                 300
Ala Gln Gln Lys Ile Phe Leu Asn Ser Glu Val Val Thr Glu Glu Val
305                 310                 315                 320
Asp Val Asn Asn Tyr Val Gln Ile Asn Tyr Ile Ile Asp Asn Val Leu
                325                 330                 335
Lys
```

<210> 23
<211> 615
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 23

```
atggcaagaa gaaaaaagaa aaaatcatct cctttattaa tactatttat tttattaata 60
gcagcaggat actattatta taataatata tataataaaa aagaaatatc aaaaacagaa 120
aagcccaaaa aagaaactat tacaagatac aatagagatg attggggaga ttgggctgat 180
```

gaagataatg acggacttaa tacaaggcat gaggtattag caagagcatc attagtaaaa 240
cctgtaatat ctaataacag agtaatatca ggaaaatggt atgataagtt tacaggaaaa 300
tattttacta atgcaaaaga tttagatata gatcatttag tgcctttaaa aaatgcacat 360
atcagcggtg ctagtaattg gagtaaagaa aagaaaaatg aatactacaa ttatatgaaa 420
aacgaaaatc atttggtagc tgtatcaaaa ggtgcaaatc gttctaaagg tgataaatcc 480
ccggtagaat ggctccctcc taatgaagaa tatcaatgcg aatatgtaag agaatggtat 540
aaaatcaaaa ccgattgggg gcttacaata gaagaaggtt ttgatgaagt ttcaaacaga 600
gtatgcaaag gaaaa 615

<210> 24
<211> 205
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 24

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

<210> 25
<211> 264
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 25
atgaataaaa ttttttatga taaagcttgg gaagattatc tttattttca aaagaatgac 60
aaaaaaatat tacagaaaat taatgatttt ataaaagata tagaaagaaa tggcttatta 120
attggtatag gaaaaccaga gagattaaaa ggtgagttaa acggattgta ttcaaggcta 180
ataaatcaag aacatagatt agtatattat attgaagata ataatttatt tatagttgga 240
tgtaaaacac attataaaaa taat 264

<210> 26
<211> 88
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 26

```
Met Asn Lys Ile Phe Tyr Asp Lys Ala Trp Glu Asp Tyr Leu Tyr Phe
 1               5                  10                  15
Gln Lys Asn Asp Lys Lys Ile Leu Gln Lys Ile Asn Asp Phe Ile Lys
            20                  25                  30
Asp Ile Glu Arg Asn Gly Leu Leu Ile Gly Ile Gly Lys Pro Glu Arg
        35                  40                  45
Leu Lys Gly Glu Leu Asn Gly Leu Tyr Ser Arg Leu Ile Asn Gln Glu
    50                  55                  60
His Arg Leu Val Tyr Tyr Ile Glu Asp Asn Asn Leu Phe Ile Val Gly
65                  70                  75                  80
Cys Lys Thr His Tyr Lys Asn Asn
                85
```

<210> 27
<211> 1503
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 27
gtgttaagga aattgatata tattattttt ttgcattcaa ttctttttaa ttttttttatt 60
tttgcacaaa ctaatgaatc agctatatta aattacactc aatatatgga aagaataaaa 120
tccataatac cagaaatgaa attaactgca tctcaagaaa gcaatgccta taataattta 180
acaaaagcaa aaagctccgg agacgttaaa tttgatttgc aggctggtgc tataggaatg 240
caaagccatt ttgatgaata caatttttta gcaacatcag attttaatta taatgggttt 300
agaataggtg caggattcag cggacttgta ccatactctg gaactagatg gtctgtagaa 360
attaaacatg acagtttttt cggcgacttt aatacaggag atatttcatt accggttgat 420
acgcctctag gtagaataaa tggaaaactt ccaaatttaa gtactaatga ttttaaatac 480
tattatccaa gcataaaaat tcaaatagct cagcctattt taagggattt ttttggtaaa 540
ttggatagat accctataaa agatgcagaa tatcagctta ccatagcaaa attaaaaaga 600
ataatagacg acaacagcgt attaacatct tatcagaaaa tttattatca atggataatg 660
gcaagaaaat taatagattt atatgatgat atgataagag aagcaagaag ttttgaaaat 720
caagtataca gaagatatac aagcggagtt atagataatg actcatatca gaatgcaaaa 780
agacaaacat taaaatatat agaagcaaga gataaatctg aattaatgct taaaaaaata 840
atgagaaata ttcaattctt tatacctgaa gaaaatatac agccaaatga agatgattgg 900
aatcagacat tagaaacctc tataaatgct aaaatagata tagtaccatt tttagaaagt 960
gctcagggac aaatggctta tcaattaaaa ttaagaagcg aatatgctat ttcagtaatg 1020
aaaaataatg ctctgcctga tttatctata gtaggaagcg tatcattatc aagtttagat 1080
gacagcggat attttaaatc tttttctacc atgactaatg ttgattattt tgtagggctt 1140
atgttttcct accccatagg cggacgtgat gctaaagcta aaatggaaga tgcttatgct 1200
gctttgaatg ctgttacggc tgattttgat agggtgaaca gagattttga cgttcagata 1260
ggtacttatt atgatgagtt tgaggcatac aaaaaaatgc tagaaaataa aaaattggaa 1320
gttaatgcta tagtatcaag aataaatacg caaaatgcta aattcagaca aggaagactc 1380
cctatagatg aaataataaa tgcaaggctt gatttagcac aggcaagagc agaacttctt 1440
aatttgcagt atttaataat aagcactgtt atggattata attctctggt gctgcttaac 1500
aat 1503

<210> 28
<211> 501
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 28
```
Val Leu Arg Lys Leu Ile Tyr Ile Ile Phe Leu His Ser Ile Leu Phe
 1               5                  10                  15
Asn Phe Phe Ile Phe Ala Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ile Leu Asn Tyr
            20                  25                  30
Thr Gln Tyr Met Glu Arg Ile Lys Ser Ile Ile Pro Glu Met Lys Leu
        35                  40                  45
Thr Ala Ser Gln Glu Ser Asn Ala Tyr Asn Asn Leu Thr Lys Ala Lys
    50                  55                  60
```

```
Ser Ser Gly Asp Val Lys Phe Asp Leu Gln Ala Gly Ala Ile Gly Met
65                  70                  75                  80
Gln Ser His Phe Asp Glu Tyr Asn Phe Leu Ala Thr Ser Asp Phe Asn
                85                  90                  95
Tyr Asn Gly Phe Arg Ile Gly Ala Gly Phe Ser Gly Leu Val Pro Tyr
            100                 105                 110
Ser Gly Thr Arg Trp Ser Val Glu Ile Lys His Asp Ser Phe Phe Gly
        115                 120                 125
Asp Phe Asn Thr Gly Asp Ile Ser Leu Pro Val Asp Thr Pro Leu Gly
    130                 135                 140
Arg Ile Asn Gly Lys Leu Pro Asn Leu Ser Thr Asn Asp Phe Lys Tyr
145                 150                 155                 160
Tyr Tyr Pro Ser Ile Lys Ile Gln Ile Ala Gln Pro Ile Leu Arg Asp
                165                 170                 175
Phe Phe Gly Lys Leu Asp Arg Tyr Pro Ile Lys Asp Ala Glu Tyr Gln
            180                 185                 190
Leu Thr Ile Ala Lys Leu Lys Arg Ile Ile Asp Asp Asn Ser Val Leu
        195                 200                 205
Thr Ser Tyr Gln Lys Ile Tyr Tyr Gln Trp Ile Met Ala Arg Lys Leu
    210                 215                 220
Ile Asp Leu Tyr Asp Asp Met Ile Arg Glu Ala Arg Ser Phe Glu Asn
225                 230                 235                 240
Gln Val Tyr Arg Arg Tyr Thr Ser Gly Val Ile Asp Asn Asp Ser Tyr
                245                 250                 255
Gln Asn Ala Lys Arg Gln Thr Leu Lys Tyr Ile Glu Ala Arg Asp Lys
            260                 265                 270
Ser Glu Leu Met Leu Lys Lys Ile Met Arg Asn Ile Gln Phe Phe Ile
        275                 280                 285
Pro Glu Glu Asn Ile Gln Pro Asn Glu Asp Asp Trp Asn Gln Thr Leu
    290                 295                 300
Glu Thr Ser Ile Asn Ala Lys Ile Asp Ile Val Pro Phe Leu Glu Ser
305                 310                 315                 320
Ala Gln Gly Gln Met Ala Tyr Gln Leu Lys Leu Arg Ser Glu Tyr Ala
                325                 330                 335
Ile Ser Val Met Lys Asn Asn Ala Leu Pro Asp Leu Ser Ile Val Gly
            340                 345                 350
Ser Val Ser Leu Ser Ser Leu Asp Asp Ser Gly Tyr Phe Lys Ser Phe
        355                 360                 365
Ser Thr Met Thr Asn Val Asp Tyr Phe Val Gly Leu Met Phe Ser Tyr
    370                 375                 380
Pro Ile Gly Gly Arg Asp Ala Lys Ala Lys Met Glu Asp Ala Tyr Ala
385                 390                 395                 400
Ala Leu Asn Ala Val Thr Ala Asp Phe Asp Arg Val Asn Arg Asp Phe
                405                 410                 415
Asp Val Gln Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Glu Phe Glu Ala Tyr Lys Lys
            420                 425                 430
Met Leu Glu Asn Lys Lys Leu Glu Val Asn Ala Ile Val Ser Arg Ile
        435                 440                 445
Asn Thr Gln Asn Ala Lys Phe Arg Gln Gly Arg Leu Pro Ile Asp Glu
    450                 455                 460
Ile Ile Asn Ala Arg Leu Asp Leu Ala Gln Ala Arg Ala Glu Leu Leu
465                 470                 475                 480
Asn Leu Gln Tyr Leu Ile Ile Ser Thr Val Met Asp Tyr Asn Ser Leu
                485                 490                 495
Val Leu Leu Asn Asn
            500
```

<210> 29
<211> 1386
<212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 29
atggaaatac tactagttta tttatttgaa atatttataa ttattattct tattatgctc 60
tctgctttat tttctggaag tgagactgca tatacatcta ttgatgatgt tactttaatg 120
cgtttggtca gagagaaaaa aatcaaagaa gaagataaaa aatattggga aaagtcaagt 180
tctatgatac ctaccctact tgttggtaat aacatagtta atatatcagc aagttccatt 240
ataactgtat ttgctgtaag gcttgctgac attctgccgc atgtatcaac aaatgtgatg 300
gttacaatat caactgccac aataacaata cttattatta tattcggaga aatacttcct 360
aaagtcttaa tgagagttaa tgctgaaaaa atgatgcctt atcttctata ttttatgaag 420
ttttgtcatt ttatattcaa gcctataact ttcttaatgg ataaagtaac tacttttata 480
atgaattatt ttgtacctaa aagattaaga gatgctgaaa aaagaagtgc tttatcaagt 540
atggaagata tcactactat aatacatttg gggcataaag aaggaataat aaaagaatat 600
acacatgaaa tgcttacagg agtaatagat tttagaaata aaactgtaga agagataatg 660
acgccccgtg ttgatatggt atgtattgaa gctgaaacag atgtaaatga aataataaaa 720
cttactgtag aatcaggact ttcaagattt cctgtttatg aggaaacagt agatcatata 780
ataggtatat tccatacaag agctttattt aaagaatatg ttaaaggcgg cggaaagatg 840
aacaaagtaa aaaagaaagc aatagattat ataatgcttc cctactttgt acctgaaact 900
aaaactataa gcagcttatt tagtgatatg caaaagaaaa aacttcagat ggtaattact 960
attgatgaat acggcggaac tgccggactt gttactatgg aagatataat agaagagata 1020
atgggtgata tagaagatga aagtgataaa aaagaagctg atgtaataag atttaaggga 1080
aaaagaatta taataaatgg aaatgcttct atagaagatg tcaacaaaac tttaaaatta 1140
gaattagagc atgaagaata tcaaactata gcaggatatg ttattgatat gcttgatcat 1200
atacctgaaa caaatgagag attcatatta aaaggatata gggtaagaat aatgaaagtt 1260
gaagacagaa gaatagttga aatggaattt actcctataa aatttgcaag aacaaatgaa 1320
agtgataata ttgatatata agagacatct gattcagaaa aaaatgattt agaaatttta 1380
aatgaa 1386

<210> 30
<211> 462
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 30
Met Glu Ile Leu Leu Val Tyr Leu Phe Glu Ile Phe Ile Ile Ile Ile
 1   5   10   15
Leu Ile Met Leu Ser Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Thr Ala Tyr Thr
            20   25   30
Ser Ile Asp Asp Val Thr Leu Met Arg Leu Val Arg Glu Lys Lys Ile
        35   40   45
Lys Glu Glu Asp Lys Lys Tyr Trp Glu Lys Ser Ser Ser Met Ile Pro
    50   55   60
Thr Leu Leu Val Gly Asn Asn Ile Val Asn Ile Ser Ala Ser Ser Ile
65   70   75   80
Ile Thr Val Phe Ala Val Arg Leu Ala Asp Ile Leu Pro His Val Ser
                85   90   95
Thr Asn Val Met Val Thr Ile Ser Thr Ala Thr Ile Thr Ile Leu Ile
            100   105   110
Ile Ile Phe Gly Glu Ile Leu Pro Lys Val Leu Met Arg Val Asn Ala
        115   120   125
Glu Lys Met Met Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Met Lys Phe Cys His Phe
    130   135   140
Ile Phe Lys Pro Ile Thr Phe Leu Met Asp Lys Val Thr Thr Phe Ile
145   150   155   160
Met Asn Tyr Phe Val Pro Lys Arg Leu Arg Asp Ala Glu Lys Arg Ser
                165   170   175
Ala Leu Ser Ser Met Glu Asp Ile Thr Thr Ile Ile His Leu Gly His
            180   185   190
Lys Glu Gly Ile Ile Lys Glu Tyr Thr His Glu Met Leu Thr Gly Val
        195   200   205
Ile Asp Phe Arg Asn Lys Thr Val Glu Glu Ile Met Thr Pro Arg Val

```
    210                 215                 220
Asp Met Val Cys Ile Glu Ala Glu Thr Asp Val Asn Glu Ile Ile Lys
225                 230                 235                 240
Leu Thr Val Glu Ser Gly Leu Ser Arg Phe Pro Val Tyr Glu Glu Thr
                245                 250                 255
Val Asp His Ile Ile Gly Ile Phe His Thr Arg Ala Leu Phe Lys Glu
            260                 265                 270
Tyr Val Lys Gly Gly Gly Lys Met Asn Lys Val Lys Lys Lys Ala Ile
        275                 280                 285
Asp Tyr Ile Met Leu Pro Tyr Phe Val Pro Glu Thr Lys Thr Ile Ser
    290                 295                 300
Ser Leu Phe Ser Asp Met Gln Lys Lys Lys Leu Gln Met Val Ile Thr
305                 310                 315                 320
Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Thr Ala Gly Leu Val Thr Met Glu Asp Ile
                325                 330                 335
Ile Glu Glu Ile Met Gly Asp Ile Glu Asp Glu Ser Asp Lys Lys Glu
            340                 345                 350
Ala Asp Val Ile Arg Phe Lys Gly Lys Arg Ile Ile Ile Asn Gly Asn
        355                 360                 365
Ala Ser Ile Glu Asp Val Asn Lys Thr Leu Lys Leu Glu Leu Glu His
    370                 375                 380
Glu Glu Tyr Gln Thr Ile Ala Gly Tyr Val Ile Asp Met Leu Asp His
385                 390                 395                 400
Ile Pro Glu Thr Asn Glu Arg Phe Ile Leu Lys Gly Tyr Arg Val Arg
                405                 410                 415
Ile Met Lys Val Glu Asp Arg Arg Ile Val Glu Met Glu Phe Thr Pro
            420                 425                 430
Ile Lys Phe Ala Arg Thr Asn Glu Ser Asp Asn Ile Asp Ile Gln Glu
        435                 440                 445
Thr Ser Asp Ser Glu Lys Asn Asp Leu Glu Ile Leu Asn Glu
    450                 455                 460
```

<210> 31
<211> 1080
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 31

