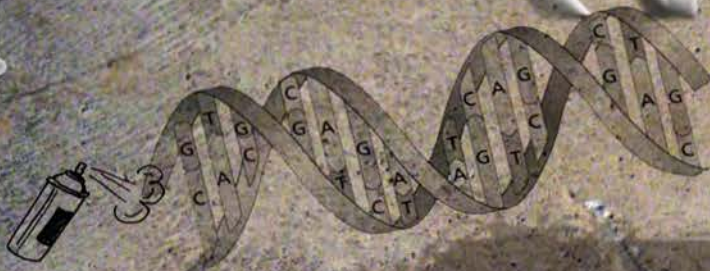


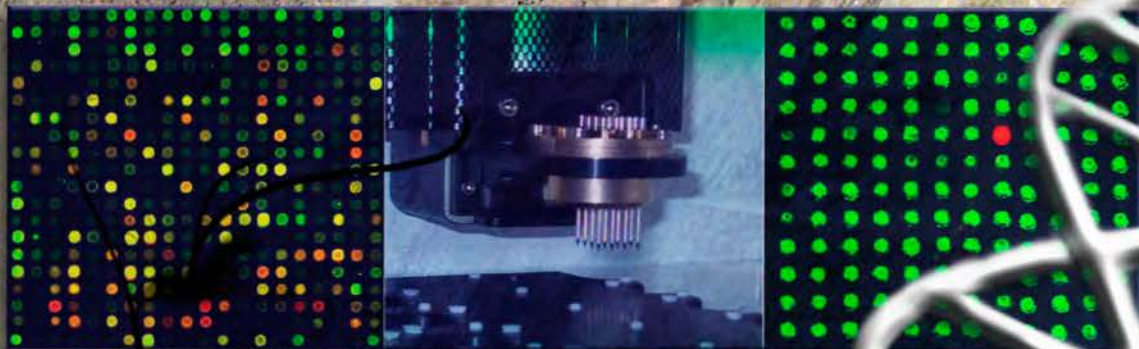
Andrea Guridi Cortaberria
Tesis Doctoral
Vitoria-Gasteiz , 2011



Genomotipificación de *Campylobacter jejuni*
mediante *microarrays* de ADN.

Análisis de marcadores y diversidad genética

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

Genomotipificación de *Campylobacter jejuni* mediante *microarrays* de ADN. Análisis de marcadores y diversidad genética

Andrea Guridi Cortaberria

Vitoria-Gasteiz, 2011



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

en reunión celebrada el día 26 de septiembre de 2011 ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada: Genomotipificación de *Campylobacter jejuni* mediante *microarrays* de ADN. Análisis de marcadores y diversidad genética


dirigida por los Dres. AURORA FERNÁNDEZ ASTORGA y RODRIGO ALONSO MONSALVE

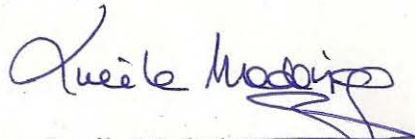
y presentada por Dña. ANDREA GURIDI CORTABERRIA
ante este Departamento.

En Leioa, a 29 de noviembre de 2011

Vº Bº DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

SECRETARIA DEL DEPARTAMENTO


Fdo.: Ramón Cisterna Cancér

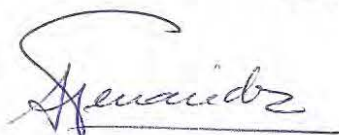

Fdo.: Lucila Madariaga Torres

**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Dres. AURORA FERNÁNDEZ ASTORGA y RODRIGO ALONSO MONSALVE
como Directores de la Tesis Doctoral: GENOMOTIPIFICACIÓN DE *Campylobacter jejuni* MEDIANTE *MICROARRAYS* DE ADN. ANÁLISIS DE MARCADORES Y DIVERSIDAD GENÉTICA / *Campylobacter jejuni*ren GENOMOTIPIFIKAZIOA DNA *MICROARRAYEN* BIDEZ. MARKATZAILEEN ETA DIBERTSITATE GENETIKOAREN ANALISIA
realizada en el Departamento INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
por la Doctoranda Dña. ANDREA GURIDI CORTABERRIA
autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Vitoria-Gasteiz a 29 de noviembre de 2011

LOS DIRECTOR/A DE LA TESIS



Fdo.: Aurora Fernández Astorga



Fdo.: Rodrigo Alonso Monsalve

ACTA DE GRADO DE DOCTOR
ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO D^{ÑA}. ANDREA GURIDI CORTABERRIA

TITULO DE LA TESIS: Genomotipificación de *Campylobacter jejuni* mediante *microarrays* de ADN. Análisis de marcadores y diversidad genética / *Campylobacter jejuni*ren genomotipifikazioa DNA *microarray*en bidez. Markatzaileen eta dibertsitate genetikoaren analisisa

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:
unanimidad ó mayoría

Idioma/s defensa: _____

En _____ a _____ de _____ de _____

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

Dr/a: _____

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: _____

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes Proyectos de Investigación:

1. Búsqueda de posibles marcadores genéticos de atribución de fuente en *Campylobacter jejuni* utilizando *arrays* de ADN. MEC: AGL 2008-03626/ALI. (2009-2011).
2. Epidemiología molecular de *Campylobacter* y *Arcobacter*. Grupos de Investigación Consolidados del Sistema Universitario Vasco financiado por el Gobierno Vasco (DEUI): IT-528-10 (2010-2016).

Por otra parte, la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) ha financiado también este trabajo mediante la concesión de la siguiente beca:

1. Ayuda para la Formación de Personal Investigador en la UPV/EHU (2007-2011).

El trabajo incluido en la presente Tesis Doctoral ha sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos.

- **Guridi, A.**, Velasco, H., Martínez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Fernández-Astorga, A. and R. Alonso. Genomotyping Analysis by DNA Microarray of *Campylobacter jejuni* Strains from Different Countries. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Vancouver (Canada) 2011. CHRO 2011.

- **Guridi, A.**, Velasco, H., Girbau, C., Martínez-Malaxetxebarria, I., Alonso, R. and A. Fernández-Astorga. Presence of Integrated-elements (CJIE) in *Campylobacter jejuni* Strains from Different Countries. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Vancouver (Canada) 2011. CHRO 2011.

- Martínez, A., Alonso, R., Girbau, C., **Guridi, A.**, Martínez, I., Hofshagen, M. and A. Fernández Astorga. Clonal complexes determined by MLST among *flaA*-SVR type 32 *C. jejuni* strains from Norway. 3rd congress of European Microbiologist (FEMS 2009). Gothenburg (Sweden).

- Velasco, H., Girbau, C., Alonso, R., **Guridi, A.**, Martínez, I. and A. Fernández-Astorga. Multilocus sequence typing of *C. jejuni* isolates *flaA*-SVR type 34 from humans and poultry in the Basque Country (Spain). 3rd congress of European Microbiologist (FEMS 2009). Gothenburg (Sweden).

- Wassenaar, T.M., Fernández-Astorga, A., Marteinsson, V., Girbau, C., Mateo, E., **Guridi, A.**, Magnusson, S., Gunnarson, E., Hardardottir, H. and M. Hofshagen. Comparison of *Campylobacter flaSVR* genotype isolated from humans and poultry in three European regions. International *Campylobacter* Workshop in Montreal (Canada) 2008.

- Fernández-Astorga, A., Martínez, I., Churruca, E., Girbau, C., **Guridi, A.** and R. Alonso. Putative genetic markers for association with infection source in *Campylobacter jejuni*. 14th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Rotterdam (The Netherlands) 2007. CHRO 2007.

- Fernández-Astorga, A., **Guridi, A.**, Martínez, I., Girbau, C., Churruca, E. and R. Alonso. Potenciales marcadores genéticos de *Campylobacter jejuni* asociados a patogénesis y fuente de infección. XXI Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Sevilla 2007.

Creo que estas líneas quizás sean las más difíciles de redactar, han sido muchas las personas que han contribuido de una manera u otra en la realización de este trabajo, aportando conocimientos, amistad, ayuda y sobre todo cariño. Sin todos ellos, nada hubiera sido posible. Por ello, llegó el momento de agradecer...

Al Dr. Ramón Cisterna Cáncer, director del Departamento, por permitir que realizase mi Tesis Doctoral en este Departamento.

A la Dra. Aurora Fernández-Astorga, directora de esta tesis, por haberme dado la gran oportunidad de conocer todo lo que rodea al mundo de la ciencia trabajando en su equipo, pero sobre todo, por confiar en mí para este trabajo aportando sus conocimientos, consejos y experiencia. De igual manera, al Dr. Rodrigo Alonso, director de esta tesis, por haber podido contar siempre con su indispensable ayuda, por su paciencia y apoyo, y por enseñarme muchísimas técnicas y trucos.

Al Banco de ADN (SGIker), por dejarme utilizar el escáner pese a molestar a muchos de sus integrantes con mis entradas y salidas a horas intempestivas. Mila esker Naiara!

A Águeda, Eli y Karmele, profesoras del Departamento, porque uno de los peores días de mi vida sentí vuestro gran apoyo.

A la Dra. Marijo Madeira, por su gran paciencia y por haberme ayudado desinteresadamente con el mundo de la filogenia. Eskerrik asko bihotz-bihotzez!

A la Dra. Itziar Txurruka, euskara aipamenerako behar izan dudun dokumentazio guztia aurkitzen laguntzeagatik. Esker anitz!

A la Dra. Kate Gould y la Dra. Beatriz Quiñones, porque aunque estéis lejos de aquí habéis colaborado mucho en esta tesis. ¡Gracias por ayudarme a resolver todas esas malditas dudas!

A **CVI**, Central Veterinary Institute Lelystad, The Netherlands; **DMIB**, Division of Molecular Infection Biology, Utrecht University; **ESR**, Institute of Environmental Science and Research, New Zealand; **USDA**, Produce Safety and Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, California; **SVS**, School of Veterinary Science, University of Queensland, Australia, por haber contribuido en esta tesis con el aporte desinteresado y generoso de cepas con un exquisito trato.

A la Dra. Beatriz Valle (Fundación LEIA), por ayudarme a contactar con grandes expertos en este mundo y recordarme lo importante que es la constancia y la paciencia en la ciencia.

A mis compañeros *Campyadictos*: Bárbara, Cecius, Estitxu, Esti, Héctor e Irati, por todas esas charlas que hemos compartido en las que ojalá os haya ayudado tanto como vosotros a mí, porque me llevo algo más que unos compañeros, nos vemos en "algún" laboratorio o isla. A mis compañeros del Departamento: Aitor, Ana, Andoni, Blanca, Carolina, Eleni, Eli, Lorena, Idoia, Ilargi, Izaskun, Maialen, Maite, María Sephard, Raúl, Tere y Toño, ¡Gracias por escucharme y hacerme ver la ciencia desde otro punto de vista! ¡Gracias por todos vuestros ánimos cuando se me ocurría ser pesimista! Ha sido muy importante para mí teneros como compañeros estos años y además, un placer! A los pequeños Julius, Lucas y Valeria, porque nacisteis durante este largo caminar, porque sois los futuros *frikis* de la cuadrilla!

A mi kuadrilla de Sukarrieta, porque nunca olvidaré ningún verano y aunque no estéis cerca, me habéis acompañado en este camino con vuestro cariño. Eskerrik asko, Itzi!!

A la kuadrilla de Agurain, por ayudarme a sacar una sonrisa y por interesarse siempre por la marcha de mi tesis!

A la kuadrilla de Amurrio, por todas esas excursiones y escapadas que hemos compartido durante estos años y por las que haremos. ¡Me han hecho sonreír siempre! ¡Porque os ha interesado más mi tesis que el Athletic! En especial: Gon, Gorki, Ibon, Itzi, Saio y Urtzi.

A todos los integrantes y ex integrantes de Algara Dantza Taldea, por la excedencia que me habéis concedido para poder centrarme de lleno en este duro camino. Pero en especial, a Txemi, mila esker lagun on baten moduan aritu izanagatik! Elena, zaren moduan izateagatik eta behar izan dudanean, zugar babesa topatu dudalako! Bidean berezi izan zaitudalako!

A Begotxu, unibertsitatean eta hemendik aurrera bizitza osorako lortutako gauza berezietariko bat izateagatik eta nire atsedendientzako sostengu izateagatik! Atzerrian ikusiko dugu elkar?

A mi kuadrilla, porque después de tantos años seguís a mi lado, porque cada uno a su manera me habéis ayudado en este duro camino. Nombraros uno a uno son demasiadas cosas por escribir y prefiero decíroslo frente a una caña, así que me conformaré con deciros que nada es más importante que teneros como amigos! Nahiz eta azken urteotan momentu asko galdu izana, inoiz ez da berandu bueltatzeko!!

A Ainaritxu, Amets, Edorta, Eider, Esther, Igarri Taberna, Lee, María, Naiara, Rosa, Sergio, Thor, Kai, Tube y Ñarra, porque no sé donde ubicaros en estos párrafos pero si tengo claro que quiero que estéis aquí y de aquí en adelante.

A aitite, por todo el cariño con el que me has tratado y la fuerza que me has transmitido durante este tiempo.

A TODA mi familia GURIDI-CORTABERRIA y SAN JUAN-BILBAO, a los que están y a los que no, porque sin vosotros nada hubiera sido igual, porque consiga lo que consiga también es vuestro. Saio, Berlinetik ere hemen sentitzen zaitut! Tío Jose, gracias por tu ayuda y tus correcciones!

A Ramontxu, azkenean nire bidai laguna, zu izan zarelako. Porque no has dejado que mirase nunca hacia abajo, porque has entendido mi actitud muchas veces, porque has estado cuando te he necesitado y cuando no. Mila esker bidai honetan izan duzun pazientzia eta eskaini didazun laguntzagatik!! Eta zuk esango zenukeen moduan: Egurre!!!!

A mi amatxu, porque siempre has estado a mi lado, porque nunca has dejado de apoyarme y por ayudarme a conseguir lo que me propongo, porque lo que soy lo soy gracias a ti.

A Aita y tío, porque siempre habéis estado dentro de mí, porque siempre me vais a acompañar, porque sé que estaríais orgullosos de mí, porque me hubiera encantado que estuvierais hoy aquí...

“Bizitzan baloreak aukeratu behar ditut, ideiak garatzean pertsona bezala hobetu”

Gorka Urbizu

*“Zuen urratsen oihartzunak
orbel arteko isiltasunean dirau”*

*“El eco de vuestros pasos
permanece en el silencio de la hojarasca”*

Iturrietako mendiak, Onraitia.



Índice

ÍNDICE	1
Índice de figuras	6
Índice de tablas.....	9
INTRODUCCIÓN	11
1. Género <i>Campylobacter</i>	13
1.1. Taxonomía y nomenclatura	14
1.2. <i>Campylobacter jejuni</i>	15
2. Campilobacteriosis	16
3. Epidemiología de las campilobacteriosis	19
3.1. Incidencia.....	19
3.2. Fuentes de infección y transmisión.....	21
4. Patogénesis y factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> spp.	22
4.1. Movilidad y quimiotaxis	23
4.2. Adhesión e invasión.....	24
4.3. Cápsula y lipooligosacáridos (LOS)	25
4.4. CDT (<i>Cytolethal Distending Toxin</i>)	26
4.5. Sistema de glicosilación.....	26
4.6. Otros	27
5. Genotipificación en <i>Campylobacter</i> spp.	27
5.1. Técnicas basadas en el análisis con enzimas de restricción	30
5.1.1. Ribotipificación.....	30
5.1.2. PFGE (<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i>).....	31
5.2. Técnicas basadas en la amplificación por PCR.....	32
5.2.1. PCR-RFLP de la flagelina	32
5.2.2. AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	33
5.2.3. RAPD (<i>Random Amplified Polimorphic ADN</i>) y AP-PCR	34
5.2.4. Rep-PCR (<i>Repetitive Element PCR</i>).....	35
5.3. Técnicas basadas en la secuenciación.....	37
5.3.1. MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)	37
5.3.2. SVR- <i>flaA</i>	38
5.3.3. SNPs (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)	39
5.4. Técnicas basadas en la hibridación.....	40
5.4.1. <i>Microarray</i> de ADN	40
6. Genomas secuenciados de <i>Campylobacter</i>	47
6.1. Genoma de <i>C. jejuni</i> NCTC11168	50
6.2. Genoma de <i>C. jejuni</i> RM1221	51

6.3.	Genoma de <i>C. jejuni</i> 81-176	53
6.4.	Regiones variables	55
6.5.	Plásmidos de <i>Campylobacter</i>	57
6.5.1.	Plásmido pVir	57
6.5.2.	Plásmido pTet / pCC31	58
6.5.3.	Plásmidos crípticos	59
7.	Inferencia filogenética	59
7.1.	Métodos de distancia	60
7.2.	Métodos discretos	61
7.3.	Árboles filogenéticos	62
OBJETIVOS		63
MATERIALES Y MÉTODOS		67
1.	Cepas bacterianas	69
1.1.	Cepas bacterianas	69
1.2.	Condiciones generales de cultivo y conservación de las cepas	70
2.	Identificación de las cepas bacterianas	70
2.1.	Extracción de ADN cromosómico	70
2.2.	Identificación genética de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> mediante PCR	71
3.	Genotipificación mediante SVR-<i>flaA</i>	73
3.1.	Amplificación del gen <i>flaA</i> mediante PCR	74
3.2.	Purificación y secuenciación de los productos de PCR	75
4.	Técnica del MLST	77
4.1.	Amplificación de los fragmentos mediante PCR	78
4.2.	Purificación de los productos de PCR	80
4.3.	Secuenciación de los fragmentos obtenidos	81
4.4.	Análisis de las secuencias	82
4.5.	Elaboración de árboles filogenéticos	83
4.6.	Relación entre secuencias tipo	83
5.	Genomotipificación mediante <i>microarrays</i> de ADN	83
5.1.	Extracción de ADN cromosómico	84
5.2.	Marcado de las muestras	84
5.3.	Control de calidad de las muestras marcadas	85
5.4.	Prehibridación del <i>microarray</i>	86
5.5.	Hibridación del <i>microarray</i>	86

5.6.	Lavados posthibridación	87
5.7.	Escaneado del <i>microarray</i>	89
5.8.	Tratamiento de datos	89
5.9.	Determinación del punto de corte	91
5.10.	Filogenómica comparativa	91
RESULTADOS		95
1.	Identificación de las cepas bacterianas mediante PCR	97
2.	Genotipificación por SVR-<i>flaA</i>.....	98
2.1.	Amplificación del gen <i>flaA</i>	98
2.2.	Secuenciación de la región SVR del gen <i>flaA</i>	99
2.2.1.	Diversidad de los alelos obtenidos.....	100
2.2.2.	Diversidad de los péptidos obtenidos	101
3.	Genotipificación por MLST	102
3.1.	Amplificación mediante PCR de los genes <i>housekeeping</i>	102
3.2.	Secuenciación	103
3.2.1.	Diversidad de las secuencias tipo (ST) obtenidas	104
3.2.2.	Diversidad de los complejos clonales (CC) asignados	106
4.	Comparativa MLST vs SVR-<i>flaA</i>	108
5.	Genomotipificación mediante <i>microarrays</i> de ADN	109
5.1.	Puesta a punto del protocolo	109
5.1.1.	Optimización del marcado de las muestras de ADN.....	109
5.1.2.	Optimización de la prehibridación del <i>microarray</i>	110
5.1.3.	Optimización de la hibridación del <i>microarray</i>	110
5.1.4.	Optimización de los lavados posthibridación del <i>microarray</i>	110
5.2.	Determinación del punto de corte	111
5.3.	Matriz binaria	113
5.3.1.	Especificidad de la técnica.....	114
5.3.2.	Matriz binaria obtenida por análisis CGH.....	115
5.4.	Porcentaje de hibridación en función de la procedencia de las sondas presentes en el <i>microarray</i>	115
5.4.1.	Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168.....	115
5.4.2.	Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa RM1221	117
5.4.3.	Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa 81-176 .	119

5.4.4.	Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a las restantes cepas	121
5.4.5.	Comparativa entre las cepas procedentes de España y Nueva Zelanda.....	122
5.5.	Filogenómica.....	123
5.5.1.	Árbol filogenómico basado en el genoma universal de <i>C. jejuni</i>	124
5.5.2.	Árbol filogenómico basado en el genoma de la cepa NCTC11168.....	125
5.5.2.1.	Árbol filogenómico por países.....	125
5.5.2.2.	Árbol filogenómico correspondientes a las cepas españolas y neozelandesas.....	126
5.5.3.	Árbol filogenómico basado en los genes correspondientes a las islas genómicas	128
5.5.3.1.	Árbol filogenómico correspondiente a CJIE1	128
5.5.3.2.	Árbol filogenómico correspondiente a CJIE2	129
5.5.3.3.	Árbol filogenómico correspondiente a CJIE3	131
5.5.3.4.	Árbol filogenómico correspondiente a CJIE4	132
5.6.	Marcadores genéticos.....	133
5.6.1.	Posibles marcadores genéticos de fuente de aislamiento y origen geográfico	133
5.6.2.	Posibles marcadores genéticos relacionados con un complejo clonal.....	139
5.7.	Variabilidad genómica.....	143
5.7.1.	Regiones de plasticidad hipervariables (PR)	143
5.7.2.	Otras regiones hipervariables	154
5.7.3.	Nuevas regiones hipervariables detectadas en este estudio	162
5.7.4.	Resultado global de variabilidad	164
5.7.5.	Genes relacionados con la virulencia.....	167
5.7.6.	Plásmidos	168
5.7.7.	Islas genómicas (CJIE).....	169
DISCUSIÓN		179
1. Análisis genómico		181
2. Marcadores genéticos		185
3. Variabilidad genómica		190
CONCLUSIONES		211
RESUMEN		215

EZTABAIDA	225
1. Analisi genomikoa	227
2. Markatzaile genetikoa	231
3. Aldakortasun genomikoa	235
ONDORIOAK	257
LABURPENA	261
BIBLIOGRAFÍA	269
ANEXOS	305
Anexo 1	307
Anexo 2	325
Anexo 3	329
Anexo 4	349
Anexo 5	351
Anexo 6	353

Índice de figuras

Figura 1. Esquema simplificado de las fases del proceso completo de <i>microarrays</i> de ADN	44
Figura 2. Genomas secuenciados de <i>Campylobacter</i>	48
Figura 3. Localización cromosómica de los <i>loci</i> de MLST en el cromosoma de la cepa NCTC11168	78
Figura 4. Detección por PCR múltiple de los genes <i>16 ADNr</i> , <i>mapA</i> y <i>ceuE</i>	97
Figura 5. Amplificación por PCR del gen <i>flaA</i>	98
Figura 6. Porcentaje de alelos detectados en las cepas estudiadas.	100
Figura 7. Porcentaje de péptidos obtenidos para las cepas estudiadas.....	101
Figura 8. Resultados obtenidos para la amplificación de 4 <i>locus</i> distintos.....	102
Figura 9. Fragmento del electroferograma del locus <i>pgm</i> de la cepa CPM-141.....	103
Figura 10. Porcentajes de secuencias tipo obtenidos en este estudio para cada país	105
Figura 11. Árbol filogenético obtenido mediante el método UPGMA.....	105
Figura 12. Imagen representativa de la posición de las 3500 STs	107
Figura 13. Imágenes representativas obtenidas tras escanear los <i>microarrays</i>	111
Figura 14. Porcentajes de aciertos obtenidos para diferentes puntos de corte para los 3 <i>microarrays</i> NCTC11168 vs NCTC11168	112
Figura 15. Porcentajes de aciertos obtenidos para diferentes puntos de corte para los 3 <i>microarrays</i> NCTC11168 vs RM1221	113
Figura 16. Número de genes evaluados para los <i>microarrays</i> de la cepa NCTC11168 frente a ella misma.....	114
Figura 17. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a todas las cepas presentes en el <i>microarray</i>	124
Figura 18. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168.....	125
Figura 19. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168.....	126
Figura 20. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE1.....	128
Figura 21. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE2.....	129
Figura 22. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE3.....	131
Figura 23. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE4.....	132
Figura 24. Análisis comparativo de los posibles marcadores genéticos descritos por Champion <i>et al.</i> (2005)..	133

Figura 25. Análisis comparativo de los posibles marcadores genéticos descritos por Champion <i>et al.</i> (2005) por origen geográfico.....	134
Figura 26. Resultados obtenidos para los marcadores genéticos predictivos descritos por González <i>et al.</i> (2008).....	134
Figura 27. Resultados obtenidos para la comparativa Dinamarca vs Nueva Zelanda	136
Figura 28. Resultados obtenidos para la comparativa Reino Unido vs Nueva Zelanda.....	136
Figura 29. Resultados obtenidos para la comparativa España vs Nueva Zelanda	137
Figura 30. Resultados obtenidos para la comparativa países europeos vs no europeos	139
Figura 31. Genes destacados para cada complejo clonal.	140
Figura 32. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR1	143
Figura 33. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable, PR1	144
Figura 34. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR2	145
Figura 35. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable PR2	145
Figura 36. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR3	146
Figura 37. Comparativa por países de de la región de plasticidad hipervariable PR3	146
Figura 38. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR4	147
Figura 39. Comparativa por países de de la región de plasticidad hipervariable PR4	148
Figura 40. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR5	149
Figura 41. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable PR5	150
Figura 42. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR6	151
Figura 43. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable PR6	152
Figura 44. Comparativa humanas vs pollo de la región de plasticidad hipervariable PR7	153
Figura 45. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable PR7	153
Figura 46. Sondas relacionados con los sistemas de restricción y modificación del ADN descritas por Dorrell <i>et al.</i> (2001).	154
Figura 47. Comparativa humanas vs pollo de la zona que comprendía los genes relacionados con la biosíntesis de LOS.	155
Figura 48. Comparativa de la zona que comprendía los genes relacionados con la biosíntesis de LOS por países.....	156
Figura 49. Comparativa de la zona que comprendía los genes relacionados con la biosíntesis de los polisacáridos capsulares por países.	157
Figura 50. Comparativa humanas vs pollo de las zonas hipervariables descritas por Taboada <i>et al.</i> (2004)....	159
Figura 51. Comparativa las zonas hipervariables descritas por Taboada <i>et al.</i> (2004) por países.	160
Figura 52. Comparativa humanas vs pollo de zonas hipervariables detectadas en este estudio	163
Figura 53. Comparativa de zonas hipervariables detectadas en este estudio por países.....	163
Figura 54. Distribución de genes ausentes/divergentes.	166

Figura 55. Comparativa humanas vs pollo de genes relacionados con la virulencia.....	167
Figura 56. Comparativa por países de genes relacionados con la virulencia.....	168
Figura 57. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE1.	170
Figura 58. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE2.	171
Figura 59. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE3.	172
Figura 60. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE4.	173
Figura 61. Resultados obtenidos para las 3 nucleasas.	177
Figura 62. Matriz binaria de los resultados de hibridación correspondiente a las sondas procedentes de la cepa NCTC11168.....	305
Figura 63. Matriz binaria de los resultados de hibridación correspondiente a las sondas procedentes del resto de cepas.....	323
Figura 64. Composición del <i>microarray</i>	329
Figura 65. Porcentajes de hibridación positiva según la procedencia de las sondas.	347

Índice de tablas

Tabla 1. Número de casos declarados en el País Vasco.	20
Tabla 2. Proyectos de secuenciación genómica de <i>Campylobacter</i>	49
Tabla 3. Relación de cepas de <i>C. jejuni</i> utilizadas para este estudio.	69
Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados para las amplificaciones.	72
Tabla 5. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes <i>16S ADNr</i> , <i>mapA</i> y <i>ceuE</i> por PCR.	72
Tabla 6. Ciclos de amplificación de los genes <i>16S ADNr</i> , <i>mapA</i> y <i>ceuE</i>	73
Tabla 7. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación.	74
Tabla 8. Reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>flaA</i>	74
Tabla 9. Ciclos de amplificación del gen <i>flaA</i>	75
Tabla 10. Secuencia de los iniciadores utilizados para la secuenciación.	76
Tabla 11. Secuencia de los iniciadores utilizados para las amplificaciones.	79
Tabla 12. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes por PCR.	79
Tabla 13. Ciclos de amplificación de los genes.	80
Tabla 14. Tamaño de los fragmentos de interés.	81
Tabla 15. Secuencia de los iniciadores utilizados para la secuenciación.	82
Tabla 16. Reactivos utilizados para la solución de prehibridación.	86
Tabla 17. Reactivos utilizados para la solución de hibridación.	87
Tabla 18. Reactivos utilizados para el Lavado 1.	88
Tabla 19. Reactivos utilizados para el Lavado 2.	88
Tabla 20. Reactivos utilizados para el Lavado 3.	88
Tabla 21. Alelos y péptidos obtenidos por SVR- <i>flaA</i> para cada cepa.	99
Tabla 22. Secuencias peptídicas observadas.	101
Tabla 23. Resultados obtenidos mediante análisis MLST de las cepas estudiadas.	104
Tabla 24. Comparativa de los resultados obtenidos mediante MLST y SVR- <i>flaA</i>	108
Tabla 25. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 1652 sondas de la cepa NCTC11168.	116
Tabla 26. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 313 sondas de la cepa RM1221.	118
Tabla 27. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 74 sondas de la cepa 81-176.	120
Tabla 28. Resultados de hibridación positiva con las sondas de diversas cepas en función de la procedencia de los aislamientos.	121
Tabla 29. Resultados de hibridación positiva con las sondas de diversas cepas en función del origen geográfico.	122
Tabla 30. Porcentajes de hibridación de las sondas obtenidos para las cepas procedentes de España y Nueva Zelanda.	123

Tabla 31. Funciones asignadas a los genes destacados.	141
Tabla 32. Grupos definidos por Zautner <i>et al.</i> (2011).	142
Tabla 33. Grupos definidos en este estudio.....	142
Tabla 34. Resultados detallados de los datos obtenidos.....	174
Tabla 35. Resultados globales en función de la procedencia geográfica.	175



1. Género *Campylobacter*

Los miembros de este género son bacilos delgados gram negativos, no esporulados, catalasa y oxidasa positivos, ureasa negativos y poseen forma curvada o espiral. Cuando los cultivos son viejos o bajo condiciones de estrés, *Campylobacter* puede adquirir forma cocoide o esférica (Van Vliet y Ketley, 2001).

Esta forma cocoide relacionada con condiciones de estrés, ha sido propuesta como el estado viable no cultivable (VNC), una estrategia activa de supervivencia con participación en las vías centrales de control que, a su vez, inducen respuestas de diferenciación celular reguladas secuencialmente bajo control genético (McDougald *et al.*, 1998). La razón por la que las células VNC son consideradas viables es su capacidad de reversión, es decir, bajo las condiciones apropiadas pueden recobrar su cultivabilidad (Nyström *et al.*, 2001). Autores en el extremo opuesto proponen el estado VNC como un proceso previo a la muerte celular, implicando una degeneración progresiva e irreversible (Hochman *et al.*, 1997; Kusters *et al.*, 1997).

A uno o ambos extremos de la célula poseen un flagelo polar que les confiere una movilidad característica en sacacorchos (Guerry *et al.*, 1991) y les facilita la colonización de la mucosa intestinal.

Son quimiorganotrofos, pero en lugar de utilizar las vías oxidativas de carbohidratos o su fermentación, usan aminoácidos y compuestos intermedios del ciclo de los ácidos tricarbónicos como fuente de energía.

Para su crecimiento requieren condiciones de microaerofilia con concentraciones de oxígeno que pueden variar del 3 al 15 %, y concentraciones de dióxido de carbono entre el 3 y el 5 %.

El tamaño del genoma de *Campylobacter* es comparativamente pequeño (1,5-2,05 Mb) (Chang y Taylor, 1990; Kim *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1992; Friis *et al.*, 2010) y contiene un bajo contenido de G+C (29-44 %). Este pequeño tamaño podría ser una manifestación de su naturaleza delicada, sus exigencias nutricionales y su baja actividad bioquímica (Nuijten *et al.*, 1990).

1.1. Taxonomía y nomenclatura

El género *Campylobacter* fue observado por primera vez en 1886 por Theodor Escherich en muestras de heces de niños, que fallecían por la entonces llamada "*cholera infantum*" (Snelling *et al.*, 2005). Años más tarde dos veterinarios británicos, MacFaydean y Stockman (MacFaydean y Stockman, 1913), lograron identificar *Campylobacter* en tejido fetal de abortos ovinos y lo clasificaron dentro del género *Vibrio* dada su morfología espiral. Sin embargo, el organismo descrito era muy similar a *Campylobacter fetus* (subespecie *fetus*), un organismo muy común en enfermedades veterinarias. En 1947 Vincent (Vincent *et al.*, 1947) aisló *Campylobacter* a partir de muestras de sangre de tres mujeres embarazadas de las que dos de ellas más tarde abortaron. En 1957, King describió un aislamiento de "Vibrio" en sangre de niños con diarrea (King *et al.*, 1957).

La taxonomía del género *Campylobacter* ha sufrido continuas modificaciones a lo largo del tiempo. Hasta 1963 permanece como género *Vibrio*, si bien tras los trabajos de Sebald y Verón (Sebald y Verón, 1963) se propone reagrupar estos vibrios microaéofilos en un nuevo género, *Campylobacter*, en función del contenido G+C del ADN. La especie tipo es *Campylobacter fetus* subesp. *fetus* (Véron y Chatelain, 1973) y los "Vibrio" de King pasan a ser *C. jejuni* y *C. coli* (Smibert *et al.*, 1984). En 1972 Dekeyser y Butzler aislaron por primera vez *Campylobacter* de muestras de heces de pacientes con enteritis hemorrágica. Después de diferentes controversias, la clasificación de Véron y Chatelain es definitivamente reconocida en 1984.

Según la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2004, www.cme.msu.edu/Bergeys/) el género *Campylobacter* junto con *Arcobacter*, *Dehalospirillum* y *Sulfurospirillum* está incluido en la familia I *Campylobacteraceae*, que unido a las familias *Helicobacteraceae*, *Nautiliaceae* e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden *Campylobacterales* y pertenecen a su vez a la clase *Epsilonproteobacterias*, subgrupo más pequeño de las *Proteobacterias*.

Durante los últimos años la taxonomía del género *Campylobacter* ha sufrido modificaciones y algunas de sus especies han pasado a pertenecer al género *Arcobacter* o *Helicobacter*.

Actualmente, en el género *Campylobacter* se incluyen las siguientes especies: *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*. Todas ellas son capaces de crecer a 37 °C. Además, las especies termófilas *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. helveticus* pueden crecer a 42 °C.

Dentro de este género, *C. jejuni* y *C. coli* son las dos especies que más habitualmente infectan al ser humano (Nachamkin *et al.*, 2003). En menor medida, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus* también son especies patógenas para el humano, siendo *C. fetus* la especie que más veces ocasiona infecciones extraintestinales (Park *et al.*, 2002; Altekruuse *et al.*, 2003).

1.2. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni posee morfología espiral, oscilando sus dimensiones entre 0,2-0,9 µm de anchura y 0,5-5 µm de longitud. En cultivos viejos o bajo condiciones de estrés tiene tendencia a adquirir morfología esférica de aproximadamente 1 µm de diámetro.

El genoma de *C. jejuni* posee un tamaño de entre 1,6-1,8 Mb (Chang y Taylor, 1990; Kim *et al.*, 1992). El cromosoma consiste en una molécula circular simple de ADN con un bajo contenido en G+C (29-30 %). En comparación con otros organismos, *Escherichia coli* (5 Mb) o *Myxococcus* (9,45 Mb), el genoma de *C. jejuni* es muy pequeño. Este pequeño tamaño del genoma se ve reflejado en los complejos requerimientos nutricionales, la no oxidación o fermentación de carbohidratos o su relativamente baja actividad bioquímica (Nuijten *et al.*, 1990; VanDamme *et al.*, 1991).