```
atgaaagagt taggaatatc catttacccc tttcactcaa aaatggaaga taataaatat 60
tatatagatt tggcttctaa atacggattc gcaagatgtt ttatgtgtct gctttcagtt 120
gatagatcta aagatgaaat aataaatgaa ttttcaacta taataaatta tgctaaagaa 180
aaaggtataa aaactacttt agatatatct ccggctgtat tcaaacattt ggatatagat 240
tataaaaatc ttgacttttt tcataaattg ggagcttggg gcgtaagatt agatttaggg 300
tttacaggta atgaagaaag tttaatgaca tataacgaat atgatttgaa aatagaatta 360
aatatgagca atgatacaga ttatcttgat aatataatga aatattatcc taatactgat 420
aatttgatag gctgttataa tttctatcct catgcatata caggactaga cagaacactt 480
tttaaaagca gcatgaaacg ttttaaaaaa tattctataa gttcatctgc atttgttaat 540
gccaaagaag ctacttttgg accttggcct gtaagcgatg gtatttgcac attggaagaa 600
catagagata tgcctataga tgcacaggct atggaattat ttgctcttgg tgttgactgt 660
gttttcattg ctaactgtta tgcagatgaa aatactttta aaacattata taatatggat 720
aaaagattaa taacttttaa agtagaatta gttgattcta ttcctaaaga agaaaagagt 780
atagtattag atatgcttca tcaaaacaga ttagatgctt ctgctgatgt tataagatct 840
tcagatacaa gagcaaaata taagggacat aatttcaaaa tatttaatgc tgtttccgat 900
ataaaaagag gagatatatt aatagattca tcagaatacg gcagttatac cggagaaatg 960
cagatagctt tgaaagattt aaaaaatacc ggaagaacta atgtagtagg cagaattaaa 1020
gatgaatatt tatttctgct agattatata agtccggcta aaagatttat tataagagaa 1080
```

<210> 32
<211> 360

<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 32

```
Met Lys Glu Leu Gly Ile Ser Ile Tyr Pro Phe His Ser Lys Met Glu
 1               5                  10                  15
Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Asp Leu Ala Ser Lys Tyr Gly Phe Ala Arg
            20                  25                  30
Cys Phe Met Cys Leu Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asp Glu Ile Ile
        35                  40                  45
Asn Glu Phe Ser Thr Ile Ile Asn Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Ile Lys
    50                  55                  60
Thr Thr Leu Asp Ile Ser Pro Ala Val Phe Lys His Leu Asp Ile Asp
65                  70                  75                  80
Tyr Lys Asn Leu Asp Phe Phe His Lys Leu Gly Ala Trp Gly Val Arg
                85                  90                  95
Leu Asp Leu Gly Phe Thr Gly Asn Glu Glu Ser Leu Met Thr Tyr Asn
            100                 105                 110
Glu Tyr Asp Leu Lys Ile Glu Leu Asn Met Ser Asn Asp Thr Asp Tyr
        115                 120                 125
Leu Asp Asn Ile Met Lys Tyr Tyr Pro Asn Thr Asp Asn Leu Ile Gly
    130                 135                 140
Cys Tyr Asn Phe Tyr Pro His Ala Tyr Thr Gly Leu Asp Arg Thr Leu
145                 150                 155                 160
Phe Lys Ser Ser Met Lys Arg Phe Lys Lys Tyr Ser Ile Ser Ser Ser
                165                 170                 175
Ala Phe Val Asn Ala Lys Glu Ala Thr Phe Gly Pro Trp Pro Val Ser
            180                 185                 190
Asp Gly Ile Cys Thr Leu Glu Glu His Arg Asp Met Pro Ile Asp Ala
        195                 200                 205
Gln Ala Met Glu Leu Phe Ala Leu Gly Val Asp Cys Val Phe Ile Ala
    210                 215                 220
Asn Cys Tyr Ala Asp Glu Asn Thr Phe Lys Thr Leu Tyr Asn Met Asp
225                 230                 235                 240
Lys Arg Leu Ile Thr Phe Lys Val Glu Leu Val Asp Ser Ile Pro Lys
                245                 250                 255
Glu Glu Lys Ser Ile Val Leu Asp Met Leu His Gln Asn Arg Leu Asp
            260                 265                 270
Ala Ser Ala Asp Val Ile Arg Ser Ser Asp Thr Arg Ala Lys Tyr Lys
        275                 280                 285
Gly His Asn Phe Lys Ile Phe Asn Ala Val Ser Asp Ile Lys Arg Gly
    290                 295                 300
Asp Ile Leu Ile Asp Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Tyr Thr Gly Glu Met
305                 310                 315                 320
Gln Ile Ala Leu Lys Asp Leu Lys Asn Thr Gly Arg Thr Asn Val Val
                325                 330                 335
Gly Arg Ile Lys Asp Glu Tyr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Ile Ser Pro
            340                 345                 350
Ala Lys Arg Phe Ile Ile Arg Glu
        355                 360
```

<210> 33
<211> 2574
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 33

```
ttgatgaaga aatacaagcc tgaaacaaaa caagaattag aacaattggt atatactgac 60
ggaataaaac tctatgatgt agatacgagt cttataacag atatgagcga gctttttcat 120
aacagcacca gaaaagattt tgaaggcata gaagattggg acgtttctaa tgttgaggat 180
```

```
atgtcctata tgtttgccca tatgagttat gatagttatg aaaaccgttc taaagctaag 240
tttaatcata atcttaataa ttggaatgta tctaaagtta agcatatgag ttttatgttt 300
tattattgtc aggattttaa tcagccttta gataaatggg acgtttctaa tgttcaggat 360
acatttagaa tgtttgataa ttgtaaaaaa ttcaatcagc ctttaaatag ctggaatgta 420
tctaatgtaa caaatatgag cggtatgttt caggtagcag aaagtttcaa tcagccttta 480
gacaagtggg acgtttcaaa agttacaact atgagggcta tgtttaatta tgctaaagct 540
tttaatcaag atataagtaa ttggaatgtt agtaaagttg aagatatggg ttatatgttt 600
agtatatgcg ttaattttaa tcagcctatt aatgattggg acgtatctaa agtaaaaact 660
atggaaggta tgtttagaag tgcttttaaa ttcaatcagc ctttagataa atggaatact 720
tcaaaggttg aaaatatgaa tcagatgttt aatgaggctt taaaatttaa tcagccttta 780
aatagctgga atgtttccaa tgtaaaaact atggaatgta tgtttcgcgg tactgaagct 840
tttaatcagc ctttggataa atgggataca aaaaaattaa aaacaatgtt tggaatgttt 900
gactttgctg aaggttataa tagttttgac tcattagcaa actgggattt aaataaagta 960
tcagaaatga gtaatttatg ttttaaaagg tatgaagaac ttcctttaag aattaaagca 1020
tatcttcagg cattttatgg ttcttataaa gattatttaa ctgttacaaa agataatgtc 1080
aaagaaatat atgatcttat ttcaaaagac acaaataaaa aagttttgtc atttaaaaag 1140
agattagaaa gcgagtttag tgaggaactt tcatctgtta cagataatta taatttcaaa 1200
tctatagaag aagcagaaaa gtatgttgaa aataattata ataaaaaaga tgataagaaa 1260
gttagcttta taaatgatta taaagttttg ataaaagata aatcaagaga agttgaaaat 1320
aaagttttaa aatatatata tttggaatat ttgctcctta aaagagatgt taaaaaatta 1380
gtgcagattg ataatatagt taatttactt gataaagaat catttataaa atttattaaa 1440
aatgtttatg atgaaactaa taaagaaaca gccgctttta tttatggcat atacggagga 1500
gatgaggcag taaaaaatat atataaaaaa gaaaaagaca ctaaactttc actattaata 1560
attaaattaa atatagaaag taaatatgca cttagaatat tatatgaaat atattcaaat 1620
acaaaaaaat ctgaagttag ttatgaagct gataaattga ttgatgaagt aatggaaaaa 1680
atggatatta gttataatga attccaatta agatattcat ctgatttagg atttaattct 1740
aaaggtgaaa aagaattgaa taaagattat aaattaattt tgaatagcga ttattctttg 1800
agtctttttg atataaaaaa taataaggaa cttaaaaaag cccctcaaaa tcttaatgaa 1860
gatttaaaag aagaaataac aaaattaaga aaagaaattc cttattttat gaaaaacact 1920
gcttctcttt tagctgtttt attagcaagc ggtgaaaaat acagttatga tttattcaaa 1980
gagattttta ttgataatgc cattatgaat agatttgctt catctttaat atggaatcta 2040
tatgacaaag attctaattt tataacaact ttcagatatt caggcgatgg aagttattca 2100
aactgtgaag atgaagaagt aaaaattaat gataatagtt ttgtaagttt agcaagccct 2160
gtggaaatgg atgatgaaac tatagataaa tggagaaaac agcttgaaga ttatgagata 2220
gcacagccaa taagtcaatt aactgtcata aaattagata aagataattt gaaaagcgaa 2280
gtagaaaaaa tagataattt agaaatagct tatggtactt tcaaggcttt cggtgaaaga 2340
tatgaaatgt atagcgagta tataggttat gatgttgtta aaagttattc attagaatca 2400
aagaacggag acactttcac tatagacgct gatgttaatt caaaaactga ttttcatgac 2460
agagtaaaaa ttaatattaa ttttgataat gaaaatggtg aggaagtaag taaaagattt 2520
atttatactt tgttagtatt aatgatttgg gattttagat taacagattt attt       2574
```

<210> 34
<211> 858
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 34

```
Leu Met Lys Lys Tyr Lys Pro Glu Thr Lys Gln Glu Leu Glu Gln Leu
 1               5                  10                  15
Val Tyr Thr Asp Gly Ile Lys Leu Tyr Asp Val Asp Thr Ser Leu Ile
            20                  25                  30
Thr Asp Met Ser Glu Leu Phe His Asn Ser Thr Arg Lys Asp Phe Glu
        35                  40                  45
Gly Ile Glu Asp Trp Asp Val Ser Asn Val Glu Asp Met Ser Tyr Met
    50                  55                  60
Phe Ala His Met Ser Tyr Asp Ser Tyr Glu Asn Arg Ser Lys Ala Lys
65                  70                  75                  80
Phe Asn His Asn Leu Asn Asn Trp Asn Val Ser Lys Val Lys His Met
                85                  90                  95
Ser Phe Met Phe Tyr Tyr Cys Gln Asp Phe Asn Gln Pro Leu Asp Lys
            100                 105                 110
```

```
Trp Asp Val Ser Asn Val Gln Asp Thr Phe Arg Met Phe Asp Asn Cys
        115                 120                 125
Lys Lys Phe Asn Gln Pro Leu Asn Ser Trp Asn Val Ser Asn Val Thr
    130                 135                 140
Asn Met Ser Gly Met Phe Gln Val Ala Glu Ser Phe Asn Gln Pro Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Trp Asp Val Ser Lys Val Thr Thr Met Arg Ala Met Phe Asn
                165                 170                 175
Tyr Ala Lys Ala Phe Asn Gln Asp Ile Ser Asn Trp Asn Val Ser Lys
            180                 185                 190
Val Glu Asp Met Gly Tyr Met Phe Ser Ile Cys Val Asn Phe Asn Gln
        195                 200                 205
Pro Ile Asn Asp Trp Asp Val Ser Lys Val Lys Thr Met Glu Gly Met
    210                 215                 220
Phe Arg Ser Ala Phe Lys Phe Asn Gln Pro Leu Asp Lys Trp Asn Thr
225                 230                 235                 240
Ser Lys Val Glu Asn Met Asn Gln Met Phe Asn Glu Ala Leu Lys Phe
                245                 250                 255
Asn Gln Pro Leu Asn Ser Trp Asn Val Ser Asn Val Lys Thr Met Glu
            260                 265                 270
Cys Met Phe Arg Gly Thr Glu Ala Phe Asn Gln Pro Leu Asp Lys Trp
        275                 280                 285
Asp Thr Lys Lys Leu Lys Thr Met Phe Gly Met Phe Asp Phe Ala Glu
    290                 295                 300
Gly Tyr Asn Ser Phe Asp Ser Leu Ala Asn Trp Asp Leu Asn Lys Val
305                 310                 315                 320
Ser Glu Met Ser Asn Leu Cys Phe Lys Arg Tyr Glu Glu Leu Pro Leu
                325                 330                 335
Arg Ile Lys Ala Tyr Leu Gln Ala Phe Tyr Gly Ser Tyr Lys Asp Tyr
            340                 345                 350
Leu Thr Val Thr Lys Asp Asn Val Lys Glu Ile Tyr Asp Leu Ile Ser
        355                 360                 365
Lys Asp Thr Asn Lys Lys Val Leu Ser Phe Lys Lys Arg Leu Glu Ser
    370                 375                 380
Glu Phe Ser Glu Glu Leu Ser Ser Val Thr Asp Asn Tyr Asn Phe Lys
385                 390                 395                 400
Ser Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Val Glu Asn Asn Tyr Asn Lys Lys
                405                 410                 415
Asp Asp Lys Lys Val Ser Phe Ile Asn Asp Tyr Lys Val Leu Ile Lys
            420                 425                 430
Asp Lys Ser Arg Glu Val Glu Asn Lys Val Leu Lys Tyr Ile Tyr Leu
        435                 440                 445
Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Arg Asp Val Lys Lys Leu Val Gln Ile Asp
    450                 455                 460
Asn Ile Val Asn Leu Leu Asp Lys Glu Ser Phe Ile Lys Phe Ile Lys
465                 470                 475                 480
Asn Val Tyr Asp Glu Thr Asn Lys Glu Thr Ala Ala Phe Ile Tyr Gly
                485                 490                 495
Ile Tyr Gly Gly Asp Glu Ala Val Lys Asn Ile Tyr Lys Lys Glu Lys
            500                 505                 510
Asp Thr Lys Leu Ser Leu Leu Ile Ile Lys Leu Asn Ile Glu Ser Lys
        515                 520                 525
Tyr Ala Leu Arg Ile Leu Tyr Glu Ile Tyr Ser Asn Thr Lys Lys Ser
    530                 535                 540
Glu Val Ser Tyr Glu Ala Asp Lys Leu Ile Asp Glu Val Met Glu Lys
545                 550                 555                 560
Met Asp Ile Ser Tyr Asn Glu Phe Gln Leu Arg Tyr Ser Ser Asp Leu
                565                 570                 575
Gly Phe Asn Ser Lys Gly Glu Lys Glu Leu Asn Lys Asp Tyr Lys Leu
            580                 585                 590
Ile Leu Asn Ser Asp Tyr Ser Leu Ser Leu Phe Asp Ile Lys Asn Asn
```

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

<210> 35
<211> 2100
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 35
atgagaataa aacttctagc ggttatagta ttatttttaa tgactatatc gctttcatac 60
actttcgaca aaactccgta ttatgtaaac acagaaactt atgactcata cagagagtta 120
ttgagagggg tgcattatta taatcaggaa agatatgatg catccatagc tagttttaga 180
aactctctta atacaaatcc tactgataag ttcataagat attggtatag taagtcttta 240
tacaaagccg gatatatgtc cttagctatt aatgaatggc ttaatattac gagaatgggt 300
tatgaagatc ctataatact ttctaaaatt aataaatatg attctgcaaa tgttaatgaa 360
gagagagaaa atattttgag taatttttatt tatttgaaag cattctctac aaatcttaat 420
tttagaaaaa atattaatca gcctatacaa ataaaagtaa tgtctgatgg aagtttatat 480
gttttggatt atagtgattc ttcattaaag aaatttgata ttaatggaaa tctaataggt 540
aaaatatccc atggaaaaag attagaaaaa cagcagacta gctggtggag aaatttactt 600
cagtttgcag caaaagttta tccttatgaa aaattagaaa atcctagagg ttttgatata 660
gatgcaaacg gatatatata tatagccaat actaaaaaag ataaaatatt aaaatatgat 720
gctaatcata attatattac aaatattggg gtatccggtg taagtaatgg tcagcttctt 780
ggaccttcat ctgttgctgt tgatagagaa ggaaatttat atgtttctga tacaggaaat 840
aatagaatag ttatatttga tatagaagga aatttcttat atagttttgg aaaacttggt 900
gaaaataatg gagagttctt ttctcctgcg ggcatagcgg ttgatgacaa atatatttat 960
gttgctgata tgggtaataa aagaatacag caatttgatt tgagcggaaa ttatattcag 1020
agtataaagc ataatttatt taatgagcct agaggtttat cttttgctaa agatggaaat 1080
ctttatatag ctgatggaag taaggttttt tattataata tagctgaatc agattttaca 1140
atatttaata attccgaaag atatacagta actcctactt ctattgctga gggacctgat 1200

ggaaatatat atcttactga ttttatgtct ggaagaattg atgtatatac tagaaaagaa 1260
gaatattacg ctaatttaga tgtatttgta gacagagaat atttaaatag attccctgtt 1320
gttgtagctt ctgttacagt gagagataga gctatgaacc ctgtagttgg attaactcct 1380
gaaaatttct ttgttacaga gaatgcaggt gttgctcata aagttggttt ttatgatgct 1440
cctgaattgc atgaatatag attcgtgtat ttaatagaag atagtcttgc tgctaaacct 1500
tatgagagca gaattaaaga agagattagt aattttacta tgagcttaac taataatgat 1560
gaagttttag ttatacatta taatgatcag gtttacaagt ctgataatta tgatgctaga 1620
aatttaagaa tacttgaaaa tgctaatgct ttccatttta caggcggaat atctgctttg 1680
gatgatgctt attatgaagc tataagactt tcaggaaata gttttaagaa aactgctatt 1740
atacattttt cagtaactag tcctgacgac agagtatttg atatgatgaa ctttaatgat 1800
gtagcaagtt ttgctaaaaa caatgcagtt tcattaaacc aagtttatat cggtacaaat 1860
aaatctaatt atttcttaga tttaatgact gagaatactt acggttatat tatagatgct 1920
gattattcta taaattatac tgctgagctt aatagaatga aaaatataaa ttttggaaga 1980
tatttcatat actataacag ttttagaaat ttagctcagt caggacagtt tagggctttg 2040
aatgttaagg ttcaatatag agatatgtat ggtgaagaag aagttggtta tgtagtgcca 2100

<210> 36
<211> 700
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 36
Met Arg Ile Lys Leu Leu Ala Val Ile Val Leu Phe Leu Met Thr Ile
 1   5   10   15
Ser Leu Ser Tyr Thr Phe Asp Lys Thr Pro Tyr Tyr Val Asn Thr Glu
            20   25   30
Thr Tyr Asp Ser Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Gly Val His Tyr Tyr Asn
        35   40   45
Gln Glu Arg Tyr Asp Ala Ser Ile Ala Ser Phe Arg Asn Ser Leu Asn
    50   55   60
Thr Asn Pro Thr Asp Lys Phe Ile Arg Tyr Trp Tyr Ser Lys Ser Leu
65   70   75   80
Tyr Lys Ala Gly Tyr Met Ser Leu Ala Ile Asn Glu Trp Leu Asn Ile
                85   90   95
Thr Arg Met Gly Tyr Glu Asp Pro Ile Ile Leu Ser Lys Ile Asn Lys
            100   105   110
Tyr Asp Ser Ala Asn Val Asn Glu Glu Arg Glu Asn Ile Leu Ser Asn
        115   120   125
Phe Ile Tyr Leu Lys Ala Phe Ser Thr Asn Leu Asn Phe Arg Lys Asn
    130   135   140
Ile Asn Gln Pro Ile Gln Ile Lys Val Met Ser Asp Gly Ser Leu Tyr
145   150   155   160
Val Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Ser Leu Lys Lys Phe Asp Ile Asn Gly
                165   170   175
Asn Leu Ile Gly Lys Ile Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Lys Gln Gln
            180   185   190
Thr Ser Trp Trp Arg Asn Leu Leu Gln Phe Ala Ala Lys Val Tyr Pro
        195   200   205
Tyr Glu Lys Leu Glu Asn Pro Arg Gly Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly
    210   215   220
Tyr Ile Tyr Ile Ala Asn Thr Lys Lys Asp Lys Ile Leu Lys Tyr Asp
225   230   235   240
Ala Asn His Asn Tyr Ile Thr Asn Ile Gly Val Ser Gly Val Ser Asn
                245   250   255
Gly Gln Leu Leu Gly Pro Ser Ser Val Ala Val Asp Arg Glu Gly Asn
            260   265   270
Leu Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asn Asn Arg Ile Val Ile Phe Asp Ile
        275   280   285
Glu Gly Asn Phe Leu Tyr Ser Phe Gly Lys Leu Gly Glu Asn Asn Gly
    290   295   300

```
Glu Phe Phe Ser Pro Ala Gly Ile Ala Val Asp Asp Lys Tyr Ile Tyr
305                 310                 315                 320
Val Ala Asp Met Gly Asn Lys Arg Ile Gln Gln Phe Asp Leu Ser Gly
                325                 330                 335
Asn Tyr Ile Gln Ser Ile Lys His Asn Leu Phe Asn Glu Pro Arg Gly
            340                 345                 350
Leu Ser Phe Ala Lys Asp Gly Asn Leu Tyr Ile Ala Asp Gly Ser Lys
        355                 360                 365
Val Phe Tyr Tyr Asn Ile Ala Glu Ser Asp Phe Thr Ile Phe Asn Asn
    370                 375                 380
Ser Glu Arg Tyr Thr Val Thr Pro Thr Ser Ile Ala Glu Gly Pro Asp
385                 390                 395                 400
Gly Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Phe Met Ser Gly Arg Ile Asp Val Tyr
                405                 410                 415
Thr Arg Lys Glu Glu Tyr Tyr Ala Asn Leu Asp Val Phe Val Asp Arg
            420                 425                 430
Glu Tyr Leu Asn Arg Phe Pro Val Val Val Ala Ser Val Thr Val Arg
        435                 440                 445
Asp Arg Ala Met Asn Pro Val Val Gly Leu Thr Pro Glu Asn Phe Phe
    450                 455                 460
Val Thr Glu Asn Ala Gly Val Ala His Lys Val Gly Phe Tyr Asp Ala
465                 470                 475                 480
Pro Glu Leu His Glu Tyr Arg Phe Val Tyr Leu Ile Glu Asp Ser Leu
                485                 490                 495
Ala Ala Lys Pro Tyr Glu Ser Arg Ile Lys Glu Glu Ile Ser Asn Phe
            500                 505                 510
Thr Met Ser Leu Thr Asn Asn Asp Glu Val Leu Val Ile His Tyr Asn
        515                 520                 525
Asp Gln Val Tyr Lys Ser Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asn Leu Arg Ile
    530                 535                 540
Leu Glu Asn Ala Asn Ala Phe His Phe Thr Gly Gly Ile Ser Ala Leu
545                 550                 555                 560
Asp Asp Ala Tyr Tyr Glu Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Ser Phe Lys
                565                 570                 575
Lys Thr Ala Ile Ile His Phe Ser Val Thr Ser Pro Asp Asp Arg Val
            580                 585                 590
Phe Asp Met Met Asn Phe Asn Asp Val Ala Ser Phe Ala Lys Asn Asn
        595                 600                 605
Ala Val Ser Leu Asn Gln Val Tyr Ile Gly Thr Asn Lys Ser Asn Tyr
    610                 615                 620
Phe Leu Asp Leu Met Thr Glu Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ile Asp Ala
625                 630                 635                 640
Asp Tyr Ser Ile Asn Tyr Thr Ala Glu Leu Asn Arg Met Lys Asn Ile
                645                 650                 655
Asn Phe Gly Arg Tyr Phe Ile Tyr Tyr Asn Ser Phe Arg Asn Leu Ala
            660                 665                 670
Gln Ser Gly Gln Phe Arg Ala Leu Asn Val Lys Val Gln Tyr Arg Asp
        675                 680                 685
Met Tyr Gly Glu Glu Glu Val Gly Tyr Val Val Pro
    690                 695                 700
```

<210> 37
<211> 711
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 37
atgatagaat caatacaaag aatacatgcc agaataggcg agattcagga tacttttaat 60
aaattaggtt ttgctcctat taatactcag attcctacta aacctttgc tgaacattta 120
aatgaagcta tggcagaaaa caaagtcaat aatattgatg gttctatagt taatgataca 180

aataaaaagt tagataatgg aaaagtaatt aatggagata cttcttctga tgctttcaaa 240
ggaaatatat catttggtgt ttatgatagt aatacaaata attttgctaa agctataaat 300
gcttataaaa aagcttcagt agaaagtttc cctactaaat atgatgatat aattaaagag 360
gcagcagaga aatattcttt gcctgaaaat ttaataaaag cggttataaa gcaggaatca 420
aactatgtgc ctaatgctgt aagtcataaa ggtgctgttg gtttgatgca gataatgccg 480
caaacaggtg ttggcttagg tattactgat acagaaatgc ttaaagatcc atacactaat 540
ataatggctg gaagcagata tttatcacag atgttaaaca gatatgatgg aagacttgat 600
ttatctttat ctgcttataa tgccggacct gctttggtag acagattaca gagaatccct 660
aatatagagg aaactcaaaa ctatgttaaa aacattatag gatatataaa g 711

<210> 38
<211> 237
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 38
Met Ile Glu Ser Ile Gln Arg Ile His Ala Arg Ile Gly Glu Ile Gln
1 5 10 15
Asp Thr Phe Asn Lys Leu Gly Phe Ala Pro Ile Asn Thr Gln Ile Pro
20 25 30
Thr Lys Pro Phe Ala Glu His Leu Asn Glu Ala Met Ala Glu Asn Lys
35 40 45
Val Asn Asn Ile Asp Gly Ser Ile Val Asn Asp Thr Asn Lys Lys Leu
50 55 60
Asp Asn Gly Lys Val Ile Asn Gly Asp Thr Ser Ser Asp Ala Phe Lys
65 70 75 80
Gly Asn Ile Ser Phe Gly Val Tyr Asp Ser Asn Thr Asn Asn Phe Ala
85 90 95
Lys Ala Ile Asn Ala Tyr Lys Lys Ala Ser Val Glu Ser Phe Pro Thr
100 105 110
Lys Tyr Asp Asp Ile Ile Lys Glu Ala Ala Glu Lys Tyr Ser Leu Pro
115 120 125
Glu Asn Leu Ile Lys Ala Val Ile Lys Gln Glu Ser Asn Tyr Val Pro
130 135 140
Asn Ala Val Ser His Lys Gly Ala Val Gly Leu Met Gln Ile Met Pro
145 150 155 160
Gln Thr Gly Val Gly Leu Gly Ile Thr Asp Thr Glu Met Leu Lys Asp
165 170 175
Pro Tyr Thr Asn Ile Met Ala Gly Ser Arg Tyr Leu Ser Gln Met Leu
180 185 190
Asn Arg Tyr Asp Gly Arg Leu Asp Leu Ser Leu Ser Ala Tyr Asn Ala
195 200 205
Gly Pro Ala Leu Val Asp Arg Leu Gln Arg Ile Pro Asn Ile Glu Glu
210 215 220
Thr Gln Asn Tyr Val Lys Asn Ile Ile Gly Tyr Ile Lys
225 230 235

<210> 39
<211> 258
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 39
atgaaaatag tttttaatga aagagcttgg caggaatata tagagtgggt atcagaagat 60
aaaaaaatag taaaaaaaat taacgacttg attaaagata taataagaaa tccttgtgat 120
ggaataggaa aagcagaaaa attaaaatat gataaaaaag atctttactc tagaagaata 180
aataaagaac atagattagt atatcatata gaaaataatc aattaataat aacatcttgt 240
aaataccatt atgataag 258

<210> 40

<211> 86
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 40

```
Met Lys Ile Val Phe Asn Glu Arg Ala Trp Gln Glu Tyr Ile Glu Trp
 1               5                  10                  15
Val Ser Glu Asp Lys Lys Ile Val Lys Lys Ile Asn Asp Leu Ile Lys
            20                  25                  30
Asp Ile Ile Arg Asn Pro Cys Asp Gly Ile Gly Lys Ala Glu Lys Leu
        35                  40                  45
Lys Tyr Asp Lys Lys Asp Leu Tyr Ser Arg Arg Ile Asn Lys Glu His
    50                  55                  60
Arg Leu Val Tyr His Ile Glu Asn Asn Gln Leu Ile Ile Thr Ser Cys
65                  70                  75                  80
Lys Tyr His Tyr Asp Lys
                85
```

<210> 41
<211> 2646
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 41

```
gtggagattt tagtgaattt tattaagaaa aattgtatta ttttattttc atttctttta 60
cttgctgcag ctttattaat atctgcagag agtgactttg aaaatttaca aacagcaaga 120
aatatagctg tatatgaagg gcttacaata aaccgtatag atgttacagg tgaagtaagg 180
cttacaaagg aacaaataat aaacaatttt cctataaaag ccggcagtaa atttcaaaga 240
acagaaataa atgcagccat aaaaaaacta tttgatacgc agttattcga tagagtggca 300
atagatgcaa acagagaaga tgacggagta gttttaaata ttgtagtagc tgaaagattc 360
ataataaaag atatagaata tataggaaat aaaagattaa gcagaacagc acttaatgat 420
gccgtaaaac caattatgaa agcaggtgat ccttatatac ctcagaaatt aaatgatgct 480
gttaatgcta taataacaaa ttatcaagat aaaggatatt tgaaagctta tgttgagcct 540
aaagtaatag aaaataaaga tacttctgat gttttaatac aaatgaacat agtagaaggt 600
aatgaagtta aggttgctaa tataagattc catggtaata cacattttac tgataatgaa 660
cttaaaagac agatgtcaac aaaagaaaat ggatttatga ctcttggaaa atttaatgag 720
tttacatttg atggagacaa agataaaatt gttaaatact atgcagatag aggttactat 780
agagccaaag ttgataatgt aaagttcaca tatcaatgga gaaatcctga aataaaaaat 840
gaacaggatt taataataga tatatatgtt acagagggag ataaatatta tttcggagat 900
ataggattta aaggaaactt tataatacct tctgaaaata tacaaaaaga tataaaatca 960
aaaaaaggtg ctttatataa ttacacatat catatggcag actatcaggg tatacaaaat 1020
aaatattctg aaagaggtta tatattcaga caagttatac ctgtaattac agtaaatgaa 1080
gaaaataaaa tagtaaatat aatgtatgat attgttgaaa atgataaagt gcatatagaa 1140
aatattacta tagcaggaaa tacaaaaact aaagattttg ttatagaaag atatatagat 1200
ataaaacccg gagaagtatt caatactgca aaaatacaaa gagttcaaga gagattatat 1260
aatactcaat tctttgataa tattaattta ggagtaaaac ctggttctgc tgaaggactt 1320
atggaattaa atttaagtgt aactgaagga agaacagcta tggtatcagg aggaggcggt 1380
ttctccactg gttccggatt taaggtattt gcttctatta gagaaaataa cttcttagga 1440
agaggattgc agttaggatt aagcggagaa tttggagagc agcagaaacg tatagctgtt 1500
aactttgctg agccttattt acttaatctg cctatatatt tgggtgtgga tttatcatac 1560
ttcaatgaag gtgtaaacac tggttatcaa ataggaaccg atggtaattt tggtatacct 1620
aaatactcat actatactag acatggtttt gaaggtatag taagactagg ttattacttt 1680
gctgattatt attctacatt cataacattt gataccatag tacagcagta tcagcaatgg 1740
catgaccaag gagctactgc tgccggtcct aattatgttc ttagtgatat aaaaaaatat 1800
ttaactcata gagttaataa aaaagatgga tcattccaaa gatgggaaag tgattggttt 1860
acaacattca ttgtttcata ttctttactt agagatagca gaaacgatta tttgaaccct 1920
actagaggaa gtttcttgag aggtatggta gatttctatt ttggacacac ccagcttaca 1980
agattgagtg ctacaggatt cttggctgta cctgctacag aatggctgtc atttgcattc 2040
tatggagaat taggacaaat aattgctact cctggacttg ctttgcaaaa tgatgctgat 2100
gttctttatt atcttaaccc atttgaagat gtaaggggat gggatacttc caaatatact 2160
```