La cepa *C. jejuni* NCTC11168, cuyo genoma está totalmente secuenciado, presenta pocos mecanismos por los que el microorganismo pueda generar diversidad. No contiene transposones ni ADN proveniente de fagos y tiene muy pocas secuencias repetitivas. Sin embargo, esta bacteria parece presentar una alta diversidad tanto fenotípica como genotípica. *C. jejuni* es competente naturalmente y tiene un alto índice de recombinación que puede contribuir en la diversidad (Parkhill *et al.*, 2000).

Se han descrito plásmidos de resistencia a diversos antibióticos y también se han encontrado fracciones genómicas procedentes de bacteriófagos (Taylor *et al.*, 1992). *C. jejuni* es naturalmente transformable aunque la conjugación también ha sido empleada para la introducción de ADN (Wang y Taylor, 1990; van Vliet y Ketley, 2001).

2. Campilobacteriosis

El género *Campylobacter* es responsable de infecciones tanto en humanos como en animales. En animales se ha relacionado con infecciones en ganado bovino y ovino, ocasionando problemas de esterilidad y en humanos se ha relacionado con infecciones gastrointestinales (Taylor y Al-Masat, 1985).

La campilobacteriosis digestiva humana se ha extendido por todo el mundo, lo que la convierte en una enfermedad infecciosa de amplia distribución. Ahora bien, factores socioeconómicos como la pobreza y/o la higiene defectuosa contribuyen de manera decisiva en la incidencia de la enfermedad en determinados países.

Campylobacter ha pasado a ser junto con *Salmonella* el patógeno entérico transmitido por alimentos más frecuente en los países industrializados (Bryan y Doyle, 1995), llegando a alcanzar una incidencia anual de casos declarados próxima al 1 % de la población. Son las especies termófilas *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* las relacionadas con las infecciones digestivas. En particular, *C. jejuni* es responsable del 95 % de los casos (Begue *et al.*, 1989).

La elevada prevalencia de infecciones por esta bacteria, su baja dosis infectiva y la gravedad de sus posibles secuelas, confirman la importancia de este microorganismo como un potencial riesgo para la salud pública (Moore *et al.*, 2005).

Para algunas cepas específicas se ha determinado que la dosis mínima infecciosa es de aproximadamente 800 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) (Black *et al.*, 1988) aunque una dosis de 500 a 800 microorganismos puede ser suficiente para causar enfermedad (Skirrow y Blazer, 2000). Estas diferencias se deben a variaciones del pH del jugo gástrico del huésped y del tipo de alimento consumido. La leche y los alimentos grasos en general, permiten salvar la barrera ácida del estómago y producir la infección de forma más fácil.

La manifestación clínica más típica es una enteritis aguda que dura entre un día y una semana y que cursa con diarrea, heces sanguinolentas, dolor abdominal, fiebre, cefalea y malestar general. El periodo de incubación varía entre uno y siete días. En raras ocasiones la infección puede provocar bacteriemia, artritis, meningitis, infecciones del tracto urinario y otros síntomas extraintestinales (Canton *et al.*, 1989). Es muy improbable que llegue a

producirse la muerte, pudiéndose dar en niños, ancianos y pacientes con enfermedades subyacentes.

La enteritis es autolimitada y el tratamiento suele consistir en la reposición hidroelectrolítica. Sin embargo, en determinados pacientes como, por ejemplo, pacientes inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes o aquellos en los que los síntomas de la infección persisten más de una semana, es recomendable terapia antibiótica. En caso de requerirse tratamiento antimicrobiano, la eritromicina es el tratamiento de elección. Desde 1990 ha habido un incremento significativo en la prevalencia de la resistencia a macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas en *Campylobacter* spp. Esto es considerado como un problema emergente de salud pública en muchos países europeos (Engberg *et al.*, 2001).

Las complicaciones extraintestinales tras una campilobacteriosis por *C. jejuni* o *C. coli* son raras, presentándose en menos del 1 % de los pacientes. Si la infección es por *C. fetus*, estas manifestaciones pueden ser más comunes (Blaser, M.J., 1995, 1997). Las complicaciones más graves asociadas a *Campylobacter* son el síndrome de Guillain-Barré que provoca parálisis neuromuscular aguda, la artritis, el síndrome de Reiter asociado con artropatías reactivas, o el síndrome de Miller-Fisher considerado como una variación infrecuente del síndrome de Guillain-Barré (Salloway *et al.*, 1996). Se cree que estos tres síndromes son respuestas autoinmunes desencadenadas por la infección por *Campylobacter* (Altekruse *et al.*, 1999).

3. Epidemiología de las campilobacteriosis

3.1. Incidencia

La campilobacteriosis humana posee un amplio espectro de incidencia. Hoy en día se ha convertido en una de las causas más frecuentes de diarrea de origen bacteriano, con niveles de prevalencia parecidos y hasta en ocasiones superiores a los de *Salmonella* spp.

En la última década *Campylobacter* ha mostrado un aumento en su incidencia en países desarrollados siendo una de las causas más frecuente de enteritis bacteriana junto con *Salmonella* (Bryand y Doyle, 1995). La campilobacteriosis presenta típicamente una distribución bimodal con picos de incidencia en niños menores de 4 años (Tenkate y Stafford, 2001) y en adultos jóvenes, especialmente en hombres (Hernández *et al.*, 1993) y se distribuye durante todo el año con un pico agudo en verano y principios de otoño al igual que en otras infecciones por patógenos entéricos.

Es difícil establecer la incidencia real de esta enfermedad ya que al no tratarse de una enfermedad grave y, en la mayoría de los casos, la infección desaparece sin necesidad de consulta médica (Hernández *et al.*, 1993), su declaración es muy baja y está infravalorada. Cada vez son más los autores que consideran que esta infravaloración de la incidencia puede estar también asociada a errores en el diagnóstico como consecuencia de un método de aislamiento e identificación inapropiado (Engberg *et al.*, 2000).

La campilobacteriosis se da en forma de casos esporádicos, afectando a una única persona cada vez, al contrario que la infección por *Salmonella* spp. que aparece en forma de brotes epidémicos (familiares o comunitarios) con múltiples afectados.

A nivel estatal *Campylobacter*, con 5.113 casos declarados al SIM (Sistema de Información Microbiológica) durante el año 2009 frente a los 4.327 de *Salmonella*, es la

primera causa de gastroenteritis bacteriana. El número de casos declarados ha descendido tras el aumento registrado entre 2005 con 5.471 y 2006 con 5.883. Cabe destacar la alta incidencia en el País Vasco con 1.073 casos declarados frente a los 5.113 totales.

En la siguiente tabla se muestran los números de casos declarados de infección gastrointestinal por *Campylobacter* que corresponden al Sistema de Información Microbiológica de la Comunidad Autónoma del País Vasco (SIM CAV; http://www.osasun.ejgv.euskadi.net/r52publ01/es/contenidos/informacion/publicaciones_epidem/es_4383/publicaciones_epidem_c.html).

Tabla 1. Número de casos declarados en el País Vasco.

Año	Álava	Guipúzcoa	Vizcaya	Total
2000	468	1.488	1.070	3.026
2001	383	1.602	1.007	2.992
2002	350	1.456	965	2.771
2003	318	1.543	873	2.734
2004	282	1.370	778	2.536
2005	322	1.484	770	2.576
2006	331	1.226	894	2.451
2007	288	993	697	1.978
2008	225	902	579	1.706
2009	*	967	565	*

*No existen datos de 2009 en Álava

En el País Vasco, nuestro entorno más cercano, el total de casos declarados ha descendido considerablemente en las tres provincias desde el año 2000. Guipúzcoa es en todos los casos, la provincia con mayor incidencia de registros. En todas las provincias la especie predominante detectada fue *C. jejuni*.

Tanto a nivel estatal como europeo se está detectando una disminución de *Salmonella* y un incremento de *Campylobacter*. Las tasas por cien mil habitantes de

Salmonella en 2007 fueron de 47,1 en Bélgica, 21,1 en Reino Unido, 9,4 en Francia, y 42,9 en Suecia. Mientras que las tasas por *Campylobacter* fueron; 65,9 en Bélgica, 88 en Reino Unido, 3,3 en Francia y 77,5 en Suecia, datos que reflejan claramente mencionado incremento.

3.2. Fuentes de infección y transmisión

Los principales reservorios de *Campylobacter* spp. son tanto las aves migratorias, incluyendo patos, grullas, gansos y otras especies salvajes, así como las aves domésticas, incluyendo el pollo. También forma parte de la biota intestinal habitual de otras especies como cerdos, vacas y ganado ovino donde está presente como saprofito y también como patógeno entérico ocasional. (Blaser *et al.*, 1997).

Los lagos, ríos y aguas superficiales que reciben aguas residuales con contaminación de origen fecal (Bolton *et al.*, 1985), también forman parte de lugares donde puede aislarse *Campylobacter* spp., además de considerarse este tipo de aguas potenciales vías de transmisión.

Los principales mecanismos de transmisión a humanos incluyen el contacto directo con aves colonizadas y la manipulación y consumo de alimentos contaminados. Este último se debe principalmente al consumo de carne, especialmente de ave, contaminada e insuficientemente cocinada y al de leche cruda o mal pasteurizada (Effler *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2004). Se han descrito casos esporádicos relacionados con el consumo de marisco (ostras, almejas) o de vegetales crudos, derivados posiblemente de contaminaciones cruzadas. En los últimos años la enteritis por *Campylobacter* spp. ha sido considerada también una zoonosis.

Está demostrado que la carne de pollo es sin duda la fuente de infección más importante. Diferentes estudios epidemiológicos han establecido que entre el 50-70 % de las infecciones esporádicas de origen alimentario por *Campylobacter* spp. se deben al consumo

o manipulación de la carne de pollo poco cocinada o por un tratamiento térmico insuficiente. Lo que no está del todo claro es la fuente de infección principal. Se sabe que la mayoría de las explotaciones avícolas de engorde están contaminadas con *C. jejuni*. El pienso y agua no clorada, han estado vinculadas como vehículos de introducción y transmisión de la infección. Las jaulas, ropa, manos y calzado del personal de las explotaciones avícolas, también pueden ser vías de entrada del microorganismo. Otras fuentes podrían ser los animales domésticos o salvajes que viven alrededor de la explotación.

Se han propuesto diferentes estrategias para controlar la campilobacteriosis tanto a nivel de las granjas como a nivel del consumidor. Entre ellas destaca la importancia de la higiene a la hora del procesado y manipulación del alimento, ya que se han descrito casos en los que *Campylobacter* spp. es capaz de sobrevivir más de una hora en superficies y paños de algodón (De Cesare *et al.*, 2003) o de sobrevivir en superficies de trabajo tras largos periodos de congelación (Morrhead *et al.*, 2002). En el matadero, y posteriormente durante el procesado, es imprescindible la aplicación de los principios HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Points*) durante todos los pasos para la obtención de productos seguros. Por último, a nivel de consumidor se deben aplicar buenas prácticas higiénicas y un tratamiento térmico correcto para reducir el riesgo potencial de los productos contaminados.

4. Patogénesis y factores de virulencia de *Campylobacter* spp.

La adhesión y la invasión al epitelio gastrointestinal son procesos anteriores al proceso inflamatorio y diarreico. Hoy en día muy pocos factores de virulencia son conocidos o se ha determinado su papel en los procesos de invasión y adhesión y en varios casos existen controversias. El poder de invasividad es utilizado normalmente como medida para determinar la virulencia de una bacteria y refleja la implicación de muchas estructuras y mecanismos bacterianos en este proceso.

Campylobacter entra en el intestino atravesando la barrera ácida del estómago y colonizando el íleon y colon. Tras la colonización del mucus y la adhesión a las células intestinales, *Campylobacter* altera la capacidad de absorción del intestino dañando la superficie epitelial.

4.1. Movilidad y quimiotaxis

Una colonización efectiva requiere quimiotaxis. La secuenciación de varios genomas han mostrado que *C. jejuni* posee componentes del sistema de quimiotaxis de *Escherichia coli* (Parkhill *et al.*, 2000; Marchant *et al.*, 2002). *C. jejuni* muestra movilidad quimiotáctica hacia la mucina, L-serina y L-fucosa. Estos últimos son aminoácidos que se encuentran en el tracto gastrointestinal y en el mucus del pollo (Hugdahl *et al.*, 1988). Los mutantes con carencias de los receptores de quimiotaxis DocB (*Cj0019c*) y *Cj0262c* mostraron un bajo poder de colonización (Hendrixson *et al.*, 2004). Algunos otros componentes del sistema de quimiotaxis de *C. jejuni* han sido identificados, entre ellos CheY, CheV, CetA y CetB (Young *et al.*, 2007).

Por otro lado, *Campylobacter* requiere para su movilidad de la producción de un flagelo, siendo éste el factor de virulencia más estudiado hasta el momento. El flagelo y la movilidad flagelar son vitales para la colonización del huésped (Newell *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1986; Szymanski *et al.*, 1995). La estructura flagelar está compuesta por subunidades de flagelina que son codificadas por los genes *flaA* y *flaB*. Los mutantes del gen *flaA* son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal del pollo pero no pueden invadir células humanas intestinales *in vitro* (Fields *et al.*, 1999). La adhesión e invasión son dependientes de la motilidad y de la expresión del flagelo.

Wassenaar *et al.* (1993) demostraron que los mutantes que poseían una reducción en su motilidad, pero que al mismo tiempo presentaban intacta la expresión del gen *flaA*, actuaban de forma muy similar a la cepa salvaje. Por el contrario, mutantes deficientes en la expresión del gen *flaA* pero sin reducción en la motilidad, presentaban deficiencias en su

habilidad para colonizar el intestino del pollo (Wassenaar *et al.*, 1993). Estos autores, a raíz de los resultados obtenidos, sugirieron un papel adicional del flagelo en la virulencia distinto al de la motilidad.

4.2. Adhesión e invasión

La adhesión en bacterias patógenas está mediada por estructuras fimbriales. Algunas cepas de *C. jejuni* no contienen en sus genomas información para codificar el *pili*. Sin embargo, muchas proteínas contribuyen a la adherencia de *C. jejuni* a células eucarióticas. Por ejemplo, al estudiar la adhesión mediada por la unión de CadF a la fibronectina de la matriz celular (Konkel *et al.*, 1997) se ha demostrado que los mutantes de esta proteína no son capaces de colonizar el tracto intestinal del pollo (Ziprin *et al.*, 1999). Otra de las adhesinas más estudiada es la JlpA, que se une a Hsp90 α de las células Hep-2, la lipoproteína CapA (Cj0628-Cj0629), que juega un papel importante en la adhesión e invasión de las células Caco-2 (Ashgar *et al.*, 2007) y la adhesina Peb1, proteína periplasmática de unión ABC que es requerida para la adherencia a células HeLa (Pei *et al.*, 1998).

Respecto a la invasión no existen sistemas de secreción tipo III como en otras bacterias entéricas. Sin embargo, el flagelo de *C. jejuni* muestra funciones similares al sistema de secreción tipo III y secreta varias proteínas que afectan al poder de invasión (Konkel *et al.*, 2004). Las proteínas Cia (A-H) son secretadas a través del filamento del flagelo y afectan al poder de invasión de varias cepas de *C. jejuni*. La secreción flagelar está mediada por un complejo proteico acoplado a la cara citoplasmática del motor. Este "aparato exportador de flagelina" utiliza energía derivada de la hidrólisis de ATP. Además de las proteínas Cia este aparato también secreta FlaC a su vez relacionada con la invasión. La habilidad de atravesar la barrera epitelial permite a la bacteria pasar a la superficie basolateral. Además, ha sido demostrada la capacidad de *C. jejuni* de replicarse en macrófagos e inducir la apoptosis (Hickey *et al.*, 2005). Las interacciones de *C. jejuni* con las células epiteliales, células dendríticas y macrófagos pueden provocar la liberación de quimioquinas y citoquinas que contribuyen a la inflamación e infección (Poly *et al.*, 2008a).

4.3. Cápsula y lipooligosacáridos (LOS)

Los polisacáridos de la cápsula (CPS) desempeñan un papel importante en la supervivencia bacteriana, en la resistencia a las condiciones del entorno y muy a menudo contribuyen al proceso de patogénesis (Roberts *et al.*, 1996). Estas biomoléculas pueden mostrar variaciones estructurales que potencien la resistencia frente a la fagocitosis y a la lisis.

La secuenciación de genomas y los estudios con *microarrays* de ADN demuestran que *C. jejuni* contiene muchas regiones variables en el cromosoma. Las regiones más variables están relacionadas con la biosíntesis de estructuras de carbohidratos como lipooligosacáridos, polisacáridos de la cápsula y el *locus* de la O-glicosilación (Poly *et al.*, 2008b), presentando todos ellos un papel importante en la virulencia.

Recientes estudios llevados a cabo en modelos *in vitro* con mutantes que presentan alguna deficiencia en su estructura capsular, han demostrado una reducción tanto en el poder invasivo como en su virulencia (Bacon *et al.*, 2001). Otros autores observaron cómo se veía notablemente reducido el poder de adherencia a células del epitelio intestinal humano por parte de estos mutantes. Por el contrario, pudieron constatar que no ocurría lo mismo si se trataba de colonización en pollo. En este último caso, las diferencias entre la cepa salvaje y la mutante no eran significativas (Bachtiar *et al.*, 2007). Según estos autores, la contribución de los CPS a la patogenicidad en el huésped puede estar relacionada con la especie que coloniza.

Los LOS de *C. jejuni* poseen una gran variabilidad debido a las diferentes relaciones de unión a monosacáridos y a su composición. Varios LOS son similares a los gangliósidos neuronales humanos. Esta similitud molecular se cree que puede estar relacionada con enfermedades autoinmunes incluyendo el Síndrome de Guillain-Barre (GBS) (Young *et al.*, 2007).

Algunos estudios han demostrado que los LOS y el flagelo de *C. jejuni* están sializados, lo que hace pensar que es responsable de la similitud con los gangliósidos que produce el GBS (van Vliet *et al.*, 2001). Las mutaciones en los genes responsables de la biosíntesis de los LOS afectan en la resistencia al suero, la adherencia y la invasión de células INT 407 (Fry *et al.*, 2000).

4.4. CDT (*Cytotoxic Distending Toxin*)

Diversos estudios han descrito la producción de citotoxinas y enterotoxinas, pero exceptuando la toxina CDT, no se han conseguido aislar genes codificantes de toxinas (Wassenaar *et al.*, 1997).

Las CDT contienen tres subunidades (A, B y C). La subunidad activa es CdtB mientras que las subunidades CdtA y CdtC son componentes de unión. Una vez que la toxina está unida a la célula, CdtB es transportada al núcleo donde actúa como una DNAsa. Estas toxinas provocan que las células eucariotas queden estancadas en la fase G2/M del ciclo celular, evitando así su pase a la fase mitótica, y conduciéndola a la muerte celular (Zilbauer *et al.*, 2007). Además las CDT inducen la secreción de IL-8 de las células epiteliales contribuyendo así a la inflamación (Hickey *et al.*, 2000).

4.5. Sistema de glicosilación

Recientemente ha sido rechazado el dogma de que las bacterias sólo expresaban proteínas no glicosiladas, lo que abre puertas a nuevas investigaciones sobre la estructura y función de muchas proteínas procarióticas (Schmidt *et al.*, 2003).

Campylobacter posee dos vías o sistemas de glicosilación: *N*-glicosilación, en la que los azúcares se unen a un residuo asparragina, y *O*-glicosilación (responsable de la glicosilación flagelar), en la que pueden unirse a residuos como la serina, treonina o tirosina.

Los azúcares encontrados en las glicoproteínas procariontas son más diversos en composición y estructura que los encontrados en organismos eucariotas.

Se han sugerido diversas funciones de la glicosilación proteica en procariontas: el mantenimiento de la conformación proteica, el aumento de la resistencia frente a digestión proteolítica, la adhesión celular, la actividad enzimática o la evasión y modulación de la respuesta inmune (Schmidt *et al.*, 2003).

Investigaciones médicas recientes han demostrado que algunos de los organismos procariontas que sintetizan glicoproteínas son importantes patógenos, *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* y *Campylobacter*, entre otros. En estos organismos las glicoproteínas se encuentran asociadas a la superficie del organismo o son secretadas al medio, sugiriendo su implicación en la interacción con el hospedador (Benz y Schmidt, 2002).

4.6. Otros

Otro factor de virulencia putativo es un sistema de adquisición de hierro en condiciones de escasez del mismo ya que las células hospedadoras carecen de concentraciones altas de hierro por lo que no permiten el crecimiento bacteriano y es esta escasez la que constituye una defensa para la célula hospedadora.

5. Genotipificación en *Campylobacter* spp.

Los métodos microbiológicos tradicionales basados en el crecimiento de los microorganismos sobre medios de cultivo hacen que su detección e identificación requiera de cuatro a seis días. El trabajar con *Campylobacter* spp. es una labor lenta y tediosa, al estar consideradas como bacterias fastidiosas. Además, la identificación de especies se realiza en base a unas pocas pruebas bioquímicas de resultados en muchos casos poco o nada

concluyentes (Logan *et al.*, 2001). Por ello, numerosos autores han expuesto la necesidad de optimizar los métodos de cultivo e identificación disponibles en la actualidad así como desarrollar metodologías alternativas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos (Engberg *et al.*, 2000).

En estudios epidemiológicos o taxonómicos, la tipificación resulta esencial para diferenciar tipos dentro de una misma especie o subespecie. La tipificación es importante en estudios epidemiológicos para determinar fuentes y rutas de transmisión de las infecciones humanas, para la identificación y monitorización de cepas con características fenotípicas importantes y para el desarrollo de estrategias de control de organismos dentro de la cadena alimentaria.

Las diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli* son detectables tanto a nivel fenotípico como a nivel genotípico. Hasta la fecha, el método más utilizado para la tipificación fenotípica es la serotipificación, existiendo dos posibles esquemas. En primer lugar tendríamos el método descrito por Penner en 1980. Este es un método de hemaglutinación pasiva que utiliza antígenos termoestables del lipopolisacárido de la membrana externa de las cepas de *C. jejuni* subsp. *jejuni*. Estos son enfrentados a antisueros conteniendo los distintos anticuerpos para cada serotipo en estudio (Penner y Hennessy, 1980). Por otro lado, existe el método propuesto por Lior *et al.* (1982) basado en la utilización de antígenos termolábiles y aglutinación en placa.

Las mayores desventajas de estos métodos son el alto número de cepas no tipificables, el tiempo requerido y las necesidades técnicas implicadas.

Debido a todos estos inconvenientes, hoy en día son más accesibles y utilizados los métodos basados en la genotipificación dada su universalidad y su poder de discriminación.

Las técnicas de genotipificación en bacterias patógenas gram negativas son variadas y pueden clasificarse en cuatro categorías generales en función de su base metodológica: las

basadas en el análisis del ADN bacteriano con enzimas de restricción, las basadas en la amplificación por la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), las basadas en la identificación de polimorfismos de ADN mediante secuenciación (Foley *et al.*, 2009) y, por último, las basadas en la hibridación (*microarrays* de ADN).

Entre las técnicas basadas en el análisis con enzimas de restricción de un fragmento o todo el genoma bacteriano, podemos encontrar técnicas que analizan distintos tipos o partes del material genético bacteriano, como son los polimorfismos presentes en el ADN cromosómico (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism* y PCR-RFLP), en los genes de ARN ribosómico (ribotipado) y en las secuencias de inserción (IS-RFLP, *insertional sequences*), y el análisis del cromosoma completo (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Por otro lado están las técnicas basadas en la amplificación por PCR de diversas dianas genéticas, para conocer su presencia o ausencia, mediante el perfil de amplificación, (*amplification profiling*), polimorfismos de longitud en el ADN (AFLP, *amplified fragment length polymorphism*), ADN polimórfico al azar (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*), elementos repetitivos (Rep-PCR) y número variable de repeticiones en tándem de un *locus* (*variable number of tandem repeat -VNTR- analysis*) o de varios (*multiple locus VNTR analysis*, MLVA).

Existe un tercer grupo donde se incluyen las basadas en la identificación de polimorfismos de ADN mediante la secuenciación de *loci* distintos (MLST, *multilocus sequence typing*) y el estudio de las mutaciones producidas sobre *loci* específicos (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Dentro de este grupo se incluye también la técnica de SVR-*flaA*, que se basa en la secuenciación la región SVR (*Short Variable Region*) del gen *flaA* del género *Campylobacter*.

Y, por último, en el cuarto grupo se incluyen los *microarrays* de ADN con los que es posible estudiar todo el genoma en un mismo experimento.

5.1. Técnicas basadas en el análisis con enzimas de restricción

Las técnicas basadas en el análisis con enzimas de restricción se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la amplificación por PCR, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos.

5.1.1. Ribotipificación

La ribotipificación es una técnica de genotipificación que está basada en las diferencias de localización y número de los genes ribosómicos que constituyen un operón; *ARNr 16S*, *ARNr 23S* y *ARNr 5S*.

Algunas bacterias presentan en diferentes localizaciones cromosómicas un número variable de operones de los genes que codifican el ARNr, en diferentes posiciones. Estos genes son, por tanto, apropiados para su utilización en genotipificación porque presentan regiones altamente conservadas y están flanqueados por regiones muy variables, no codificantes.

La ribotipificación consiste en la digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción de corte frecuente, separación electroforética del ADN digerido, transferencia a membrana mediante el método Southern y posterior hibridación del ADN transferido con una sonda específica de los genes *ARNr*. Para una hibridación específica es necesaria la elección correcta de una sonda para el operón ribosómico. En muchos estudios de ribotipificación se utilizaban como diana para la sonda los genes *ARNr 16S* y *23S* de *Escherichia coli* (Stull *et al.*, 1988).

En *Campylobacter* el poder discriminatorio de esta técnica es limitado ya que sólo presenta tres copias de estos genes. Otro inconveniente de esta técnica de tipificación es que las diferencias en los enzimas y las sondas utilizadas generalmente dificultan las

comparaciones directas de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios (Denes *et al.*, 1997).

5.1.2. PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*)

El PFGE es una técnica de tipificación útil para varias bacterias, que consiste en la digestión del cromosoma bacteriano mediante enzimas de restricción con baja frecuencia de corte. Los fragmentos que se obtienen tras la restricción son grandes pero se pueden separar por tamaños utilizando condiciones electroforéticas especiales. Este sistema de electroforesis está basado en la aplicación coordinada de campos eléctricos pulsátiles desde diferentes posiciones de la cámara de electroforesis. Los perfiles de restricción del ADN se visualizan tras tinción del gel con bromuro de etidio.

A los perfiles obtenidos mediante esta técnica se les denomina perfiles de macrorrestricción. Estos perfiles se generan gracias a las variaciones en la presencia de los puntos de restricción relevantes (Wassenaar *et al.*, 2000).

El PFGE se utilizó inicialmente para *C. jejuni* y posteriormente se adaptó para las especies *C. coli*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis* y *C. fetus*. Los enzimas más utilizados para la digestión del ADN son *SmaI*, *SaII*, *KpnI*, *SacII*, *ApaI* y *BssHIII*. La utilización de más de un enzima incrementa considerablemente el poder de discriminación (Hänninen *et al.*, 1998, 2000).

La alta sensibilidad de esta técnica se basa en el hecho de que se detectan polimorfismos de los puntos de restricción de todo el genoma y las diferencias entre cepas son fáciles de detectar.

Aunque el poder discriminatorio de esta técnica es excelente, un gran inconveniente es la difícil comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, ya que las variaciones en las condiciones electroforéticas y/o en los enzimas de restricción utilizados

ocasionan diferencias en los perfiles. Cabe destacar otras desventajas como el alto coste de esta técnica, el procedimiento tedioso y los problemas de interpretación de resultados debido a la inestabilidad genética de este género (de Boer *et al.*, 2000).

5.2. Técnicas basadas en la amplificación por PCR

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos (Fernández-Cuenca *et al.*, 2004).

5.2.1. PCR-RFLP de la flagelina (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

La técnica de PCR-RFLP consiste en una amplificación por PCR de una secuencia conocida del ADN cromosómico utilizando un par de iniciadores complementarios a las regiones extremas del fragmento que queremos digerir. Las secuencias de ADN amplificadas son digeridas por un enzima de restricción y la resolución de los fragmentos obtenidos por electroforesis permite la comparación de los diferentes perfiles de restricción.

Esta técnica puede ser utilizada para cualquier *locus* génico que contenga tanto regiones altamente conservadas como regiones variables. Los iniciadores se diseñan en la zona conservada quedando la zona variable flanqueada por estos. Las variaciones que existan en los sitios de restricción mostrarán genotipos diferentes, permitiendo una discriminación entre ellos. Para *Campylobacter* se propone el gen *flaA* como diana para esta técnica.

El poder de discriminación de esta técnica es mayor que el de la serotipificación (Madden *et al.*, 1998) pero menor que el de las técnicas PFGE y AFLP (Nielsen *et al.*, 2000). Una de las ventajas de la técnica AFLP es su simplicidad y la ausencia de requerimientos de reactivos y equipamiento complejos. Tanto *C. jejuni* como *C. coli* son tipificables por este método, sin embargo, la capacidad de *C. jejuni* y *C. coli* para sufrir recombinaciones dentro de los genes *fla* ha sido demostrada (Wassenaar *et al.*, 1995), lo que conlleva el hecho de que esta técnica no pueda ser considerada un método de tipificación estable a largo plazo y ha sido paulatinamente sustituida por la técnica del SVR-*flaA*.

5.2.2. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

La técnica de AFLP, consiste en la combinación de los métodos de PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de ADN que comprende los sitios de corte de los enzimas de restricción (una de corte frecuente y otra de corte infrecuente). Estos cambios se perciben como un patrón diferente, en número y tamaño de bandas generadas.

La técnica AFLP se basa en estos dos puntos de restricción y está diseñada para que sólo se amplifiquen los fragmentos que están flanqueados por los dos sitios de restricción. Tras la restricción se ligan adaptadores diseñados para que se unan a los extremos cohesivos de los fragmentos generados por los enzimas. A continuación se realiza una PCR utilizando iniciadores específicos para los adaptadores utilizados. Los iniciadores que se utilizan para la amplificación están marcados con fluorescencia o con radioactividad, de tal forma que los amplificados que se obtienen también lo estén. Para el análisis de los amplificados se utilizan geles de poliacrilamida. Se obtiene un perfil de bandas muy específico y no tan aleatorio como el obtenido por la técnica RAPD, debido a que no se amplifican fragmentos al azar sino de forma dirigida.

Moreno *et al.* (2002) utilizaron una variante de esta técnica en *Campylobacter* utilizando un solo enzima de restricción (*Hpa II* de corte infrecuente), adaptadores sin marcado y geles de agarosa.

El AFLP también ha sido utilizado para diferenciar entre especies de *Campylobacter*, utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *HhaI*, permitiendo agrupar las cepas de la misma especie en diferentes *clusters* (Duim *et al.*, 2001).

Jakopanec *et al.* (2008) utilizaron la técnica de AFLP para tipificar un brote de *Campylobacter* en Noruega y utilizando los enzimas de restricción *BglII* y *MfeI*.

El elevado poder discriminatorio y la alta reproducibilidad de esta técnica vienen dados por los enzimas de restricción utilizados y por la amplificación selectiva derivada de iniciadores específicos. Sin embargo, esta técnica es muy compleja y requiere de un coste elevado.

5.2.3. RAPD (*Random Amplified Polimorphic ADN*) y AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*)

Mediante la técnica RAPD se obtienen fragmentos de ADN amplificados al azar utilizando iniciadores de anillamiento aleatorio y condiciones de PCR poco estrictas; temperatura moderada, elevada osmolaridad y pH neutro.

La técnica de AP-PCR es similar a la de la RAPD, aunque varía el diseño de los oligonucleótidos y el tipo de PCR. Los oligonucleótidos son más largos, y la PCR consta dos de ciclos de baja astringencia y posteriores ciclos de alta astringencia. Los fragmentos amplificados se pueden migrar en un gel de agarosa para observar diferencias entre especies, o bien se puede marcar radioactivamente y migrar en gel de poliacrilamida para obtener resultados mucho más finos y precisos.

Para llevar a cabo estas técnicas se utilizan iniciadores diseñados al azar y condiciones que permitan anillamientos inespecíficos (*mismatches*), de forma que el número de puntos de unión entre el ADN diana y los iniciadores aumenta. En estas condiciones la amplificación se da cuando los lugares de anillamiento se sitúan dentro de la distancia de amplificación y presentan orientaciones opuestas (Wassenaar *et al.*, 2000).

Madden *et al.* (1996) encontraron mediante el uso de iniciadores de 10 pb RAPDs en cepas de *Campylobacter* pertenecientes al mismo serotipo. También describieron la potencial utilidad de este método para la tipificación de cepas que no pueden ser exactamente serotipificadas. A pesar de la alta heterogeneidad genética entre cepas de *Campylobacter* Mehmet Nuri Açık *et al.* (2006) consiguieron tipificar 348 cepas de *C. jejuni* y *C. coli* mediante esta técnica.

Iriarte *et al.* (1996) utilizaron la técnica AP-PCR para el análisis de un brote de *Campylobacter* y sugirieron que esta técnica era una herramienta muy útil para una investigación rápida en brotes cuyo poder de resolución se veía muy incrementado cuando se combinaba con PFGE.

Esta técnica presenta un bajo poder discriminativo y una baja reproducibilidad. Cualquier pequeño cambio en los reactivos, condiciones de amplificación o parámetros de análisis pueden alterar significativamente su reproducibilidad (Micheli *et al.*, 1994). Sin embargo esta técnica requiere poco tiempo para obtener resultados, necesita poca cantidad de ADN y los iniciadores son genéricos por lo que no se necesita conocimiento previo de la secuencia del genoma (Franklin *et al.*, 1999).

5.2.4. Rep-PCR (*Repetitive Element PCR*)

Esta técnica está dirigida a secuencias repetidas de ADN distribuidas por todo el genoma. Los iniciadores específicos de los elementos repetitivos están diseñados para amplificar las secuencias comprendidas entre dos repeticiones. Estos amplificados se

separan por electroforesis y los perfiles resultantes se comparan entre sí para determinar la relación genética.

Son tres las secuencias repetitivas que se utilizan: las secuencias REP (*repetitive extragenic palindromic*), las ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y los elementos BOX (*BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR*). En estos casos, las técnicas se denominan REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR respectivamente, y rep-PCR colectivamente.

La diversidad de los diferentes patrones de bandas puede ser debida tanto a las diferencias en el número de elementos repetitivos como a su distribución y orientación a lo largo del genoma.

Al igual que las demás técnicas basadas en la amplificación, los resultados de la técnica rep-PCR se obtienen relativamente rápido y necesitan poca cantidad inicial de ADN. Basados en el número de secuencias repetitivas presentes en las cepas, este método puede tener un alto poder discriminatorio. Además el poder de discriminación de esta técnica puede incrementarse utilizando iniciadores fluorescentes (Del Vecchio *et al.*, 1995). Sin embargo, su reproducibilidad puede ser baja si hay variabilidad en los reactivos, condiciones de PCR o electroforesis.

En *Campylobacter* han sido utilizadas todas las técnicas; sin embargo, ERIC-PCR ha mostrado en diferentes estudios una alta reproducibilidad y los patrones de ADN obtenidos son menos complejos que los generados por REP-PCR (Wilson *et al.*, 2009).