```
atatttaaga aaaacagagg attatcaact tatgatatgt taggagccaa cggttcagac 2220
ggtaaaccta ctactgactc ttggagttac ggtagagcaa aagtaagatt ctttgctgaa 2280
cttcgtatac ctataatacc taaaactctt ggattcgtta ctttccttga tgcaggacaa 2340
ttatggatgc catacagtac aggttggaat caggacggag atgctcattc atatccttct 2400
caatttatga atattaaaga tatatttgat ccttctcaat atatatattc tgtaggaata 2460
ggattcagac ttacaatacc tatattcaat ataagattct atattgctaa aagattcgtt 2520
tacaataaag aagatgttgg atttggtaaa ggatttcaag attttgaagg agatactttc 2580
actcctcttg gtgcttggtt cggaagagga tggggaattg catttactat gaaccaccca 2640
ttctat                                                            2646
```

<210> 42
<211> 882
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 42

```
Val Glu Ile Leu Val Asn Phe Ile Lys Lys Asn Cys Ile Ile Leu Phe
 1               5                  10                  15
Ser Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ile Ser Ala Glu Ser Asp
            20                  25                  30
Phe Glu Asn Leu Gln Thr Ala Arg Asn Ile Ala Val Tyr Glu Gly Leu
        35                  40                  45
Thr Ile Asn Arg Ile Asp Val Thr Gly Glu Val Arg Leu Thr Lys Glu
    50                  55                  60
Gln Ile Ile Asn Asn Phe Pro Ile Lys Ala Gly Ser Lys Phe Gln Arg
65                  70                  75                  80
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Ile Lys Lys Leu Phe Asp Thr Gln Leu Phe
                85                  90                  95
Asp Arg Val Ala Ile Asp Ala Asn Arg Glu Asp Asp Gly Val Val Leu
            100                 105                 110
Asn Ile Val Val Ala Glu Arg Phe Ile Ile Lys Asp Ile Glu Tyr Ile
        115                 120                 125
Gly Asn Lys Arg Leu Ser Arg Thr Ala Leu Asn Asp Ala Val Lys Pro
    130                 135                 140
Ile Met Lys Ala Gly Asp Pro Tyr Ile Pro Gln Lys Leu Asn Asp Ala
145                 150                 155                 160
Val Asn Ala Ile Ile Thr Asn Tyr Gln Asp Lys Gly Tyr Leu Lys Ala
                165                 170                 175
Tyr Val Glu Pro Lys Val Ile Glu Asn Lys Asp Thr Ser Asp Val Leu
            180                 185                 190
Ile Gln Met Asn Ile Val Glu Gly Asn Glu Val Lys Val Ala Asn Ile
        195                 200                 205
Arg Phe His Gly Asn Thr His Phe Thr Asp Asn Glu Leu Lys Arg Gln
    210                 215                 220
Met Ser Thr Lys Glu Asn Gly Phe Met Thr Leu Gly Lys Phe Asn Glu
225                 230                 235                 240
Phe Thr Phe Asp Gly Asp Lys Asp Lys Ile Val Lys Tyr Tyr Ala Asp
                245                 250                 255
Arg Gly Tyr Tyr Arg Ala Lys Val Asp Asn Val Lys Phe Thr Tyr Gln
            260                 265                 270
Trp Arg Asn Pro Glu Ile Lys Asn Glu Gln Asp Leu Ile Ile Asp Ile
        275                 280                 285
Tyr Val Thr Glu Gly Asp Lys Tyr Tyr Phe Gly Asp Ile Gly Phe Lys
    290                 295                 300
Gly Asn Phe Ile Ile Pro Ser Glu Asn Ile Gln Lys Asp Ile Lys Ser
305                 310                 315                 320
Lys Lys Gly Ala Leu Tyr Asn Tyr Thr Tyr His Met Ala Asp Tyr Gln
                325                 330                 335
Gly Ile Gln Asn Lys Tyr Ser Glu Arg Gly Tyr Ile Phe Arg Gln Val
            340                 345                 350
Ile Pro Val Ile Thr Val Asn Glu Glu Asn Lys Ile Val Asn Ile Met
```

```
        355                 360                 365
Tyr Asp Ile Val Glu Asn Asp Lys Val His Ile Glu Asn Ile Thr Ile
    370                 375                 380
Ala Gly Asn Thr Lys Thr Lys Asp Phe Val Ile Glu Arg Tyr Ile Asp
385                 390                 395                 400
Ile Lys Pro Gly Glu Val Phe Asn Thr Ala Lys Ile Gln Arg Val Gln
                405                 410                 415
Glu Arg Leu Tyr Asn Thr Gln Phe Phe Asp Asn Ile Asn Leu Gly Val
            420                 425                 430
Lys Pro Gly Ser Ala Glu Gly Leu Met Glu Leu Asn Leu Ser Val Thr
        435                 440                 445
Glu Gly Arg Thr Ala Met Val Ser Gly Gly Gly Gly Phe Ser Thr Gly
    450                 455                 460
Ser Gly Phe Lys Val Phe Ala Ser Ile Arg Glu Asn Asn Phe Leu Gly
465                 470                 475                 480
Arg Gly Leu Gln Leu Gly Leu Ser Gly Glu Phe Gly Glu Gln Gln Lys
                485                 490                 495
Arg Ile Ala Val Asn Phe Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Leu Pro Ile
            500                 505                 510
Tyr Leu Gly Val Asp Leu Ser Tyr Phe Asn Glu Gly Val Asn Thr Gly
        515                 520                 525
Tyr Gln Ile Gly Thr Asp Gly Asn Phe Gly Ile Pro Lys Tyr Ser Tyr
    530                 535                 540
Tyr Thr Arg His Gly Phe Glu Gly Ile Val Arg Leu Gly Tyr Tyr Phe
545                 550                 555                 560
Ala Asp Tyr Tyr Ser Thr Phe Ile Thr Phe Asp Thr Ile Val Gln Gln
                565                 570                 575
Tyr Gln Gln Trp His Asp Gln Gly Ala Thr Ala Ala Gly Pro Asn Tyr
            580                 585                 590
Val Leu Ser Asp Ile Lys Lys Tyr Leu Thr His Arg Val Asn Lys Lys
        595                 600                 605
Asp Gly Ser Phe Gln Arg Trp Glu Ser Asp Trp Phe Thr Thr Phe Ile
    610                 615                 620
Val Ser Tyr Ser Leu Leu Arg Asp Ser Arg Asn Asp Tyr Leu Asn Pro
625                 630                 635                 640
Thr Arg Gly Ser Phe Leu Arg Gly Met Val Asp Phe Tyr Phe Gly His
                645                 650                 655
Thr Gln Leu Thr Arg Leu Ser Ala Thr Gly Phe Leu Ala Val Pro Ala
            660                 665                 670
Thr Glu Trp Leu Ser Phe Ala Phe Tyr Gly Glu Leu Gly Gln Ile Ile
        675                 680                 685
Ala Thr Pro Gly Leu Ala Leu Gln Asn Asp Ala Asp Val Leu Tyr Tyr
    690                 695                 700
Leu Asn Pro Phe Glu Asp Val Arg Gly Trp Asp Thr Ser Lys Tyr Thr
705                 710                 715                 720
Ile Phe Lys Lys Asn Arg Gly Leu Ser Thr Tyr Asp Met Leu Gly Ala
                725                 730                 735
Asn Gly Ser Asp Gly Lys Pro Thr Thr Asp Ser Trp Ser Tyr Gly Arg
            740                 745                 750
Ala Lys Val Arg Phe Phe Ala Glu Leu Arg Ile Pro Ile Ile Pro Lys
        755                 760                 765
Thr Leu Gly Phe Val Thr Phe Leu Asp Ala Gly Gln Leu Trp Met Pro
    770                 775                 780
Tyr Ser Thr Gly Trp Asn Gln Asp Gly Asp Ala His Ser Tyr Pro Ser
785                 790                 795                 800
Gln Phe Met Asn Ile Lys Asp Ile Phe Asp Pro Ser Gln Tyr Ile Tyr
                805                 810                 815
Ser Val Gly Ile Gly Phe Arg Leu Thr Ile Pro Ile Phe Asn Ile Arg
            820                 825                 830
Phe Tyr Ile Ala Lys Arg Phe Val Tyr Asn Lys Glu Asp Val Gly Phe
        835                 840                 845
```

```
Gly Lys Gly Phe Gln Asp Phe Glu Gly Asp Thr Phe Thr Pro Leu Gly
    850                 855                 860
Ala Trp Phe Gly Arg Gly Trp Gly Ile Ala Phe Thr Met Asn His Pro
865                 870                 875                 880
Phe Tyr
```

<210> 43
<211> 1308
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 43
atgaaacgtt tatattttat tttatcagct ttattaataa ctgcttatag tgcatttagt 60
tatactgttg tagaagattt caatgatttt ttagttgatg aaaatcaatt aagaataagg 120
cttgacagat tcggagtatt ggcaggaaca gagaatttaa gatttatggt tggagtatca 180
ggagaaactg caggagtatt gcttgataat ttagacagag gtactaaagg aggaataaat 240
acattcagac cggcagcaat agcaggattt ggatataaaa cagaaagttt tggtataggt 300
gtaggttatc agtttaaata tatatcagga agctggcagt cgcatactcc tataataaca 360
gcaacagctt tgaatgataa cttgagaatc aatgtacctg ttacaatagg agtaggaagc 420
ggaaatgtta atgacggaga tatagcagtt tcaacagata ctagaataga atattataca 480
ggaaacaata tattcagcag aataagagtt aatcttaaat atggtatgta tagattaaaa 540
gctaatgaaa gcagaagcgg agatttgaca ggaagcggaa atataaatat gggtactgta 600
agtggaactg taggcgagaa tggtaaatat ggatttctta aagatactac agcacattct 660
ataggaatag atgtaagagg ttattttata gcggcaacag atcctgtatt agtagagcct 720
cagataagag tattatatca aggttctata gcggatttta caggtacttc atataaagta 780
acaacaccca ctggaactaa agaaggagga gcaggattcg gactctataa tatagatgct 840
tcaaatccta taggtgcttt ttcaataggt gatacaggtt caatacaatc agtgccttat 900
tatgatttta ctgctcataa tataatgttt acaggtgaag gagcttcaat agagatagga 960
ggtacagaat attatcttac aaagccgcag tttttaggaa tatccgttcc tgtggggttt 1020
actgctgaaa gtgagtttat tacattgtat ttggagcctg ctttatcatt ctctatgatt 1080
acaggaggaa ttaattctta tgcaagcagt gctaagcctg taagaatacc gcctttattt 1140
tattcggttg gatatttggt atatggagaa ttatatataa ctcctaaacc taatttagaa 1200
tggtattttg aggctcagat tggaagtgct acaactattg atagtatagg agatagtaaa 1260
cagggaggtt tagctttcaa tggaagtacc ggtatcactt ggaagttt 1308

<210> 44
<211> 436
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 44
```
Met Lys Arg Leu Tyr Phe Ile Leu Ser Ala Leu Leu Ile Thr Ala Tyr
 1               5                  10                  15
Ser Ala Phe Ser Tyr Thr Val Val Glu Asp Phe Asn Asp Phe Leu Val
            20                  25                  30
Asp Glu Asn Gln Leu Arg Ile Arg Leu Asp Arg Phe Gly Val Leu Ala
        35                  40                  45
Gly Thr Glu Asn Leu Arg Phe Met Val Gly Val Ser Gly Glu Thr Ala
    50                  55                  60
Gly Val Leu Leu Asp Asn Leu Asp Arg Gly Thr Lys Gly Gly Ile Asn
65                  70                  75                  80
Thr Phe Arg Pro Ala Ala Ile Ala Gly Phe Gly Tyr Lys Thr Glu Ser
                85                  90                  95
Phe Gly Ile Gly Val Gly Tyr Gln Phe Lys Tyr Ile Ser Gly Ser Trp
            100                 105                 110
Gln Ser His Thr Pro Ile Ile Thr Ala Thr Ala Leu Asn Asp Asn Leu
        115                 120                 125
Arg Ile Asn Val Pro Val Thr Ile Gly Val Gly Ser Gly Asn Val Asn
    130                 135                 140
```

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

<210> 45
<211> 2367
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 45

```
atgaaatata aacctacaag caggaaagaa ttaaaagatt tagtaacaga tgaaagtatt 60
tatttgggtg atattgatac tagcttaata actgatatgt caaacttatt tgatttttt 120
aatagagata attatgacgg tatagaaaat tgggatactt ctaatgtaga aaatatggct 180
ggtatgtttt ctgctaatag gaattttaat aaagatatta gtaaatggaa tgtatctaaa 240
gtgaaaaata cagcttatat gtttttcttg gctgaaaaat ttaatcagcc tttgaatgat 300
tgggacgtta gtaatgtaat aaatatgaat agcatgttta tgaatgctaa aagttttaat 360
cagcctatta ataattggaa tgtaagtaaa gttcaaagta tgagcaatat gtttaatcgt 420
gccgaaagtt ttaatcaaaa tataaatgat tggaatgtaa gtaatgtaga aaatatgaat 480
catatgtttt catctgccta taaattcaat cagcctttat ttaaatggga tacttctaaa 540
gtaaaagaga tggctggtat gttttcatta gcttatgcat ttaatcagcc tcttaacaat 600
tggaatgtaa gcaatgttac taatatgagg tgcatgttta tgtttgcaag agattttaat 660
aagcctatta ataattggaa tacaaaaaaa ttaaaagatg caggaagtat gttctcaaat 720
acatcggcat tcaatcagaa tttagatgat tggaatattg ataatctttc agatatgagt 780
aattttaata aagattctaa attagaatta acatttaaat tcaaaattta tttatatgct 840
ttaactttag aaaaagaaga aaaaaataat ttacatgatt ttataaaaaa caatgtaaaa 900
```

```
aagatatatg aaattataga aaatcataaa aacaagaagg ttaatcttct taaaagatat 960
ttaataaata atttttatag tgaattaaaa gaattaatac cagattatat tgaaagtttt 1020
aatagcatag aagaagttta taattatata gacaaaaatt ataataaaaa agatgataaa 1080
aaagtaaaat ttatagatga tataaaaatt gaaaatatag ataaaagaat aataaaatat 1140
atttacttat catatttaga attaaaaaga gaagcctaca gaataaagca aatagattat 1200
attataaatt taattgataa aaaatctttt ataaatgcaa ttaaaacgat atacacaagc 1260
accaataaag aaacatctct aattatgtac ggaatatacg gaggagatga ggcattaaga 1320
gagatttaca aaaaagaaaa agattcaaaa ttatgtttac ttgtattttc tatcaataaa 1380
aacagtaaat atgctattaa tatgctttat aatgtattta agaaaagtaa aaaatatgaa 1440
gtaaaagaga cagcagaaaa aattattgag gatatagcaa aagaaaataa tttgagcgtt 1500
tatgaatttg gattaaaaac tataccaaat tttggattca atataaacgg tgaaaaaata 1560
ataaataata atcaatataa aataattttg aaaaacgatt atactataga gttttttgat 1620
atcaaagaaa ataaaatatt aaagcaaata cctaaatatt ttgataatag taccaaagaa 1680
gaaattaaat atataaaaac agaaattcca aatattataa aaaatcaaag cagaaattta 1740
ataaaaattt tattaacagg taaaaagtac tatttcaatt tttttaaaga aatatttatt 1800
gataatccaa taatgaataa atttgcaatt aatttagttt ggaatttatt tgatgaaaat 1860
aacaatttta taacgacatt taggtattca ggcgacggaa gttatacaaa ctacgatgat 1920
aatacagtga atataaatga taattatttt gtaagtttat caagccctat agaaatggaa 1980
gaaaaaatta tatcaaaatg gaaaaaacat cttgaagatt atgaattatc acagcctata 2040
atgcagttta caaatataaa aataaataat ttagaagaag cattaaaaaa attagaaaat 2100
atagaaataa gctacggtac aataaaagca ttttctcaaa agtatgatat gaatactgaa 2160
tgtaaaagct attacgaaat taacggatat tcatttgaag actcatacaa taatcaagat 2220
ttttatataa gaacaaaaat tatcaatact gaaaccaatt ataatgataa aataaaaatt 2280
aatatagagt ttaacaatgc tagcaacaga tttatatata cttggcttat acttttaata 2340
tgggatttta gattaactga aatattt                                     2367
```

<210> 46
<211> 789
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 46

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