5.3. Técnicas basadas en la secuenciación

5.3.1. MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

El MLST estudia la variación genética de los aislamientos bacterianos mediante el análisis de los cambios genéticos producidos en siete genes *housekeeping*, genes altamente conservados por estar implicados en rutas metabólicas de gran importancia en la supervivencia celular. Los cambios genéticos producidos se traducen en la aparición de los distintos alelos de cada *locus* y la combinación de los alelos de los 7 *loci* da lugar a cada secuencia tipo (ST).

Las secuencias tipo que comparten cinco o más alelos se agrupan formando los llamados complejos clonales (CC), que tomarán el nombre de una secuencia tipo central de la que descienden todas las demás del complejo, de manera que en cada uno quedarán incluidas poblaciones bacterianas genéticamente relacionadas pero no idénticas (Dingle *et al.*, 2001; Urwin y Maiden, 2003).

En *Campylobacter* los genes *housekeeping* utilizados son *aspA* (aspartasa), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidrometil transferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transquelotasa), *uncA* (subunidad alfa de la ATP sintasa) (Levesque *et al.*, 2008).

Gracias al MLST se pueden conseguir caracterizaciones genotípicas de las cepas relativamente rápido, sin embargo el gasto económico es elevado (Djordjevic *et al.*, 2007; Lévesque *et al.*, 2008). Pese a ello, muchos autores la consideran una de las herramientas más útiles en el estudio epidemiológico de poblaciones bacterianas (Maiden *et al.*, 2006; Lévesque *et al.*, 2008).

Behringer *et al.* (2011) demostraron que una combinación de las técnicas MLST y PFGE mostraba un mayor poder discriminatorio que las técnicas Rep-PCR y *flaA*-RFLP.

5.3.2. SVR-*flaA* (*short variable region*)

El *locus* de la flagelina de *C. jejuni* contiene los genes *flaA* y *flaB* que están situados en tándem y están separados por aproximadamente 170 nucleótidos. Puesto que los dos son regiones altamente conservadas en la especie y variables, este *locus* es adecuado para utilizar la técnica PCR/ RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y la secuenciación de la región variable del gen *flaA*, SVR-*flaA* (*short variable region*) (Meinersmann *et al.*, 1997).

Por lo que respecta a la técnica SVR-*flaA* se basa en la amplificación del gen *flaA* y posterior secuenciación de la región variable situada entre las bases 283 y 603 del propio gen (Meinersmann *et al.*, 1997). Este gen codifica la proteína flagelina, de gran importancia en la patogenia de este microorganismo, ya que es el principal componente del flagelo y esta estructura es esencial en la colonización celular que se produce en la infección (Snelling *et al.*, 2005).

Las secuencias nucleotídicas se depositan en la base de datos PUBMLST (Jolley *et al.*, 2001; <http://pubmlst.org>), en el apartado correspondiente a *C. jejuni* y *C. coli* ([http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=sequence Query](http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=sequence%20Query)).

Esta técnica tiene un poder discriminatorio mayor que PCR/RFLP y diferencia correctamente un brote de *Campylobacter* de un caso aislado. Otra de sus ventajas es que la secuenciación del gen *flaA* proporciona una medida precisa de la variabilidad genética, debido a que se basa en la secuenciación de ADN. Sin embargo, la técnica requiere de un tiempo considerable. La región a estudiar es considerablemente pequeña, lo que delimita el poder de resolución. Y, por último, requiere de un secuenciador de ADN difícil de costear por un laboratorio común (Fitzgerald *et al.*, 2001). Además, a diferencia del MLST esta técnica no puede ser considerada como un método estable a largo plazo.

5.3.3. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Tras el proyecto del genoma humano, el análisis de los SNPs ha sido utilizado para identificar genes que están asociados a enfermedades (Weiner *et al.*, 2002). Asimismo, con el incremento de genomas procarióticos secuenciados el análisis de SNPs es cada día más estudiado para caracterizar y diferenciar cepas bacterianas (Zhang *et al.*, 2006).

En la evolución de las especies bacterianas una cepa diverge de otra genéticamente mediante deleciones o por la adición de secuencias genéticas que pueden darse por mecanismos como la transferencia horizontal de genes, recombinaciones o mutaciones de nucleótidos.

La técnica de análisis de SNPs cobra importancia en la diferenciación de bacterias por mutaciones de nucleótidos en *loci* específicos. Estos polimorfismos de un único nucleótido podrían alterar la identidad del aminoácido que codifican creando mutaciones con o sin sentido, dependiendo de la localización del aminoácido afectado. Muchos SNPs, especialmente aquellos que provocan mutaciones con sentido, persisten en el genoma bacteriano y pueden utilizarse como indicadores del origen o evolución particular de ciertos microorganismos y así diferenciarlos con exactitud.

Para localizar estos polimorfismos se utilizan diferentes técnicas como *microarrays* de oligonucleótidos, secuenciación de la región afectada o pirosecuenciación (Mortimer *et al.*, 2004; Roos *et al.*, 2006), espectrometría de masas (Lechner *et al.*, 2002), PCR a tiempo real, RFLP y citometrías de flujo entre otras.

El análisis de SNPs en aislamientos de *Campylobacter* va dirigido a los mismos loci específicos altamente conservados de la técnica MLST. Cuando el análisis SNP se combina con la secuenciación de la región variable del gen *flaA* el poder discriminatorio es similar al del análisis MLST (Price *et al.*, 2006).

5.4. Técnicas basadas en la hibridación

5.4.1. *Microarray* de ADN

Durante la última década, el desarrollo tecnológico de los equipos de secuenciación automatizada y de la bioinformática ha permitido el aumento exponencial en el número de trabajos científicos centrados en la secuenciación de genomas completos. De la mano de toda esta información genómica se han desarrollado nuevas herramientas para su análisis, como la tecnología de *microarrays* de ADN, que ha permitido el estudio de la presencia y ausencia o divergencia de genes y/o de la expresión génica para miles de genes en un solo experimento. Esta tecnología se ha usado durante los últimos años para el estudio de perfiles transcripcionales y de variaciones en el genoma de gran variedad de microorganismos. Gracias al incremento en el número de genomas microbianos secuenciados por completo, los *microarrays* de ADN se están convirtiendo en una herramienta fundamental en las principales áreas de investigación en microbiología como son la fisiología, epidemiología, ecología, patogénesis y filogenia microbianas.

La tecnología de los *microarrays* de ADN se basa en la automatización y robotización de las técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos. Esta técnica presenta como ventaja fundamental la inmovilización en la superficie del *microarray* de miles de sondas de ADN permitiendo analizar la presencia/ausencia de los genes o la expresión de estos a nivel del genoma completo en un único experimento (Garaizar *et al.*, 2006).

Los pasos a seguir en un experimento de *microarray* son fabricación e impresión del *microarray*, preparación de la muestra, prehibridación, hibridación, tratamiento de datos y análisis de estos.

Los *microarrays* de ADN están compuestos por sondas de ADN unidas a una superficie sólida en una disposición regular y prefijada. Los tipos de *microarrays* se pueden

clasificar en función de la naturaleza de la sonda: los *microarrays* de productos de PCR de ORFs (*Open Reading Frames*) y los *microarrays* de oligonucleótidos.

El ADN se deposita mediante un robot (*microarray spotter*) en el portaobjetos por *spotting* (de contacto), con un aplicador ultrasónico que deposita la muestra (pizeoeléctricos), o sintetizando *in situ* por métodos fotolitográficos y de fotoactivación (Lipshutz *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 2001).

Los impresores de contacto son los más económicos; su uso es relativamente sencillo y no se requiere una gran infraestructura para fabricar *microarrays* de ADN con estos equipos. Básicamente se trata de un brazo robótico con movimiento en los ejes X, Y y Z y su característica más importante es poderse desplazar en cualquiera de estas direcciones con una resolución de una décima de milímetro.

Los robots de contacto cuentan con una cabeza en la que se pueden colocar de uno a cuarenta y ocho aplicadores. Los aplicadores, son pequeñas agujas con una ranura en la punta similar a la punta de una pluma y al igual que en ésta, la muestra se toma y se deposita por capilaridad. Las superficies sobre las que se pueden imprimir los *microarrays* de ADN son dos, las membranas de materiales como la nitrocelulosa o el nylon y los portaobjetos de vidrio o epóxico, semejantes a los que se utilizan para microscopía. Estos últimos son los más utilizados, ya que los portaobjetos de vidrio de microscopía muestran una baja fluorescencia basal, admiten tratamientos de superficie para la unión covalente de las sondas y además permiten tener un mejor control sobre el diámetro de las aplicaciones y la distancia entre ellas. Los portaobjetos se pueden conseguir con diferentes recubrimientos como poli-lisina, aminas y aldehídos que permiten la unión química del ADN con la superficie.

Una vez impresos los *microarrays* el ADN debe ser fijado a la superficie. Esto se puede lograr horneando los *microarrays* a 80 °C por cuatro horas o con un entrecruzador de luz ultravioleta. Adicionalmente se delimita la región donde se encuentra el *microarray* y se

identifica cada portaobjetos, ya sea con un código de barras o un número de serie (Ramírez *et al.*, 2003).

Las muestras a analizar pueden ser o ADN (para búsquedas de secuencias específicas o de variaciones en las mismas) o de ARN (para perfiles de expresión).

Para la preparación de la muestra es necesario marcar con fluoróforos (Cy3 y Cy5) la misma. Este proceso consiste en la síntesis de cadenas complementarias de ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I que, a diferencia del enzima completo, carece de actividad 5'-3' exonucleasa. Esta síntesis, que usa ADN desnaturalizado por calor como sustrato monocadena, hace uso de una mezcla de oligonucleótidos muy cortos (hexámeros) de todas las posibles secuencias, que actúan de iniciadores de la reacción de polimerización que incorpora nucleótidos marcados.

Posteriormente se realiza la prehibridación o lo que es lo mismo, el bloqueo de la superficie de potencial unión no específica en el que no hay ADN depositado en el *microarray*. Tras la prehibridación se realiza la hibridación donde la solución y condiciones de hibridación son vitales para unos resultados óptimos. La solución de hibridación está compuesta por un tampón para estabilizar las posibles variaciones de pH, un detergente para disminuir la tensión superficial y compuestos para acelerar la hibridación o para bajar la T_m (*Melting Temperature*). Por último se realizan una serie de lavados para eliminar el ADN que no presentó homología con las sondas y para reducir el ruido de fondo (*background*).

Para obtener los datos para el posterior análisis estadístico el *microarray* se introduce en un escáner donde el láser excita las moléculas fluorescentes unidas al ADN y se genera la imagen de cada una de las muestras. Este procedimiento se hace para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 y otra para el fluoróforo Cy5. Para la obtención de estas imágenes se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores, de tal forma que ambas imágenes den

valores semejantes de fluorescencia total. El tubo fotomultiplicador (PMT) convierte los fotones en una señal eléctrica, que es transformada en una imagen digital de bits/pixel por medio de un convertidor. Una vez obtenidas estas imágenes, pueden ser combinadas para obtener un aspecto visual del *microarray*.

Para una buena interpretación de resultados es necesario realizar un análisis estadístico previo. Básicamente se trata de discriminar entre los miles de datos que se obtienen, aquéllos que son significativos y que representan un cambio real. Una vez obtenidos estos datos se construye una matriz y mediante programas informáticos se realiza el análisis filogenómico.

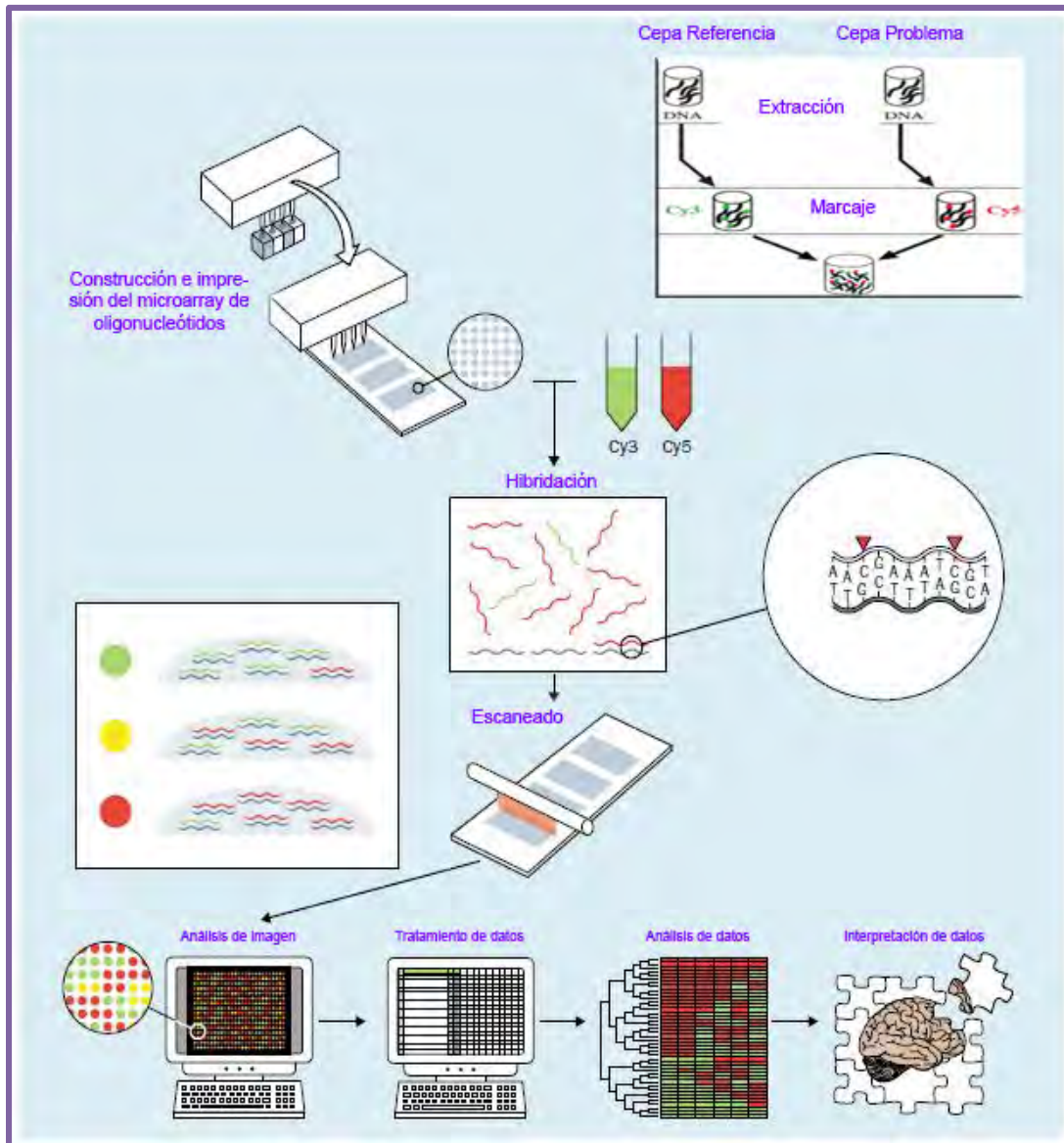


Figura 1. Esquema simplificado de las fases del proceso completo de *microarrays* de ADN (A Bryant *et al.*, 2004, dibujo modificado).

Los *microarrays* de ADN han sido muy utilizados para analizar mutaciones en el genoma (Call *et al.*, 2003) y para revelar la presencia de resistencias antibióticas y así estudiar la patogenicidad (Ma *et al.*, 2005). Recientes estudios han estudiado la filogenómica y la microevolución de las bacterias patógenas utilizando *microarrays* de ADN (Dorrell *et al.*, 2005).

La aplicación de la tecnología de los *microarrays* es todavía muy esporádica en tipificación bacteriana ya que no son muchos los genomas secuenciados y el coste de todo el proceso es muy elevado. Aun así, la comparación de cepas mediante la hibridación del ADN genómico con *microarrays* es una nueva aproximación frente a la secuenciación completa de cepas. Las comparaciones genómicas entre cepas de la misma especie con diferente grado de patogenicidad informan sobre los genes necesarios para la virulencia o la adaptación a un nicho hospedador-específico; éste el caso de las islas de patogenicidad, que codifican factores de virulencia.

Una de las ventajas de esta técnica es la riqueza de la información que se obtiene y su flexibilidad. También permite analizar simultáneamente miles de genes de la bacteria con una baja proporción de falsos positivos y negativos. Cuando esta técnica es combinada con análisis computerizados y herramientas de visualización proporcionan una nueva capacidad para observar relaciones entre microorganismos estrechamente relacionados (Quackenbush *et al.*, 2001).

Sin embargo, los *microarrays* de ADN al igual que todos los métodos también tienen limitaciones o desventajas. Tienen un alto coste inicial para sintetizar tanto los iniciadores de genes específicos necesarios para amplificar cada gen como los oligonucleótidos que posteriormente serán depositados en el *microarray* y de igual manera, el resto de reactivos y maquinaria necesaria para realizar el experimento completo también supone cuantías muy elevadas. Por otro lado debería ser destacada la ambigüedad de la interpretación de los ratios de hibridación e hibridación cruzada entre genes parálogos (Van Bakel y Holstege, 2004).

Respecto al análisis estadístico todavía no existe un criterio sólido para determinar presencia/ausencia de genes puesto que existe una alta diversidad de tipos de *microarrays* y esto afecta al posterior metanálisis de los datos obtenidos por diferentes laboratorios (Joyce *et al.*, 2002).

Los *microarrays* de oligonucleótidos están diseñados generalmente con sondas que poseen temperaturas similares de hibridación mientras que las sondas obtenidas por amplificación de PCR tienen condiciones diferentes de hibridación. Las variaciones intra e inter*microarrays* pueden entorpecer la interpretación de los datos obtenidos. Estas limitaciones son más restrictivas para el estudio de la expresión de genes y menos problemáticas en la hibridación comparativa de genomas (CGH, *Comparative Genome Hybridization*).

Sin embargo, la reproducibilidad de los datos entre laboratorios necesita ser establecida. Desafortunadamente se han realizado pocos estudios para comparar los resultados de *microarrays* con las técnicas fenotípicas y genotípicas ya consolidadas y así estimar el grado de concordancia entre ellas.

Un *microarray* de productos de PCR puede detectar pérdidas de ORFs completas, sin embargo no puede detectar deleciones menores, mutaciones puntuales, deleciones en los espacios intergénicos, reorganizaciones genéticas, deleciones de elementos homólogos repetitivos o inserciones de genes. Los *microarrays* de productos de PCR generalmente no tienen la suficiente resolución para detectar la deleción de una parte pequeña de un gen o secuencias variables dentro de un gen. Todo esto puede llevar a una subestimación de las regiones variables. Los *microarrays* de oligonucleótidos son más precisos a la hora de detectar polimorfismos en nucleótidos pero requiere una cantidad muy alta de sondas de un elevado gasto económico.

La inserción de genes en la cepa test, comparada con la cepa de referencia ya secuenciada no puede ser detectada en *microarrays* de ADN. Este problema puede reducirse añadiendo secuencias amplificadas no redundantes de diferentes bacterias estrechamente relacionadas (Borucki *et al.*, 2003, 2004; Porwollik *et al.*, 2003; Cassat *et al.*, 2005).

El genotipificado de microorganismos mediante esta técnica puede revolucionar la identificación bacteriana, y se espera que en el futuro sea incluida para el diagnóstico clínico

y el control de calidad en la industria. La aplicación de los perfiles de expresión bacterianos promete seguir siendo muy útil en la investigación microbiológica.

Aunque el diseño y construcción de los *microarrays* de ADN hoy en día está limitado a un número bajo de laboratorios y condicionado a bacterias ya secuenciadas, las compañías han encontrado negocio en ello y se está incrementando la construcción y distribución.

Numerosas publicaciones destacan la alta detección mediante *microarrays* de ADN de regiones genéticas muy variables dentro de una misma especie. En el futuro los *microarrays* de oligonucleótidos *in situ*, incrementarán notablemente el número de sondas por *microarray* permitiendo así la detección de cada vez más pequeñas variaciones genéticas.

El continuo desarrollo tecnológico hará posible próximamente la mejora de la técnica de *microarrays* de ADN, haciéndola mucho más efectiva y pudiendo responder con más eficacia a cuestiones a escala genómica, o lo que es lo mismo, del organismo completo.

6. Genomas secuenciados de *Campylobacter*

En los últimos años, las secuencias genómicas de algunas especies de las epsilonproteobacterias del orden *Campylobacterales* han sido secuenciadas incluyendo nueve especies de *Campylobacter jejuni* (NCTC11168, RM1221, 269.97, 81-176, 81116, IA3902, ICDCJ07001, M1, S3) y una cepa de cada una de las siguientes especies: *C. concius*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. curvus*, *C. hominis* (Tabla 2). Además, a enero de 2011 se encuentran 28 proyectos de secuenciación de especies de *Campylobacter* por terminar de secuenciar, la gran mayoría de las secuenciaciones realizadas por el instituto TIGR (*The Institute for Genomic Research*), donde están incluidas especies como: *C. coli*, *C. concius*, *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. upsaliensis*. Muchas de estas secuencias están en estado de ensamblaje y pronto estarán accesibles en la base de datos del NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). La accesibilidad a estas secuencias abre nuevas perspectivas para el estudio de genómica comparativa.

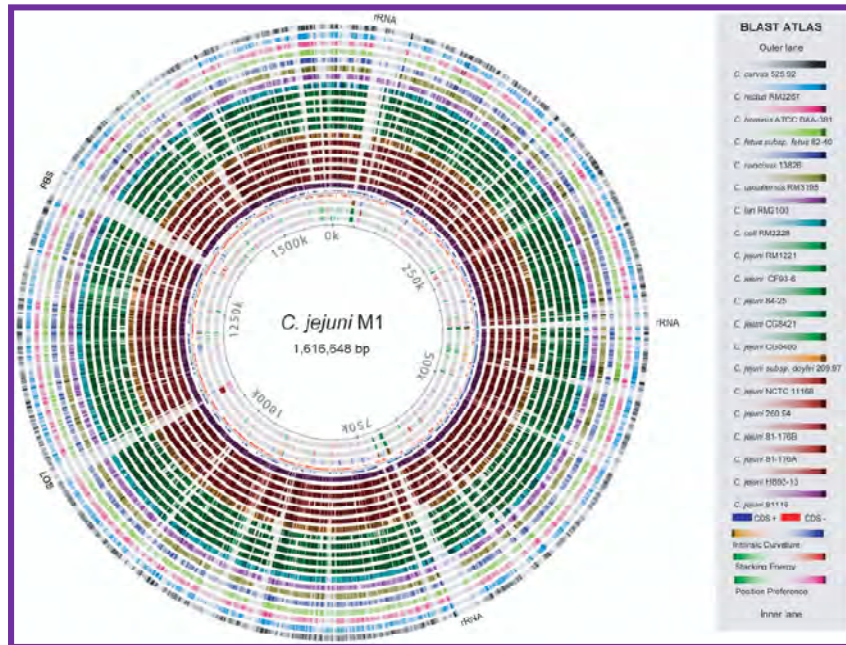


Figura 2. Genomas secuenciados de *Campylobacter* (Friis et al., 2010).

Tabla 2. Proyectos de secuenciación genómica de *Campylobacter*.

Especie	Longitud(nt)	% G/C	%Secuencias codificantes	Nº genes	Proteínas codificantes	ARN estructurales	Pseudogenes	Completado	RefSeg Centro Secuenciación
<i>C. concius</i> 13826	2.052.007	39	83	2139	1929	59	151	2007	NC_009802.1
<i>C. curvus</i> 525-92	1.971.264	44	86	2108	1931	70	119	2007	NC_009715.1
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 82-40	1.773.615	33	90	1820	1719	51	50	2006	NC_008599.1
<i>Campylobacter hominis</i> ATCC BAA-381	1.711.273	31	84	1799	1682	56	61	2007	NC_009714.1
<i>Campylobacter jejuni</i> RM1221	1.777.831	30	90	1940	1938	56	46	2002	NC_003912.7
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 269-97	1.845.106	30	82	2037	1731	61	251	2007	NC_009707.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176	1.616.554	30	93	1707	1653	54	0	2007	NC_008787.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81116	1.628.115	30	93	1681	1626	54	1	2007	NC_009839.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> IA3902	1.635.045								
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> GDCC07001	1.664.840	30	85	1632	1494	53	85	2010	NC_014802.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> M1	1.616.648				1624			2010	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> M11	1.641.481	30	92	1699	1623	56	20	2001	NC_002163.1
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> MCTC 11168	1.681.364	30			1761	44	28	2011	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> S3	1.525.460	29	93	1571	1503	57	11	2009	NC_012039.1
<i>Campylobacter lari</i> RM2100	1.674.540	30	92	1801	1756	40	5		University of Liverpool Cornell University
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1336									
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 2008-979									TIGR
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 260-94	1.657.846	30	94	1760	1716	44	0		University of Copenhagen
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 305									University of Liverpool
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 327									TIGR
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 414	1.686.453	29	90	1840	1800	34	6		University of Copenhagen
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 84-25	1.671.624	30	93	1794	1748	46	0		TIGR
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> BH-01-0142	1.676.304	30	93	1803	1757	46	0		Naval Research Center
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> CF93-6	1.608.937	30	85	1590	1512	0	9		TIGR
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> CG8421	1.597.692	30	80	1588	1425	0	3		Naval Research Center
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> CG8486									NMRC
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> DFVF1099									University of Copenhagen
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> H22082									Massey University
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> HB93-13	1.694.788	30	92	1710	1710	0	0		TIGR
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> P110B									Massey University
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> GDCC07001 plasmid pTet	44.084	28	81	37	37	0	0	2010	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176 plasmid pTet	45.025	29	92	52	52	0	0	2007	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176 plasmid pVir	37.473	25	85	53	53	0	0	2007	
<i>Campylobacter jejuni</i> plasmid pCJ1170	4.381	30'	61	3	3	0	0	2006	
<i>Campylobacter jejuni</i> plasmid pCJ01	3.212	33	62	4	4	0	0	2006	
<i>Campylobacter jejuni</i> plasmid pCJ419	4.013	30	63	4	4	0	0	2003	
<i>Campylobacter coli</i> CC31 plasmid pCC31	44.707	29	92	50	50	0	0	2004	

6.1. Genoma de *C. jejuni* NCTC11168

El genoma de *C. jejuni* NCTC11168 fue el primero en ser secuenciado y publicado en el año 2000 por el instituto *Sanger* (Parkhill *et al.*, 2000). Para la secuenciación de este genoma se utilizaron varias librerías de 1.4-2.2 kb del plásmido pUC18. Este cromosoma circular fue generado mediante 33.824 lecturas de secuenciación y contiene 1.641.481 pares de bases (30,6 % G+C) que codifican 1623 proteínas y 56 ARN estructurales. De las 1623 secuencias codificantes predictivas veinte probablemente representan pseudogenes. Es conocida o se predice la función del 77,8 % de las secuencias codificantes mientras que del 13,5 % de ellas la función es desconocida y el 8,7 % restante son genes huérfanos.

El contenido G+C del cromosoma indica que el origen de replicación se sitúa cerca del inicio del gen *adnA*. Existen dos regiones con un alto contenido G+C que corresponden a *clusters* de biosíntesis de lipooligosacáridos (LOS, *Cj1135-Cj1148*) y polisacáridos extracelulares (CAP, *Cj1421-Cj1442*). El 61,1 % de las secuencias codificantes se transcriben en la misma dirección que la replicación. Exceptuando los *clusters* de LOS y CAP, los dos operones de proteínas ribosomales y los genes que codifican el flagelo, el cromosoma de *C. jejuni* parece estar organizado en *clusters* funcionales. Es importante remarcar la ausencia de operones funcionales en genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (aa) exceptuando los genes que codifican: his, leu y trp. Sin embargo los genes que codifican para aro, asp, dap, gln, gly, ilv, met, phe, pro, ser, thr y tyr se encuentran dispersos de manera aleatoria por todo el genoma.

Una de las características más sorprendentes del genoma de *C. jejuni* es la ausencia de secuencias repetitivas de ADN ya que sólo contiene cuatro que comprenden tres copias del operón de los ARNr. Aparte de *Cj0752* que es similar a una parte de IS605 *tnpB* de *H. pylori*, no hay evidencias de que existan secuencias de inserción (IS), transposones, retrones o profagos en el genoma.

Otro de los hallazgos sorprendentes del genoma de *C. jejuni* son la presencia de secuencias variables compuestas de secuencias cortas homopoliméricas (variaciones en poliG:C). Estas secciones homopoliméricas son comúnmente encontradas en genes que codifican la biosíntesis o modificación de las estructuras de la superficie bacteriana y en genes cuya función no es aún conocida. Aparentemente el alto índice de variación de estas regiones homopoliméricas puede estar relacionado con estrategias de supervivencia. Estas variaciones que ocurren durante el proceso de replicación pueden ser favorecidas por los genes de reparación de *C. jejuni* aunque carece de genes de reparación directa (*ada*, *phr*), glicosilasas (*tag*, *alkA*, *mutM* y *nfo*) y genes SOS (*lexA*, *umuC* y *umuD*).

C. jejuni y *H. pylori* están muy relacionados por la filogenia del 16S ARNr y algunas propiedades biológicas, por lo que fueron clasificados hace años dentro del género *Campylobacter*. A pesar de esta estrecha relación filogenética, los genomas son ortólogos en un 55,4 %, principalmente en genes *housekeeping*. Al igual que *H. pylori*, *C. jejuni* contiene sólo tres factores sigma predictivos (*rpoD*, *rpoN* y *fliA*) pero parece que posee varios sistemas de regulación de dos componentes (histidín-proteín-quinasas y reguladores de respuesta). Sin embargo, en funciones relacionadas con la supervivencia, transmisión y patogénesis no muestran relación alguna. Esto indica que la presión selectiva creó dos patógenos muy específicos y apropiados para sus nichos. El 28 % de los genes de *C. jejuni* muestran similitud con *E. coli*, un 27 % con *B. subtilis*, un 4,6 % con *Archeoglobus fulgidus* y un 2,1 % con *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2. Genoma de *C. jejuni* RM1221

La cepa RM1221 fue secuenciada y comparada frente a la cepa NCTC11168 en diversos estudios (Taboada *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2006). La estructura genómica de *C. jejuni* RM1221 y la cepa *C. jejuni* NCTC11168 es semejante. Sin embargo, esta semejanza se ve disminuida por la inserción de profagos e islas genómicas en el caso de la cepa RM1221 y en el caso de la cepa NCTC11168 por la aparición de ORFs (*Open Reading Frames*) dentro del *loci* de los polisacáridos capsulares.

La mayor diferencia entre las cepas de *C. jejuni* NCTC11168 y RM1221 es la presencia de cuatro islas genómicas. Las cuatro islas genómicas son referidas como elementos integrados de *C. jejuni* (CJIE). Las islas, están consideradas como parte del material genético flexible de las bacterias ya que con frecuencia poseen secuencias adquiridas de fagos o plásmidos conteniendo ciertos genes de transferencia, transposasas, integrasas y otros elementos de inserción. Las islas genómicas son estructuras dinámicas que se transfieren horizontalmente de una bacteria a otra como una unidad. Suelen poseer tamaños de entre 10 y 100 kb y además, se caracterizan por estar flanqueados por secuencias repetidas directas y genes que codifican para ARNt. A parte de los genes mencionados, estas islas poseen genes funcionalmente relacionados (islas de patogenicidad, islas de simbiosis, islas metabólicas, islas de resistencia antibiótica, islas de secreción...). Tal y como ocurre con cualquier elemento de ADN extra cromosómico, en su mayor parte estas islas, se diferencian del ADN propio por su contenido G+C. Ciertos análisis realizados a islas genómicas mostraron el contenido de ciertos genes que codifican proteínas relacionadas con transferencia, recombinación, restricción y modificación y otros genes relacionados con funciones útiles para la supervivencia y transmisión de microorganismos, lo cual dota de ventajas selectivas al organismo que lo posea dentro de una población.

La primera isla genómica CJIE1 (también llamada CMLP1) está localizada río arriba de *argC* (CJE0275) y codifica proteínas similares a las proteínas de bacteriófagos *Mu* y otros *Mu-like* profagos, incluyendo transposasas putativas homólogas a MuA y MuB. Las islas CJIE2 y CJIE4 poseen genes predictivos que codifican endonucleasas relacionadas con fagos, metilasas y represores y están integradas en el extremo 3' de arginil y metionil-ARNt respectivamente. Y por último la isla CJIE3 (integrada en el extremo 3' de arginil-ARNt) muestra homología con un 73 % de las proteínas del megaplásmido pCC178 de *C. coli* RM2228 sugiriendo que puede ser un plásmido integrado (Parker *et al.*, 2006). Además el 23 % de los productos de CJIE3 son similares a las proteínas encontradas entre los 71 Kb de islas de patogenicidad que contiene *Helicobacter hepaticus* (HHG11) (Fouts *et al.*, 2005). Los tres elementos CJIE2, CJIE3 y CJIE4 están situados colindantes a los genes ARNt y esto es muy común en otras islas de patogenicidad (Hou *et al.*, 1999).

Un estudio basado en hibridación genómica comparativa (CGH *microarrays*) donde estudiaron 67 cepas de *C. jejuni* y 12 de *C. coli* demostró que estas islas también estaban presentes en otras cepas de *Campylobacter* (Parker *et al.*, 2006). Sin embargo algunas secuencias codificantes presentes entre CJIEs estaban ausentes o altamente divergentes en 26 cepas de *C. jejuni*, demostrando la alta variabilidad en estas regiones. Un 55 % de las cepas estudiadas de *C. jejuni* fueron positivas para una CJIE y el 27 % para dos o más. Además un 58 % de las cepas de *C. coli* contenían islas aunque solo poseían CJIE1 o CJIE3. Las islas CJIE1 y CJIE3 poseen puntos de inserción en el genoma muy variables.

6.3. Genoma de *C. jejuni* 81-176

El genoma y los plásmidos de la cepa *C. jejuni* 81-176 exhiben ciertas características patogénicas exclusivas de esta especie. Esta cepa contiene dos plásmidos residentes, pVir y pTet. Sin embargo este genoma es comparativamente más pequeño que los genomas de las cepas RM1221 y NCTC11168 debido al número reducido de genes implicados en la cápsula y síntesis del flagelo y la ausencia de profagos como en la cepa RM1221.

Esta cepa contiene vestigios de elementos integrados como un sistema de restricción-modificación de ADN probablemente adquirido horizontalmente. La estructura genómica de *C. jejuni* 81-176 es muy similar a la de NCTC11168, exceptuando algunas duplicaciones, deleciones o inserciones de islas genómicas de diferentes tamaños. Esta cepa también contiene regiones de plasticidad hipervariables que se localizan en los *clusters* de genes que codifican LOS y biosíntesis de la cápsula así como el *loci* de glicosilación, pero carece de cincuenta y uno genes en comparación con la cepa NCTC11168 (Hofreuter *et al.*, 2006).

La cepa 81-176 contiene treinta y siete genes, ausentes en las cepas RM1221 y NCTC11168, localizados en 11 regiones del cromosoma y relacionados con la colonización y la virulencia. Como ejemplo, *C. jejuni* 81-176 codifica funciones adicionales de respiración que pueden contribuir a su habilidad única de colonizar eficientemente el intestino del

huésped. El *cluster* adicional del gen que codifica los componentes de la DMSO reductasa de *Wolinella succinogenes* (DmsABCD) se ha propuesto como de vital importancia para la respiración en condiciones restrictivas de oxígeno. Otro ejemplo de las vías respiratorias de la cepa 81-176 es el *cluster* adicional de genes de biogénesis del citocromo c (*cytC*).