```
225                 230                 235                 240
Thr Ser Ala Phe Asn Gln Asn Leu Asp Asp Trp Asn Ile Asp Asn Leu
                245                 250                 255
Ser Asp Met Ser Asn Phe Asn Lys Asp Ser Lys Leu Glu Leu Thr Phe
            260                 265                 270
Lys Phe Lys Ile Tyr Leu Tyr Ala Leu Thr Leu Glu Lys Glu Glu Lys
        275                 280                 285
Asn Asn Leu His Asp Phe Ile Lys Asn Asn Val Lys Lys Ile Tyr Glu
    290                 295                 300
Ile Ile Glu Asn His Lys Asn Lys Lys Val Asn Leu Leu Lys Arg Tyr
305                 310                 315                 320
Leu Ile Asn Asn Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Leu Ile Pro Asp Tyr
                325                 330                 335
Ile Glu Ser Phe Asn Ser Ile Glu Glu Val Tyr Asn Tyr Ile Asp Lys
            340                 345                 350
Asn Tyr Asn Lys Lys Asp Asp Lys Lys Val Lys Phe Ile Asp Asp Ile
        355                 360                 365
Lys Ile Glu Asn Ile Asp Lys Arg Ile Ile Lys Tyr Ile Tyr Leu Ser
    370                 375                 380
Tyr Leu Glu Leu Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Ile Lys Gln Ile Asp Tyr
385                 390                 395                 400
Ile Ile Asn Leu Ile Asp Lys Lys Ser Phe Ile Asn Ala Ile Lys Thr
                405                 410                 415
Ile Tyr Thr Ser Thr Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Met Tyr Gly Ile
            420                 425                 430
Tyr Gly Gly Asp Glu Ala Leu Arg Glu Ile Tyr Lys Lys Glu Lys Asp
        435                 440                 445
Ser Lys Leu Cys Leu Leu Val Phe Ser Ile Asn Lys Asn Ser Lys Tyr
    450                 455                 460
Ala Ile Asn Met Leu Tyr Asn Val Phe Lys Lys Ser Lys Lys Tyr Glu
465                 470                 475                 480
Val Lys Glu Thr Ala Glu Lys Ile Ile Glu Asp Ile Ala Lys Glu Asn
                485                 490                 495
Asn Leu Ser Val Tyr Glu Phe Gly Leu Lys Thr Ile Pro Asn Phe Gly
            500                 505                 510
Phe Asn Ile Asn Gly Glu Lys Ile Ile Asn Asn Asn Gln Tyr Lys Ile
        515                 520                 525
Ile Leu Lys Asn Asp Tyr Thr Ile Glu Phe Phe Asp Ile Lys Glu Asn
    530                 535                 540
Lys Ile Leu Lys Gln Ile Pro Lys Tyr Phe Asp Asn Ser Thr Lys Glu
545                 550                 555                 560
Glu Ile Lys Tyr Ile Lys Thr Glu Ile Pro Asn Ile Ile Lys Asn Gln
                565                 570                 575
Ser Arg Asn Leu Ile Lys Ile Leu Leu Thr Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe
            580                 585                 590
Asn Phe Phe Lys Glu Ile Phe Ile Asp Asn Pro Ile Met Asn Lys Phe
        595                 600                 605
Ala Ile Asn Leu Val Trp Asn Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asn Phe Ile
    610                 615                 620
Thr Thr Phe Arg Tyr Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Asp Asp
625                 630                 635                 640
Asn Thr Val Asn Ile Asn Asp Asn Tyr Phe Val Ser Leu Ser Ser Pro
                645                 650                 655
Ile Glu Met Glu Glu Lys Ile Ile Ser Lys Trp Lys Lys His Leu Glu
            660                 665                 670
Asp Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Ile Met Gln Phe Thr Asn Ile Lys Ile
        675                 680                 685
Asn Asn Leu Glu Glu Ala Leu Lys Lys Leu Glu Asn Ile Glu Ile Ser
    690                 695                 700
Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Phe Ser Gln Lys Tyr Asp Met Asn Thr Glu
705                 710                 715                 720
```

```
Cys Lys Ser Tyr Tyr Glu Ile Asn Gly Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Tyr
                725                 730                 735
Asn Asn Gln Asp Phe Tyr Ile Arg Thr Lys Ile Ile Asn Thr Glu Thr
            740                 745                 750
Asn Tyr Asn Asp Lys Ile Lys Ile Asn Ile Glu Phe Asn Asn Ala Ser
        755                 760                 765
Asn Arg Phe Ile Tyr Thr Trp Leu Ile Leu Leu Ile Trp Asp Phe Arg
    770                 775                 780
Leu Thr Glu Ile Phe
785
```

<210> 47
<211> 729
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 47
atgataaaaa aaattttaac tttaatcttt gtattaattt tggcagcttc atgttctact 60
aatgataaac atgttgtagt attagctttt agtaaacagc ttcatgctgt actttataat 120
gataatagtc agtctacaaa aacagcatca aaaacatata tacaaaaaga tgatattaca 180
actgtagcag atcctataaa agaaaaaaaa gaatatacaa atactcaagc acaagtaagt 240
aaaaaagcag aagaaaaaaa agaagaactt acaaataacg atgctttaga agaagaaaaa 300
cctcaagtta taaagcaaac tgaggttata cagaaagatg ataatgagat tcttcttact 360
gcaaatataa tatcttttga ttttgattct tatgaattaa aaaatgaata taatgaaggg 420
atagatgaaa tttgcaaata tttaaataat aatcgagata ttaatctaat aatagaagga 480
catagcgaca gtatagggga ctcaaattat aatatatatt tatctgaaaa cagagcaaaa 540
gcgatatttg ataaattagt agataaagga atagataaag atagacttag atatatagga 600
tatggctcta ctcattcatc tgagtataat gataaagaca gaaaatgcca atttgttata 660
ataaataatt cagatgaaga gcaggaatac aaaaaagaaa acgaaactga tattatcaaa 720
ttaaaacaa 729

<210> 48
<211> 243
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 48
```
Met Ile Lys Lys Ile Leu Thr Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Ala Ala
 1               5                  10                  15
Ser Cys Ser Thr Asn Asp Lys His Val Val Val Leu Ala Phe Ser Lys
            20                  25                  30
Gln Leu His Ala Val Leu Tyr Asn Asp Asn Ser Gln Ser Thr Lys Thr
        35                  40                  45
Ala Ser Lys Thr Tyr Ile Gln Lys Asp Asp Ile Thr Thr Val Ala Asp
    50                  55                  60
Pro Ile Lys Glu Lys Lys Glu Tyr Thr Asn Thr Gln Ala Gln Val Ser
65                  70                  75                  80
Lys Lys Ala Glu Glu Lys Lys Glu Glu Leu Thr Asn Asn Asp Ala Leu
                85                  90                  95
Glu Glu Glu Lys Pro Gln Val Ile Lys Gln Thr Glu Val Ile Gln Lys
            100                 105                 110
Asp Asp Asn Glu Ile Leu Leu Thr Ala Asn Ile Ile Ser Phe Asp Phe
        115                 120                 125
Asp Ser Tyr Glu Leu Lys Asn Glu Tyr Asn Glu Gly Ile Asp Glu Ile
    130                 135                 140
Cys Lys Tyr Leu Asn Asn Asn Arg Asp Ile Asn Leu Ile Ile Glu Gly
145                 150                 155                 160
His Ser Asp Ser Ile Gly Asp Ser Asn Tyr Asn Ile Tyr Leu Ser Glu
                165                 170                 175
Asn Arg Ala Lys Ala Ile Phe Asp Lys Leu Val Asp Lys Gly Ile Asp
```

```
            180                 185                 190
Lys Asp Arg Leu Arg Tyr Ile Gly Tyr Gly Ser Thr His Ser Ser Glu
        195                 200                 205
Tyr Asn Asp Lys Asp Arg Lys Cys Gln Phe Val Ile Ile Asn Asn Ser
    210                 215                 220
Asp Glu Glu Gln Glu Tyr Lys Lys Glu Asn Glu Thr Asp Ile Ile Lys
225                 230                 235                 240
Leu Lys Gln
```

<210> 49
<211> 969
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 49
atgaaaaaaa ttattttatt aatatttata ttattaaata tatcatgcag aaatatcatt 60
acaatagcag aaaataaaaa aaatatagat aatgtaaata atgtacatat agaagaaaat 120
gaatacttat atgctcttga aatagataaa gccaatcctc aaaatatgga agaagcatta 180
aaaagatatg cagcagatca taatggaaaa tataaattaa tattcacagg tacatcaaca 240
aaaaaatatg atgtttggac ttcaataagt caaatgcttg aagatatttc tttaaaaaac 300
ataaaaatag aaatatcgat tgtaaatgta atttttccaa atggtaaaat acctgatttt 360
ttatttggag gaaatgctgt aaataaatca atagtaaaaa taacatttcc aaatagcata 420
actgaaatag gcgaatacag tatttttttgt ccagaattaa cggaaataac acttccaagt 480
aatttaagaa caataggcag aagaggatta ataggatgcg aaagtttaaa aatactgaaa 540
cttcctaatt cattaaaaac aataggagaa ttatcattaa atggatgcgg atttgccagt 600
attgtaattc ctgattctgt aacttctata ggtaaaagtg cttttgccga ttgtgagaat 660
ttagtaaata taaaattacc aaataattta gaaacaatac ctgatagtat gcttgaaagc 720
tgcggatcca ttaatacaat aactatacca gcatctgtaa aaaaaataga aaattctgta 780
ttttttttact gcaaaaactt tgaaaacatt agatttttaa atggtaatct tcaatcaatg 840
acagtaggaa aagatatatt tgcaggctgc cctttaaaaa atgtttatat acctaaaaac 900
agcagtgcat cagatgaaga atggagaaat actttaggca ttaaatcaac tgtaaagatt 960
ataagagaa 969

<210> 50
<211> 323
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 50
```
Met Lys Lys Ile Ile Leu Leu Ile Phe Ile Leu Leu Asn Ile Ser Cys
 1               5                  10                  15
Arg Asn Ile Ile Thr Ile Ala Glu Asn Lys Lys Asn Ile Asp Asn Val
            20                  25                  30
Asn Asn Val His Ile Glu Glu Asn Glu Tyr Leu Tyr Ala Leu Glu Ile
        35                  40                  45
Asp Lys Ala Asn Pro Gln Asn Met Glu Glu Ala Leu Lys Arg Tyr Ala
    50                  55                  60
Ala Asp His Asn Gly Lys Tyr Lys Leu Ile Phe Thr Gly Thr Ser Thr
65                  70                  75                  80
Lys Lys Tyr Asp Val Trp Thr Ser Ile Ser Gln Met Leu Glu Asp Ile
                85                  90                  95
Ser Leu Lys Asn Ile Lys Ile Glu Ile Ser Ile Val Asn Val Ile Phe
            100                 105                 110
Pro Asn Gly Lys Ile Pro Asp Phe Leu Phe Gly Gly Asn Ala Val Asn
        115                 120                 125
Lys Ser Ile Val Lys Ile Thr Phe Pro Asn Ser Ile Thr Glu Ile Gly
    130                 135                 140
Glu Tyr Ser Ile Phe Cys Pro Glu Leu Thr Glu Ile Thr Leu Pro Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Asn Leu Arg Thr Ile Gly Arg Arg Gly Leu Ile Gly Cys Glu Ser Leu
                165                 170                 175
Lys Ile Leu Lys Leu Pro Asn Ser Leu Lys Thr Ile Gly Glu Leu Ser
            180                 185                 190
Leu Asn Gly Cys Gly Phe Ala Ser Ile Val Ile Pro Asp Ser Val Thr
        195                 200                 205
Ser Ile Gly Lys Ser Ala Phe Ala Asp Cys Glu Asn Leu Val Asn Ile
    210                 215                 220
Lys Leu Pro Asn Asn Leu Glu Thr Ile Pro Asp Ser Met Leu Glu Ser
225                 230                 235                 240
Cys Gly Ser Ile Asn Thr Ile Thr Ile Pro Ala Ser Val Lys Lys Ile
                245                 250                 255
Glu Asn Ser Val Phe Phe Tyr Cys Lys Asn Phe Glu Asn Ile Arg Phe
            260                 265                 270
Leu Asn Gly Asn Leu Gln Ser Met Thr Val Gly Lys Asp Ile Phe Ala
        275                 280                 285
Gly Cys Pro Leu Lys Asn Val Tyr Ile Pro Lys Asn Ser Ser Ala Ser
    290                 295                 300
Asp Glu Glu Trp Arg Asn Thr Leu Gly Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile
305                 310                 315                 320
Ile Arg Glu
```

<210> 51
<211> 564
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 51
atgcatattt ctggtgattc tcctttagat aggaaagttg gagatgctag ttattatttt 60
gctactgttc aacattgctg ggggtgggct acttggaaaa gagcttggaa atattttgat 120
gtaactatgg aaagtataaa ttttgaagat gtaaaaaaaa caattagaaa aagatacaaa 180
gattttaata taaaagatta ctggcaaaga tggtttccta gaataaaaaa agagcattct 240
tctgtatggg attatcaatg gacttactgt attatctcaa aaaatggaat atgcattaat 300
ccaagtataa atttaacttc taatatagga tttggagaag attctaccca cactacaaat 360
gaaaatgatg aaaatataaa tagtaaaaca taccctatgg atactgaaaa tattattcat 420
cctaaagaaa taaaatgtga tgaaagagct gattttgaaa tagctattaa aagatttaat 480
ataaaacctt tctctttaac atctaatata accagagaag ttaaaagaat tataaaacaa 540
ataaaaaact tatttatcaa aaaa 564

<210> 52
<211> 188
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 52
```
Met His Ile Ser Gly Asp Ser Pro Leu Asp Arg Lys Val Gly Asp Ala
 1               5                  10                  15
Ser Tyr Tyr Phe Ala Thr Val Gln His Cys Trp Gly Trp Ala Thr Trp
            20                  25                  30
Lys Arg Ala Trp Lys Tyr Phe Asp Val Thr Met Glu Ser Ile Asn Phe
        35                  40                  45
Glu Asp Val Lys Lys Thr Ile Arg Lys Arg Tyr Lys Asp Phe Asn Ile
    50                  55                  60
Lys Asp Tyr Trp Gln Arg Trp Phe Pro Arg Ile Lys Lys Glu His Ser
65                  70                  75                  80
Ser Val Trp Asp Tyr Gln Trp Thr Tyr Cys Ile Ile Ser Lys Asn Gly
                85                  90                  95
Ile Cys Ile Asn Pro Ser Ile Asn Leu Thr Ser Asn Ile Gly Phe Gly
            100                 105                 110
```

Glu Asp Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Asn Asp Glu Asn Ile Asn Ser
115 120 125
Lys Thr Tyr Pro Met Asp Thr Glu Asn Ile Ile His Pro Lys Glu Ile
130 135 140
Lys Cys Asp Glu Arg Ala Asp Phe Glu Ile Ala Ile Lys Arg Phe Asn
145 150 155 160
Ile Lys Pro Phe Ser Leu Thr Ser Asn Ile Thr Arg Glu Val Lys Arg
165 170 175
Ile Ile Lys Gln Ile Lys Asn Leu Phe Ile Lys Lys
180 185

<210> 53
<211> 396
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 53
atgtttaata ctcctatatt attaattatt tttaaaagaa aatatactgc attaaaagtt 60
ttagatacaa taagaaatgt aaaacccaaa aaattatata tagcagctga tggctggaga 120
aatgaagaag aaaaaacaaa atgtattgat acaagagaag ctgtattaga agctgtagat 180
tgggaatgcg aagtaaaaac tttatttcaa gataaaaatt taggatgctg ttatggtcct 240
gtaaatgctg taaattggtt atttgaaaat gaagaacaag gaataatact tgaagatgat 300
gttatagctg aaacttcttt ttttattatt gcgagaaatt acttaactat tataaagata 360
atgaaaaaat tatgcatatt tctggtgatt ctccttt 396

<210> 54
<211> 132
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 54
Met Phe Asn Thr Pro Ile Leu Leu Ile Ile Phe Lys Arg Lys Tyr Thr
1 5 10 15
Ala Leu Lys Val Leu Asp Thr Ile Arg Asn Val Lys Pro Lys Lys Leu
20 25 30
Tyr Ile Ala Ala Asp Gly Trp Arg Asn Glu Glu Glu Lys Thr Lys Cys
35 40 45
Ile Asp Thr Arg Glu Ala Val Leu Glu Ala Val Asp Trp Glu Cys Glu
50 55 60
Val Lys Thr Leu Phe Gln Asp Lys Asn Leu Gly Cys Cys Tyr Gly Pro
65 70 75 80
Val Asn Ala Val Asn Trp Leu Phe Glu Asn Glu Glu Gln Gly Ile Ile
85 90 95
Leu Glu Asp Asp Val Ile Ala Glu Thr Ser Phe Phe Ile Ile Ala Arg
100 105 110
Asn Tyr Leu Thr Ile Ile Lys Ile Met Lys Lys Leu Cys Ile Phe Leu
115 120 125
Val Ile Leu Leu
130

<210> 55
<211> 825
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 55
atgaatgata ttattaaagt gataaatata ttaaacgata taccagaacc tttttctgta 60
gatggaataa taaaaacttt tgaagcaagc tctaaagatt ttataaaaag ttttgctgtt 120
tatttttata aggaaggcag tgaagaagca agattatggt atacatctaa aaataaatta 180

gttattaatg ataaaaaaaa taatagagaa tatactctat ttgccagagg taataaattt 240
ggttatataa tagttaatgc agataaaaat aaagatgaaa tggaagtact tattaattat 300
ctatcaataa tattatatag tgaaaaactt tcatttttgg caaatagaga caaacttaca 360
ggtttataca atcgcggata tataataaaa tatttgcagg agaaagaaac tacaaatgaa 420
atatattcta tagtaatagt agatttagat aaattcaaac attataatga tacttacgga 480
cataatatag gagatcatgt attaaaatta atttcaaagg taatgaaaga ttctttaaaa 540
aatataaaat ataaatctgt attggcaaga tatggaggag aagaatttat tatagtaatt 600
gatgttaata ataaaaatga tctttttaat gctatggaag aaataagaaa ctcaataata 660
gaaactgatt tatctacaga agaatattct ctaaaagcaa cagcatcttt aggaggtgct 720
ataaaagagg aaaatacaac tttaagaact tttataaata aagcagatca atcattatat 780
aatgccaaag aaacaggaag aaataaatcc gttatattag atttt 825

<210> 56
<211> 275
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 56
Met Asn Asp Ile Ile Lys Val Ile Asn Ile Leu Asn Asp Ile Pro Glu
 1   5   10   15
Pro Phe Ser Val Asp Gly Ile Ile Lys Thr Phe Glu Ala Ser Ser Lys
            20   25   30
Asp Phe Ile Lys Ser Phe Ala Val Tyr Phe Tyr Lys Glu Gly Ser Glu
        35   40   45
Glu Ala Arg Leu Trp Tyr Thr Ser Lys Asn Lys Leu Val Ile Asn Asp
    50   55   60
Lys Lys Asn Asn Arg Glu Tyr Thr Leu Phe Ala Arg Gly Asn Lys Phe
65   70   75   80
Gly Tyr Ile Ile Val Asn Ala Asp Lys Asn Lys Asp Glu Met Glu Val
                85   90   95
Leu Ile Asn Tyr Leu Ser Ile Ile Leu Tyr Ser Glu Lys Leu Ser Phe
            100   105   110
Leu Ala Asn Arg Asp Lys Leu Thr Gly Leu Tyr Asn Arg Gly Tyr Ile
        115   120   125
Ile Lys Tyr Leu Gln Glu Lys Glu Thr Thr Asn Glu Ile Tyr Ser Ile
    130   135   140
Val Ile Val Asp Leu Asp Lys Phe Lys His Tyr Asn Asp Thr Tyr Gly
145   150   155   160
His Asn Ile Gly Asp His Val Leu Lys Leu Ile Ser Lys Val Met Lys
                165   170   175
Asp Ser Leu Lys Asn Ile Lys Tyr Lys Ser Val Leu Ala Arg Tyr Gly
            180   185   190
Gly Glu Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Val Asn Asn Lys Asn Asp Leu
        195   200   205
Phe Asn Ala Met Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ile Glu Thr Asp Leu
    210   215   220
Ser Thr Glu Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Ala Ser Leu Gly Gly Ala
225   230   235   240
Ile Lys Glu Glu Asn Thr Thr Leu Arg Thr Phe Ile Asn Lys Ala Asp
                245   250   255
Gln Ser Leu Tyr Asn Ala Lys Glu Thr Gly Arg Asn Lys Ser Val Ile
            260   265   270
Leu Asp Phe
        275

<210> 57
<211> 1815
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 57
atgaaaaata tttttaaata tgcttccatt ataggatgca cttttgcctc gcttaatttt 60
gcggctgatt atatagatta taaagtaaaa aacggcgata ctttatttgg aatagctttc 120
gctcatgata tgagtgcaaa tgaattttta aaagttaata atataaaaga tcctgataaa 180
tataatctta gagtaggaga aactttaaaa gtaaaagata aaggttatac tcttgtatat 240
gactctgata ataaagtttt cggcttgaaa ggagaagaag gaaactcata caaagattat 300
aaagtaaaaa acggggatac tttatttggt atagcatttg cccatggaat gactgctaat 360
gaatttctag ctataaataa tattaaagat gccaataaat ataatcttag agtaggacaa 420
actcttaaag tagcaaataa tcaaaaagaa aataatgctt cttcaaataa tataaataat 480
agtgataata cagaaaatta tgatacttat aaagtgcaaa gcggtgatac tttatacgga 540
atagctttct ctcatggtat gacagcaagc gaatttttaa agattaataa tatagatgat 600
cctgataaat ataaactata tgtaggtaaa actatgtatg ttaaatcatc taaaaaagaa 660
aataatttaa acacaaataa tgaaaaagat acaggaaaag aaatagaata ctatactgta 720
aaaagcggcg ataccttata cggaatagct tttcaaaatg atattagcgt aaatgatttt 780
ctaagaatta acaatataga tgatccttta aaatacaaat taagaacagg cgaaaaatta 840
aaaatatatg caagagaaaa tgcctcaaat acacaaagca aaactataaa aacatataga 900
gtaaaaaacg gagatactct tggagagata gcattaagaa attctatgtc tttgaaagat 960
cttcttcaat taaataatct aaaaaataat tatgtgctta aagtaggaga tactttaaaa 1020
atatatgata atattaatat aacaagttct tcaacatcaa caacatacag aactttggaa 1080
aattataaag taaaaagcgg tgatacttta agcggaatag ctctagcaag aggaatggat 1140
ctagtagaat tatactccat aaataatata aatgacaaat atattttgaa agttggagat 1200
aatcttaaag tatatgctaa ccctaaaaaa acaactactt tagtaatatc aaattataaa 1260
gttcaaagcg gagatagttt atactcaata gcaaaaaaac ataaaatgga tttaagagat 1320
ttaatgcagc ttaataatat aaaaaatgct aatgaatata aattatatgt cggcgccaat 1380
ctaaaagtaa aaacagcaaa aatggtgcct tattctttta atgatgattc tatattacct 1440
gacagctctt ttatatggcc ttataaagga ataataattt caggatatgg agtagcttct 1500
gataaacttg caaacagagg tgtgaatata ttaggagatg taggagacaa agttgtagct 1560
tctgatgacg gaatcgtaga atatgctgat aatataagag gattcggtac tgttataata 1620
cttaaacata aaaacggata taatacttct tatgctcatc tttctaagat aaatgttaaa 1680
cttggagata tagtaaagaa aggagattat ataggagaca ttggcgatac tggtatgata 1740
gatagaagcg aactatattt taagatttct tatcagggaa gatcaataga tcctgttaaa 1800
cttcttccta aaagt 1815

<210> 58
<211> 605
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 58
Met Lys Asn Ile Phe Lys Tyr Ala Ser Ile Ile Gly Cys Thr Phe Ala
 1   5   10   15
Ser Leu Asn Phe Ala Ala Asp Tyr Ile Asp Tyr Lys Val Lys Asn Gly
            20   25   30
Asp Thr Leu Phe Gly Ile Ala Phe Ala His Asp Met Ser Ala Asn Glu
        35   40   45
Phe Leu Lys Val Asn Asn Ile Lys Asp Pro Asp Lys Tyr Asn Leu Arg
    50   55   60
Val Gly Glu Thr Leu Lys Val Lys Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Val Tyr
65   70   75   80
Asp Ser Asp Asn Lys Val Phe Gly Leu Lys Gly Glu Glu Gly Asn Ser
                85   90   95
Tyr Lys Asp Tyr Lys Val Lys Asn Gly Asp Thr Leu Phe Gly Ile Ala
            100   105   110
Phe Ala His Gly Met Thr Ala Asn Glu Phe Leu Ala Ile Asn Asn Ile
        115   120   125
Lys Asp Ala Asn Lys Tyr Asn Leu Arg Val Gly Gln Thr Leu Lys Val
    130   135   140
Ala Asn Asn Gln Lys Glu Asn Asn Ala Ser Ser Asn Asn Ile Asn Asn
145   150   155   160
Ser Asp Asn Thr Glu Asn Tyr Asp Thr Tyr Lys Val Gln Ser Gly Asp
                165   170   175

```
Thr Leu Tyr Gly Ile Ala Phe Ser His Gly Met Thr Ala Ser Glu Phe
            180                 185                 190
Leu Lys Ile Asn Asn Ile Asp Asp Pro Asp Lys Tyr Lys Leu Tyr Val
        195                 200                 205
Gly Lys Thr Met Tyr Val Lys Ser Ser Lys Lys Glu Asn Asn Leu Asn
    210                 215                 220
Thr Asn Asn Glu Lys Asp Thr Gly Lys Glu Ile Glu Tyr Tyr Thr Val
225                 230                 235                 240
Lys Ser Gly Asp Thr Leu Tyr Gly Ile Ala Phe Gln Asn Asp Ile Ser
                245                 250                 255
Val Asn Asp Phe Leu Arg Ile Asn Asn Ile Asp Asp Pro Leu Lys Tyr
            260                 265                 270
Lys Leu Arg Thr Gly Glu Lys Leu Lys Ile Tyr Ala Arg Glu Asn Ala
        275                 280                 285
Ser Asn Thr Gln Ser Lys Thr Ile Lys Thr Tyr Arg Val Lys Asn Gly
    290                 295                 300
Asp Thr Leu Gly Glu Ile Ala Leu Arg Asn Ser Met Ser Leu Lys Asp
305                 310                 315                 320
Leu Leu Gln Leu Asn Asn Leu Lys Asn Asn Tyr Val Leu Lys Val Gly
                325                 330                 335
Asp Thr Leu Lys Ile Tyr Asp Asn Ile Asn Ile Thr Ser Ser Ser Thr
            340                 345                 350
Ser Thr Thr Tyr Arg Thr Leu Glu Asn Tyr Lys Val Lys Ser Gly Asp
        355                 360                 365
Thr Leu Ser Gly Ile Ala Leu Ala Arg Gly Met Asp Leu Val Glu Leu
    370                 375                 380
Tyr Ser Ile Asn Asn Ile Asn Asp Lys Tyr Ile Leu Lys Val Gly Asp
385                 390                 395                 400
Asn Leu Lys Val Tyr Ala Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Val Ile
                405                 410                 415
Ser Asn Tyr Lys Val Gln Ser Gly Asp Ser Leu Tyr Ser Ile Ala Lys
            420                 425                 430
Lys His Lys Met Asp Leu Arg Asp Leu Met Gln Leu Asn Asn Ile Lys
        435                 440                 445
Asn Ala Asn Glu Tyr Lys Leu Tyr Val Gly Ala Asn Leu Lys Val Lys
    450                 455                 460
Thr Ala Lys Met Val Pro Tyr Ser Phe Asn Asp Asp Ser Ile Leu Pro
465                 470                 475                 480
Asp Ser Ser Phe Ile Trp Pro Tyr Lys Gly Ile Ile Ile Ser Gly Tyr
                485                 490                 495
Gly Val Ala Ser Asp Lys Leu Ala Asn Arg Gly Val Asn Ile Leu Gly
            500                 505                 510
Asp Val Gly Asp Lys Val Val Ala Ser Asp Asp Gly Ile Val Glu Tyr
        515                 520                 525
Ala Asp Asn Ile Arg Gly Phe Gly Thr Val Ile Ile Leu Lys His Lys
    530                 535                 540
Asn Gly Tyr Asn Thr Ser Tyr Ala His Leu Ser Lys Ile Asn Val Lys
545                 550                 555                 560
Leu Gly Asp Ile Val Lys Lys Gly Asp Tyr Ile Gly Asp Ile Gly Asp
                565                 570                 575
Thr Gly Met Ile Asp Arg Ser Glu Leu Tyr Phe Lys Ile Ser Tyr Gln
            580                 585                 590
Gly Arg Ser Ile Asp Pro Val Lys Leu Leu Pro Lys Ser
        595                 600                 605
```

<210> 59
<211> 1068
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 59
atgattagaa atattaaata tattttcatt atatatttat tagctatttc ctgctctaat 60
tatagagtta ctgatccatt ctccattcaa aataatagta ataataacat aagcattata 120
cctgaatatg tagatgctca atatttcatc aaagcagatt acactgaaca gcaaatagaa 180
gaaataatga ataaatattt ccagaatttt ggagaatata taatattttt aaatgatact 240
aaagataata tagataaaaa taaaacaata gaaacaataa ataaagtagt taataaacct 300
gcttatttac ataacggagc tgctgttgat ttaagcagaa ctgatataac agaaatagca 360
caaagtgcat ttaatgcaaa taaaaattta atagaagtta agcttcctaa ctcattaaaa 420
actataaatt catcagcatt tcaatcatgc gaaagattaa aatatataaa tctagtaagc 480
tctataaccg atatacaatc tgctgcattt caagactgta tgtctttaga aattattaat 540
ataacatcaa aagtaaaaac tatagctaat aatgcattta aaaattgtgt tactttaaga 600
gaagtaatac ttcctgaagg attaacttca atagcagatg gagcattcaa ttactgtaca 660
tcattagaat caattaattt tccatcaact ttacaaacta taggcacagc agcattttac 720
agctgtaaat cattaaaaag tataaaatta aatcaaggat taactaccat aaatgataat 780
gcttttaatc tttgctcatc attaacagct ataagcttac ctaatagtat aacaagcctt 840
ttaaatcctt cagaaggtaa ggtttttttct gattgtaaaa tgcttaaaaa tgttgaatat 900
cttgatacag atcccgtaaa aatacttaaa gaaaatgata cattcagagg ttcacctgta 960
accgatttat accttcctaa tgtggcagaa gatcctaaaa atggaagctg ggataatttt 1020
ttaggtgttg cttggacaac tattcattat ggaaaatcta tgcctagg 1068

<210> 60
<211> 356
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 60
Met Ile Arg Asn Ile Lys Tyr Ile Phe Ile Ile Tyr Leu Leu Ala Ile
 1   5   10   15
Ser Cys Ser Asn Tyr Arg Val Thr Asp Pro Phe Ser Ile Gln Asn Asn
            20   25   30
Ser Asn Asn Asn Ile Ser Ile Ile Pro Glu Tyr Val Asp Ala Gln Tyr
        35   40   45
Phe Ile Lys Ala Asp Tyr Thr Glu Gln Gln Ile Glu Glu Ile Met Asn
    50   55   60
Lys Tyr Phe Gln Asn Phe Gly Glu Tyr Ile Ile Phe Leu Asn Asp Thr
65   70   75   80
Lys Asp Asn Ile Asp Lys Asn Lys Thr Ile Glu Thr Ile Asn Lys Val
                85   90   95
Val Asn Lys Pro Ala Tyr Leu His Asn Gly Ala Ala Val Asp Leu Ser
            100   105   110
Arg Thr Asp Ile Thr Glu Ile Ala Gln Ser Ala Phe Asn Ala Asn Lys
        115   120   125
Asn Leu Ile Glu Val Lys Leu Pro Asn Ser Leu Lys Thr Ile Asn Ser
    130   135   140
Ser Ala Phe Gln Ser Cys Glu Arg Leu Lys Tyr Ile Asn Leu Val Ser
145   150   155   160
Ser Ile Thr Asp Ile Gln Ser Ala Ala Phe Gln Asp Cys Met Ser Leu
                165   170   175
Glu Ile Ile Asn Ile Thr Ser Lys Val Lys Thr Ile Ala Asn Asn Ala
            180   185   190
Phe Lys Asn Cys Val Thr Leu Arg Glu Val Ile Leu Pro Glu Gly Leu
        195   200   205
Thr Ser Ile Ala Asp Gly Ala Phe Asn Tyr Cys Thr Ser Leu Glu Ser
    210   215   220
Ile Asn Phe Pro Ser Thr Leu Gln Thr Ile Gly Thr Ala Ala Phe Tyr
225   230   235   240
Ser Cys Lys Ser Leu Lys Ser Ile Lys Leu Asn Gln Gly Leu Thr Thr
                245   250   255
Ile Asn Asp Asn Ala Phe Asn Leu Cys Ser Ser Leu Thr Ala Ile Ser
            260   265   270
Leu Pro Asn Ser Ile Thr Ser Leu Leu Asn Pro Ser Glu Gly Lys Val