Por otro lado, existe un gen que codifica una posible γ -glutamyltranspeptidasa (Ggt) que sólo está presente en la cepa 81-176 y es requerido por *H. pylori* para la colonización en animales (McGovern *et al.*, 2001). Esta enzima pertenece a la vía antioxidante del glutatión y contribuye a contrarrestar el estrés oxidativo. El papel de la Ggt en la patogénesis de *C. jejuni* 81-176 fue testada utilizando mutantes de *ggt*. El mutante no mostraba defectos en el crecimiento y era capaz de entrar y sobrevivir entre células epiteliales cultivadas del intestino. Sin embargo su habilidad de colonizar los ratones se vio reducida. Estos resultados indican que el gen *ggt* contribuye en la virulencia.

Los mutantes de los genes *dmsA* y *cytC* no mostraron alteración en el crecimiento y también eran capaces de entrar y sobrevivir entre células epiteliales cultivadas del intestino. Sin embargo, después de tres semanas de la infección el mutante *dmsA* mostró defectos en el poder de colonización.

Los genomas de *C. jejuni* NCTC11168 y RM1221 contienen un número alto de pseudogenes, como resultado de los marcos de lectura o de la significativa degeneración de los ORF. Algunos de estos pseudogenes codifican proteínas funcionales en la cepa 81-176 como *glpT* (transportador glicerol-3-fosfato). Este gen aparece alterado en la cepa RM1221 pero intacto en la 81-176. El poder de transportar el glicerol-3-fosfato puede conferir ventajas metabólicas en esta cepa. Otro caso que parece funcional en la cepa 81-176 y no en las cepas NCTC11168 y RM1221 son los genes que codifican una ATPasa de transporte de potasio (*kdpABC*). La presencia de este sistema adicional puede beneficiar el crecimiento de la cepa 81-176 en vacuolas fagocíticas, donde la concentración de potasio es baja (Wagner *et al.*, 2005).

6.4. Regiones variables

Dorrell *et al.* (2001) construyeron un *microarray* de ADN de productos de PCR con las 1731 secuencias codificantes de la cepa NCTC11168 de *C. jejuni*. Estudiaron once cepas y encontraron que las regiones ausentes estaban asociadas con la biosíntesis de estructuras de la superficie de la bacteria, con el flagelo, con los lipooligosacáridos y con la cápsula. Otras zonas variables incluían genes relacionados con la asimilación del hierro y con sistemas de restricción/metilación del ADN.

Pearson *et al.* (2003) encontraron en *C. jejuni* mediante *microarrays* de ADN siete regiones de plasticidad hipervariable (PR1-PR7). La región PR1 (Cj0295-Cj0306c) contiene genes importantes en la utilización de aceptores de electrones alternativos y pueden conferir ventajas a las cepas en situaciones de oxígeno restrictivas. Las regiones PR2 (Cj0480-Cj0490), PR3 (Cj0727-Cj0741) y PR7 (Cj1717-Cj1729) contienen genes de proteínas de membrana, proteínas periplásmicas y proteínas hipotéticas que pueden estar relacionadas con variaciones fenotípicas y adaptación a diferentes nichos ecológicos. Y las regiones PR4 (Cj1135-Cj1145), PR5 (Cj1296-Cj1342) y PR6 (Cj1415-Cj1442) contienen genes relacionados con la producción y modificación de estructuras antigénicas de superficie. Muchas de las regiones hipervariables son coincidentes con *clusters* de genes responsables de biosíntesis de lipooligosacáridos, polisacáridos extracelulares y modificación del flagelo. Muchos genes relacionados con la biosíntesis de lipooligosacáridos solo pueden encontrarse en la cepa 81-176 de *C. jejuni* lo que explicaría la alta divergencia entre aislamientos de *C. jejuni* (Poly *et al.*, 2005).

Taboada *et al.* (2004) realizaron un metanálisis con 97 cepas de *C. jejuni* incluyendo tanto cepas procedentes de alimentos como de aislamientos clínicos. Diferenciaron dentro del genoma 599 genes variables de los cuales 122 fueron determinadas como genes altamente divergentes, distribuidos en dieciséis regiones que incluían las regiones descritas anteriormente por Dorrell *et al.* (2001), y sugirieron que el microorganismo presentaba altos niveles de diversidad genética y bajos niveles de plasticidad genética. Al comparar los

genomas de las cepas NCTC11168 y RM1221 demostraron que poseían genes diferentes en once de las dieciséis regiones variables y altamente divergentes en trece de las dieciséis. Además se identificó la región hipervariable 17 (*Cj0258-Cj0263*).

Tanto los genes comunes como los diferentes entre las cepas ATCC 43431 y NCTC11168 también han sido estudiados con *microarrays* CGH. Poly *et al.* (2004) encontraron 88 ORFs (*Open Reading Frames*) (5,3 % del total de ORFs) ausentes en la cepa ATCC 43431, mientras que Dorrell *et al.* (2001) identificaron 117 genes ausentes en esta misma cepa. Muchos de estos genes se situaban en zonas de plasticidad PZ1-PZ5. Estas zonas fueron anteriormente descritas como regiones de plasticidad hipervariables entre cepas de *C. jejuni* (Pearson *et al.*, 2003; Poly *et al.*, 2004) e incluían genes que codifican proteínas involucradas en la modificación y transporte del azúcar (PZ3), biosíntesis de LOS (PZ4) y el *locus* del polisacárido capsular (PZ4). La ausencia de algunos genes en PZ1 como *Cj0265c* (*putative cytochrome c-type heme-binding periplasmic protein*) y *Cj0624c* (*molybdenum-containing enzyme C*) sugieren que la cepa ATCC 43431 no utiliza estos aceptores de electrones.

Por otro lado, Leonard *et al.* (2004), compararon cepas de *C. jejuni* relacionadas con el Síndrome de Guillain-Barré con cepas que no presentaron complicaciones en infecciones gastrointestinales. En este estudio pudieron confirmar la heterogenidad entre las cepas estudiadas pero no pudieron encontrar genes directamente relacionados con el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré.

Champion *et al.* (2005) propusieron, a partir de estudios filogenómicos comparativos, un *cluster* de genes (*Cj1321-Cj1326*) en *C. jejuni* como posible marcador de fuente de infección. Sin embargo, Kärenlampi *et al.* (2007) basándose en la detección por PCR de estos genes, encontraron divergencias con la hipótesis inicial propuesta por Champion *et al.* (2005). Entre las posibles causas de esta divergencia se propuso el origen geográfico de las cepas (Kärenlampi *et al.*, 2007).

Fouts *et al.* (2005) compararon las secuencias de las proteínas de la cepa RM1221 con el resto de bacterias del grupo de las epsilonproteobacterias y revelaron que comparten entre ellas 540 secuencias de proteínas de las cuales algunas tienen funciones *housekeeping*. En el mismo estudio, de las 1084 secuencias de proteínas compartidas por todas las especies de *Campylobacter*, 46 no mostraron coincidencia con ningún otro microorganismo. Once de estas tenían funciones relacionadas con la biosíntesis de la envoltura celular y con el metabolismo de los ácidos grasos y fosfolípidos. Por otro lado, de las 300 proteínas específicas de *C. jejuni* RM1221 solo 95 no pertenecían a fagos o islas genómicas.

6.5. Plásmidos de *Campylobacter*

Han sido descritos plásmidos entre el 19 y el 53 % de las cepas de *C. jejuni* (Tenover *et al.*, 1985) y muchos de ellos han sido descritos como plásmidos R, transmisibles entre *Campylobacter* pero no a *E. coli* (Taylor *et al.*, 1983). Todavía no está claro el papel de estos plásmidos en la patogenicidad de *Campylobacter*.

6.5.1. Plásmido pVir

Este plásmido contiene dos regiones largas no codificantes, una de ellas con un porcentaje G+C muy bajo (19 %) sugiriendo un posible origen de replicación. Un total de 35 ORFs codifican posibles proteínas que no presentan ortólogos en las bases de datos y hasta la fecha parecen ser específicas de *C. jejuni*. Además, ocho proteínas poseen ortólogos (dos en NCTC11168 y 6 en *H. pylori*) cuyas funciones son todavía desconocidas. Todos los ORFs nombrados anteriormente poseen zonas de unión a ribosomas (RBS). Pero sólo dos de los ORFs anteriores poseen un codón de iniciación alternativo. Esta frecuencia del codón de iniciación AUG (96,3 %) es mayor que la observada en la cepa NCTC11168 (86,2 %).

Existen dieciséis proteínas putativas que son menores de cien residuos y aproximadamente diecinueve que se encuentran entre 100-200 residuos. Esto muestra una

proporción alta de proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo la calidad de la secuencia de pVir es muy alta y todas los RBS preceden a estas pequeñas proteínas. Hay siete *clusters* de genes en pVir que codifican homólogos de las proteínas de secreción de tipo IV posiblemente involucradas en la transferencia del plásmido conjugativo o en la secreción de los factores de virulencia. Este sistema de secreción presenta mucha similitud con el sistema de secreción tipo IV de *H. pylori*. Muchos análisis han mostrado la importancia de al menos dieciséis genes en el proceso de invasión pero pVir es insuficiente para la invasión.

6.5.2. Plásmido pTet / pCC31

La secuencia del plásmido pCC31 (44.707 pb) contiene 50 ORFs. De ellas 44 se transcriben en dirección a las agujas del reloj con respecto a *tet0*. pTet es solo un 1 % más largo que pCC31 (45.205 pb) y contiene 49 ORFs, transcribiéndose 43 de ellas en dirección a las agujas del reloj (Batchelor *et al.*, 2004). El ADN de los dos plásmidos es idéntico en un 94,3 % con un 90 % de secuencias codificantes. El contenido G+C es similar: 29,8 % (pCC31) y 29,1 % (pTet). Sólo ha sido identificada una región con alto contenido G+C la cual contiene el gen *tet0* (40,4 % G+C), sugiriendo una transferencia horizontal para el origen de este gen. Los dos plásmidos difieren en dos regiones. La primera, pCC31 contiene el gen *cpp15* que codifica una proteína similar a una proteína hipotética de *H. pylori* y está ausente en pTet. En la segunda el gen *cpp21* codifica una proteína similar en un 50 % a una proteína hipotética de *H. pylori*. También puede encontrarse el gen *cpp48* en pCC31 y no en pTet.

pTet y pCC31 contienen diez genes que codifican posibles proteínas que muestran homología con el complejo multicomponente T4SS, que puede translocar proteínas y complejos de nucleoproteínas. Los dos plásmidos codifican un homólogo a VirB2 que representa el primer gen del *pili* identificado en *Campylobacter* (Parkhill *et al.*, 2000). También contienen un homólogo de los genes *VirB5*, *VirB6*, *VirB7*, *VirB8*, *VirB9* y *VirB10* asociado a VirB2 (posible precursor de un canal de membrana citoplasmática) y de tres ATPasas asociadas con T4SS, VirB11, D4 y B4. Ambos plásmidos codifican ADN nicasas y helicasas

putativas relacionadas con la producción de ADN de cadena simple así como *ssb1* (proteína de unión ssADN) que protege el ADN de cadena simple durante la transferencia.

6.5.3. Plásmidos crípticos

Existen pequeños plásmidos crípticos entre diferentes cepas de *Campylobacter*. Por ejemplo, *C. coli* contiene dos ya secuenciados: p3384 (3316 pb, 31,18 % G+C) y p3386 (2426 pb, 26,22 % G+C). El plásmido p3384 contiene tres ORFs putativas: repA, repB y Mob y p3386 dos proteínas hipotéticas y un rep3 (Jesse *et al.*, 2006).

Otro plásmido críptico secuenciado es el pCJ419 (4013 pb, 27,1 % G+C) con 22 pb de una región rica en A/T con características de origen de replicación (Alfredson *et al.*, 2003). También contiene cuatro genes putativos que codifican un tipo-Mob, iniciador de la replicación de tipo RepAB y una proteína hipotética, esta última es un 91 % idéntica a una proteína de función desconocida, Cjp32, del plásmido de virulencia de *C. jejuni* pVir (Bacon *et al.*, 2002).

7. Inferencia filogenética

La inferencia filogenética implica el desarrollo de hipótesis sobre los patrones de relación, buscando aquél que mejor explique las evidencias disponibles. El objetivo de la inferencia filogenética es construir un árbol que refleje la historia evolutiva de los taxones definidos en función de la información procedente de diversos tipos de datos, ya sean morfológicos, genéticos o de otra índole.

Existen un gran número de procedimientos que permiten realizar reconstrucciones filogenéticas. Estos métodos pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a la forma con que se utilizan los datos extraídos (métodos de distancia y métodos discretos) o atendiendo a

la forma de construir árboles filogenéticos (métodos de agrupamiento y métodos de búsqueda).

Los métodos de distancias calculan las matrices de distancia utilizando la matriz de datos y con ello se construye el árbol filogenético. Sin embargo, los métodos discretos consideran directamente la posición y distribución de los datos.

Los métodos de agrupamiento obtienen un árbol empleando un algoritmo matemático, mientras que los métodos de búsqueda optimizan los patrones de distribución de los caracteres en base a un criterio determinado que les permite elegir entre un conjunto de árboles posibles.

7.1. Métodos de distancia

Transforman las diferencias observadas en un valor de disimilitud, para después bien mediante la aplicación de métodos de optimización o mediante métodos algorítmicos, construir el árbol que se ajuste lo máximo posible a la matriz de distancias calculada.

El método de optimización más utilizado es el método de la mínima evolución, donde a partir de la matriz de distancias y mediante una búsqueda heurística se elige aquel árbol cuya longitud total de ramas sea mínima.

Entre los métodos algorítmicos más utilizados para la reconstrucción filogenética se encuentran el UPGMA (*Unweighted pair-group with arithmetic means*) (Sneath y Sokal., 1973) y NJ (*Neighbor-Joining*) (Saitou y Nei, 1987). El UPGMA utiliza un algoritmo de agrupamiento secuencial para obtener así un árbol ultra numérico. Mediante este método se encuentra en la matriz de datos la distancia más pequeña entre dos cepas y las une en una rama con una longitud proporcional a esa distancia. Una vez unidas, considera a ambas secuencias una pseudo-secuencia y recalcula su distancia, respecto al resto de secuencias, como la media de ambas secuencias a cada una de las demás. El método UPGMA produce

árboles enraizados y requiere presuponer una tasa constante de evolución, es decir, se asume un árbol en el que las distancias desde la raíz a cada extremo de las ramas son iguales. Sin embargo, el método NJ produce árboles no enraizados, pero no asume una tasa constante de evolución entre los linajes. El NJ modifica la matriz de distancias inicial de tal manera que la divergencia entre datos se ajusta de acuerdo a la divergencia media del resto de datos.

7.2. Métodos discretos

La información obtenida mediante estos métodos es obtenida teniendo en cuenta la posición y distribución de los datos. Entre los métodos más utilizados se encuentran: máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana.

El método de la máxima parsimonia trata de buscar la topología que requiera el menor número de pasos para explicar la matriz de datos y la suma de los pasos de cada uno de los datos representa la longitud total del árbol. Por otro lado, el método de máxima verosimilitud se basa en obtener el árbol que presenta la probabilidad o verosimilitud más alta de producir la alineación observada.

La inferencia bayesiana es un método de inferencia filogenética rápido y eficaz (Rannala y Yang, 1996) que permite realizar particiones de los datos y posee ciertas ventajas computacionales. En este método la probabilidad *a priori* de obtener una determinada inferencia filogenética se ve transformada en una probabilidad *a posteriori*, una vez incorporada la evidencia que aportan los datos. Es por ello que la mejor inferencia filogenética es la que maximiza la probabilidad posterior de que un árbol sea el correcto (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

La probabilidad posterior es calculada mediante el Teorema de Bayes teniendo en cuenta la probabilidad *a priori* de una filogenia (verosimilitud) y la probabilidad de los datos. Calcular las probabilidades posteriores de todos los árboles no es factible y es por ello que se

intenta realizar una aproximación de estas para obtener la probabilidad posterior de una determinada filogenia. Esta aproximación se calcula mediante el método MCMC (Markov Chain Monte Carlo) (Metropolis *et al.*, 1949) implementado en el programa informático MrBayes.

7.3. Árboles filogenéticos

Las inferencias filogenéticas pueden mostrar un error de muestreo que puede dar lugar a un árbol incorrecto. Los errores pueden darse por una topología incorrecta o por un error en la longitud de las ramas (Nei y Kumar, 2000). Es imposible saber si una topología es incorrecta pero existen métodos que evalúan el grado de confianza y la robustez de la topología. Entre estos métodos el más utilizado es el *bootstrap*, que define los límites de confianza de las ramas internas en un árbol filogenético (Felsenstein *et al.*, 1985).



Objetivos

La finalidad del trabajo fue determinar el grado de variabilidad (diversidad y/o posible plasticidad) genómica entre cepas de *Campylobacter jejuni* procedentes de diversas áreas geográficas y diferentes fuentes de aislamiento, al objeto de detectar posibles genes que pueda emplearse como marcadores genéticos. La base del análisis incluye una comparativa por CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays* de ADN que contienen el genoma universal de *C. jejuni*.

Para ello, nuestros objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Determinar las condiciones experimentales más adecuadas para la hibridación en el *microarray* de ADN, asegurando la reproducibilidad entre ensayos, minimizando la presencia de hibridaciones cruzadas y asegurando la discriminación entre las señales de fluorescencia para los genes presentes y los ausentes o divergentes.
2. Confeccionar una colección multigeográfica de cepas de *C. jejuni* que incluya aislamientos no clonales, según alelos de la región SVR (*Short Variable Region*) del gen *flaA*, aislados en muestras humanas y de pollo.
3. Analizar la colección de cepas seleccionadas mediante CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays* de ADN (genoma universal), con el fin de encontrar posibles marcadores predictivos.
4. Determinar el grado de variabilidad y estructura genética que presentan las cepas seleccionadas mediante métodos bayesianos de inferencia filogenética.



Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas

1.1. Cepas bacterianas

En la Tabla 3 se muestra una relación de las cepas de *Campylobacter jejuni* utilizadas para la realización de este estudio.

Tabla 3. Relación de cepas de *C. jejuni* utilizadas para este estudio.

HUMANO			POLLO		
Cepa	Origen	Procedencia	Cepa	Origen	Procedencia
BF08-092-0156	Australia	SVS	50	Australia	SVS
BF07-128-0091	Australia	SVS	CNET-065	Dinamarca	CNET
CNET-039	Bélgica	CNET	CNET-091	Dinamarca	CNET
CNET-040	Bélgica	CNET	CNET-092	Dinamarca	CNET
CNET-001	Dinamarca	CNET	CNET-095	Dinamarca	CNET
CNET-002	Dinamarca	CNET	65	Dinamarca	CVI
CNET-003	Dinamarca	CNET	22	Dinamarca	CVI
CNET-004	Dinamarca	CNET	95	Dinamarca	CVI
CNET-005	Escocia	CNET	RM1221	Estados Unidos	USDA
CNET-006	Escocia	CNET	CNET-083	Irlanda del Norte	CNET
D3141	Estados Unidos	DMIB	CNET-084	Irlanda del Norte	CNET
D3468	Estados Unidos	DMIB	CNET-085	Irlanda del Norte	CNET
CNET-009	Irlanda del Norte	CNET	85	Irlanda del Norte	CVI
CNET-010	Irlanda del Norte	CNET	ERL04-1823	Nueva Zelanda	ESR
RM3147	México	USDA	ERL04-0959	Nueva Zelanda	ESR
ERL06-2377	Nueva Zelanda	ESR	ERL04-0480	Nueva Zelanda	ESR
ERL03-1621	Nueva Zelanda	ESR	ERL04-0969	Nueva Zelanda	ESR
CH-005	País Vasco	UPV/EHU	CPM-125	País Vasco	UPV/EHU
CH-068	País Vasco	UPV/EHU	CPM-141	País Vasco	UPV/EHU
CH-001	País Vasco	UPV/EHU	CPM-087	País Vasco	UPV/EHU
CH-015	País Vasco	UPV/EHU	CPM-118	País Vasco	UPV/EHU
CH-096	País Vasco	UPV/EHU	CPM-032	País Vasco	UPV/EHU
CNET-031	Países Bajos	CNET	CPM-129	País Vasco	UPV/EHU
CNET-033	Reino Unido	CNET	C356	Países Bajos	DMIB
CNET-035	Reino Unido	CNET	76	Países Bajos	CVI
CO19165	Reino Unido	DMIB	CNET-086	Reino Unido	CNET
CO12599	Reino Unido	DMIB	87	Reino Unido	CVI
NCTC11168	Reino Unido	NCTC	89	Reino Unido	CVI
RM3193	Sudáfrica	USDA			
233.95	Sudáfrica	DMIB			

CNET, Colección Campynet

CVI, Central Veterinary Institute Lelystad, The Netherlands.

DMIB, Division of Molecular Infection Biology, Department of Infectious Diseases and Immunology, Veterinary Faculty, Utrecht University

ESR, Institute of Environmental Science and Research Ltd. National Centre for Biosecurity and Infectious Disease, New Zealand.

USDA, Produce Safety and Microbiology Research Unit, Western Regional Research Center, Agricultural Research Service, USDA, California.

SVS, School of Veterinary Science, University of Queensland, Australia

UPV/EHU, Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Además, se utilizó la cepa 14 de *Campylobacter coli*, proporcionada por el laboratorio CVI (Países Bajos) en el análisis filogenómico.

1.2. Condiciones generales de cultivo y conservación de las cepas

Como procedimiento general de mantenimiento las cepas fueron cultivadas en agar sangre (Columbia agar with sheep blood, Oxoid), durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones microaeróbicas, en una atmósfera compuesta por 7 % CO₂, 8 % O₂ y 85 % N₂ (GenBag Microaer, Biomerieux).

Como rutina, se tomó una alícuota del cultivo para examinar la morfología celular por microscopía de epifluorescencia con naranja de acridina.

Para la conservación de las cepas se utilizaron viales individuales que contenían 1 ml de caldo nutritivo N°2 (Oxoid) y 15 % de glicerol. Los viales fueron almacenados a -80 °C.

2. Identificación de las cepas bacterianas

La identificación de las cepas a nivel de especie se confirmó mediante PCR, reacción en cadena de la polimerasa, como se indica a continuación.

2.1. Extracción de ADN cromosómico

La extracción de ADN cromosómico se realizó empleando el sistema comercial *PrepMan*® Ultra (Applied Biosystems) y siguiendo las directrices del fabricante.

A partir de los viales congelados a -80 °C se sembraron las cepas bacterianas en placas de agar sangre y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en microaerofilia.



La población bacteriana se resuspendió en 1 ml de PBS y se recogieron las células por centrifugación a 13.000 *g* durante 3 min. El *pellet* se resuspendió en el reactivo de extracción *Prepman* y las células se lisaron por calor (10 min, 100 °C). Posteriormente, se centrifugó a 13000 *g* durante 3 min y se recuperó el sobrenadante.

El ADN extraído se purificó mediante precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio. El ARN se eliminó por tratamiento con RNasa.

Una vez purificado el ADN se estimó su cantidad utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). La absorbancia se midió a 260 nm y 280 nm, donde un ratio 260/280 de 1,8 aproximadamente fue considerado indicador de un ADN puro. Posteriormente, se conservó a -20 °C a una concentración final de 20 ng/μl.

2.2. Identificación genética de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* mediante PCR

La confirmación de la identificación de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* se realizó mediante PCR múltiple amplificando un fragmento de 857 pb del gen *16S ADNr*, común a las especies *C. jejuni* y *C. coli* (Linton *et al.*, 1997), y los genes específicos de especie *mapA* (Stucki *et al.*, 1995) y *ceuE* (Gonzalez *et al.*, 1997) según el protocolo descrito por Mateo *et al.* (2005). Los iniciadores amplifican un fragmento de 589 pb del gen *mapA* especie específico de *C. jejuni* y otro de 462 pb del gen *ceuE* especie específico de *C. coli*.

En la Tabla 4 se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados para las ampliaciones de los genes *16S ARNr*, *mapA* y *ceuE*.

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados para las amplificaciones.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
MD16S1	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC	Denis <i>et al.</i> (1999)
MD16S2	GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	Denis <i>et al.</i> (1999)
COL3	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG	González <i>et al.</i> (1997)
MDCOL2	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	Denis <i>et al.</i> (1999)
MDmapA1	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	Denis <i>et al.</i> (1999)
MDmapA2	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	Denis <i>et al.</i> (1999)

En la Tabla 5 se presenta los reactivos y concentraciones que se utilizaron para la mezcla de reacción cuyo volumen total fue de 30 μ l.

Tabla 5. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes 16S *ADNr*, *mapA* y *ceuE* por PCR múltiple.

Reactivos	Concentración final
10X Tampón (Invitrogen)	1×
10 mM dNTPs mix (Bioline)	200 μ M
25 mM MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM
50 μ M Iniciador MD16S1 (Isogen)	0,5 μ M
50 μ M Iniciador MD16S2 (Isogen)	0,5 μ M
50 μ M Iniciador COL3 (Isogen)	0,5 μ M
50 μ M Iniciador MDCOL2 (Isogen)	0,5 μ M
50 μ M Iniciador MDmapA1 (Isogen)	0,5 μ M
50 μ M Iniciador MDmapA2 (Isogen)	0,5 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> polimerasa (Invitrogen)	0,6 U
ADN	100 ng
Agua (libre de DNAsas y RNAsas)	Hasta 30 μ l



Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador RoboCycler modelo *GeneAmp PCR System 9600* (Stratagene) con las condiciones indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Ciclos de amplificación de los genes *16S ADNr*, *mapA* y *ceuE*.

Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos	
94 °C	05:00	}	1
94 °C	00:45		30
59 °C	00:45		
72 °C	02:00		
72 °C	05:00		1

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad) al 2 % en tampón 1X TBE, con un voltaje de 100 V durante 75 min. El volumen de carga fue de 10 μ L previamente mezclado con 2 μ L de tampón de carga (*6X MassRuler Loading Dye Solution*, Fermentas). El marcador de pesos moleculares utilizado fue HyperLadder IV (Bioline).

Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/ml) durante 20 min seguido de tres lavados con agua. Para su visualización se utilizó el analizador de imágenes ChemiDoc XRS (Bio-Rad), acoplado a un ordenador con el programa Quantity One.

3. Genotipificación mediante SVR-*flaA*

La genotipificación de la región SVR (*short variable region*) del gen *flaA* se llevó a cabo mediante amplificación del gen *flaA* y posterior secuenciación de la región SVR situada

entre las bases 283 y 603 de dicho gen. Este método fue descrito por Meinersmann *et al.* (1997).

3.1. Amplificación del gen *flaA* mediante PCR

Se amplificó un fragmento de 640 pb del gen *flaA* según el método descrito por Nachamkin *et al.* (1993) y Meinersmann *et al.* (1997). En la Tabla 7 se muestran las secuencias de los iniciadores:

Tabla 7. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
A1	GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC	Nachamkin <i>et al.</i> (1993)
FLA-625RU	CAA G(AT) CCT GTT CC(AT) ACT GAAG	Meinersmann <i>et al.</i> (1997)

En la Tabla 8 se presentan los reactivos y concentraciones que se utilizaron para la mezcla de reacción cuyo volumen total fue de 50 μ l. El proceso de amplificación se realizó en un termociclador Robocycler 96 modelo *Gene Amp PCR System 9600* (Stratagene).

Tabla 8. Reactivos utilizados para la amplificación del gen *flaA*.

Reactivos	Concentración final
10X Tampón (Invitrogen)	1×
10 mM dNTPs mix (Bioline)	200 μ M
50 mM MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM
10 μ M Iniciador A1 (Isogen)	0,4 μ M
10 μ M Iniciador FLA-625 RU (Isogen)	0,4 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> polimerasa (Invitrogen)	2,5 U
ADN	100 ng
Agua (libre de DNasas y RNasas)	Hasta 50 μ l

Tabla 9. Ciclos de amplificación del gen *flaA*.

Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
94 °C	05:00	1
94 °C	00:45	} 30
60 °C	00:45	
72 °C	01:00	
72 °C	05:00	1

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad) al 2 % en tampón 1X TBE, con un voltaje de 100 V durante 75 min. El volumen de carga fue de 5 μ L previamente mezclado con 1 μ l de tampón de carga (*6X MassRuler Loading Dye Solution*, Fermentas). El marcador de pesos moleculares utilizado fue HyperLadder IV (Bioline).

Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/ml) durante 20 min seguido de tres lavados con agua. Para su visualización se utilizó el analizador de imágenes ChemiDoc XRS (Bio-Rad), acoplado a un ordenador con el programa Quantity One.

3.2. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey – Nagel) siguiendo las directrices del fabricante. Las muestras fueron eluidas en un volumen total de 30 μ l.

Una vez purificado el ADN se cuantificó por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Con el fin de obtener la secuencia de 321 pb de la región SVR del gen *flaA*, las dos cadenas de los productos de PCR fueron secuenciadas con los iniciadores FLA-242FU y

FLA-625RU descritos por Meinersmann *et al.* (1997). La secuencia de los iniciadores se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los iniciadores utilizados para la secuenciación.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
Fla-242FU	CTA TGG ATG AGC AAT T(AT) AAA AT	Meinersmann <i>et al.</i> (1997)
Fla-625RU	CAA G(AT) CCT GTT CC(AT) ACT GAAG	Meinersmann <i>et al.</i> (1997)

Las regiones SVR fueron secuenciadas por Sistemas Genómicos S.L. (Valencia). Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing reaction (versión 3.1). Estas reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos en la secuenciación fueron analizados con el programa informático *Chromas Pro version 2.0* para comprobar si las secuencias eran apropiadas para la posterior asignación de los alelos. Las secuencias correspondientes a la región SVR contienen 321 nucleótidos que corresponden a las bases 283-603 del gen *flaA*.

La caracterización de las cepas estudiadas se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las presentes en la base de datos PUBMLST (Jolley *et al.*, 2001; <http://pubmlst.org>), en el apartado correspondiente a *C. jejuni* y *C. coli* (http://pubmlst.org/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=sequenceQuery), y la correspondiente asignación de alelos. Las secuencias peptídicas fueron traducidas según las secuencias de ADN obtenidas y nombradas según la base de datos PUBMLST.

En algún caso fue necesario un análisis complementario mediante alineamiento de varias secuencias, para lo que se utilizó el programa CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>).

4. Técnica del MLST

Mediante esta técnica se analizaron 11 cepas de *C. jejuni* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea en Vitoria-Gasteiz y 6 cepas de *C. jejuni* pertenecientes al *Institute of Environmental Science and Research Ltd National Centre for Biosecurity and Infectious Disease* de Nueva Zelanda.

Estas cepas fueron analizadas según el protocolo de MLST descrito por Dingle *et al.* (2001), presente en la base de datos <http://pubmlst.org/campy/> de Jolley *et al.* (2001). Este protocolo establece el análisis mediante amplificación y posterior secuenciación de fragmentos internos de los siguientes siete genes *housekeeping*: *aspA* (aspartasa), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidromexil tranferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transquelotasa) y *uncA* (subunidad alfa de la ATP sintasa).

Como cepa control se utilizó la cepa *C. jejuni* NCTC11168, cuyo genoma está completamente secuenciado y disponible en la dirección de Internet http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_jejuni/. La localización cromosómica de estos genes se muestra en la Figura 3.

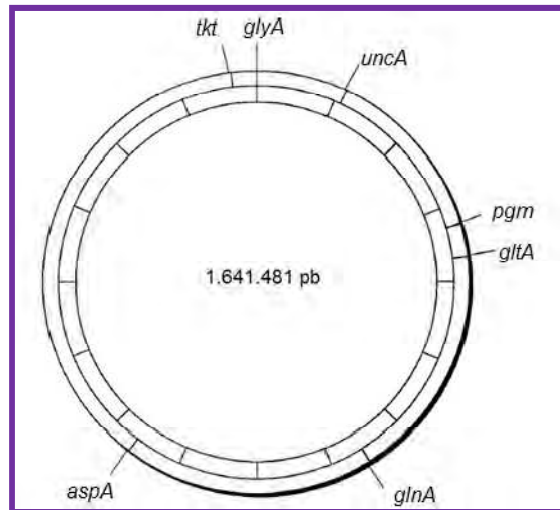


Figura 3. Localización cromosómica de los loci de MLST en el cromosoma de la cepa NCTC11168 de *C. jejuni*. El cromosoma está dividido en 16 segmentos (indicados en el círculo interior) que representan alrededor de 100.000 pb cada uno (Dingle *et al.*, 2001).

La técnica del MLST se divide en la amplificación de los fragmentos mediante PCR, electroforesis y visualización de esos productos, purificación y secuenciación de los amplicones y, por último, análisis de las secuencias.

4.1. Amplificación de los fragmentos mediante PCR

Para la amplificación de los fragmentos de los genes *housekeeping* se utilizaron siete parejas de iniciadores que se detallan en la Tabla 11. Estos iniciadores amplificaron los siguientes fragmentos: *aspA* (899 pb), *glnA* (1.262 pb), *gltA* (1.012 pb), *glyA* (816 pb), *pgm* (1.150 pb), *tkt* (1.102 pb) y *uncA* (1.120 pb).

Tabla 11. Secuencia de los iniciadores utilizados para las amplificaciones.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
asp-A9	AGT ACT AAT GAT GCT TAT CC	
asp-A10	ATT TCA TCA ATT TGT TCT TTG C	
gln-A1	TAG GAA CTT GGC ATAC ATA TTA CC	
gln-A2	TTG GAC GAG CTT CTA CTG GC	
glt-A1	GGG CTT GAC TTC TAC AGC TAC TTG	
glt-A2	CCA AAT AAA GTT GTC TTG GAC GG	
gly-A1	GAG TTA GAG CGT CAA TGT GAA GG	
gly-A2	AAA CCT CGT GCA GTA AGG GC	Dingle <i>et al.</i> (2001)
pgm-A7	TAC TAA TAA TAT CTT AGT AGG	
pgm-A8	CAC AAC ATT TTT CAT TTC TTT TTC	
tkl-A3	GCA AAC TAC GGA CAC CCA GG	
tkl-A6	AAA CGA TTG TTA ATG GCT GC	
unc-A7	ATG GAC TTA AGA ATA TTA TGG C	
unc-A2	GCT AAG CGG AGA ATA AGG TGG	

En la Tabla 12 se presentan los reactivos y concentraciones que se utilizaron para la mezcla de reacción de PCR cuyo volumen total fue de 50 μ l.

Tabla 12. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes por PCR.

Reactivos	Concentración final
10X Tampón (Invitrogen)	1×
10 mM dNTPs mix (Bioline)	200 μ M
50 mM MgCl ₂ (Invitrogen)	2 mM
20 μ M Iniciadores (Isogen)	0,2 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> polimerasa (Invitrogen)	1,25 U
ADN	100 ng
Agua (libre de DNasas y RNasas)	Hasta 50 μ l

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador RoboCycler modelo *GeneAmp PCR System 9600* (Stratagene) con las condiciones indicadas en la Tabla 13.

Tabla 13. Ciclos de amplificación de los genes.

Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
94 °C	05:00	1
94 °C	01:00	
53 °C	01:00	35
72 °C	01:00	
72 °C	05:00	1

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad) al 2 % en tampón 1X TBE, con un voltaje de 100 V durante 75 min. El volumen de carga fue de 5 μ L previamente mezclado con 2 μ l de tampón de carga. El marcador de pesos moleculares utilizado fue HyperLadder I (Bioline).

Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/ml) durante 20 min seguido de tres lavados con agua. Para su visualización se utilizó el analizador de imágenes ChemiDoc (Bio-Rad), acoplado a un ordenador con el programa Quantity One.

4.2. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados con NucleoSpin Extract II Kit (Macherey – Nagel) siguiendo las directrices del fabricante. Las muestras fueron eluídas en un volumen total de 30 μ l.

Una vez purificado el ADN se cuantificó por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

4.3. Secuenciación de los fragmentos obtenidos

Las regiones amplificadas fueron secuenciadas por el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos S.L. (Valencia). Para la realización de las reacciones de secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator *cycle sequencing reaction* (versión 3.1). Estas reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar en un secuenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

La longitud de los fragmentos de interés para ser analizados aparece detallada en la Tabla 14.

Tabla 14. Tamaño de los fragmentos de interés.

Locus	Fragmento (pb)
<i>aspA</i>	477
<i>glnA</i>	477
<i>gltA</i>	402
<i>glyA</i>	507
<i>pgm</i>	498
<i>tkl</i>	459
<i>uncA</i>	489

La secuencia de los iniciadores descritos por Dingle *et al.* (2001), correspondientes a zonas internas de los amplicones, se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Secuencia de los iniciadores utilizados para la secuenciación.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
asp-S3	CCA ACT GCA AGA TGC TGT ACC	
asp-S6	TTA ATT TGC GGT AAT ACC ATC	
gln-S3	CAT GCA ATC AAT GAA GAA AC	
gln-S6	TTC CAT AAG CTC ATA TGA AC	
glt-S1	GTG GCT ATC CTA TAG AGT GGC	
glt-S6	CCA AAG CGC ACC AAT ACC TG	
gly-S3	AGC TAA TCA AGG TGT TTA TGC GG	
gly-S4	AGG TGA TTA TCC GTT CCA TCG C	Dingle <i>et al.</i> (2001)
pgm-S5	GGT TTT AGA TGT GGC TCA TG	
pgm-S2	TCC AGA ATA GCG AAA TAA GG	
tkl-S5	GCT TAG CAG ATA TTT TAA GTG	
tkl-S4	ACT TCT TCA CCC AAA GGT GCG	
unc-S5	TGT TGC AAT TGG TCA AAA GC	
unc-S4	TGC CTC ATC TAA ATC ACT AGC	

4.4. Análisis de las secuencias

Los electroferogramas obtenidos en la secuenciación fueron analizados con el programa informático *Chromas Pro version 2.0* para la posterior asignación de los alelos MLST.

Para caracterizar las cepas estudiadas mediante la asignación de los alelos se compararon las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos PUBMLST (Jolley *et al.*, 2001; <http://pubmlst.org>), en el apartado correspondiente a *C. jejuni* y *C. coli*.

En algunos casos se realizó un análisis complementario alineando varias secuencias mediante el programa CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) para comprobar el tamaño de las secuencias, sustituciones y posibles fallos en la secuenciación.



Para asignar las secuencias tipo (ST) asociadas a los alelos de las cepas estudiadas así como su distribución en complejos clonales (CC) se utilizó la aplicación *ST query* de la página PUBMLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) donde a las diferentes combinaciones de los alelos de los siete genes se les asigna un número.

4.5. Elaboración de árboles filogenéticos

El árbol filogenético fue realizado mediante el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), disponible en la página web de PUBMLST (<http://pubmlst.org/analysis>).

4.6. Relación entre secuencias tipo

Para visualizar las relaciones entre secuencias tipo se empleó el programa *eBurst* v3.0, accesible en la página <http://eburst.mlst.net>.

5. Genomotipificación mediante *microarrays* de ADN

Para la genomotipificación de las cepas de este estudio se utilizaron *microarrays* de ADN diseñados, manufacturados y suministrados por el grupo *BμG@S* (*Division of Clinical Sciences, St George's, University of London*).

El *microarray* CJv3, está desarrollado para *C. jejuni*, utiliza oligonucleótidos de 60 bases (60 mer) dirigidos a 2.420 genes de *C. jejuni*; incluyendo genes de las cepas NCTC11168, RM1221, 11828, 12517, 17683, 43431, 43432, 43437, 43438, 43456, 460, 81116, 81-176, G1, LIO87, SSH, CjX y de los plásmidos pTet y pVir.

El *microarray* contiene 6.081 *spots* donde aparecen los 2.420 genes presentes en el *microarray* por duplicado. Los *spots* restantes son *spots* de calibración y control.

5.1. Extracción de ADN cromosómico

La extracción de ADN cromosómico se realizó empleando el sistema comercial *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Quiagen) y siguiendo las directrices del fabricante.

A partir de los viales congelados a -80 °C se sembraron las cepas bacterianas en placas de agar sangre y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en microaerofilia.

Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se recogieron por centrifugación a 13000 g durante 3 min. El proceso de extracción y purificación se basa en lisis celular a 56 °C, retención de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en una columna de intercambio iónico, inactivación de nucleasas con proteinasa K y la eliminación de restos celulares por lavados. El ARN se elimina por tratamiento con RNasa. Finalmente el ADN es eluido en un tampón de baja concentración en sales.

Una vez extraído el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

5.2. Marcado de las muestras

Para el marcado se secaron 3500 ng de ADN cromosómico de la cepa de referencia NCTC11168 y la cepa test en un concentrador 5301 (Eppendorf) y fueron marcados con los fluoróforos Cy3dUTP (*indocarbocyanine*) y Cy5dUTP (*indodicarbocyanine*), respectivamente.

Para la incorporación de los fluoróforos se mezcló el ADN con 3 µg de oligonucleótidos *Random Primers* (New England BioLabs) en un volumen final de 36 µl. La mezcla fue desnaturalizada a 95 °C durante 5 minutos y enfriada a 4 °C durante 5 minutos.

Posteriormente se añadieron a la mezcla 5 µl de 10X dNTP mix (1,2 mM de dATP, dGTP y dCTP; 0,5mM dTTP) (Invitrogen), 3 µl de 1mM Cy3 dUTP o Cy5 dUTP (GE



Healthcare), 5 μ l de 1X NE Buffer (New England BioLabs) y 5 U de fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I (New England BioLabs). Esta mezcla de marcado fue incubada 16 horas a 37 °C en un termociclador Robocycler, GeneAmp PCR Systems 9600 (Stratagene).

Tras el marcado, la mezcla fue purificada con el QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las directrices del fabricante. Las muestras fueron eluidas dos veces en un volumen final de 60 μ l. La purificación permite una cuantificación más exacta y reduce el *background* (ruido de fondo) en el experimento de hibridación.

5.3. Control de calidad de las muestras marcadas

Para comprobar el correcto marcado de las muestras, se determinó la cantidad de ADN y la incorporación de fluoróforo por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Para determinar la cantidad de fluoróforo incorporado se midió la absorbancia a 550 nm (Cy3Dye) y 650 nm (Cy5Dye). Se estimó la frecuencia de incorporación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{FOI (Frequency Of Incorporation)} = \text{pmol Cye} \times 324,5 \text{ (peso molecular de 1 kb de ADN en g/mol)} / \text{ng DNA}$$

Sólo las muestras que presentaron valores entre 15 y 50 se utilizaron para la hibridación.

Posteriormente se mezclaron 40 pmoles de la muestra test y 40 pmoles de la muestra de referencia en un mismo tubo, se secaron en un concentrador 5301 (Eppendorf) y se congelaron en oscuridad a -20 °C hasta su posterior utilización.

5.4. Prehibridación del *microarray*

Se preparó la solución de prehibridación que se detalla en la Tabla 16 y se precalentó durante 60 min a 42 °C.

Tabla 16. Reactivos utilizados para la solución de prehibridación.

Reactivos	Concentración final
20X SSC (Sigma)	3,5X SSC
20 % SDS (National Diagnostics)	0,1 % SDS
100 mg/ml BSA (Sigma)	10 mg/ml
Agua (libre de DNasas y RNasas)	Hasta 50 ml

Los *microarrays* se incubaron en la solución de prehibridación durante 1 hora a 42 °C.

Posteriormente se llevó a cabo un lavado de 1 minuto en agua Milli-Q, y por último se secaron utilizando una centrífuga 5804R (Eppendorf) a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación se guardaron en oscuridad hasta la hibridación.

5.5. Hibridación del *microarray*

La mezcla de ADN marcado de referencia y el ADN marcado de la muestra test, se resuspendió en 35 µl de solución de hibridación cuya composición se detalla en la Tabla 17.

Tabla 17. Reactivos utilizados para la solución de hibridación.

Reactivos	Concentración final
100 % Formamida (Sigma)	40 %
100 % Solución Denhardt (Sigma)	5X
20XSSC (Sigma)	8X
20 mM Sodio Pirofosfato (Sigma)	1 mM
1 M Tris (pH 7,4) (Sigma)	50 mM
2 % SDS (National Diagnostics)	0,1 %

La solución con el ADN marcado se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos y enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió todo el volumen de solución marcada al *microarray* y se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm (LifterSlips, VWR International).

La hibridación se llevo a cabo a 42 °C durante 16 horas, utilizando una cámara de hibridación (VersArray Hybridization Chamber, BioRad) siguiendo las directrices del fabricante.

5.6. Lavados posthibridación

Tras la hibridación, se realizaron tres lavados con 500 ml de cada una de las soluciones (referenciadas en las Tablas 18, 19 y 20) durante 10 minutos, agitación suave, temperatura ambiente y oscuridad en las estaciones de lavado (Arrayit Corporation). Estos lavados se realizaron por duplicado para asegurar la eliminación del ADN que no presentó homología con las sondas y para reducir el *background*. La composición de los tampones de lavado se detalla a continuación:

Tabla 18. Reactivos utilizados para el Lavado 1.

Reactivos	Concentración final
20X SSC (Sigma)	2X SSC
20 % SDS (National Diagnostics)	0,1 %
Agua (libre de DNAsas y RNAsas)	Hasta 1 l

Tabla 19. Reactivos utilizados para el Lavado 2.

Reactivos	Concentración final
20X SSC (Sigma)	1X SSC
Agua (libre de DNAsas y RNAsas)	Hasta 1 l

Tabla 20. Reactivos utilizados para el Lavado 3.

Reactivos	Concentración final
20X SSC (Sigma)	0,1X SSC
Agua (libre de DNAsas y RNAsas)	Hasta 1 l

Tras los lavados, los *microarrays* se secaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos en una centrifuga 5804R (Eppendorf) y se guardaron en oscuridad hasta el escaneado.

Por cada cepa testada, se hibridaron 3 *microarrays* en un mismo experimento para garantizar la reproducibilidad.



5.7. Escaneado del *microarray*

Para realizar el escaneado, se utilizó el escáner GenePix 4100A (Molecular Devices) a longitudes de onda de excitación de 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5) y con una resolución de 10 μm .

La obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia obtenidas en el *microarray*, requiere un análisis previo de las imágenes. Las intensidades de fluorescencia y *background* fueron detectadas y cuantificadas mediante el *software* GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices).

Los *spots* con morfología anómala, regiones no específicas de fluorescencia o que no presentasen una señal de fluorescencia dos veces mayor al *background* fueron excluidos manualmente del análisis.

5.8. Tratamiento de datos

El tratamiento de datos fue llevado a cabo manualmente en hojas de cálculo Excel integrado en Microsoft Office. Debido a la gran cantidad de datos a tratar, resultó necesaria la elaboración de una plantilla para dicho software. A causa del gran número de cálculos matemático-estadísticos a realizar, esta plantilla fue minuciosamente elaborada para tal fin. Además, fue preciso introducir cada uno de los pasos y cálculos mediante complicados comandos. Así, se consiguió una plantilla automatizada que contenía los comandos que se detallan a continuación.

En primer lugar, se eliminaron los *spots* con una señal neta menor que dos veces las desviaciones estándar del *background*. Las fórmulas correspondientes a estos cálculos, según el procedimiento descrito por Anjum *et al.* (2003), se detallan a continuación.

$$\text{Señal neta} = \text{Mediana fluorescencia (Cy3 o Cy5)} - \text{Mediana ruido de fondo (Cy3 o Cy5)}$$

$$\text{Señal neta (Cy3 o Cy5)} > 2 \text{ SD} = \text{Señal neta (Cy3 o Cy5)} - 2x \text{ SD ruido de fondo (Cy3 o Cy5)}$$

Las intensidades de señal fueron corregidas restando el ruido de fondo (señal neta) y calculando el ratio Cy3/Cy5 (referencia/test). Para compensar la incorporación desigual de los fluoróforos, se centralizaron los datos calculando la mediana del logaritmo neperiano de los ratios de cada bloque (grupo de *spots* impresos con el mismo pin) mediante la siguiente ecuación:

$$\ln (T_i) = \ln (R_i/G_i) - c$$

T_i = ratio centralizado del gen

R_i = intensidad Cy3

G_i = intensidad Cy5

c = percentil 50 de todos los ratios

Posteriormente, se calculó la media aritmética entre los duplicados de los 2420 genes presentes en el *microarray*. Aquellos genes que no aparecían por duplicado fueron excluidos del análisis.

Una vez realizadas todas estas modificaciones estadísticas, se realizó la inversa del exponente de estos últimos valores ($1/EXP$ (valor obtenido)). De esta manera se obtuvo el ratio Cy5/Cy3 (test/referencia).

Los datos centralizados fueron utilizados para todos los análisis posteriores.

5.9. Determinación del punto de corte

El punto de corte que determina la presencia o ausencia de los genes de la cepa test se calculó a partir de los resultados obtenidos en los *microarrays* en los que se hibridó la cepa NCTC11168 contra ella misma y contra la cepa RM1221. Se asignó el valor 1 a los genes que deberían estar presentes y el valor de 0 a los genes que deberían estar ausentes, según la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) accesible en la página web del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) de las cepas NCTC11168 y RM1221. El punto de corte se calculó empíricamente en ambos casos considerando el valor de Cy5/Cy3 (test/referencia) que proporcionaba menor porcentaje de errores.

Una vez seleccionados los puntos de corte con menor índice de error, éstos fueron utilizados para todos los posteriores análisis CGH (*Comparative Genomic Hybridization*). Así, se asignó el valor de 1 (presencia para la cepa test) a los valores del ratio Cy5/Cy3 (test/referencia) mayores que dichos puntos de corte y, por el contrario, el valor de 0 (ausencia/divergencia para la cepa test) a los menores.

Posteriormente, y como ya ha sido mencionado, se contrastaron los resultados obtenidos en los tres *microarrays* realizados para una misma cepa y se consensuó un único valor. Utilizando el conjunto de 0 y 1 de todas las cepas a estudio, se elaboró una matriz binaria, de 0 y 1. Esta matriz se utilizará para diferentes análisis.

5.10. Filogenómica comparativa

Para la elaboración de las matrices de datos de presencia/ausencia y su posterior análisis filogenético, las matrices se construyeron en formato nexus, requerido por los programas estadísticos que se utilizarán posteriormente. En estas matrices, los datos se

agruparon tanto en función de su origen geográfico como de la fuente de la que procedían. Esto permite también el poder establecer comparativas directas entre grupos de datos.

Una vez elaboradas las matrices de datos se procedió a la reconstrucción filogenética de los mismos, lo que permitió determinar el grado de variabilidad genética que presentan las cepas analizadas así como su estructura genética. Para ello, se empleó el método de inferencia bayesiana utilizando el modelo GTR+G (*General time Reversible and Gamma Distribution*). El análisis se llevó a cabo mediante el método MCMC (*Markov Chain Montecarlo*) implementado en el programa MrBayes ver. 3.0 y utilizando cuatro cadenas (una fría y tres calientes). Se aplicaron un total de 2.500.000 generaciones y una frecuencia de muestreo cada 100 generaciones.

Estos análisis se repitieron varias veces con el fin de comparar las probabilidades posteriores obtenidas en todos ellos. Además, de esta manera se pudo establecer con mayor fiabilidad qué porcentaje de árboles filogenéticos deberían ser eliminados del total de árboles muestreados (periodo *burn-in* de 10 %), con el fin de no incluir árboles subóptimos en el resultado final. Finalmente, el árbol consenso se obtuvo mediante la utilización del programa de inferencia filogenética PAUP* ver.4.0b 10 (PPC). Para la visualización de los árboles se utilizó el programa TreeView.

Para el análisis discriminativo, una vez obtenida la filogenia que nos permitió observar la estructuración genética que presentaban los datos, se procedió al análisis de los datos mediante el programa MCCLADE ver.4. Este programa permite establecer comparativas entre los diferentes grupos filogenéticos obtenidos, con el fin de determinar cuál es el gen o grupos de genes responsables de la diferenciación de cada clado y así identificar los genes predictivos.

La filogenia de *C. jejuni* fue determinada incluyendo una cepa de *Campylobacter coli* (H14) en el conjunto de datos inicial que fue utilizada como grupo externo. Posteriormente se



eliminó la cepa de *C. coli* del conjunto de datos y el análisis fue repetido, primero porque podía incubar en la hibridación transespecie y segundo para minimizar la saturación que puede perturbar la estabilidad de la filogenia.

A decorative horizontal bar at the bottom of the page. It features a central rectangular area with a light, textured background. The word "Resultados" is written in a dark blue, serif font within this central area. On either side of the central area, there are dark, silhouetted botanical illustrations of plants and leaves, extending to the edges of the bar.

Resultados

1. Identificación de las cepas bacterianas mediante PCR

Siguiendo el protocolo de Mateo *et al.* (2005) se realizó la identificación de las cepas en estudio como *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, mediante una PCR múltiple (mPCR), con los iniciadores propios del gen *16S ADNr* (*Campylobacter* spp.) y con los iniciadores específicos de los genes *mapA* (*C. jejuni*) y *ceuE* (*C. coli*).

Esta mPCR se aplicó a un total de 59 cepas de diversos orígenes. Una selección de los resultados de estas PCRs se muestra en la Figura 4.

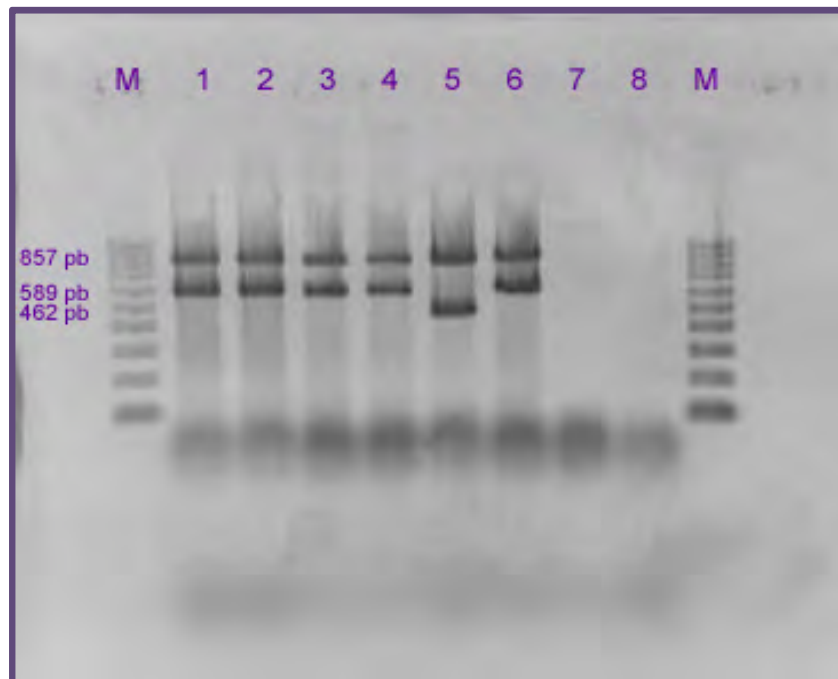


Figura 4. Detección por PCR múltiple de los genes *16 ADNr*, *mapA* y *ceuE*. M, marcador; Calle 1: NCTC11168 (control positivo); Calles 2-6: CNET-005, CNET-004, ERL04-0969, 14, D3141; calle 7: control negativo (*Arcobacter* spp.); calle 8: control negativo (agua).

En todos los casos se detectó una banda de 857 pb correspondiente al gen *16S ADNr* de *Campylobacter* spp. De las 59 cepas analizadas, 58 presentaron la banda

correspondiente al gen *mapA* propio de *C. jejuni* y una cepa (14) la banda correspondiente al gen *ceuE* propio de *C. coli*. Esta cepa se utilizó como *outgroup* en el posterior análisis filogenómico.

2. Genotipificación por SVR-*flaA*

La genotipificación mediante secuenciación de la región SVR del gen *flaA* permite determinar relaciones entre diferentes cepas (Meinersmann *et al.*, 1997). Esta técnica se realizó con el fin de comprobar el grado de diversidad de la población en estudio.

2.1. Amplificación del gen *flaA*

La amplificación del gen *flaA* se realizó utilizando los protocolos e iniciadores descritos por Nachamkin *et al.* (1993) y Meinersmann *et al.* (1997).

Mediante esta PCR, se analizaron las 56 cepas de *C. jejuni*. Una selección de los resultados se muestra en la Figura 5.

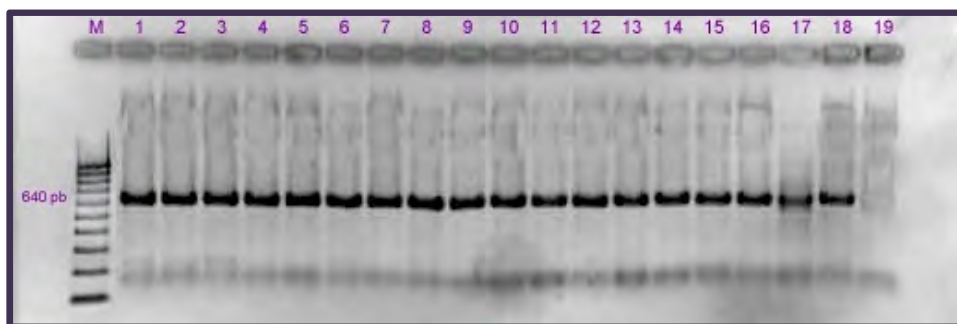


Figura 5. Amplificación por PCR del gen *flaA*. M, marcador; calle 1: NCTC11168 (control positivo); calles 2-18: CNET-006, CNET-001, CNET-002, CNET-003, CNET-004, CNET-065, CNET-095, 65, 95, ERL04-0480, 22, CNET-092, CNET-035, CNET-040, ERL04-1823, ERL04-0959, ERL04-0969; calle 19: control negativo (agua).

En todos los casos se detectó la banda específica de 640 pb del gen *flaA*. Tras su amplificación, este producto de PCR se purificó y se envió para su secuenciación.

2.2. Secuenciación de la región SVR del gen *flaA*

Un total de 321 pb de la región SVR del gen *flaA* fue secuenciada con los iniciadores descritos por Meinersmann *et al.* (1997). Para la asignación del alelo correspondiente, se comparó la secuencia de un fragmento interno de 321 pb con las secuencias depositadas en la base de datos PUBMLST (Jolley *et al.*, 2001; <http://pubmlst.org>), en el apartado correspondiente a *C. jejuni* y *C. coli*. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 21.

Tabla 21. Alelos y péptidos obtenidos por SVR-*flaA* para cada cepa.

HUMANO				POLLO			
Cepa	Origen	Alelo	Péptido	Cepa	Origen	Alelo	Péptido
BF08-092-0156	Australia	320	5	50	Australia	320	5
BF07-128-0091	Australia	36	1	CNET-065	Dinamarca	8	1
CNET-039	Bélgica	239	9	CNET-091	Dinamarca	320	5
CNET-040	Bélgica	32	1	CNET-092	Dinamarca	15	5
CNET-001	Dinamarca	8	1	CNET-095	Dinamarca	8	1
CNET-002	Dinamarca	8	1	65	Dinamarca	8	1
CNET-003	Dinamarca	8	1	95	Dinamarca	8	1
CNET-004	Dinamarca	8	1	22	Dinamarca	14	11
CNET-005	Escocia (RU)	2	27	CNET-083	Irlanda del Norte(RU)	609	18
CNET-006	Escocia(RU)	2	27	CNET-084	Irlanda del Norte(RU)	67	8
D3141	Estados Unidos	106	3	CNET-085	Irlanda del Norte(RU)	36	1
D3468	Estados Unidos	106	3	85	Irlanda del Norte(RU)	36	1
CNET-009	Irlanda del Norte(RU)	78	5	ERL04-1823	Nueva Zelanda	21	2
CNET-010	Irlanda del Norte(RU)	78	5	ERL04-0959	Nueva Zelanda	22	1
RM3147	México	161	3	ERL04-0480	Nueva Zelanda	8	1
ERL06-2377	Nueva Zelanda	264	15	ERL04-0969	Nueva Zelanda	22	1
ERL03-1621	Nueva Zelanda	66	1	CPM-125	País Vasco(E)	34	1
CH-005	País Vasco(E)	34	1	CPM-141	País Vasco(E)	34	1
CH-068	País Vasco(E)	34	1	CPM-087	País Vasco(E)	34	1
CH-001	País Vasco(E)	32	1	CPM-118	País Vasco(E)	34	1
CH-015	País Vasco(E)	32	1	CPM-032	País Vasco(E)	32	1
CH-096	País Vasco(E)	32	1	CPM-129	País Vasco(E)	32	1
CNET-031	Países Bajos	37	1	C356	Países Bajos	32	1
CNET-033	Inglaterra(RU)	42	14	76	Países Bajos	32	1
CNET-035	Inglaterra(RU)	16	12	CNET-086	Inglaterra(RU)	320	5
CO19165	Inglaterra(RU)	190	71	87	Inglaterra(RU)	85	24
CO12599	Inglaterra(RU)	32	1	89	Inglaterra(RU)	315	9
RM3193	Sudáfrica	338	3				
233.95	Sudáfrica	338	3				

RU, Reino Unido; E, España

2.2.1. Diversidad de los alelos obtenidos

En la Figura 6 se muestran los porcentajes de los alelos presentes en las cepas.

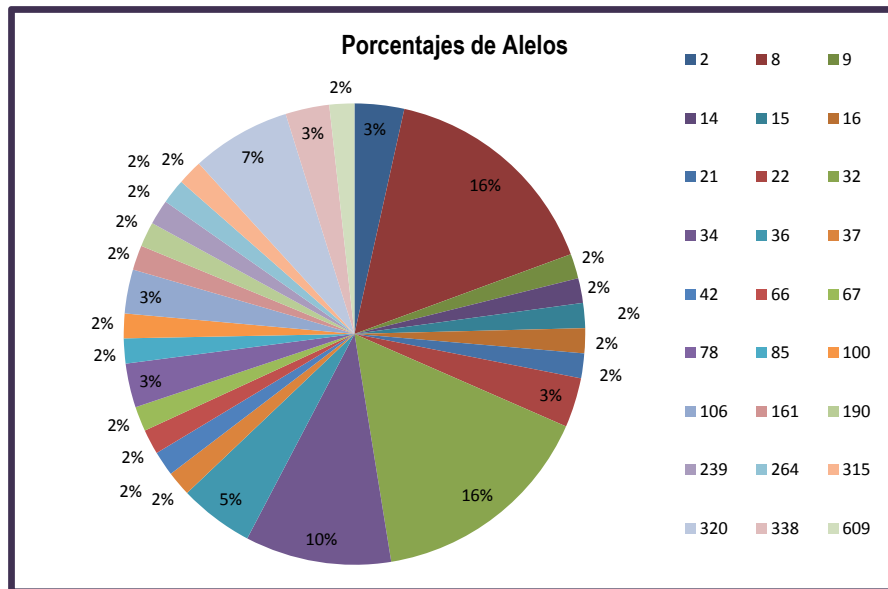


Figura 6. Porcentaje de alelos detectados en las cepas estudiadas.

Los alelos más frecuentes fueron el 8 y el 32, que se detectaron en 9 cepas, seguidos por los alelos 34 y 320 que se detectaron en 6 y 4 cepas, respectivamente.

Por lo que refiere al origen geográfico, en el País Vasco fueron predominantes los alelos 32 y 34, que se detectaron en 5 y 6 cepas, respectivamente. En el caso de Dinamarca, el alelo 8 se detectó en 8 de las 11 cepas analizadas.

Además, los alelos 8, 32, 36 y 320 fueron compartidos por cepas de diferentes orígenes geográficos. El alelo 32 fue detectado sólo en cepas europeas, mientras que las cepas que compartían alguno de los otros tres alelos (8, 36 y 320), tenían un origen más diverso.

2.2.2. Diversidad de los péptidos obtenidos

En la Tabla 22 se muestran las secuencias peptídicas que presentan las cepas en este estudio.

Tabla 22. Secuencias peptídicas observadas.

HUMANAS		POLLO	
Péptido	Nº de cepas	Péptido	Nº de cepas
1	14	1	17
3	5	5	4
5	3	11	1
27	2	33	1
15	1	18	1
14	1	8	1
12	1	2	1
71	1	24	1
10	1	9	1
9	1		

En la Figura 7 se muestran los porcentajes de los péptidos presentes en las cepas.

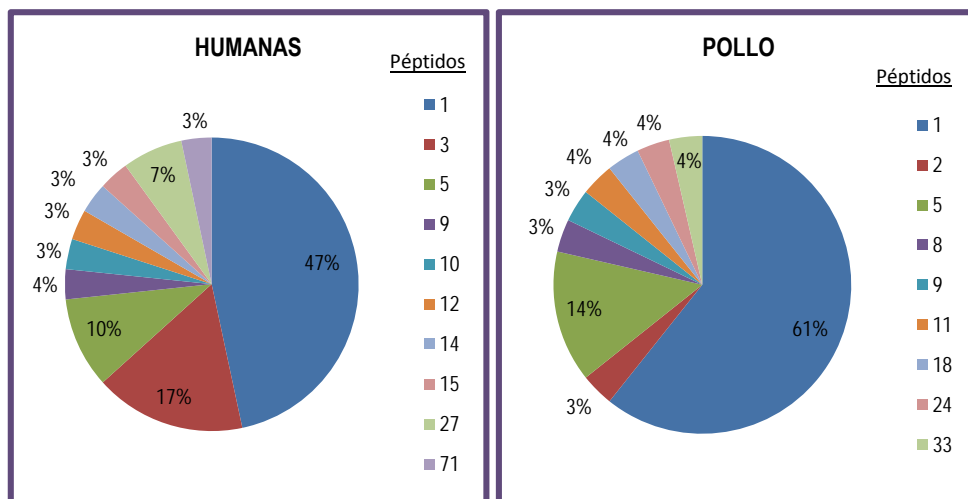


Figura 7. Porcentaje de péptidos obtenidos para las cepas estudiadas.

El péptido más común entre todas las cepas fue el péptido 1. Este péptido se observó en todas las cepas del País Vasco y de los Países Bajos, en 8 de las 11 cepas de Dinamarca

y en 4 de las 6 cepas de Nueva Zelanda. El péptido 3 se observó sólo en cepas humanas procedentes de Estados Unidos, México y Sudáfrica.

3. Genotipificación por MLST

Mediante esta técnica se analizaron las 11 cepas de España (País Vasco) y las 6 cepas de Nueva Zelanda. Los genes amplificados fueron *aspA* (aspartasa), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidromexil tranferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transquelotasa) y *uncA* (subunidad alfa de la ATP sintasa) siguiendo el protocolo descrito por Dingle *et al.* (2001).

3.1. Amplificación mediante PCR de los genes *housekeeping*

En la Figura 8, se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos después del proceso de amplificación y electroforesis en gel de agarosa y tinción para cuatro de los siete genes: *aspA*, *tkt*, *uncA* y *pgm*.

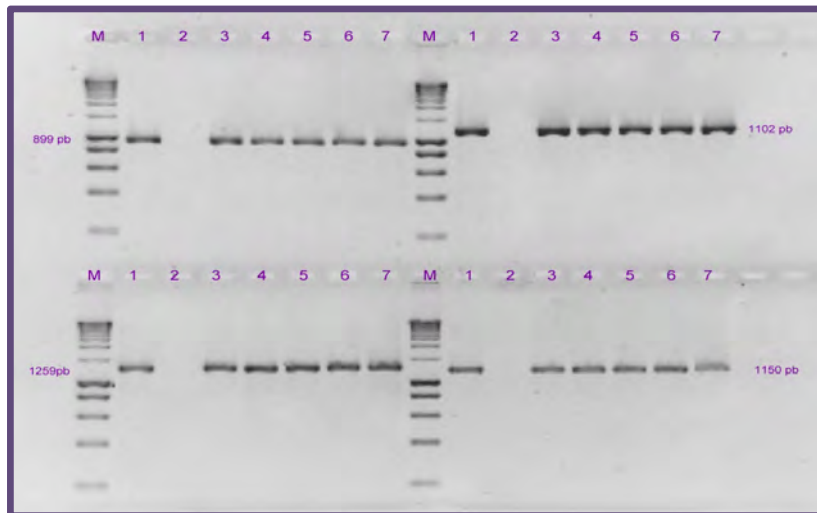


Figura 8. Resultados obtenidos para la amplificación de 4 locus distintos, *aspA* (899pb), *tkt* (1102pb), *uncA* (1259pb) y *pgm* (1150pb). Para cada locus; M, marcador; calle 1: NCTC11168 (control positivo); calle 2: control negativo (agua); calles 3-7: CNET-001, CNET-002, 22, ERL04-0969, CNET-084.

En todos los casos se obtuvo la banda correspondiente al amplificado esperado.

3.2. Secuenciación

Posteriormente, se realizó la purificación, cuantificación y secuenciación de los amplicones con los iniciadores descritos por Dingle *et al.* (2001). En la Figura 9, se muestra un ejemplo representativo del fragmento de un electroferograma.

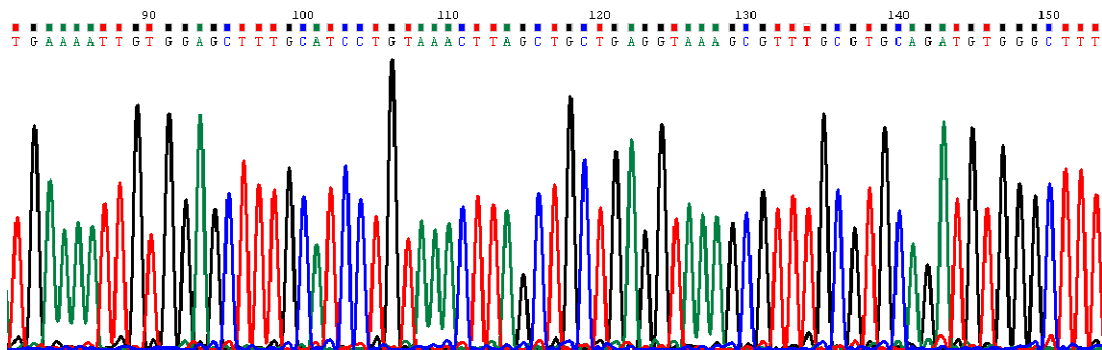


Figura 9. Fragmento del electroferograma del locus *pgm* de la cepa CPM-141.

Una vez obtenidas las secuencias para los 7 genes en estudio, se asignó a cada una de ellas el correspondiente número de alelo. Con los perfiles alélicos obtenidos, se determinaron las secuencias tipo (ST) y el complejo clonal (CC) al que pertenecen. Todos los datos se asignaron por comparación con los depositados en la base de datos correspondiente a MLST de *C. jejuni* (<http://pubmlst.org/campylobacter>).