```
        275                 280                 285
Phe Ser Asp Cys Lys Met Leu Lys Asn Val Glu Tyr Leu Asp Thr Asp
    290                 295                 300
Pro Val Lys Ile Leu Lys Glu Asn Asp Thr Phe Arg Gly Ser Pro Val
305                 310                 315                 320
Thr Asp Leu Tyr Leu Pro Asn Val Ala Glu Asp Pro Lys Asn Gly Ser
                325                 330                 335
Trp Asp Asn Phe Leu Gly Val Ala Trp Thr Thr Ile His Tyr Gly Lys
            340                 345                 350
Ser Met Pro Arg
        355
```

<210> 61
<211> 1296
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 61

```
atggatataa ttataataat agtgttaata cttttaaatg gtatttttgc catgtcggaa 60
attgcagtaa tttctgctag aaaatcttct cttatgaaag acagcaaaga aggaaataaa 120
ggtgcaaaga ctgcattagc tttagcagat aatcctgaca aatttttatc tacaatacaa 180
ataggtataa ctttaatagg tatattaaca ggtatttact caggcgatac agttgccaaa 240
gaagtttcaa atttacttgt aaaaataaat gtaccattaa attatgcttc tttaatagct 300
caggtattgg tggtagcatt ggtaacatat cttacattga tattcggaga gcttgtgcct 360
aaaagaatag gaatggtaat gcctgaaaga atagcaaaag tggttgcagc tcctatgaca 420
atacttgcaa agataggtgc tccttttgtg tggatattat caaatagcgc attgcttgtt 480
tcaagagttt tgggtataaa agatgataaa agtcctgtta ctgaagagga aataaaatct 540
atgatagaag agggcagaca agggggagaa gttaaggaga tagaacagaa tattatagag 600
agggctttct ttttgggaga tagaaaaata gaatctataa tgacacatag aaatgatatg 660
gtatttttag atataaatat gagtaatgat gagataaaaa agatagtatc aaaacattct 720
ttttctgctt atcctgttgt tgataaaaat ttggataata ttgtaggagt tgtaagagta 780
actgatatat tcgataaatt aaatacttca aaggctaaaa tagaaaagtt tgtgaagaaa 840
gctaattact ttcataacaa tatggaagtt tatttggttc ttgaagagat gaaaaagaat 900
aatactaaaa taggtcttgt atcagatgag tttgggaata tagacggaat gattactcaa 960
agcgatatat tcgaggcttt agtgggttct gtaacagaag gaaaagacag taaggatatt 1020
agaaagagaa agagcggaag ttggtttgta gatggtcaat gtcctatgta tgatttctta 1080
gagtattttg aaatagaaga tgaaaatgct tctaataatt ataatactat aagcggtttg 1140
attttagaat tattacagca tgtacctagt gaaggagaat ctttagaatg gaagaattta 1200
aatttagaag ttgttgatat ggacggtgct agaatagata aggttatagt aaataaaata 1260
gaaaaaactg atgaaaagaa tgattcagac actgaa                          1296
```

<210> 62
<211> 432
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 62

```
Met Asp Ile Ile Ile Ile Ile Val Leu Ile Leu Leu Asn Gly Ile Phe
 1               5                  10                  15
Ala Met Ser Glu Ile Ala Val Ile Ser Ala Arg Lys Ser Ser Leu Met
            20                  25                  30
Lys Asp Ser Lys Glu Gly Asn Lys Gly Ala Lys Thr Ala Leu Ala Leu
        35                  40                  45
Ala Asp Asn Pro Asp Lys Phe Leu Ser Thr Ile Gln Ile Gly Ile Thr
    50                  55                  60
Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Ile Tyr Ser Gly Asp Thr Val Ala Lys
65                  70                  75                  80
Glu Val Ser Asn Leu Leu Val Lys Ile Asn Val Pro Leu Asn Tyr Ala
                85                  90                  95
Ser Leu Ile Ala Gln Val Leu Val Val Ala Leu Val Thr Tyr Leu Thr
```

```
            100                 105                 110
Leu Ile Phe Gly Glu Leu Val Pro Lys Arg Ile Gly Met Val Met Pro
        115                 120                 125
Glu Arg Ile Ala Lys Val Val Ala Ala Pro Met Thr Ile Leu Ala Lys
    130                 135                 140
Ile Gly Ala Pro Phe Val Trp Ile Leu Ser Asn Ser Ala Leu Leu Val
145                 150                 155                 160
Ser Arg Val Leu Gly Ile Lys Asp Asp Lys Ser Pro Val Thr Glu Glu
                165                 170                 175
Glu Ile Lys Ser Met Ile Glu Glu Gly Arg Gln Gly Gly Glu Val Lys
            180                 185                 190
Glu Ile Glu Gln Asn Ile Ile Glu Arg Ala Phe Phe Leu Gly Asp Arg
        195                 200                 205
Lys Ile Glu Ser Ile Met Thr His Arg Asn Asp Met Val Phe Leu Asp
    210                 215                 220
Ile Asn Met Ser Asn Asp Glu Ile Lys Lys Ile Val Ser Lys His Ser
225                 230                 235                 240
Phe Ser Ala Tyr Pro Val Val Asp Lys Asn Leu Asp Asn Ile Val Gly
                245                 250                 255
Val Val Arg Val Thr Asp Ile Phe Asp Lys Leu Asn Thr Ser Lys Ala
            260                 265                 270
Lys Ile Glu Lys Phe Val Lys Lys Ala Asn Tyr Phe His Asn Asn Met
        275                 280                 285
Glu Val Tyr Leu Val Leu Glu Glu Met Lys Lys Asn Asn Thr Lys Ile
    290                 295                 300
Gly Leu Val Ser Asp Glu Phe Gly Asn Ile Asp Gly Met Ile Thr Gln
305                 310                 315                 320
Ser Asp Ile Phe Glu Ala Leu Val Gly Ser Val Thr Glu Gly Lys Asp
                325                 330                 335
Ser Lys Asp Ile Arg Lys Arg Lys Ser Gly Ser Trp Phe Val Asp Gly
            340                 345                 350
Gln Cys Pro Met Tyr Asp Phe Leu Glu Tyr Phe Glu Ile Glu Asp Glu
        355                 360                 365
Asn Ala Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Leu Ile Leu Glu Leu
    370                 375                 380
Leu Gln His Val Pro Ser Glu Gly Glu Ser Leu Glu Trp Lys Asn Leu
385                 390                 395                 400
Asn Leu Glu Val Val Asp Met Asp Gly Ala Arg Ile Asp Lys Val Ile
                405                 410                 415
Val Asn Lys Ile Glu Lys Thr Asp Glu Lys Asn Asp Ser Asp Thr Glu
            420                 425                 430
```

<210> 63
<211> 2940
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 63
atgcgaatct ttatcttgtt attatttaca ttgattttta atgtatgttt atatgctcag 60
gatactaatg taaataatac agcagcaaca aataatacta ctgcagcaac caataatgta 120
ggcgaaagtg caataatgca gataaataga tttgatgcta aaagaaatcc tgtatcattt 180
attaatttag ttaattttac accatattat gtattgcagg aatatgctag ggttaataat 240
atagaaattt atccctatga tactgaaagt acattaagag caagaatcat tgaaagacaa 300
gtaaatataa aacaggaagt tattaataat aaagatgaaa tacgcgaagt agcaagaaca 360
actataaata gaggcggtgc tcaggtagaa cttataggtg cagattttgc tgaaagatat 420
accatagatg aagcaggtga agagcttata tcattatatg gtaatgttac catgaaaatg 480
tataataata cattagttgc tgataaggtt gtttatagct taaaaacagg agaagttttt 540
gcttcaggaa atttaactgt agcatctgaa ggaagtactt tcaaaggtga atggtttatg 600
cttaatagag aaagtaaaag aggcatacta ttcggcggaa atacgaaatt catgagtttt 660
acagttgaag ggcgtataat taaatttaat gaccaagatt tttttgctga aaacagcagt 720

```
gtgagttttt cacgtcttac tcctatagcg catgattttt tagcgagtag agtttatctt 780
tgggatacta aaaagatgat ggttttcaat agtatctata gggtaggaag acagcctgta 840
ttttattttc cattatttat acagaataat tttggtactg gtataatatc ttcttttggg 900
cagtctttga gagaaggtgt ttatattcaa aattataaga tatttaattt atatggtgtg 960
cagcataaga taagattcga tgcctatcag aaattaggtt ttttattagg agatgaaata 1020
aggtatacaa gtcagtatca ggatttagca cttgatgcta tgtttgcttt tggaaggcag 1080
tattatttat ttgattccta tattacttca agtgtaggat ttggtacaag gtatgttaac 1140
tattttggat caggtgaagg cggaaagttt gtaccaagat ataaatttca atatgatcat 1200
accattcaat tatataatag tcaaaatata aatagttata ttacaggaaa gttaaattta 1260
aatagcgact tatatttcag atctgatttt tacaatcaaa gaggacagtt tgatatatta 1320
acatttttta catcacttac aggaaatttg caggacatag gagattctta tcctgaaaat 1380
tatattgaaa attctgttta tcttaataat aatatttacg gacttaattt aaaagttggt 1440
gcagaatggg atttagaatc tgttagaaat atatcggttg atgttaatac taatttcgac 1500
tattatatgc ctaaaccata taaacttgta cttccttctg tagaagctag ttacaattct 1560
atatttggaa atgagacatc ttattacttt ccaaatctta acattaacta taatttaaga 1620
gctaattata atcatactat aaattataag acttctgaag gtattgcttt ttataacaat 1680
cctatgcttg actcacaatt aaatgataaa cttgctgaaa gagataatct taatttacat 1740
ggtgatatat caagagcttt tactaatgat tttttaagat ttgtacctag ctttaatatg 1800
gaatactcat atcaaaatag tatagatcct aaagcagaag atttgattta tgataaagat 1860
aatacttact ttggtatagg cacaggaatg aatttttcta tgttttacc ttacagtata 1920
ttgccatatg atttcacaag atattttgaa cctactgtta gatgggatac aacatataca 1980
ttgggatata gatttaaaga aaaatacatt gatacagatt ataaagattc tcaattcggt 2040
gaatttaata atcatagctt tacaactaga ttttctatgg gcggaaccgg atacagctta 2100
ttttatttgc ctgatttgaa tctcaatatg gaaacattta taactacagg ttatgatttt 2160
atacctagtt ataattcaga aacaagaact tatcaagttg aattttctac aaataaaatg 2220
cttacaactg aagtaggtgc ttcagcaaga cttttatata atcaatctta tgtttcttat 2280
gatataacta gaaatttatt aggaactaat ttaacagcaa atagaataaa tgcatatttt 2340
cactttccta tacctttagg taaaattaca gattggattt taataaaaaa caataaaaga 2400
cctttctttg atggtatagt taatgatttt aatttatatt ttggttttgc ctttactcat 2460
gattttataa attatagata taatactacc gcatttacat ttggtataga gcttcaggtt 2520
ttggaacaat ggaaatttag aatagcaact actagtgcaa atgagaatgc atatagatat 2580
ataaaatctt atgcagaaaa agaaaatcaa acttgggtta atccttttg ggatatcata 2640
aattcattca atttctctga cagtaaaaaa agaactgaaa gtttatttaa attaaaatct 2700
atagaagcta gtgtttggca tgaattagac ggatggcaga ttcaggctac atttgctgta 2760
agaccttcta ctctcccttc tgatattact tcaggttcag taaaaggagt ttattggaac 2820
aaggagtttt ggattgaatt tactcttaca gactttccta atgttggatt gcctaagaaa 2880
gaatataatc ttaatagtac tattaccgat ttacaagata gtgctgctgt tactactcca 2940
```

<210> 64
<211> 980
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 64

```
Met Arg Ile Phe Ile Leu Leu Leu Phe Thr Leu Ile Phe Asn Val Cys
 1               5                  10                  15
Leu Tyr Ala Gln Asp Thr Asn Val Asn Asn Thr Ala Ala Thr Asn Asn
            20                  25                  30
Thr Thr Ala Ala Thr Asn Asn Val Gly Glu Ser Ala Ile Met Gln Ile
        35                  40                  45
Asn Arg Phe Asp Ala Lys Arg Asn Pro Val Ser Phe Ile Asn Leu Val
    50                  55                  60
Asn Phe Thr Pro Tyr Tyr Val Leu Gln Glu Tyr Ala Arg Val Asn Asn
65                  70                  75                  80
Ile Glu Ile Tyr Pro Tyr Asp Thr Glu Ser Thr Leu Arg Ala Arg Ile
                85                  90                  95
Ile Glu Arg Gln Val Asn Ile Lys Gln Glu Val Ile Asn Asn Lys Asp
            100                 105                 110
Glu Ile Arg Glu Val Ala Arg Thr Thr Ile Asn Arg Gly Gly Ala Gln
        115                 120                 125
```

```
Val Glu Leu Ile Gly Ala Asp Phe Ala Glu Arg Tyr Thr Ile Asp Glu
    130                 135                 140
Ala Gly Glu Glu Leu Ile Ser Leu Tyr Gly Asn Val Thr Met Lys Met
145                 150                 155                 160
Tyr Asn Asn Thr Leu Val Ala Asp Lys Val Val Tyr Ser Leu Lys Thr
                165                 170                 175
Gly Glu Val Phe Ala Ser Gly Asn Leu Thr Val Ala Ser Glu Gly Ser
            180                 185                 190
Thr Phe Lys Gly Glu Trp Phe Met Leu Asn Arg Glu Ser Lys Arg Gly
        195                 200                 205
Ile Leu Phe Gly Gly Asn Thr Lys Phe Met Ser Phe Thr Val Glu Gly
    210                 215                 220
Arg Ile Ile Lys Phe Asn Asp Gln Asp Phe Phe Ala Glu Asn Ser Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Phe Ser Arg Leu Thr Pro Ile Ala His Asp Phe Leu Ala Ser
                245                 250                 255
Arg Val Tyr Leu Trp Asp Thr Lys Lys Met Met Val Phe Asn Ser Ile
            260                 265                 270
Tyr Arg Val Gly Arg Gln Pro Val Phe Tyr Phe Pro Leu Phe Ile Gln
        275                 280                 285
Asn Asn Phe Gly Thr Gly Ile Ile Ser Ser Phe Gly Gln Ser Leu Arg
    290                 295                 300
Glu Gly Val Tyr Ile Gln Asn Tyr Lys Ile Phe Asn Leu Tyr Gly Val
305                 310                 315                 320
Gln His Lys Ile Arg Phe Asp Ala Tyr Gln Lys Leu Gly Phe Leu Leu
                325                 330                 335
Gly Asp Glu Ile Arg Tyr Thr Ser Gln Tyr Gln Asp Leu Ala Leu Asp
            340                 345                 350
Ala Met Phe Ala Phe Gly Arg Gln Tyr Tyr Leu Phe Asp Ser Tyr Ile
        355                 360                 365
Thr Ser Ser Val Gly Phe Gly Thr Arg Tyr Val Asn Tyr Phe Gly Ser
    370                 375                 380
Gly Glu Gly Gly Lys Phe Val Pro Arg Tyr Lys Phe Gln Tyr Asp His
385                 390                 395                 400
Thr Ile Gln Leu Tyr Asn Ser Gln Asn Ile Asn Ser Tyr Ile Thr Gly
                405                 410                 415
Lys Leu Asn Leu Asn Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Ser Asp Phe Tyr Asn
            420                 425                 430
Gln Arg Gly Gln Phe Asp Ile Leu Thr Phe Phe Thr Ser Leu Thr Gly
        435                 440                 445
Asn Leu Gln Asp Ile Gly Asp Ser Tyr Pro Glu Asn Tyr Ile Glu Asn
    450                 455                 460
Ser Val Tyr Leu Asn Asn Asn Ile Tyr Gly Leu Asn Leu Lys Val Gly
465                 470                 475                 480
Ala Glu Trp Asp Leu Glu Ser Val Arg Asn Ile Ser Val Asp Val Asn
                485                 490                 495
Thr Asn Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Lys Pro Tyr Lys Leu Val Leu Pro
            500                 505                 510
Ser Val Glu Ala Ser Tyr Asn Ser Ile Phe Gly Asn Glu Thr Ser Tyr
        515                 520                 525
Tyr Phe Pro Asn Leu Asn Ile Asn Tyr Asn Leu Arg Ala Asn Tyr Asn
    530                 535                 540
His Thr Ile Asn Tyr Lys Thr Ser Glu Gly Ile Ala Phe Tyr Asn Asn
545                 550                 555                 560
Pro Met Leu Asp Ser Gln Leu Asn Asp Lys Leu Ala Glu Arg Asp Asn
                565                 570                 575
Leu Asn Leu His Gly Asp Ile Ser Arg Ala Phe Thr Asn Asp Phe Leu
            580                 585                 590
Arg Phe Val Pro Ser Phe Asn Met Glu Tyr Ser Tyr Gln Asn Ser Ile
        595                 600                 605
Asp Pro Lys Ala Glu Asp Leu Ile Tyr Asp Lys Asp Asn Thr Tyr Phe
```