Los perfiles alélicos de las cepas, así como la secuencia tipo y el complejo clonal están recogidos en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados obtenidos mediante análisis MLST de las cepas estudiadas.

País	Cepa	Origen	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA	ST	CC
España	CH-001	H	2	1	1	3	2	1	5	21	21
España	CPM-129	P	2	1	1	3	2	1	5	21	21
España	CH-096	H	2	1	21	3	2	1	5	53	21
España	CH-005	H	7	1	2	83	2	3	6	441	-
España	CPM-141	P	7	1	2	83	2	3	6	441	-
España	CH-068	H	9	2	2	2	11	5	6	824	257
España	CPM-125	P	9	2	2	2	11	5	6	824	257
España	CH-015	H	24	2	5	53	23	3	1	904	607
España	CPM-087	P	24	2	5	53	23	3	1	904	607
España	CPM-118	P	9	30	2	2	89	137	6	1074	460
España	CPM-032	P	8	1	5	3	2	1	1	1519	21
N. Zelanda	ERL04-0969	P	1	2	3	4	5	9	3	42	42
N. Zelanda	ERL04-0480	P	4	7	10	4	1	7	1	45	45
N. Zelanda	ERL04-0959	P	4	7	10	4	1	7	1	45	45
N. Zelanda	ERL04-1823	P	4	7	10	4	1	7	1	45	45
N. Zelanda	ERL06-2377	H	4	7	10	4	1	7	1	45	45
N. Zelanda	ERL03-1621	H	8	15	214	27	11	80	23	2374	-

-, *singleton*; H, humana; P, pollo; ST, secuencia tipo; CC, complejo clonal

En las 17 cepas estudiadas se detectaron 10 secuencias tipo, siendo ST-45 la más frecuente, que pertenecían a 6 complejos clonales.

3.2.1. Diversidad de las secuencias tipo (ST) obtenidas

En la Figura 10, se muestran las secuencias tipo diferenciadas por origen geográfico así como los porcentajes obtenidos para cada una de ellas.

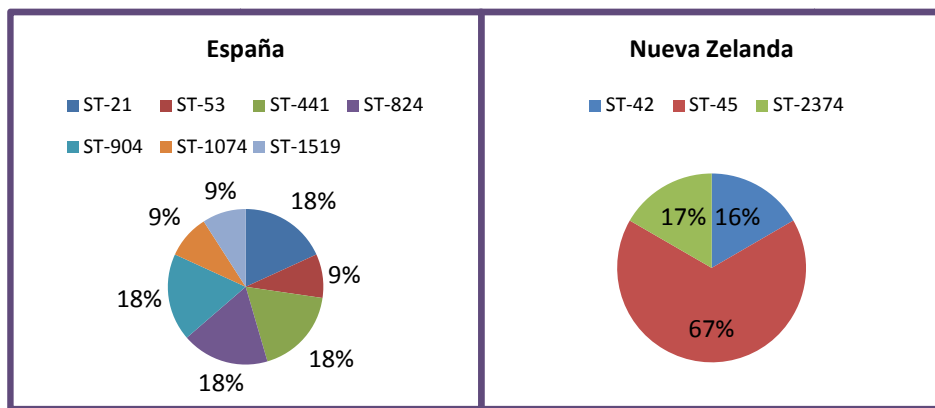


Figura 10. Porcentajes de secuencias tipo obtenidos en este estudio para cada país.

Se observó que la secuencia tipo predominante entre las cepas de Nueva Zelanda fue la ST-45, mientras que entre las cepas de España no existió ninguna secuencia tipo predominante. Además, se observaron 3 secuencias tipo exclusivas en pollo (ST-42, ST-1074 y ST-1519) y una exclusiva en humanas (ST-53).

En la Figura 11, se muestra el árbol filogenético configurado mediante el método UPGMA (Sneath P. H. A. & Sokal R. R., 1973) a partir de los perfiles alélicos obtenidos mediante MLST.

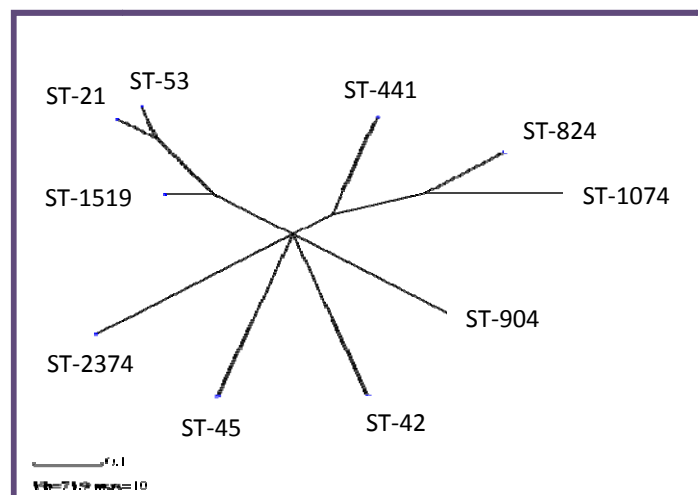


Figura 11. Árbol filogenético obtenido mediante el método UPGMA.

Como se puede observar en la Figura 11, la primera divergencia tras el supuesto origen común divide las 10 STs encontradas en 6 partes. Hay 2 agrupaciones que comprenden 3 STs cada una y existen otras 4 STs aisladas. Los dos grupos están formados por una ST aislada y una pareja. Esto cobra mayor sentido cuando se analiza el número de alelos de los *loci* MLST coincidentes entre las STs. Mientras que la pareja ST824-ST1074 comparte 4 alelos, ST-441 comparte sólo dos con dicha pareja, lo que explica su ancestro común más alejado en el tiempo. Lo mismo podemos observar con respecto al segundo grupo donde la pareja formada por ST53-ST21, comparten 6 de los 7 alelos, mientras que la ST-1519 aislada comparte con esta pareja 4. Además podemos observar como las ramas que forman la pareja de ST53-ST21, al compartir más alelos entre ellas que la formada por las ST824-ST1074, representan mayor cercanía filogenética.

3.2.2. Diversidad de los complejos clonales (CC) asignados

Como se puede observar en la Tabla 23, el complejo clonal mayoritario entre las cepas de Nueva Zelanda fue el CC-45 que incluye 4 de las 6 cepas. Sin embargo, entre las cepas de España el predominante fue el CC-21 agrupando 4 de las 11 cepas. Ambos complejos clonales se detectaron tanto en cepas de procedencia clínica como de pollo.

Para el estudio poblacional, se utilizó el programa *eBurst*. Dado que el número de ST detectadas en el presente estudio es reducido, la relación se estableció comparando los aproximadamente 3500 perfiles alélicos depositados en la base de datos de *eBurst*. Debido al límite existente en la base de datos de *eBurst* no se pudieron contrastar los 5487 perfiles alélicos que existen en la base de datos del PUBMLST. El programa generó 178 grupos, numerados de forma arbitraria, y en la Figura 12 se muestra una imagen de la relación de los CC pertenecientes a diferentes grupos.

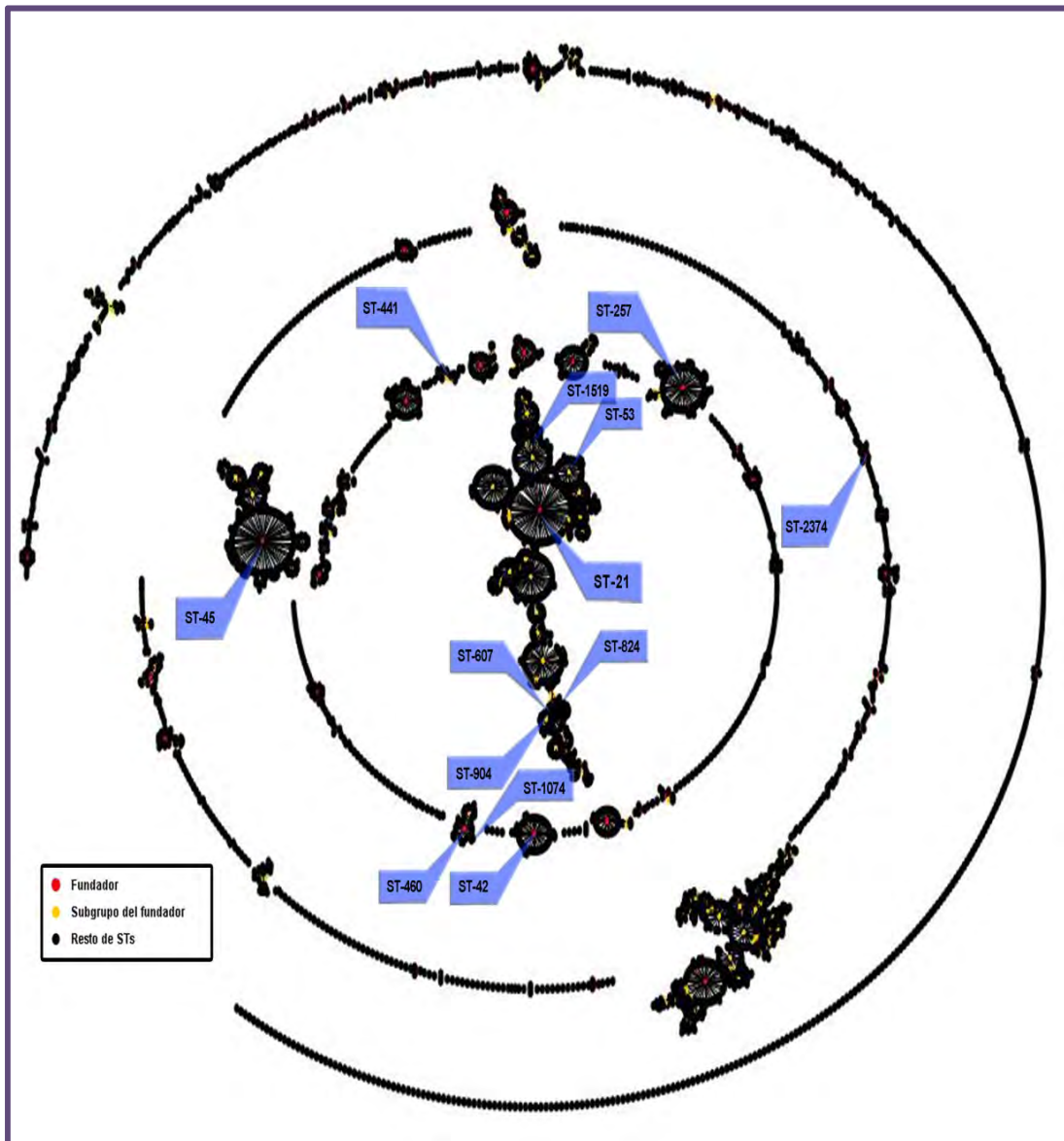


Figura 12. Imagen representativa de la posición de las 3500 STs. Los ST de interés se han resaltado mediante rectángulos. El número de nodos que relacionan CC y ST corresponde al número de variaciones entre ellos.

En primer lugar se vió que las STs obtenidas pertenecen a 7 grupos diferentes lo cual indica que los orígenes de las cepas estudiadas son diversos. De igual manera, y tal y como predijo la base de datos del PUBMLST, encontramos coincidencia en las asignaciones a las ST de los complejos clonales.

4. Comparativa MLST vs SVR-*flaA*

En la Tabla 24 se comparan los resultados obtenidos por la técnica del MLST y la técnica SVR-*flaA*.

Tabla 24. Comparativa de los resultados obtenidos mediante MLST y SVR-*flaA*.

Origen	Cepa	SVR- <i>flaA</i>	Secuencia Tipo	Complejo Clonal
N. Zelanda	ERL04-0480	8	45	45
N. Zelanda	ERL04-1823	21	45	45
N. Zelanda	ERL04-0969	22	42	42
N. Zelanda	ERL04-0959	22	45	45
España	CH-001	32	21	21
España	CPM-129	32	21	21
España	CH-096	32	53	21
España	CH-015	32	904	607
España	CPM-032	32	1519	21
España	CH-005	34	441	-
España	CPM-141	34	441	-
España	CH-068	34	824	257
España	CPM-125	34	824	257
España	CPM-087	34	904	607
España	CPM-118	34	1074	460
N. Zelanda	ERL03-1621	66	2374	-
N. Zelanda	ERL06-2377	264	45	45

-, *singleton*

Mediante comparación se pudo observar que aunque algunas cepas compartían alelos SVR-*flaA* como el 22, 32 y 34 presentaban secuencias tipo diferentes.

5. Genomotipificación mediante *microarrays* de ADN

Para la optimización del protocolo se tomó como referencia el protocolo descrito por Champion *et al.* (2005) por sugerencia del grupo *BμG@S* (*Division of Clinical Sciences, St George's, University of London*) que nos suministró los *microarrays* utilizados en este estudio.

5.1. Puesta a punto del protocolo

5.1.1. Optimización del marcado de las muestras de ADN

La optimización del marcado de las muestras se realizó probando diferentes cantidades de ADN, de fluoróforos, de enzima *Klenow* y diferentes tiempos de marcado a fin de conseguir un FOI entre 20 y 40 unidades relativas.

Para el marcado de las muestras se probaron cantidades de ADN entre 2 y 6 μg . El mayor porcentaje de incorporación de fluoróforo o mayor frecuencia de incorporación (FOI) se consiguió utilizando 3,5 μg de ADN donde el FOI presentaba valores relativos entre 20 y 40.

Posteriormente, se ensayaron diferentes cantidades de los fluoróforos Cy3 dUTP y Cy5 dUTP. El mayor porcentaje de incorporación de fluoróforo se obtuvo utilizando una concentración final de 0,06 mM, con la que se consiguieron valores relativos de FOI entre 20 y 40.

Por lo que refiere a la cantidad de enzima *Klenow*, se probaron concentraciones finales de 3 a 9 U consiguiendo los mejores resultados con una concentración final de 5 U.

Tras estas pruebas, se estableció el tiempo adecuado de incubación para el marcado de las muestras. Se ensayaron desde 2 horas hasta 24 horas y el mayor valor de FOI se consiguió tras un periodo de incubación de 16 horas.

Respecto a la purificación, el protocolo descrito por Champion *et al.* (2005) purificaba las muestras marcadas con diferentes fluoróforos en un mismo tubo. Sin embargo, se consiguieron mejores resultados purificando las muestras por separado. Una vez purificadas las muestras, se analizaron las concentraciones de cada muestra marcada. Tras ensayar con concentraciones de 20-50 pmoles se determinó que la cantidad óptima necesaria para obtener unos valores cuantitativos adecuados en el escaneado era de 40 pmoles de ADN marcado.

5.1.2. Optimización de la prehibridación del *microarray*

Para la optimización de la prehibridación (bloqueo del *microarray*) se ensayaron diferentes temperaturas de incubación. Se testaron temperaturas entre 40 y 65 °C (véase Figura 13b) y los mejores valores de señal de fluorescencia se obtuvieron a una temperatura de 42 °C.

5.1.3. Optimización de la hibridación del *microarray*

La optimización de la hibridación se realizó probando temperaturas que oscilaban entre 40 °C y 65 °C. El uso de formamida en la solución de hibridación hace que se pueda disminuir la temperatura de hibridación sin perder especificidad. Es por ello que tras varios ensayos se optó por utilizar formamida y una temperatura de 42 °C. Bajo esta temperatura los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia obtenidas en el *microarray* fueron las mejores, en cuanto a contraste con el fondo (véase Figura 13c).

5.1.4. Optimización de los lavados posthibridación del *microarray*

Champion *et al.* (2005) realizaban 2 lavados posthibridación; un primer lavado con tampón 1 (1x SSC, 0,06 % SDS) a la temperatura de hibridación (55 °C) durante 2 minutos y un segundo lavado con tampón 2 (0,06x SSC) a temperatura ambiente durante 2 minutos (véase Figura 13a). Sin embargo, el *background* obtenido bajo estas condiciones era muy

alto; tras varios ensayos se determinó que los mejores resultados se obtenían realizando 3 lavados en las siguientes condiciones: tampón de lavado 1 (2x SSC, 0,1 % SDS), tampón de lavado 2 (1x SSC) y tampón de lavado 3 (0,1x SSC), todos ellos durante 10 minutos, por duplicado y en oscuridad a 42 °C exceptuando el lavado 3 que se realizaba a temperatura ambiente.

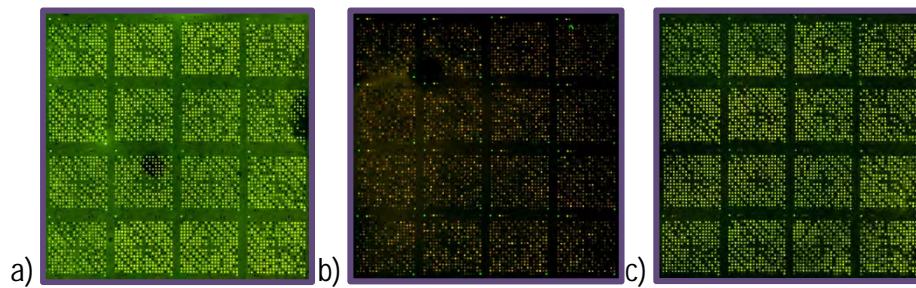


Figura 13. Imágenes representativas obtenidas tras escanear los *microarrays*. a) Imagen obtenida tras los lavados posthibridación con las condiciones de Champion *et al.* (2005). b) Imagen obtenida tras una temperatura de prehibridación e hibridación de 55 °C. c) Imagen obtenida utilizando formamida, una temperatura de 42 °C y tres lavados.

5.2. Determinación del punto de corte

Una vez eliminados manualmente los resultados que i) no presentasen una señal de fluorescencia dos veces mayor al *background*, ii) los spots con una señal neta menor que dos veces las desviaciones estándar del *background* y iii) aquellos resultados que no tenían su duplicado, se procedió a determinar el punto de corte con el resto de los *spots*. Es decir, el valor que determina si un gen está presente o ausente/divergente.

El *microarray* CJv3, contiene sondas para detectar genes de las cepas *C. jejuni* NCTC11168, RM1221, 11828, 12517, 17683, 43431, 43432, 43437, 43438, 43456, 460, 81116, 81-176, G1, LIO87, SSH, CjX y de los plásmidos pTet y pVir representados en el genoma universal de *C. jejuni* más completo encontrado en el mercado. Sin embargo, no todas estas cepas fueron utilizadas como control de marcado en los subsiguientes análisis

CGH de las 56 cepas en estudio. Únicamente se utilizó la cepa NCTC11168. Por ello, fue necesario establecer dos puntos de corte. Uno de ellos, de aplicación a los spots donde podrían potencialmente hibridar la cepa en estudio (test) y la cepa patrón (referencia), se determinó utilizando los resultados de 3 *microarrays* de la cepa NCTC11168 vs NCTC11168. El otro punto de corte, de aplicación a los spots donde solo hibridaría la cepa test (RM1221, en este caso), se determinó utilizando los 3 *microarrays* de la cepa NCTC11168 vs RM1221. El punto de corte se determinó en función del valor Cy5/Cy3 (test/referencia), a partir del cual se obtuvo un porcentaje mayor de aciertos en el total de los *microarrays* NCTC11168 vs NCTC11168 y la NCTC11168 vs RM1221.

El genoma completo de las cepas NCTC11168 y RM1221 ha sido secuenciado en su totalidad, por ello, mediante la herramienta BLAST se pudo comprobar el porcentaje de aciertos de los 6 *microarrays*, entendiéndose por aciertos los genes presentes detectados y los ausentes no detectados, y por errores el caso contrario. Se les asignó el valor de 0 ó 1 en función de los resultados obtenidos por el BLAST para las cepas NCTC11168 y RM1221. Los resultados obtenidos para los *microarrays* NCTC11168 vs NCTC11168 y la NCTC11168 vs RM1221, se presentan en las Figura 14 y Figura 15, respectivamente.

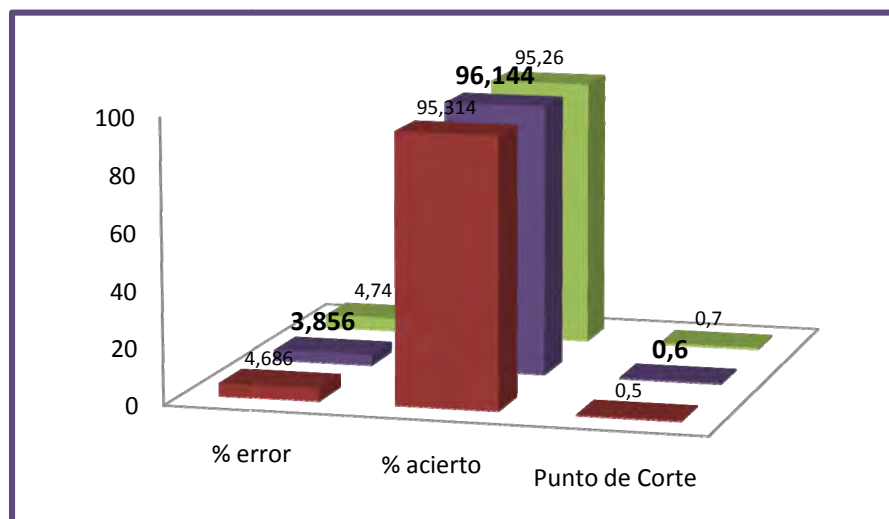


Figura 14. Porcentajes de aciertos obtenidos para diferentes puntos de corte para los 3 *microarrays* NCTC11168 vs NCTC11168.

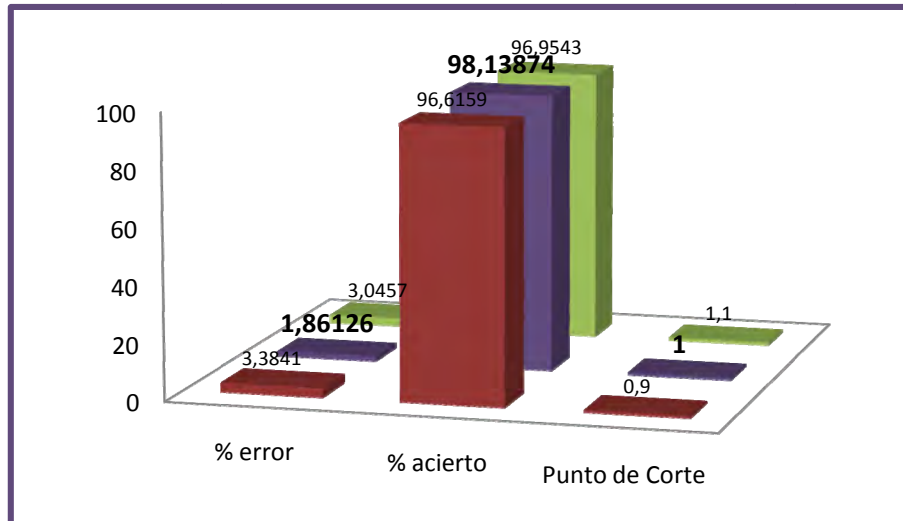


Figura 15. Porcentajes de aciertos obtenidos para diferentes puntos de corte para los 3 microarrays NCTC11168 vs RM1221.

A pesar de que las diferencias en el porcentaje de aciertos no fueron importantes se optó por utilizar el valor correspondiente al mayor porcentaje de aciertos. Es decir, se utilizó el punto de corte 0,6 para el análisis CGH por comparación con la cepa NCTC11168 y el punto de corte 1, para el análisis CGH sin cepa de referencia. De esta forma si los valores obtenidos en la intensidad del ratio Cy5/Cy3 (test/referencia) eran mayores o iguales al valor del punto de corte, se consideraron genes presentes en la cepa test, asignándoles un valor 1; mientras que si eran menores, se consideraron genes ausentes/divergentes en la cepa test y se les asignó el valor 0.

5.3. Matriz binaria

Tras la determinación del punto de corte, en cada análisis posterior se generó la correspondiente matriz catalogando cada gen con el valor de 1 si el gen estaba presente en la cepa test y con 0 si el gen era ausente/divergente en la cepa test. En algunos casos se incluyó una tercera categoría de genes indeterminados, designados con la letra N. Los

valores definidos como N fueron aquellos para los que no se obtuvieron datos o éstos fueron incongruentes.

5.3.1. Especificidad de la técnica

Una vez establecido el protocolo y el punto de corte se valoró el porcentaje de aciertos que rendía incluyendo en la matriz no solo los genes presentes (1) y los ausentes/divergentes (0) sino también los indeterminados (N).

En la Figura 16 se muestra los valores absolutos de aciertos para los *microarrays* de la cepa NCTC11168 vs NCTC11168, en base a 0,6 como punto de corte. Estos datos arrojan un 96 % de aciertos.

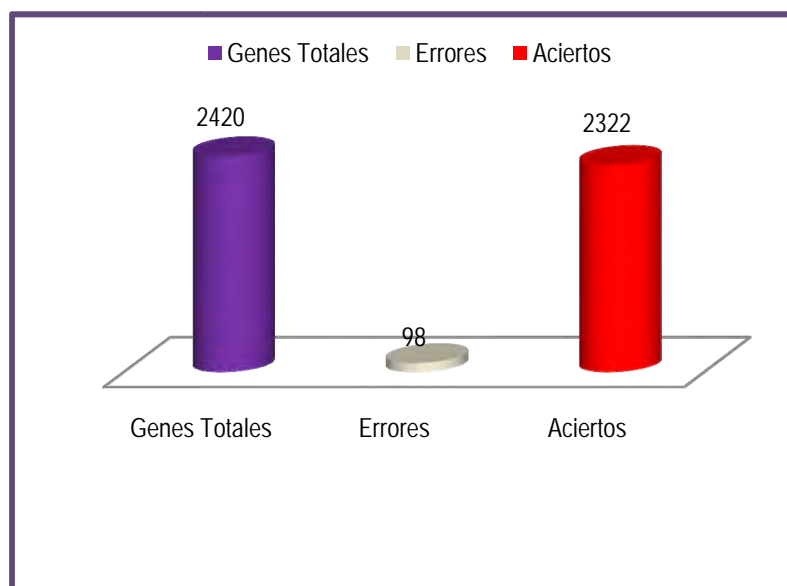


Figura 16. Número de genes evaluados para los *microarrays* de la cepa NCTC11168 frente a ella misma.

Como medida adicional para comprobar que los datos obtenidos en el *microarray* eran fiables, se analizaron las señales obtenidas de las sondas correspondientes a los genes

housekeeping descritos por Stahl *et al.* (2011). Estos autores clasificaron 150-195 genes de *C. jejuni* como potencialmente esenciales. Estos genes representaban funciones de la célula como metabolismo energético, biosíntesis de macromoléculas, cofactores y proteínas estructurales y otros procesos básicos de la célula. Sin embargo, 49 de estos genes codificaban proteínas hipotéticas o putativas.

Nuestros resultados detectaron correctamente la presencia de un 98 % de los genes con función asignada descritos como potenciales genes *housekeeping* (N=146) por Stahl *et al.* (2011). El 2 % de genes *housekeeping* no detectados, fueron considerados como errores intrínsecos de la técnica. Teniendo en cuenta la complejidad del *microarray* y de la técnica resulta de difícil a imposible determinar el origen más probable de estos errores.

5.3.2. Matriz binaria obtenida por análisis CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)

Una vez aplicado el protocolo a las 56 cepas en estudio se construyó la matriz binaria correspondiente que se presenta en los Anexos 1 e 2. Esta matriz fue la base de análisis de los diferentes grupos de genes de interés.

5.4. Porcentaje de hibridación en función de la procedencia de las sondas presentes en el *microarray*

Los resultados detallados se muestran en el Anexo 4.

5.4.1. Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168

El porcentaje de hibridación de cada cepa estudiada con las 1.654 sondas correspondientes a la cepa NCTC11168 se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 1.654 sondas de la cepa NCTC11168. Humanas, anaranjado; pollo, azul énfasis.

HUMANAS			POLLO				
CEPAS	SONDAS	%	PAÍS	CEPAS	SONDAS	%	PAÍS
BF08-092-0156	1.543	93,40	Australia	50	1.542	93,34	Australia
BF07-128-0091	1.578	95,52	Australia	CNET-065	1.613	97,64	Dinamarca
CNET-039	1.483	89,77	Bélgica	CNET-091	1.507	91,22	Dinamarca
CNET-040	1.605	97,15	Bélgica	CNET-092	1.505	91,10	Dinamarca
CNET-001	1.638	99,15	Dinamarca	CNET-095	1.545	93,52	Dinamarca
CNET-002	1.628	98,55	Dinamarca	65	1.594	96,49	Dinamarca
CNET-003	1.628	98,55	Dinamarca	76	1.636	99,03	P. Bajos
CNET-004	1.633	98,85	Dinamarca	CNET-083	1.465	88,68	R. Unido
CNET-005	1.508	91,28	R. Unido	CNET-084	1.447	87,59	R. Unido
CNET-006	1.489	90,13	R. Unido	CNET-085	1.615	97,76	R. Unido
D3141	1.425	86,26	E. Unidos	ERL04-1823	1.552	93,95	N. Zelanda
D3468	1.503	90,98	E. Unidos	ERL04-0959	1.480	89,59	N. Zelanda
CNET-009	1.604	97,09	R. Unido	ERL04-0480	1.526	92,37	N. Zelanda
CNET-010	1.601	96,91	R. Unido	ERL04-0969	1.553	94,01	N. Zelanda
RM3147	1.439	87,11	México	CPM-032	1.610	97,46	España
ERL06-2377	1.458	88,26	N. Zelanda	CPM-087	1.593	96,43	España
ERL03-1621	1.471	89,04	N. Zelanda	CPM-118	1.563	94,61	España
CH-001	1.647	99,70	España	CPM-125	1.575	95,34	España
CH-005	1.560	94,43	España	CPM-129	1.645	99,58	España
CH-015	1.553	94,01	España	CPM-141	1.553	94,01	España
CH-068	1.578	95,52	España	C356	1.580	95,64	P. Bajos
CH-096	1.636	99,03	España	22	1.576	95,40	Dinamarca
CNET-031	1.612	97,58	P. Bajos	85	1.593	96,43	R. Unido
CNET-033	1.531	92,68	R. Unido	87	1.488	90,07	R. Unido
CNET-035	1.574	95,28	R. Unido	89	1.483	89,77	R. Unido
CO19165	1.428	86,44	R. Unido	CNET-086	1.617	97,88	R. Unido
CO12599	1.586	96,00	R. Unido	95	1.519	91,95	Dinamarca
RM3193	1.504	91,04	Sudáfrica				
233.95	1.486	89,95	Sudáfrica				

Los porcentajes de hibridación positiva para las sondas oscilaban entre 86,26 % y 99,58 % siendo los más altos correspondientes a cepas procedentes de España y Dinamarca. Las diferencias de porcentajes se deben a las zonas hipervariables que se describirán más adelante, ya que cuando una cepa mostró muchos genes ausentes/divergentes en estas regiones, su porcentaje de hibridación era menor. Sin embargo, no se observaron diferencias según la fuente de las cepas.

5.4.2. Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa RM1221

Para analizar los resultados obtenidos mediante las sondas pertenecientes a la cepa RM1221 se tuvieron en cuenta las sondas diseñadas para genes exclusivos de esta cepa y que no presentaban homología con ninguna de las otras cepas del *microarray*. Por ello, se excluyeron del análisis los genes que estaban representados por sondas de la cepa NCTC11168.

A continuación se muestra la Tabla 26 con el porcentaje de hibridación de las 313 sondas exclusivas de la RM1221 para cada cepa.

Tabla 26. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 313 sondas de la cepa RM1221. Humanas, anaranjado; pollo, azul énfasis.

HUMANAS				POLLO			
CEPAS	SONDAS	%	PAÍS	CEPAS	SONDAS	%	PAÍS
BF08-092-0156	83	26,52	Australia	50	134	42,81	Australia
BF07-128-0091	25	7,99	Australia	CNET-065	21	6,71	Dinamarca
CNET-039	33	10,54	Bélgica	CNET-091	120	38,34	Dinamarca
CNET-040	117	37,38	Bélgica	CNET-092	76	24,28	Dinamarca
CNET-001	51	16,29	Dinamarca	CNET-095	28	8,95	Dinamarca
CNET-002	52	16,61	Dinamarca	65	24	7,67	Dinamarca
CNET-003	55	17,57	Dinamarca	76	62	19,81	P. Bajos
CNET-004	52	16,61	Dinamarca	CNET-083	53	16,93	R. Unido
CNET-005	81	25,88	R. Unido	CNET-084	97	30,99	R. Unido
CNET-006	82	26,20	R. Unido	CNET-085	94	30,03	R. Unido
D3141	68	21,73	E. Unidos	ERL04-1823	48	15,34	N. Zelanda
D3468	27	8,63	E. Unidos	ERL04-0959	62	19,81	N. Zelanda
CNET-009	68	21,73	R. Unido	ERL04-0480	75	23,96	N. Zelanda
CNET-010	59	18,85	R. Unido	ERL04-0969	61	19,49	N. Zelanda
RM3147	31	9,90	México	CPM-032	80	25,56	España
ERL06-2377	40	12,78	N. Zelanda	CPM-087	72	23,00	España
ERL03-1621	56	17,89	N. Zelanda	CPM-118	231	73,80	España
CH-001	129	41,21	España	CPM-125	111	35,46	España
CH-005	65	20,77	España	CPM-129	50	15,97	España
CH-015	122	38,98	España	CPM-141	82	26,20	España
CH-068	174	55,59	España	C356	58	18,53	P. Bajos
CH-096	111	35,46	España	22	68	21,73	Dinamarca
CNET-031	98	31,31	P. Bajos	85	99	31,63	R. Unido
CNET-033	18	5,75	R. Unido	87	71	22,68	R. Unido
CNET-035	133	42,49	R. Unido	89	29	9,27	R. Unido
CO19165	161	51,44	R. Unido	CNET-086	85	27,16	R. Unido
CO12599	63	20,13	R. Unido	95	37	11,82	Dinamarca
RM3193	70	22,36	Sudáfrica				
233.95	71	22,68	Sudáfrica				

Las cepas que presentaban un mayor porcentaje de hibridación con las sondas de la cepa RM1221 son cepas que contienen islas genómicas, que más adelante abordaremos. Además son las cepas españolas las que obtienen mayores porcentajes de hibridación.

5.4.3. Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a la cepa 81-176

Para las sondas correspondientes a la cepa *C. jejuni* 81-176 se estudiaron 74 sondas que representaban genes cromosómicos exclusivos de la cepa 81-176. Por otro lado, la cepa 81-176 contiene los plásmidos residentes, pVir y pTet. Los 49 y 53 genes plásmidicos de los plásmidos pTet y pVir, respectivamente, se estudiarán más adelante.

En la Tabla 27 se detalla el número de genes cromosómicos exclusivos de la cepa 81-176 que contenía cada cepa.

Tabla 27. Porcentajes de hibridación de cada cepa estudiada con las 74 sondas de la cepa 81-176. Humanas, anaranjado; pollo, azul énfasis.

HUMANAS				POLLO			
CEPAS	SONDAS	%	PAÍS	CEPAS	SONDAS	%	PAÍS
BF08-092-0156	6	8,11	Australia	50	19	25,68	Australia
BF07-128-0091	18	24,32	Australia	CNET-065	11	14,86	Dinamarca
CNET-039	41	55,41	Bélgica	CNET-091	36	48,65	Dinamarca
CNET-040	5	6,76	Bélgica	CNET-092	37	50,00	Dinamarca
CNET-001	4	5,41	Dinamarca	CNET-095	26	35,14	Dinamarca
CNET-002	5	6,76	Dinamarca	65	13	17,57	Dinamarca
CNET-003	6	8,11	Dinamarca	76	5	6,76	P. Bajos
CNET-004	6	8,11	Dinamarca	CNET-083	23	31,08	R. Unido
CNET-005	34	45,95	R. Unido	CNET-084	14	18,92	R. Unido
CNET-006	36	48,65	R. Unido	CNET-085	7	9,46	R. Unido
D3141	51	68,92	E. Unidos	ERL04-1823	35	47,30	N. Zelanda
D3468	47	63,51	E. Unidos	ERL04-0959	15	20,27	N. Zelanda
CNET-009	6	8,11	R. Unido	ERL04-0480	28	37,84	N. Zelanda
CNET-010	7	9,46	R. Unido	ERL04-0969	67	90,54	N. Zelanda
RM3147	52	70,27	México	CPM-032	22	29,73	España
ERL06-2377	31	41,89	N. Zelanda	CPM-087	5	6,76	España
ERL03-1621	25	33,78	N. Zelanda	CPM-118	23	31,08	España
CH-001	9	12,16	España	CPM-125	19	25,68	España
CH-005	24	32,43	España	CPM-129	5	6,76	España
CH-015	16	21,62	España	CPM-141	13	17,57	España
CH-068	32	43,24	España	C356	6	8,11	P. Bajos
CH-096	25	33,78	España	22	6	8,11	Dinamarca
CNET-031	8	10,81	P. Bajos	85	5	6,76	R. Unido
CNET-033	14	18,92	R. Unido	87	37	50,00	R. Unido
CNET-035	12	16,22	R. Unido	89	40	54,05	R. Unido
CO19165	16	21,62	R. Unido	CNET-086	3	4,05	R. Unido
CO12599	5	6,76	R. Unido	95	33	44,59	Dinamarca
RM3193	40	54,05	Sudáfrica				
233.95	46	62,16	Sudáfrica				

El rango de hibridación positiva osciló entre el 4-90 %. No se observaron diferencias según el origen geográfico y la fuente de las cepas.

5.4.4. Porcentaje de hibridación para las sondas correspondientes a las restantes cepas

Adicionalmente, el *microarray* contiene sondas diseñadas a partir de las cepas *C. jejuni* 11828, 12517, 17683, 4343X, SSH, CjX, LI087, G1, 81116 y 460.

En la Tabla 28 se detalla el número de sondas que mostraron señal positiva en función del origen de la misma. En el Anexo 4 aparecen detallados todos los porcentajes.

Tabla 28. Resultados de hibridación positiva con las sondas de diversas cepas en función de la procedencia de los aislamientos.

Cepa	Nº Sondas	Rango	
		Humanas	Pollo
SSH	12	0-8	0-5
CjX	5	0-2	0-3
LI087	2	0-2	0-1
G1	5	0-5	0-5
81116	22	0-22	0-22
460	6	0-5	0-4
4343X	21	0-16	0-15
17683	23	0-23	0-11
12517	2	0-2	0-1
11828	15	0-15	0-14

Tabla 29. Resultados de hibridación positiva con las sondas de diversas cepas en función del origen geográfico.

Cepa	Nº Sonda	Australia n=3	Bélgica n=2	Dinamarca n=11	Reino Unido n=15	México n=1	Nueva Zelanda n=6	España n=11	Estados Unidos n=2	Países Bajos n=3	Sudáfrica n=2
SSH	12	1	3-4	0-3	0-8	4	1-4	1-4	5	2-3	1
CjX	5	0-1	0	0-2	0-1	0	0-1	0-3	0	0	1
Li087	2	0-1	0	0-1	0-2	0	0	0-1	0	0	0
G1	5	0	0	0-4	0-5	1	0-1	0-5	0	0-5	0
81116	22	3-6	1-22	1-16	1-22	3	3-14	0-12	3	0-2	5
460	6	0	0-5	0-4	0-4	1	1-3	0-1	1	0	2-3
4343X	21	0-2	0-11	0-12	0-15	1	0-14	1-16	1-2	0-1	1-2
17683	23	0-2	0-6	0-7	0-11	0	0-10	1-8	0	0	23
12517	2	0	0	0-1	0	2	0	0-1	2	0	0
11828	15	0-2	1-15	0-10	0-15	1	0-11	0-8	0	0	0

Los valores más altos de hibridación para las sondas de las cepas de *C. jejuni* 81116 y 460 se dieron en Bélgica, Dinamarca y Reino Unido. Las sondas de la cepa 4343X hibridaron en mayor proporción con cepas de Reino Unido, Nueva Zelanda y España. Las cepas de Sudáfrica mostraron un mayor porcentaje de hibridación que el resto con las sondas de la cepa 17683 y las sondas de la cepa 11828 hibridaron en mayor proporción con las cepas procedentes de Bélgica y Reino Unido.

5.4.5. Comparativa entre las cepas procedentes de España y Nueva Zelanda

Los resultados obtenidos para la comparativa España vs Nueva Zelanda se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Porcentajes de hibridación de las sondas obtenidos para las cepas procedentes de España y Nueva Zelanda.

Sondas	Genes		EMD-0-237		EMD-0-1823		EMD-0-0959		EMD-0-0480		EMD-0-0969		EMD-0-1821		CH-001		CPM-129		CH-096		CPM-032		CH-008		CPM-125		CPM-007		CH-015		CPM-118		CPM-041		CH-005	
	ST	CC	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
11168	1852	1458	88.3	1552	93.9	1480	89.6	1526	92.4	1553	94.0	1471	89.0	1647	99.7	1645	99.6	1636	99.0	1630	99.5	1578	95.5	1575	96.3	1593	96.4	1553	94.0	1564	94.7	1503	94.0	1560	94.4	
RM1221	312	40	12.8	48	15.3	62	19.9	75	24.0	81	26.3	96	30.8	129	41.3	90	29.0	111	35.6	89	28.6	114	36.8	111	35.5	72	23.0	122	39.0	221	71.4	82	26.2	89	28.9	
81174	24	31	41.8	35	47.3	35	47.3	28	37.8	47	63.3	35	47.3	9	12.2	5	6.8	25	33.8	22	29.7	32	43.2	19	25.7	5	6.8	16	21.6	21	28.1	13	17.6	24	32.4	
81186	22	14	63.6	11	50.0	10	45.5	12	54.5	3	13.6	5	22.7	3	13.6	0	0.0	9	40.9	3	13.6	12	54.5	7	31.8	5	22.7	6	27.3	8	40.9	7	33.8	10	45.5	
pTet	49	0	0.0	3	6.1	13	28.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	10.2	24	49.0	44	89.8	37	75.5	21	42.9	4	8.2	6	12.2	5	10.2	46	94.9	35	71.4	43	87.8	
pVir	53	0	0.0	3	5.7	1	1.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	7	13.2	0	0.0	18	34.0	6	11.3	13	24.5	3	5.7	3	5.7	5	9.4	4	7.5	11	20.8			
43431	21	12	57.1	8	38.1	2	9.5	14	66.7	2	9.5	0	0.0	4	19.0	2	9.5	10	47.6	5	23.8	8	38.1	2	9.5	2	9.5	1	4.8	5	23.8	15	71.4	16	76.2	
17083	23	7	30.4	9	39.1	0	0.0	10	43.5	1	4.3	0	0.0	1	4.3	0	0.0	5	21.7	1	4.3	5	21.7	0	0.0	4	17.4	8	34.8	4	17.4	7	30.4	8	34.8	
55H	12	2	16.7	2	16.7	1	8.3	1	8.3	1	8.3	2	16.7	4	33.3	4	33.3	3	25.0	2	16.7	1	8.3	1	8.3	2	16.7	1	8.3	4	33.3	1	8.3	2	16.7	
CSX	5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	1	20.0	0	0.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	2	40.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	60.0	2	40.0	2	40.0	
U087	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0	
G1	5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	5	100.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	1	20.0	0	0.0	1	20.0	
460	6	1	50.0	1	16.7	1	50.0	2	33.3	1	16.7	1	16.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	16.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
12517	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0	0	0.0	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0			
11828	35	9	60.0	10	66.7	1	6.7	11	73.3	0	0.0	0	0.0	2	13.3	2	13.3	5	33.3	6	40.0	3	20.0	2	13.3	1	6.7	0	0.0	2	13.3	7	46.7	8	53.3	
Total	2254	1571	1682	1588	1682	1682	1684	1560	1815	1732	1867	1778	1853	1725	1693	1716	1898	1723	1752																	
%	65.7	74.6	70.5	74.6	75.2	69.2	80.5	76.8	82.8	78.9	82.2	76.5	75.1	76.1	84.2	76.4	77.7																			

Celdas rojo énfasis, N. Zelanda; celdas rosas, España; CC, complejo clonal; ST, secuencia tipo.

Los resultados obtenidos por origen geográfico mostraron que en la comparativa, las cepas de España presentaron un mayor porcentaje de hibridación con las sondas correspondientes a las cepas NCTC11168, RM1221 y los plásmidos pTet y pVir. Las cepas de Nueva Zelanda presentaron mayor porcentaje de hibridación con las sondas de las cepas 81-176 y 460.

Por complejo clonal, las cepas pertenecientes al CC-45 presentaron un mayor grado de hibridación con las sondas correspondientes a la cepa 11828. Por otro lado, las cepas del CC-21 presentaron un mayor grado de hibridación con las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168.

5.5. Filogenómica

Se realizaron árboles filogenómicos a partir de los datos obtenidos en nuestro experimento. Para ello, las matrices se construyeron en formato nexus. El software analizó los datos de las diferentes matrices y generó los árboles que se detallarán a continuación.

En este árbol se aprecia que no existe ninguna asociación clara con respecto al origen geográfico y la fuente. Aun así, cabe destacar que las cepas pertenecientes a un complejo clonal concreto hayan quedado agrupadas en un mismo *cluster*.

5.5.2. Árbol filogenómico basado en el genoma de la cepa NCTC11168

5.5.2.1. Árbol filogenómico por países

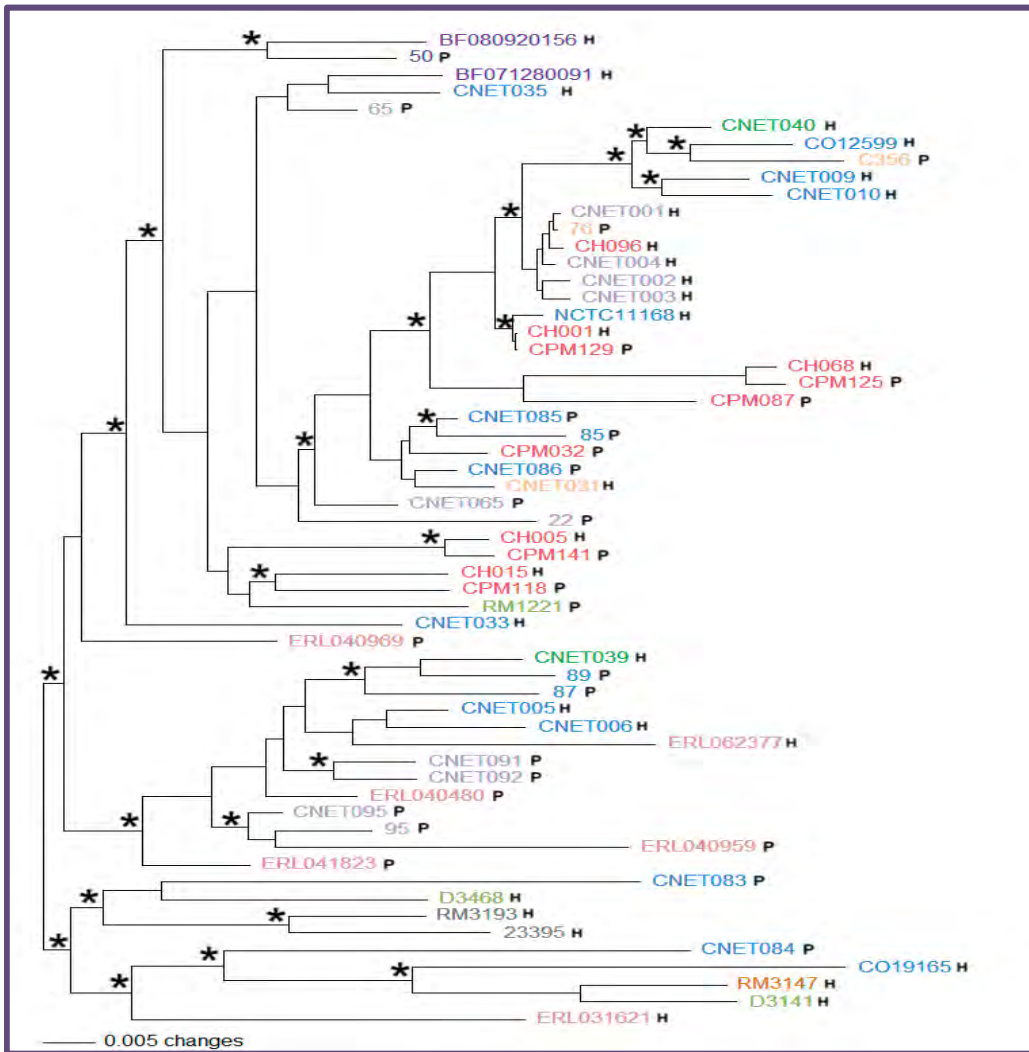


Figura 18. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris). H, humana; p, pollo; *, $BPP \geq 0,95$.

Tal y como se observa en el anterior árbol, existen tres grandes clados con un valor de soporte alto. Sin embargo, no existe una estructura genética en función del origen geográfico o fuente a la hora de separar dichos clados.

5.5.2.2. Árbol filogenómico correspondientes a las cepas españolas y neozelandesas

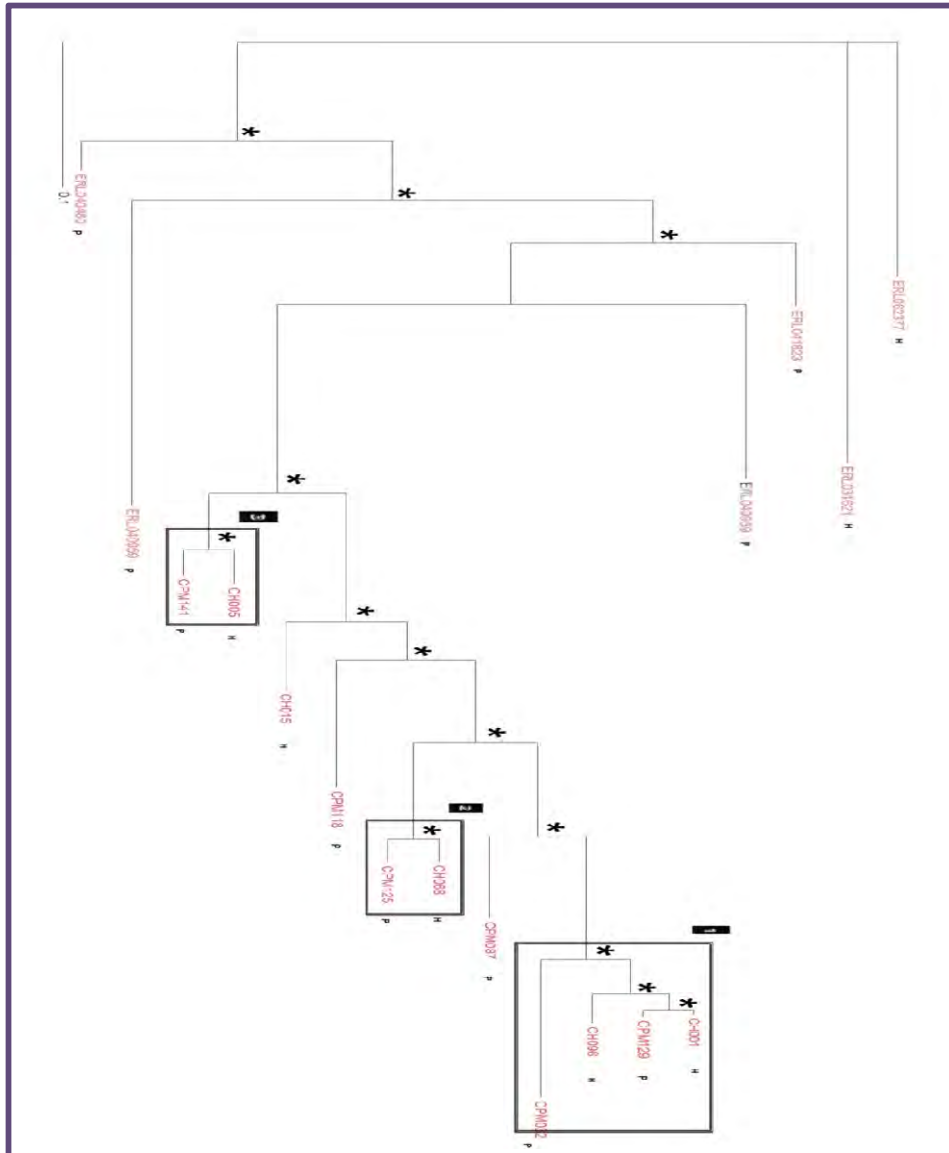


Figura 19. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la cepa NCTC11168. Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa). H, humana; p, pollo; *, $BPP \geq 0,95$.

El análisis filogenómico entre las cepas españolas y neozelandesas agrupó las de origen español en un mismo *cluster*, mientras que las de Nueva Zelanda quedaron excluidas de dicho clado. Además, dentro del clado no homogéneo de las cepas españolas se agruparon por un lado las que poseían el CC-21 (cuadro nº1), por otro lado las que poseían el CC-257 (cuadro nº2) y por último, las que a pesar de no tener un complejo clonal asignado (*singleton*) si compartían la misma secuencia tipo (ST-441) (cuadro nº3). Como hecho destacable, observamos una disgregación entre las cepas CPM-087 y CH-015, aun poseyendo el mismo complejo clonal (CC-607).

5.5.3. Árbol filogenómico basado en los genes correspondientes a las islas genómicas

5.5.3.1. Árbol filogenómico correspondiente a CJIE1



Figura 20. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE1. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris). H, humana; p, pollo; *, $BPP \geq 0,95$.

El árbol muestra en un mismo *cluster* (enmarcado en negro) todas las cepas que poseían la isla CJIE1, exceptuando ERL04-1823, CH-096 y CPM-032 que quedaron excluidas posiblemente por tener tan solo una de las dos transposasas.

5.5.3.2. Árbol filogenómico correspondiente a CJIE2

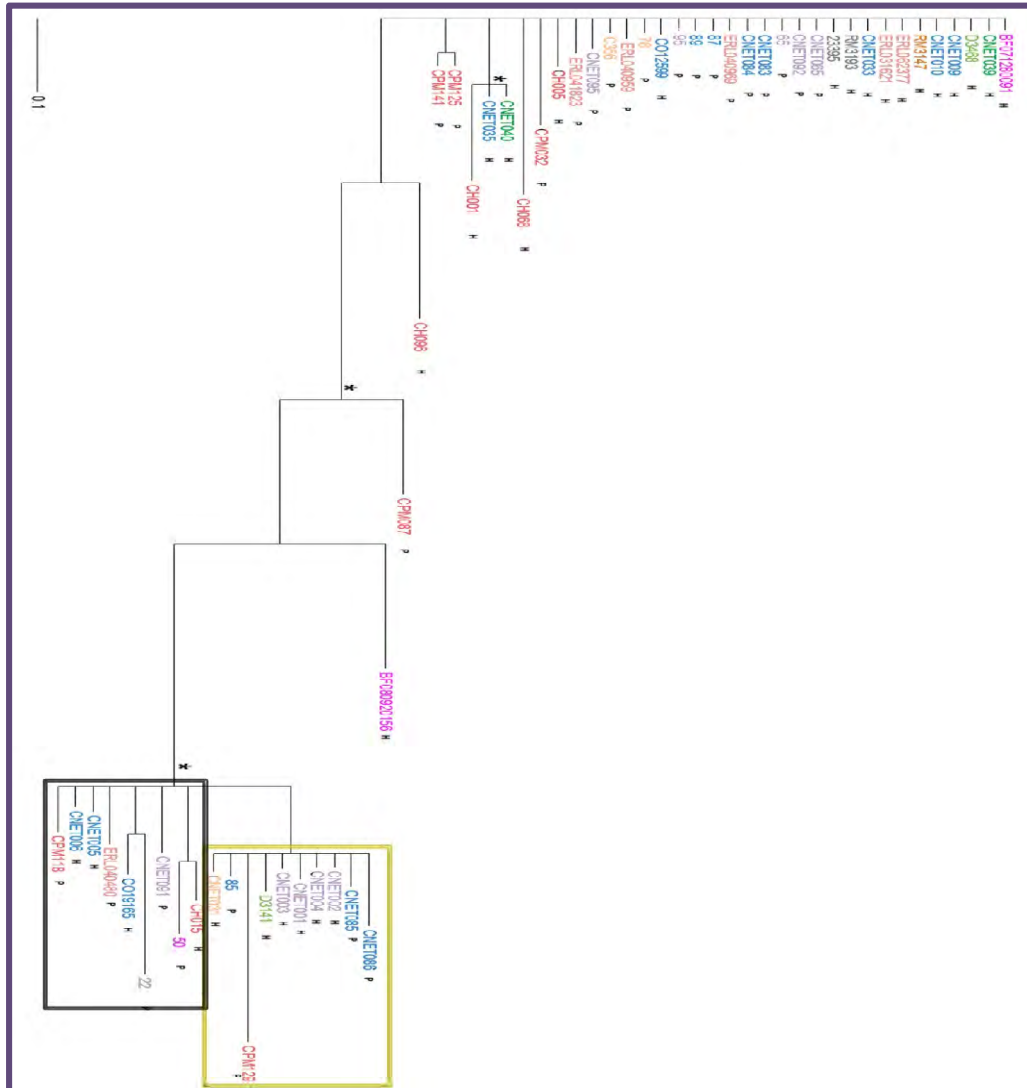


Figura 21. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE2. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris). H, humana; p, pollo; *, *BPP* ≥ 0,95.

En el árbol anterior, se muestran agrupadas en un mismo *cluster* (enmarcado en negro) las cepas que poseían la isla CJIE2 exceptuando la cepa BF080920156 que queda fuera debido a su bajo contenido de genes pertenecientes a dicha isla. Por otro lado, en otro *cluster* (enmarcado en amarillo) quedaron agrupadas las cepas que poseían islas ancladas (no poseen integrasas o transposasas, pero poseen un alto número de genes pertenecientes a las islas) salvo la cepa 22 que posiblemente debido a su alto número de genes quedó incluida en el *cluster* donde las cepas poseían dicha isla.

En el árbol generado por las sondas correspondientes a la isla CJIE3, todas las cepas que contenían dicha isla quedaron agrupadas en un mismo *cluster* (remarcado en negro).

5.5.3.4. Árbol filogenómico correspondiente a CJIE4

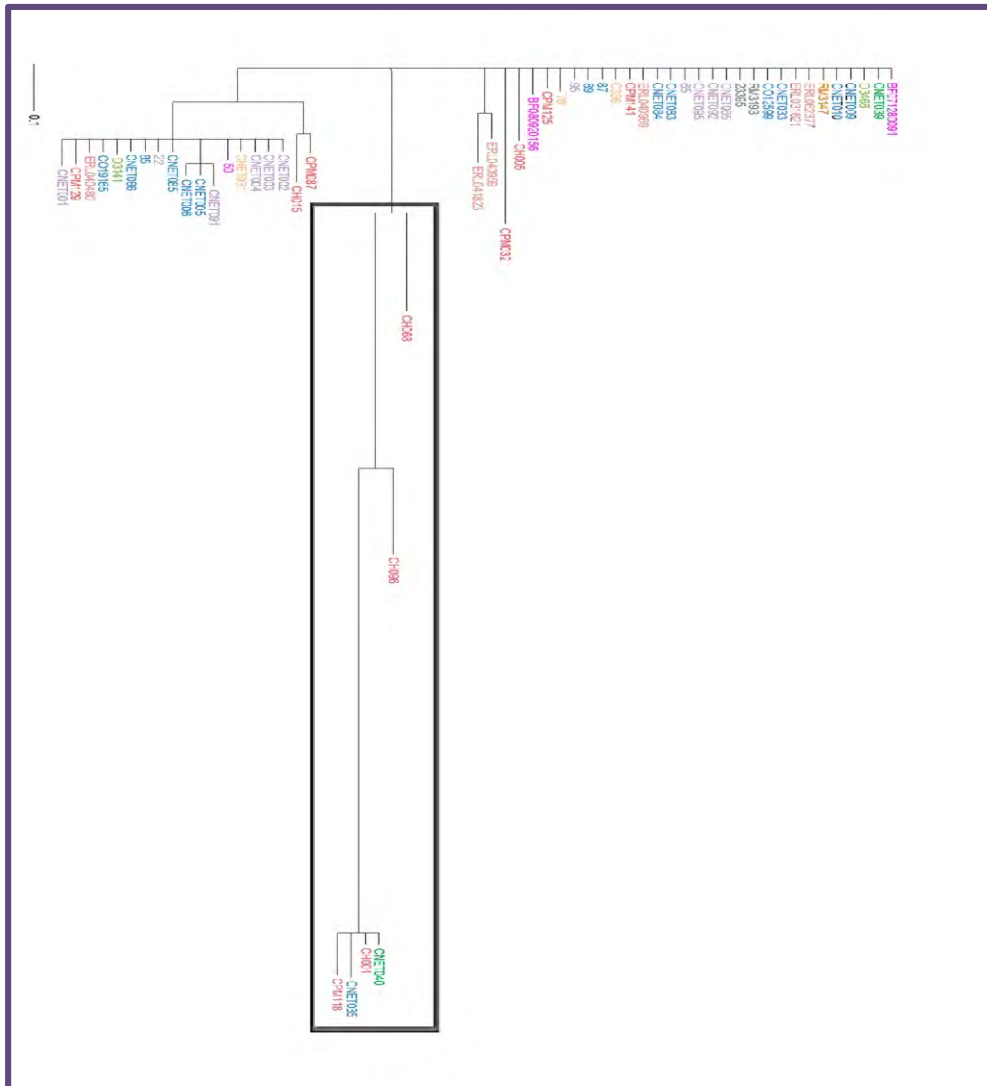


Figura 23. Árbol generado con los resultados obtenidos por hibridación con las sondas correspondientes a la isla CJIE4. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris). H, humana; p, pollo; *, $BPP \geq 0,95$.

El gen *Cj1585c* se detectó en un 73 % de las cepas humanas, el gen *ggt* en un 33 %, el gen *dmsA* en un 26 % y el gen de la serin proteasa en un 73 %. Mientras que entre las cepas de pollo el gen *Cj1585c* se detectó en un 60 %, el gen *ggt* en un 21 %, el gen *dmsA* en un 35 % y el gen de la serin proteasa en un 68 %.

Respecto a los posibles marcadores genéticos de fuente de aislamiento obtenidos en este trabajo, sólo se encontró un posible marcador, el gen *neuA1* que se encontraba presente en un 83 % de las cepas humanas y en un 50 % en las de pollo.

Posteriormente, con el fin de detectar un posible marcador genético de origen geográfico se estudiaron mediante CGH las cepas de diferentes regiones geográficas (regiones dentro de cada país). No se observó ningún marcador geográfico de una región concreta. Por ello, se realizó una comparación entre los distintos países estudiados.

Se compararon entre sí los cuatro países con una representación mayor en cuanto a número de cepas, es decir, España, Reino Unido, Dinamarca y Nueva Zelanda. Las mayores diferencias se observaron a la hora de comparar las cepas de Nueva Zelanda con las cepas de los países restantes. Los resultados se muestran detallados en las Figuras 27, 28, y 29.

Tal y como se observa en la Figura 27 la mayoría de los genes pertenecen a las zonas hipervariables descritas por Dorrell *et al.* (2001), Pearson *et al.* (2003) y Taboada *et al.* (2004) que serán descritas más adelante. La excepción fueron los genes *Cj0144* y *Cj0501* que no se localizan en ninguna zona hipervariable.

DINAMARCA											N.ZELANDA				GEN	
CNET-001	CNET-002	CNET-003	CNET-004	CNET-091	CNET-092	CNET-095	65	22	95	ERL06-2377	ERL03-1621	ERL04-1823	ERL04-0959	ERL04-0480		ERL04-0969
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	CJ0008
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	CJ0144
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	luxA'
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	CJ0501
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	CJ0569
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	CJ0618
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	CJ0738
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	CJ0752
1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	neuC1
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	CJ1297
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	CJ1309c
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	CJ1322
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	CJ1325
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	CJ1326
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	hdcC
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	CJ1442c

Figura 27. Resultados obtenidos para la comparativa Dinamarca vs Nueva Zelanda. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Dinamarca (morado), Nueva Zelanda (rojo énfasis).

REINO UNIDO											N.ZELANDA				GEN								
CNET-005	CNET-006	CNET-083	CNET-084	CNET-085	CNET-009	85	CNET-010	CNET-033	CNET-035	CO19165	CO12599	NCTC1.1168	CNET-086	87		89	ERL06-2377	ERL03-1621	ERL04-1823	ERL04-0959	ERL04-0480	ERL04-0969	
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	CJ0057
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	CJ0058
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0177
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	exbB1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	exbD1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	tonB1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	CJ0501
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0617
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0618
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	CJ1309c
1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	CJ1679

Figura 28. Resultados obtenidos para la comparativa Reino Unido vs Nueva Zelanda. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), Nueva Zelanda (rojo énfasis).

Todos los genes en los que se observaron diferencias en la Figura 28 se localizan en regiones hipervariables descritas por Pearson *et al.* (2003) y Taboada *et al.* (2004) y serán

descritos en el apartado correspondiente. La excepción fue el gen *Cj0501* que no se localiza en ninguna zona hipervariable. Además se observó que el gen *rplB* (*Cj1704c*) se encontraba en un 83 % de las cepas de Nueva Zelanda y sólo en un 30 % en las cepas de Reino Unido.

N.ZELANDA					ESPAÑA								GEN				
ERL06-2377	ERL03-1621	ERL04-1823	ERL04-0959	ERL04-0480	ERL04-0969	CH-001	CH-005	CH-015	CH-068	CH-096	CPM-032	CPM-087		CPM-118	CPM-125	CPM-129	CPM-141
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0177
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	CJ0178
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>exbB1</i>
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>exbD1</i>
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	<i>tonB1</i>
0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	CJ0380c
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	CJ0423
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	CJ0480c
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	<i>dapA</i>
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>uxaA</i>
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>uxaA'</i>
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	CJ0484
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	CJ0485
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	<i>fucP</i>
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	CJ0488
0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	<i>ald',aldA</i>
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	<i>ald'</i>
0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0501
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0617
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0618
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0747
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	<i>tonB3</i>
0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	<i>cjel</i>
0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1297
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1321
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1322
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1323
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1324
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1325
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1326
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	CJ1427c
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1585c
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	CJ1725
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	<i>metA</i>
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	<i>metB;metY</i>

Figura 29. Resultados obtenidos para la comparativa España vs Nueva Zelanda. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa).

Como se observa en la Figura 29, a excepción de los genes *Cj0380c* (proteína hipotética), *Cj0501* (proteína hipotética) y *cjel* (enzima de restricción/modificación), los demás

genes se describirán en el apartado de las regiones hipervariables descritas por Dorrell *et al.* (2001), Pearson *et al.* (2003) y Taboada *et al.* (2004).

Además se detectaron los genes *Cj0859-Cj0860* en un 83 % de las cepas neozelandesas y en un 18 % de las cepas españolas.

A la hora de comparar las cepas de Dinamarca frente a España se observó que el gen *Cj1305c* estaba presente en un 81 % de las cepas de Dinamarca y tan sólo en un 27 % en las cepas españolas mientras que los genes *Cj1051c* (enzima de restricción/modificación) y *Cj1427c* (epimerasa/dehidratasa putativa) estaban presentes en un 81 % en las cepas españolas y en un 36 % en Dinamarca.

En la comparativa de las cepas de Dinamarca vs Reino Unido se observó que el gen *rplB* estaba presente en un 72 % de las cepas danesas y en un 30 % de las británicas. Sin embargo, se observó que el gen *Cj1679* estaba presente en un 75 % de las cepas de Reino Unido frente a un 27 % en Dinamarca.

Los genes *Cj0170-Cj0171* (proteínas hipotéticas) y *Cj0815-Cj0816* (proteínas hipotéticas) se encontraron en más de un 75 % de las cepas de Reino Unido y en un 36 % de cepas de España. Sin embargo, los genes *rplB* y *Cj1427c* se encontraron en porcentajes altos en cepas procedentes de España y bajos porcentajes en cepas procedentes de Reino Unido.

Además se observó que los genes *Cj0177*, *exbB1*, *exbD1*, *tonB1* y *Cj0617* estaban presentes en un porcentaje alto entre las cepas de Reino Unido y España y ausente/divergente en un porcentaje alto entre las cepas de Nueva Zelanda. Los genes *Cj1297*, *Cj1322*, *Cj1325* y *Cj1326* mostraron un alto porcentaje de presencia entre las cepas de Dinamarca y España, mientras que mostraron un bajo porcentaje de presencia entre las neozelandesas. Por otro lado, el gen *Cj1309* mostró un alto porcentaje de presencia entre las cepas de Dinamarca y Reino Unido y un bajo porcentaje entre las cepas de Nueva Zelanda. Por último el gen *Cj0618* se encontró en altos porcentajes de presencia entre las cepas de

Reino Unido, España y Dinamarca y en un bajo porcentaje entre las cepas de Nueva Zelanda.

Tras la comparativa por países se estableció una comparativa entre países europeos y países no europeos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

SONDA	Australia		N. Zelanda				E. Unidos		México		Sudáfrica		España								P. Bajos		Bélgica		Dinamarca					R. Unido					GEN																				
	BR08-092-0156	BF07-128-0091	ERD06-2377	ERD03-1621	ERD04-0959	ERD04-0480	ERD04-0969	D3141	D3468	RM3147	RM3193	233_95	CH-001	CH-005	CH-015	CH-068	CH-096	CPM-032	CPM-087	CPM-118	CPM-125	CPM-129	CPM-141	CNET-031	C356	76	CNET-039	CNET-040	CNET-001	CNET-002	CNET-003	CNET-004	CNET-001	CNET-002		CNET-003	CNET-004	CNET-005	CNET-006	CNET-007	CNET-008	CNET-009	85	CNET-010	CNET-033	CNET-035	CO15165	CO12599	NCTC11168	CNET-086	87	89			
Cj11168-0617	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ0617				
Cj11168-1297	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1297		
Cj11168-1321	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1321	
Cj11168-1322	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1322
Cj11168-1323	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1323	
Cj11168-1324	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1324	
Cj11168-1325	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1325	
Cj11168-1326	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	CJ1326	

Figura 30. Resultados obtenidos para la comparativa países europeos vs no europeos. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris). 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia.

Las principales diferencias se encontraron en 8 genes siendo ausentes/divergentes en la mayoría de las cepas no europeas. Dentro de estos 8 genes se encuentran el *cluster* de genes *Cj1321-Cj1326* descrito por Champion *et al.* (2005). Este *cluster* mostró ausencia/divergencia prácticamente en todas las cepas no europeas.