```
    610                 615                 620
Gly Ile Gly Thr Gly Met Asn Phe Ser Met Phe Leu Pro Tyr Ser Ile
625                 630                 635                 640
Leu Pro Tyr Asp Phe Thr Arg Tyr Phe Glu Pro Thr Val Arg Trp Asp
                645                 650                 655
Thr Thr Tyr Thr Leu Gly Tyr Arg Phe Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Thr
            660                 665                 670
Asp Tyr Lys Asp Ser Gln Phe Gly Glu Phe Asn Asn His Ser Phe Thr
        675                 680                 685
Thr Arg Phe Ser Met Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Leu Phe Tyr Leu Pro
    690                 695                 700
Asp Leu Asn Leu Asn Met Glu Thr Phe Ile Thr Thr Gly Tyr Asp Phe
705                 710                 715                 720
Ile Pro Ser Tyr Asn Ser Glu Thr Arg Thr Tyr Gln Val Glu Phe Ser
                725                 730                 735
Thr Asn Lys Met Leu Thr Thr Glu Val Gly Ala Ser Ala Arg Leu Leu
            740                 745                 750
Tyr Asn Gln Ser Tyr Val Ser Tyr Asp Ile Thr Arg Asn Leu Leu Gly
        755                 760                 765
Thr Asn Leu Thr Ala Asn Arg Ile Asn Ala Tyr Phe His Phe Pro Ile
    770                 775                 780
Pro Leu Gly Lys Ile Thr Asp Trp Ile Leu Ile Lys Asn Asn Lys Arg
785                 790                 795                 800
Pro Phe Phe Asp Gly Ile Val Asn Asp Phe Asn Leu Tyr Phe Gly Phe
                805                 810                 815
Ala Phe Thr His Asp Phe Ile Asn Tyr Arg Tyr Asn Thr Thr Ala Phe
            820                 825                 830
Thr Phe Gly Ile Glu Leu Gln Val Leu Glu Gln Trp Lys Phe Arg Ile
        835                 840                 845
Ala Thr Thr Ser Ala Asn Glu Asn Ala Tyr Arg Tyr Ile Lys Ser Tyr
    850                 855                 860
Ala Glu Lys Glu Asn Gln Thr Trp Val Asn Pro Phe Trp Asp Ile Ile
865                 870                 875                 880
Asn Ser Phe Asn Phe Ser Asp Ser Lys Lys Arg Thr Glu Ser Leu Phe
                885                 890                 895
Lys Leu Lys Ser Ile Glu Ala Ser Val Trp His Glu Leu Asp Gly Trp
            900                 905                 910
Gln Ile Gln Ala Thr Phe Ala Val Arg Pro Ser Thr Leu Pro Ser Asp
        915                 920                 925
Ile Thr Ser Gly Ser Val Lys Gly Val Tyr Trp Asn Lys Glu Phe Trp
    930                 935                 940
Ile Glu Phe Thr Leu Thr Asp Phe Pro Asn Val Gly Leu Pro Lys Lys
945                 950                 955                 960
Glu Tyr Asn Leu Asn Ser Thr Ile Thr Asp Leu Gln Asp Ser Ala Ala
                965                 970                 975
Val Thr Thr Pro
            980
```

<210> 65
<211> 1611
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 65
atgtcagaga ataaaacagt aagtaaagaa aagatagcta aatcatcatt aaaaatgtca 60
ttggtaacta ctgtaagcag agtattcgga cttgtaagag atcaaataca ggcggctttg 120
cttggtacta cattcatagc agatgctttt gcaataggat ttatacttcc aaatttattg 180
aggcgattat ttgctgaagg caatatggtt gcaagcttta tacctgtatt tacagagctt 240
gaaaaagaaa aaggtattga agaatcaaag aaatttttta gggcagtttt tacattattg 300
ggattaatac ttatagtagt tgtaggcatc ggaataataa tatctccttt gcttgtaaaa 360

```
atactttata aatctgcaca taataatata gaagcactta atttggcatc ggatctatca 420
agaataatgt ttccttatct tctatttata tctttggcag ctttgatgca gggcgtactt 480
aatataagag gctattattc aatatcagct gcaagtccta tacttttaaa tactgtaatt 540
atatctatgg ctttgttctt taaattcttt ttacctaatt tttttaataa tatggcttat 600
gtatttgcat ttgctgtgct gcttggtgga ttcgtacagt ttgcctatca aatgcctttt 660
gtacataaac aaggttttag tttcaagcct tattttcatt ttaaagaacc ctatgtcata 720
aagatgataa aattatttgc tcctggtatt ttcggagcta gtatatatca gataaatttg 780
cttgtttcta ctgcatttgc tggagctatt ggagagggca gggtttcagc tgttactttt 840
gctactagaa tacatgaatt tgttttgggc gtttttgctg tgagtgtggc aactgttatg 900
cttcctactt taagtaaatt aatagctgat aataaaaaag atgaagctgt tgaaaattta 960
ggatattctt taaggcttgt tgctttagtt actattcctg ctactttcgg atttgtggta 1020
cttggcagag aaattgtaag aatgatattt gaatatggag ctttttcttc aaaatctaca 1080
tatttagtat cgagtgcttt aagatattta tccatatcct tattctttgt ggcaagctat 1140
agaatacttg tacagtcatt ttatgctatg aaagatatga aaactcctgt atatgtggca 1200
ttttttacct ttattattaa tgctgttagt aattatttat gtgtttatat atttaaattc 1260
gatattatag gaatatctat atcaagtgtt gttgcaaata ttgtatcttt ttgtatacta 1320
tatatattgc ttataaagag aatggcagtg aaatcgataa taaataaaaa aattgaggtt 1380
gtaaagacat tggctgctag tttatttatg gctgcttctg tctatggaat gaaatattat 1440
ttattataca gcaatgccga ttctaggata atttttataa ttaaagtatt tatagtgata 1500
ttattaggag ttgttgttta ttctataatg aacattatat taagaaatga tgattttgtt 1560
tcctttatta gtatgtttaa aggcagatta tcaagaaagt ttctgaaaaa a          1611
```

<210> 66
<211> 537
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 66

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

```
            260                 265                 270
Gly Arg Val Ser Ala Val Thr Phe Ala Thr Arg Ile His Glu Phe Val
        275                 280                 285
Leu Gly Val Phe Ala Val Ser Val Ala Thr Val Met Leu Pro Thr Leu
    290                 295                 300
Ser Lys Leu Ile Ala Asp Asn Lys Lys Asp Glu Ala Val Glu Asn Leu
305                 310                 315                 320
Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Val Ala Leu Val Thr Ile Pro Ala Thr Phe
                325                 330                 335
Gly Phe Val Val Leu Gly Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Phe Glu Tyr
            340                 345                 350
Gly Ala Phe Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Leu Val Ser Ser Ala Leu Arg
        355                 360                 365
Tyr Leu Ser Ile Ser Leu Phe Phe Val Ala Ser Tyr Arg Ile Leu Val
    370                 375                 380
Gln Ser Phe Tyr Ala Met Lys Asp Met Lys Thr Pro Val Tyr Val Ala
385                 390                 395                 400
Phe Phe Thr Phe Ile Ile Asn Ala Val Ser Asn Tyr Leu Cys Val Tyr
                405                 410                 415
Ile Phe Lys Phe Asp Ile Ile Gly Ile Ser Ile Ser Ser Val Val Ala
            420                 425                 430
Asn Ile Val Ser Phe Cys Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ile Lys Arg Met
        435                 440                 445
Ala Val Lys Ser Ile Ile Asn Lys Lys Ile Glu Val Val Lys Thr Leu
    450                 455                 460
Ala Ala Ser Leu Phe Met Ala Ala Ser Val Tyr Gly Met Lys Tyr Tyr
465                 470                 475                 480
Leu Leu Tyr Ser Asn Ala Asp Ser Arg Ile Ile Phe Ile Ile Lys Val
                485                 490                 495
Phe Ile Val Ile Leu Leu Gly Val Val Val Tyr Ser Ile Met Asn Ile
            500                 505                 510
Ile Leu Arg Asn Asp Asp Phe Val Ser Phe Ile Ser Met Phe Lys Gly
        515                 520                 525
Arg Leu Ser Arg Lys Phe Leu Lys Lys
    530                 535
```

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 67
aaacgtttat attttatttt atc 23

<210> 68
<211> 18
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 68
aaacttccaa gtgatacc 18

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 69
aaatataaac ctacaagcag 20

<210> 70
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 70
aatatttcag ttaatctaaa atc 23

<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 71
actttaatct ttgtattaat tttg 24

<210> 72
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 72
ttgttttaat ttgataatat cag 23

<210> 73
<211> 29
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 73
aaaaaaatta ttttattaat atttatatt 29

<210> 74
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 74
ttctcttata atctttacag ttg 23

<210> 75
<211> 19
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 75
catatttctg gtgattctc 19

<210> 76
<211> 27
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 76
ttttttgata aataagtttt ttatttg 27

<210> 77
<211> 28
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 77
tttaatactc ctatattatt aattattt 28

<210> 78
<211> 18
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 78
aaggagaatc accagaaa 18

<210> 79
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 79
aatgatatta ttaaagtgat aaa 23

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 80
aaaatctaat ataacggatt 20

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 81
aaatatgctt ccattatagg 20

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 82
acttttagga agaagtttaa c 21

<210> 83
<211> 25
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 83
tatattttca ttatatattt attag 25

<210> 84
<211> 18
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 84
ctaggcatag attttcca 18

<210> 85
<211> 22

<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 85
tttgccatgt cggaaattgc ag 22

<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 86
tattctagca ccgtccatat c 21

<210> 87
<211> 23
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 87
gtatgtttat atgctcagga tac 23

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 88
aacagcagca ctatcttgta a 21

<210> 89
<211> 24
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 89
cagcagcaac aaataatact actg 24

<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 90
tgaatataaa caccttctct caaag 25

<210> 91
<211> 26
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 91
aaaatgtcat tggtaactac tgtaag 26

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 92
cttgataatc tgcctttaaa catac 25

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 93
atgtgaggaa aaaacagaaa g 21

<210> 94
<211> 22
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 94
tcattaccag aaaaccatac tc 22

<210> 95
<211> 27
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 95
aggaaataaa gctcctgctg cttcagc 27

<210> 96
<211> 26
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 96
gcatagcagc aacttcagaa ggtcca 26

<210> 97
<211> 24
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 97
cttattaatt ggtataggaa aacc 24

<210> 98
<211> 25
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 98
aatctatgtt cttgatttat tagcc 25

<210> 99
<211> 27
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 99
agaagctact tttggacctt GGCCTGT 27

<210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 100
acacagtcaa caccaagagc 20

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 101
aaacagcaga ctagctggtg 20

<210> 102
<211> 27
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 102
tgaccattac ttacaccgga tacccca 27

<210> 103
<211> 30
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 103
ttaatgacta tatcgctttc atacactttc 30

<210> 104
<211> 29
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 104
tcaattcttc cagacataaa atcagtaag 29

<210> 105
<211> 22
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 105
tatatagagt gggtatcaga ag 22

<210> 106
<211> 22
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 106
tcataatggt atttacaaga tg 22

<210> 107
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTrcHis-F primer

<400> 107

caatttatca gacaatctgt gtg 23

<210> 108
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTrcHis-R primer

<400> 108
tgcctggcag ttccctactc tcg 23

latin trademarks america patents

COLOMBIA

ORDEN DE RADICAR UNA SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE INVENCIÓN

INSTRUCTIONS REGARDING A DIVISION PATENT APPLICATION

Sólo para empresas (Favor omitir si es persona natural)	**For corporations only (Please leave blank if not applicable)**
En mi carácter de (Cargo en la empresa):	In ~~my~~ our capacity as (Job title): Authorized Signatories
De la compañía (Nombre de la compañía):	Of the company (Name of the company): Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
Una empresa constituida bajo las leyes de (Indique el país/jurisdicción):	A corporation organized under the laws of (Enter the country/jurisdiction): Germany
Domiciliada en (Domicilio de la empresa):	Domiciled at (Domicile of the corporation): Binger Str. 173 55216 Ingelheim am Rhein Germany

Solicito que mis apoderados los señores ALVARO RAMÍREZ BONILLA TP. 118.770., c.c. 79.790.039; MARTHA BONILLA, T.P.. 41527., c.c. 41.566.976; Eliana REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, domiciliados en la Carrera 13 No. 29 – 21 Of 241, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1 o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal, el segundo y la tercera como suplente como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, radiquen ante su despacho una solicitud de división de la solicitud de patente titulada "Nuevos Genes y proteínas de Brachyspira hyodysenteriae y el uso de los mismos." Radicada bajo el expediente No 10-24772. La solicitud divisional tendrá como titulo "Nuevos Genes y proteínas de Brachyspira hyodysenteriae

~~I~~ we request that our representatives Mr. ALVARO RAMIREZ BONILLA, TP. 118.770 C.C.79.790.039; Ms. MARTHA BONILLA, T.P.. 41527., c.c. 41.566.976 and Mrs Eliana REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, domiciled at Carrera 13 No. 29 – 21 Of 241, Bogota, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal, the second and third as alternate, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court, to file a divisional patent application of the patent application named "Nuevos Genes y proteínas de Brachyspira hyodysenteriae" with the application number 10-24772. The

y el uso de los mismos.", y contendrá una serie de reivindicaciones, las cuales serán relacionadas y seleccionadas por nuestros apoderados arriba mencionados, según instrucción previa.

new patent divisional application will have as title "Nuevos Genes y proteínas de Brachyspira hyodysenteriae y el uso de los mismos" and it will comprise a set of claims which it will be related and selected by our before noted representatives, according to our previous instructions.

Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
i.V.
ppa.
Dr. Gerard BEHRENS
Dr. Holger SEITZ

Firma del representante legal / Signature of the Legal Representative

April 12, 2013 Ingelheim am Rhein

Firmado en la fecha y lugar/Signed on the date and place

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 05 / 06 / 13 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		

Tipo de Radicación: Entrada: ☑ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-96189	0	
2	10-24772	13	
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	**Soporte Documental**
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
De los 6 Archivos Adjuntos A' Este CD Solo 5 Fueron subidos al sistema por encontrarse en Formato PDF

Yenny Arteaga