5.6.2. Posibles marcadores genéticos relacionados con un complejo clonal

Se genotipificaron mediante MLST y genomotipificaron mediante *microarrays* las 6 cepas de Nueva Zelanda y 11 cepas de España. Tras el estudio y como ya ha sido detallado, 14 de las 17 cepas pudieron ser asignados a un complejo clonal. Las cepas de España se asignaron a los complejos clonales CC-21 (4 cepas), CC-607 (2 cepas), CC-257 (2 cepas) y CC-460 (1 cepa) mientras que las cepas de Nueva Zelanda pertenecían a los complejos CC-45 (4 cepas) y CC-42 (1 cepa).

La comparativa por complejos clonales mostró diferencias entre ellos. En la Tabla 31 y Figura 31 aparecen los genes destacados o posibles marcadores vinculados a un complejo clonal particular. Son genes mayoritariamente ausentes/divergentes o presentes para cada complejo clonal.

	CC	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	Genes										
ST	45	45	45	45	45	42	42	21	21	21	21	441	441	904	607	607	904	607	824	257	257	1074	460	
Sondas	ERL062377	ERL041823	ERL040959	ERL040480	ERL040969	ERL031621	CH001	CPM129	CPM129	CPM096	CPM032	CPM005	CPM141	CPM141	CPM015	CPM087	CPM008	CPM125	CPM118					
Cj11168-0008	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0008
Cj11168-0055c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0055c
Cj11168-0056c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	CJ0056c
Cj11168-0057	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0057
Cj11168-0058	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0058
Cj11168-0818	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	CJ0818
Cj11168-0819	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	CJ0819
Cj11168-1135	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	CJ1135
Cj11168-1136	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	CJ1136
Cj11168-1137c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	CJ1137c
Cj11168-1138	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1138
Cj11168-1139c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	waN
Cj11168-1140	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	csIII
Cj11168-1141	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	neuB1
Cj11168-1142	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	neuC1
Cj11168-1143	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	neuA1;cgfA
Cj11168-1144c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	cgfA
Cj11168-1145c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1145c
Cj11168-1158c	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1158c
Cj11168-1159c	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1159c
Cj11168-1160c	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1160c
Cj11168-1549c, 11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	hsdR
Cj11168-1550c, 11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	rioH
Cj11168-1551c, 11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	hsdS
Cj11168-1552c, 11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	mloB
Cj11168-1553c, 11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	hsdM
Cj11168-1555c, 11	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1555c
Cj11168-1556, 119	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1556
Cj11168-1721c	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1721c
Cj11168-1722c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1722c
Cj11168-1723c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1723c
Cj11168-1725	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1725
Cj11168-1726c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	metA
Cj11168-1727c	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	metB;metN
CJRM1221-1101	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CJRM1221-1722	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CJRM1221-1884	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
CJRM1221-1891	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Cj81116-09	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj81116-11	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj81116-12	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj81116-13	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-01	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-02	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-03	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-04	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-05	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-06	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cj11828-07	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Figura 31. Genes destacados para cada complejo clonal. España (rosa), Nueva Zelanda (rojo énfasis). CC, complejo clonal; ST, secuencia tipo; h, humana; p, pollo. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia.

Tabla 31. Funciones asignadas a los genes destacados.

Genes Destacados	CC-21	CC-42	CC-45	CC-257	CC-460	CC-607	Función asignada	Región cromosómica
Cj0008 Cj0055c-Cj0056c Cj0818-Cj0819 Cj1135-Cj1145c Cj1549c-Cj1553c Cj1556 Cj1721c-Cj1723c CJE1101 CJE1722	P	A/D	A/D	A/D	A/D	A/D	Proteínas hipotéticas, Lipoproteína putative, Biosíntesis de LOS, Enzima de restricción y modificación tipo I putativa, Regulador transcripcional putativo, Proteína de membrana.	- Región Variable (Taboada <i>et al.</i> , 2004) - PR4 (Pearson <i>et al.</i> , 2003) Región Variable (Taboada <i>et al.</i> , 2004) Región Variable (Taboada <i>et al.</i> , 2004) PR7 (Pearson <i>et al.</i> , 2003) CJIE3 (Quiñones <i>et al.</i> , 2006) -
Cj1158c-Cj1160c CJE1884 CJE1891	A/D	P	P	P	P	P	Proteínas hipotéticas, Biosíntesis de LOS.	Región Variable detectada en este estudio - -
Cj0057-Cj0058 Cj1555c Cj1725-Cj1727c	P	P	A/D	P	P	P	Proteína periplásmica, Peptidasa, Proteínas hipotéticas, Enzima de restricción y modificación tipo I putativa	- Región Variable (Taboada <i>et al.</i> , 2004) PR7 (Pearson <i>et al.</i> , 2003)
C8J_0009 C8J_0011- C8J_0014 Cj11828-0001 -0007	A/D	A/D	P	A/D	A/D	A/D	Ribonucleasa HII, Rubreritina, Dehidratasa, Proteína integral de membrana putativa, Proteínas hipotéticas	- - -

CC, Complejo Clonal; P, Presente; A/D, Ausente/divergente

Zautner *et al.* (2011) propusieron una serie de marcadores genéticos relacionados con complejos clonales. Los posibles marcadores genéticos eran *ansB* (Cj0029), *dmsA* (CJJ81-176-1468), *ggt* (CJJ81-176-0034), *Cj1585c*, *CJJ81-176-1367/1371*(Cj1365c) y *dtlp7* (Cj0951c-Cj0952c).

Los genotipos encontrados podían segregarse en 6 grupos diferentes combinando la presencia y ausencia de los posibles marcadores. Los grupos se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Grupos definidos por Zautner *et al.* (2011).

Grupo	CJJ81-176-1367/1371	Cj1585c	<i>dtlp7</i>	<i>dmsA</i>	<i>ansB</i>	<i>ggt</i>	CC	Origen
1a	+	+	+				21	b
1b	+	+					21,48,49,206,446	h,p,b,pa
2a	+			+	+	+	42,22	h,p,b
2b				+	+	+	45,283	h,p
3a	+	+					52,353,354,443,658.828	h,p,pa
3b	+	+	+				61	b
4				+			1034,1332	pa
5	+	+						p
6	+			+	+		257	h-pa

h, humanas; p, pollo; pa, pavo; b, bovinas; +, presencia

En nuestros resultados se detectó el gen *dtlp7* en todas las cepas estudiadas (7 cepas humanas y 10 de pollo). Los resultados globales obtenidos se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Grupos definidos en este estudio.

Complejo Clonal	CJJ81-176-1367/1371	Cj1585c	<i>dtlp7</i>	<i>dmsA</i>	<i>ansB</i>	<i>ggt</i>	Origen
45			+	+	+	+	h
45			+	+	+	+/-	p
42	+		+	+	+	+	p
21,257,607,460	+		+		+		h,p

h, humanas; p, pollo; +, presencia

Todas las cepas de España presentaron la misma combinación de genes, independientemente del complejo clonal al que estaban asignados. Por otro lado el gen *dmsA* estuvo presente en todas las cepas Nueva Zelanda (CC-45 y CC-42) y en ninguna cepa de España (CC-21, CC-257, CC-607, CC-460). Además, los genes *dtlp7* y *ansB* mostraron señal positiva para todas las cepas.

SONDA	Australia	N.Zelanda	E.Unidos	México	Sudáfrica	España	P.Bajos	Bélgica	Dinamarca	R.Unido	GEN		
	RF08-092-0156 RF07-128-0091	ER06-2377	ER03-1621 ER04-1823 ER04-0959 ER04-0480 ER04-0969	D3141 RM1271 D3468 RM3147 RM3183 233_95	GH-001 GH-005 GH-015 GH-068 GH-096	GM4-032 GM4-087 GM4-118 GM4-125 GM4-129 GM4-141	CNE1-051 C396 76	CNE1-039 CNE1-001 CNE1-002 CNE1-003 CNE1-004 CNE1-091 CNE1-092 CNE1-095 CNE1-065 95 22	CNE1-005 CNE1-006 CNE1-083 CNE1-084 CNE1-085 CNE1-009 85	CNE1-010 CNE1-093 CNE1-095 CO19165 CO12599 NCTC11168 CNE1-086 87 89	CJ1135 CJ1136 CJ1137c CJ1138 wbaN cstIII neuB1 neuC1 neuA1:cgtA cgtA CJ1145c		
CJ11168-1135	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	CJ1135	
CJ11168-1136	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	CJ1136	
CJ11168-1137c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	CJ1137c	
CJ11168-1138	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	CJ1138	
CJ11168-1139c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	wbaN	
CJ11168-1140	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	cstIII	
CJ11168-1141	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	neuB1	
CJ11168-1142	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	neuC1	
CJ11168-1143	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	neuA1:cgtA
CJ11168-1144c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	cgtA	
CJ11168-1145c	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	CJ1145c	

Figura 39. Comparativa por países de de la región de plasticidad hipervariable PR4. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris).

En la comparativa humanas vs pollo una vez más no se detectó nada importante. Sin embargo, en la comparativa por países se observó que ciertas cepas europeas (1 de las 2 cepas de Bélgica, 5 de las 11 cepas de Dinamarca, 7 de las 16 de Reino Unido, 4 de las 11 cepas de España y 2 de las 3 cepas de Países Bajos) presentaron el grupo completo de genes, mientras que en ninguna de las cepas no europeas fue detectado.

Además, los 4 genes *neuA1*, *neuB1*, *neuC1* y *cst* estaban presentes en 20 de las 44 cepas europeas.

Con respecto a la región PR5, que está relacionada con la biosíntesis y modificación post-translacional de la flagelina, destacan genes que codifican muchas proteínas hipotéticas, una proteína transportadora de acilos (*acpP2*, *acpP3*, *acpP4*) y una proteína sintasa III beta-quetoacil-acil transportadora (*fabH2*), esta última esencial en la biosíntesis de ácidos grasos en otros microorganismos. A continuación se detallan los resultados obtenidos para la región de plasticidad PR5.

SONDA	Países														GEN				
	Australia	N.Zelandia	E. Unidos	México	Sudáfrica	España	P. Bajos	Bélgica	Dinamarca	R.Unido									
Cj11168-1415c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	cysC
Cj11168-1416c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1416c
Cj11168-1417c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1417c
Cj11168-1418c	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1418c
Cj11168-1419c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1419c
Cj11168-1420c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1420c
Cj11168-1421c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1421c
Cj11168-1422c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1422c
Cj11168-1423c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	hdnC
Cj11168-1424c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	gmhA2
Cj11168-1425c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hdnA
Cj11168-1426c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1426c
Cj11168-1427c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1427c
Cj11168-1428c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	fci
Cj11168-1429c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1429c
Cj11168-1430c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	rfbC
Cj11168-1431c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hdnC
Cj11168-1432c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1432c
Cj11168-1433c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1433c
Cj11168-1434c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1434c
Cj11168-1435c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1435c
Cj11168-1436c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1436c
Cj11168-1437c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1437c
Cj11168-1438c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1438c
Cj11168-1439c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	gflf
Cj11168-1440c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1440c
Cj11168-1441c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	kfID
Cj11168-1442c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1442c

Figura 43. Comparativa por países de la región de plasticidad hipervariable PR6. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris).

Respecto a la comparación entre países (Figura 43) se encontró una alta ausencia/divergencia de los genes de esta región entre las cepas europeas y no europeas. En concreto, un 63 % entre las cepas de Dinamarca, un 75 % de las cepas de Reino Unido y un 55 % de las cepas de España carecían de gran parte de estos genes. Entre las cepas no europeas esta región mostró una alta ausencia /divergencia con valores superiores a un 40 %.

Dentro de esta región existe un *cluster* de 5 genes (*Cj1416c-Cj1420c*) que está ausente/divergente en su totalidad en 8 cepas y presente en 37 cepas. Este *cluster* codifica un fosfoenolpiruvato sintasa, un GMP sintasa y GIP citidil transferasa, una metil transferasa putativa y un gen de contingencia de función desconocida (*Cj1420c*).

Años más tarde, Taboada *et al.* (2004) determinaron 17 regiones hipervariables que comprendían los genes *Cj0032-Cj0036*, *Cj0055c-Cj0059c*, *Cj0177-Cj0182*, *Cj0258-Cj0263*, *Cj0294-Cj0310c*, *Cj0421-Cj0425*, *Cj0480c-Cj0490*, *Cj0561c-Cj0571*, *Cj0625-Cj0629*, *Cj0727-Cj0755*, *Cj0967-Cj0975*, *Cj1135-Cj1151c*, *Cj1293-Cj1343*, *Cj1414c-Cj1449c*, *Cj1543c-Cj1563c*, *Cj1677-Cj1679* y *Cj1717c-Cj1729c*. Algunas de estas zonas coinciden con las descritas previamente por otros autores como Pearson *et al.* (2003) y Dorrell *et al.* (2001). Los resultados obtenidos para las 9 zonas hipervariables descritas por Taboada *et al.* (2004) se detallan en las Figuras 50 y 51.

SONDA	Países										GEN		
	Australia	NZlandia	Estados Unidos	México	Sudáfrica	España	Países Bajos	Bélgica	Dinamarca	Reino Unido			
Cj11168-0032	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0032
Cj11168-0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0033
Cj11168-0034c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0034c
Cj11168-0035c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0035c
Cj11168-0036	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0036
Cj11168-0055c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0055c
Cj11168-0056c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0056c
Cj11168-0057	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0057
Cj11168-0058	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0058
Cj11168-0059c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	hlyY
Cj11168-0177	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0177
Cj11168-0178	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0178
Cj11168-0179	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	exbB1
Cj11168-0180	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	exbD1
Cj11168-0181	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	tonB1
Cj11168-0182	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0182
Cj11168-0421c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0421c
Cj11168-0422c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0422c
Cj11168-0423	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0423
Cj11168-0424	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0424
Cj11168-0425	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0425
Cj11168-0561c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0561c
Cj11168-0562	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	dnaB
Cj11168-0563	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0563
Cj11168-0564	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0564
Cj11168-0565	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0565
Cj11168-0566	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0566
Cj11168-0567	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0567
Cj11168-0568	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0568
Cj11168-0569	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0569
Cj11168-0570	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0570
Cj11168-0571	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0571
Cj11168-0625	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	hypD
Cj11168-0626	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	hypE
Cj11168-0627	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	hypA
Cj11168-0628	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0628
Cj11168-0629	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0629
Cj11168-0967	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0967
Cj11168-0968	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0968
Cj11168-0969	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0969
Cj11168-0970	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0970
Cj11168-0971	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0971
Cj11168-0972	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0972
Cj11168-0973	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ0973
Cj11168-0974	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0974
Cj11168-0975	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ0975
Cj11168-1543	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1543
Cj11168-1544c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1544c
Cj11168-1545c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1545c
Cj11168-1546	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1546
Cj11168-1547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1547
Cj11168-1548c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1548c
Cj11168-1549c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hsdR
Cj11168-1550c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hlyA
Cj11168-1551c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hsdS
Cj11168-1552c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	mloB
Cj11168-1553c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hsdM
Cj11168-1555c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1555c
Cj11168-1556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1556
Cj11168-1558	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1558
Cj11168-1560	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1560
Cj11168-1561	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	arsR
Cj11168-1562	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1562
Cj11168-1563c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CJ1563c
Cj11168-1677	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1677
Cj11168-1678	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1678
Cj11168-1679	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CJ1679

Figura 51. Comparativa las zonas hipervariables descritas por Taboada *et al.* (2004) por países. 1= Presencia y 0= Ausencia/Divergencia. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (canela), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris).

A la hora de analizar las cepas según su origen geográfico la región *Cj0032-Cj0036*, no mostró diferencias destacables. La región *Cj0055c-Cj0059c*, se encontró

ausente/divergente en 1 cepa de Bélgica, 3 de Dinamarca, 4 de Reino Unido, 4 de Nueva Zelanda y 2 de Sudáfrica. Las cepas de Australia, España, Estados Unidos y Países Bajos no mostraron prácticamente ausencia/divergencia en esta región.

La región *Cj0177-Cj0182* se encontró ausente/divergente en todas las cepas de Nueva Zelanda, estando presente en todas las cepas de Australia, España, Países Bajos y Sudáfrica.

Los genes *Cj0421c-Cj0425* mostraron una alta ausencia/divergencia en las cepas de Nueva Zelanda y Estados Unidos. Sin embargo, estaban presentes prácticamente en todas las cepas de Australia, España, Países Bajos y Sudáfrica.

El grupo de genes *Cj0561c-Cj0571* mostró un alto grado de ausencia/divergencia en las cepas de Nueva Zelanda, Estados Unidos y Sudáfrica. Mientras que en Australia, y Países Bajos esta ausencia/divergencia fue mínima.

Los genes *Cj0628-Cj0629* mostraron ausencia/divergencia en las cepas de los países no europeos Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Sudáfrica.

El grupo de genes *Cj0967-Cj0975* mostró un alto grado de ausencia/divergencia en las cepas de España (55 %) y en las cepas de Sudáfrica (100 %).

Los genes relacionados con un sistema de restricción y modificación de tipo I (*Cj1543c-Cj1563c*) mostraron una alta ausencia/divergencia en las cepas de Australia, Dinamarca, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Sudáfrica.

Por último los resultados obtenidos para los genes *Cj1677-Cj1679* mostraron que estaban prácticamente ausentes/divergentes en todas las cepas, independientemente de su origen geográfico.

Poly *et al.* (2004) estudiaron la cepa *C. jejuni* ATCC 43431 mediante *microarrays* y secuenciación, y encontraron que la mayoría de los genes no esenciales para esta cepa se agrupaban en 5 regiones cromosómicas referidas como zonas de plasticidad PZ1-PZ5. Estas zonas coincidían con las zonas hipervariables caracterizadas anteriormente por Dorrell *et al.* (2001), Pearson *et al.* (2003) y Taboada *et al.* (2004). La zona PZ1 se corresponde con los genes *Cj0258-Cj0265* descritos por Taboada *et al.* (2004). Esta zona contiene ocho genes, un posible regulador, una dihidroorotasa, una putativa proteína metil aceptora de la señal transductora de quimiotaxis, una molibdepterin oxidorreductasa, una putativa proteína periplásmica de citocromo c, una proteína transportadora de zinc, una metiltransferasa dependiente SAM putativa y una proteína hipotética. La zona PZ2 (*Cj0299-Cj0306c*) se corresponde con la región PR1, la zona PZ3 (*Cj0480-Cj0490*) se corresponde con la región PR2, PZ4 (*Cj1135-Cj1145c*) se corresponde con la región PR4, por último, la zona PZ5 (*Cj1421c-Cj1441*) que se corresponde con la región PR6.

5.7.3. Nuevas regiones hipervariables detectadas en este estudio

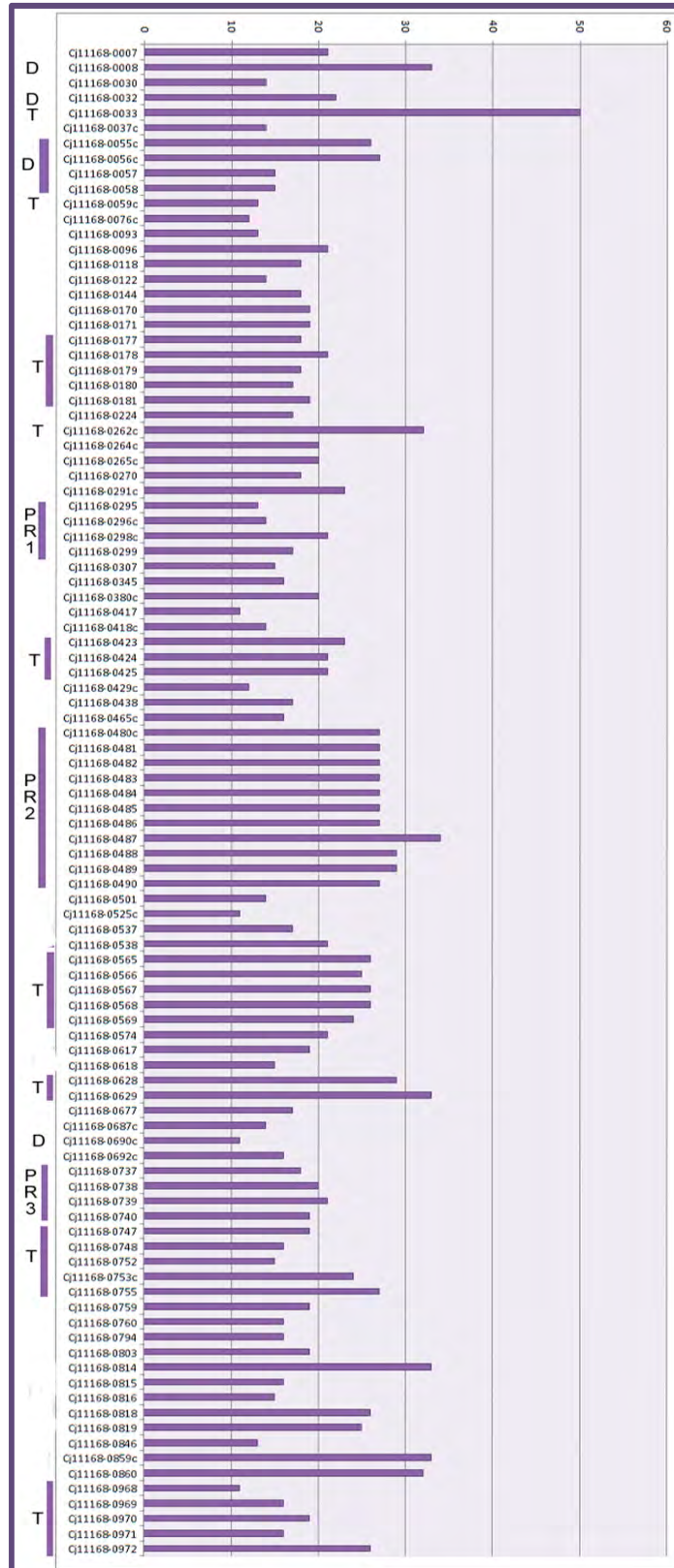
El análisis de las 58 cepas nos permitió identificar 5 nuevas zonas hipervariables que no habían sido identificadas hasta el momento. Estas zonas son las siguientes:

- Cj0170-Cj0171*, codifican proteínas hipotéticas.
- Cj0537-Cj0538*, codifican las subunidades OorB y OorC del 2-oxoglutarato reductasa.
- Cj0617-Cj0618*, codifican proteínas hipotéticas.
- Cj0814-Cj0819*, codifican una proteína putativa periplásmica de unión a la glutamina, una lipoproteína putativa y 4 proteínas hipotéticas.
- Cj1158-Cj1160c*, codifican 3 proteínas hipotéticas.

Los resultados obtenidos para estos genes se muestran en las Figuras 52 y 53.

5.7.4. Resultado global de variabilidad

Un análisis global de los resultados demostró que la ausencia/divergencia de los genes pertenecientes a la cepa de *C. jejuni* NCTC11168 adquirió valores de hasta el 13,7 % (226 genes) para cada cepa y suponía un 30 % (504 genes) de genes variables totales. La variabilidad se concentraba en las regiones descritas en los apartados 5.7.1., 5.7.2. y 5.7.3., pero también en algunos genes dispersos en el cromosoma. En la Figura 54 se muestra representada la distribución de los genes que mostraron un porcentaje alto de ausencia/divergencia.



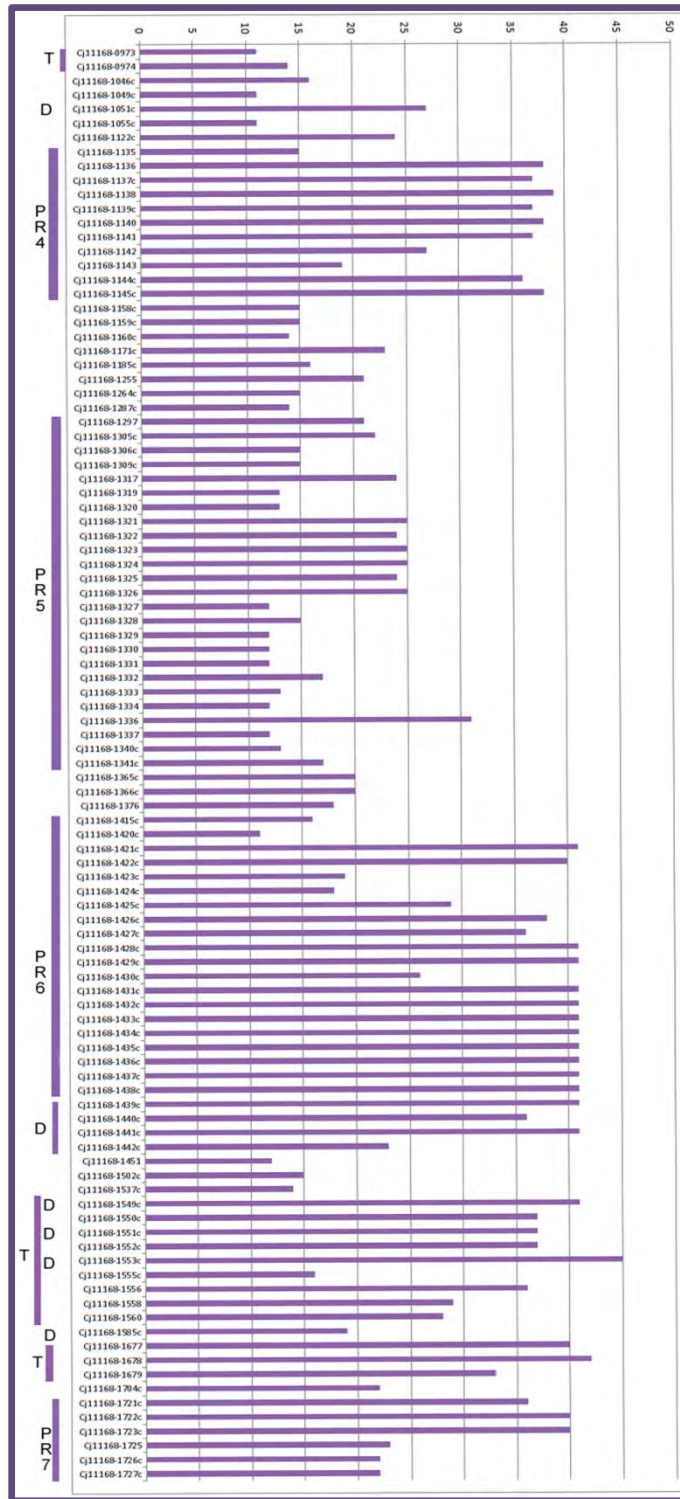


Figura 54. Distribución de genes ausentes/divergentes. D, Dorrell *et al.* (2001); PR, Pearson *et al.* (2003); T, Taboada *et al.* (2004).

El gen *tet0* vinculado a la resistencia a la tetraciclina solo se detectó en 15 cepas europeas. Por otro lado, ninguna de las cepas hibridó con el gen *virB11* considerado factor de virulencia putativo.

5.7.7. Islas genómicas (CJIE)

El contenido genómico de las cepas NCTC11168 y RM1221 es muy similar excepto por la presencia en la cepa RM1221 de cuatro islas genómicas denominadas elementos integrados en *C. jejuni* (CJIE) y pequeños *clusters* de genes. Las islas genómicas corresponden al 70 % del total de las sondas exclusivas de la cepa RM1221. La presencia de cada una de las CJIE se consideró como positiva cuando se detectó la presencia de integrasas (*CJE0544*, *CJE1094* y *CJE1418*) o transposasas (*CJE0269-CJE0270*). Aun así, los casos que no se detectaron integrasas o transposasas fueron denominados como islas ancladas (como ya viene definido en el NCBI) si poseían un alto número de genes pertenecientes a la isla; por el contrario, si poseían un bajo número de genes se denominaron *isla like* (genes descritos anteriormente en la cepa RM1221). Los resultados obtenidos para estas islas genómicas se detallan en las Figuras 57, 58, 59 y 60.

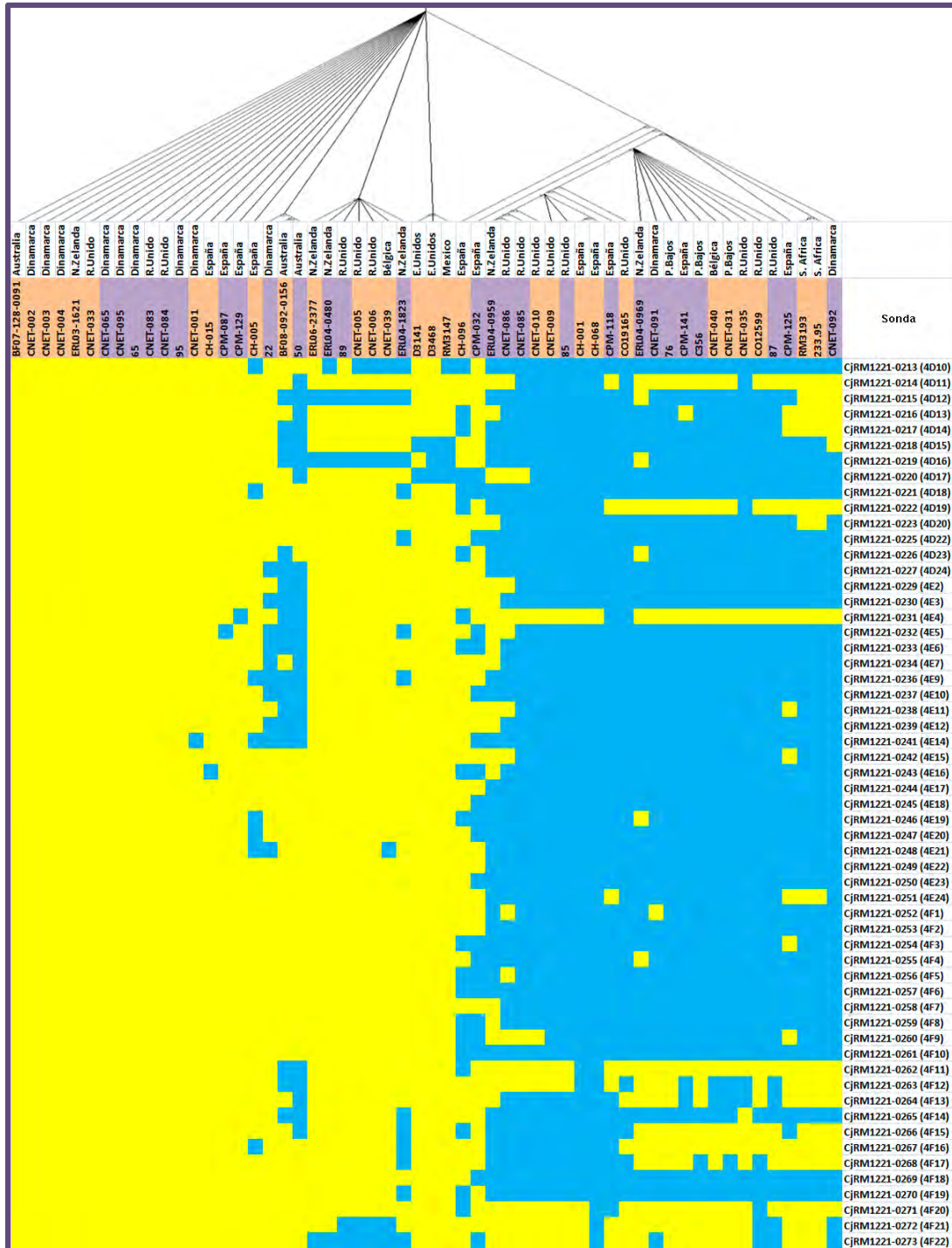


Figura 57. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE1. Azul, presencia; amarillo, ausencia/divergencia; morado, pollo; anaranjado, humanas.

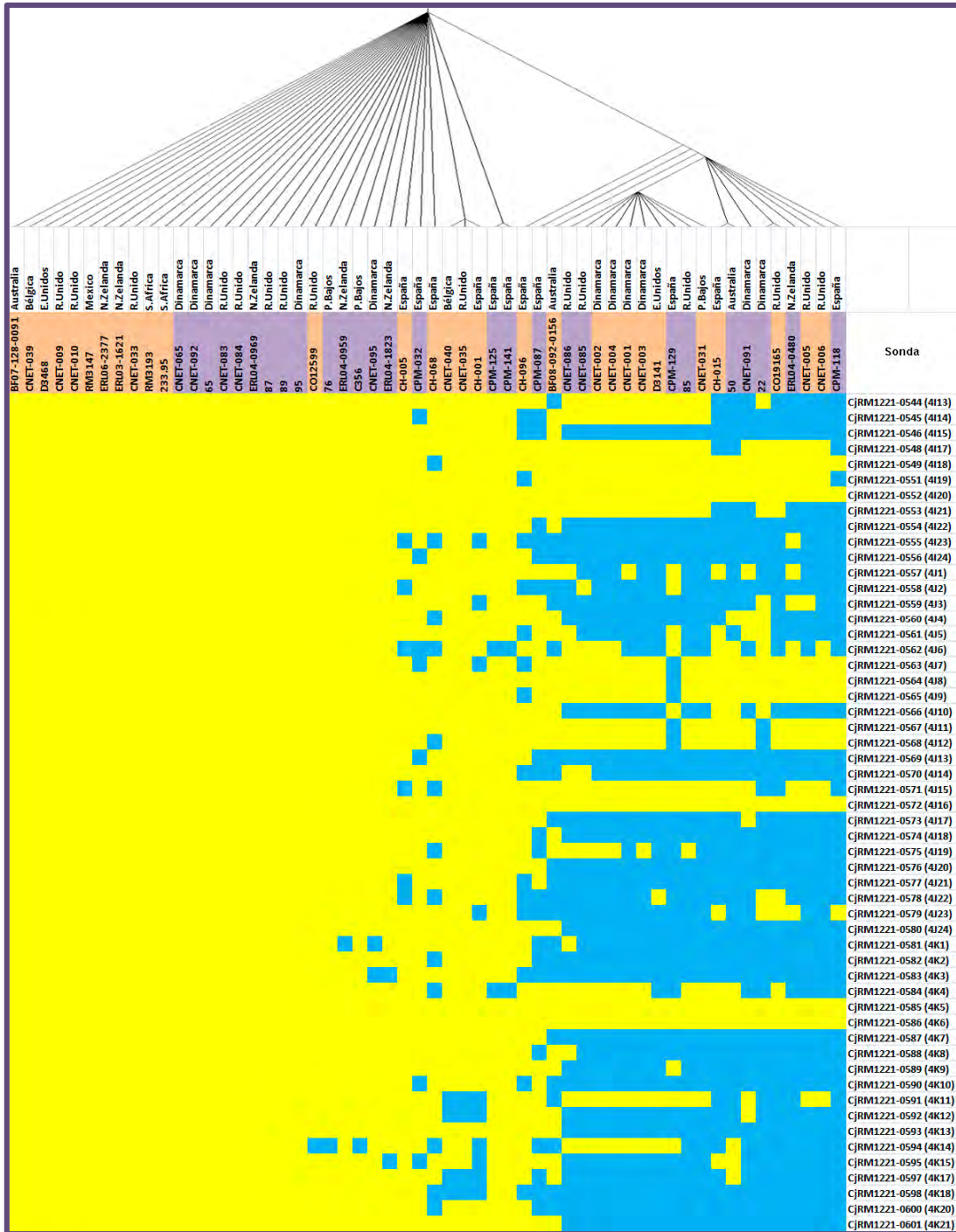


Figura 58. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE2. Azul, presencia; amarillo, ausencia/divergencia; morado, pollo; anaranjado, humanas.

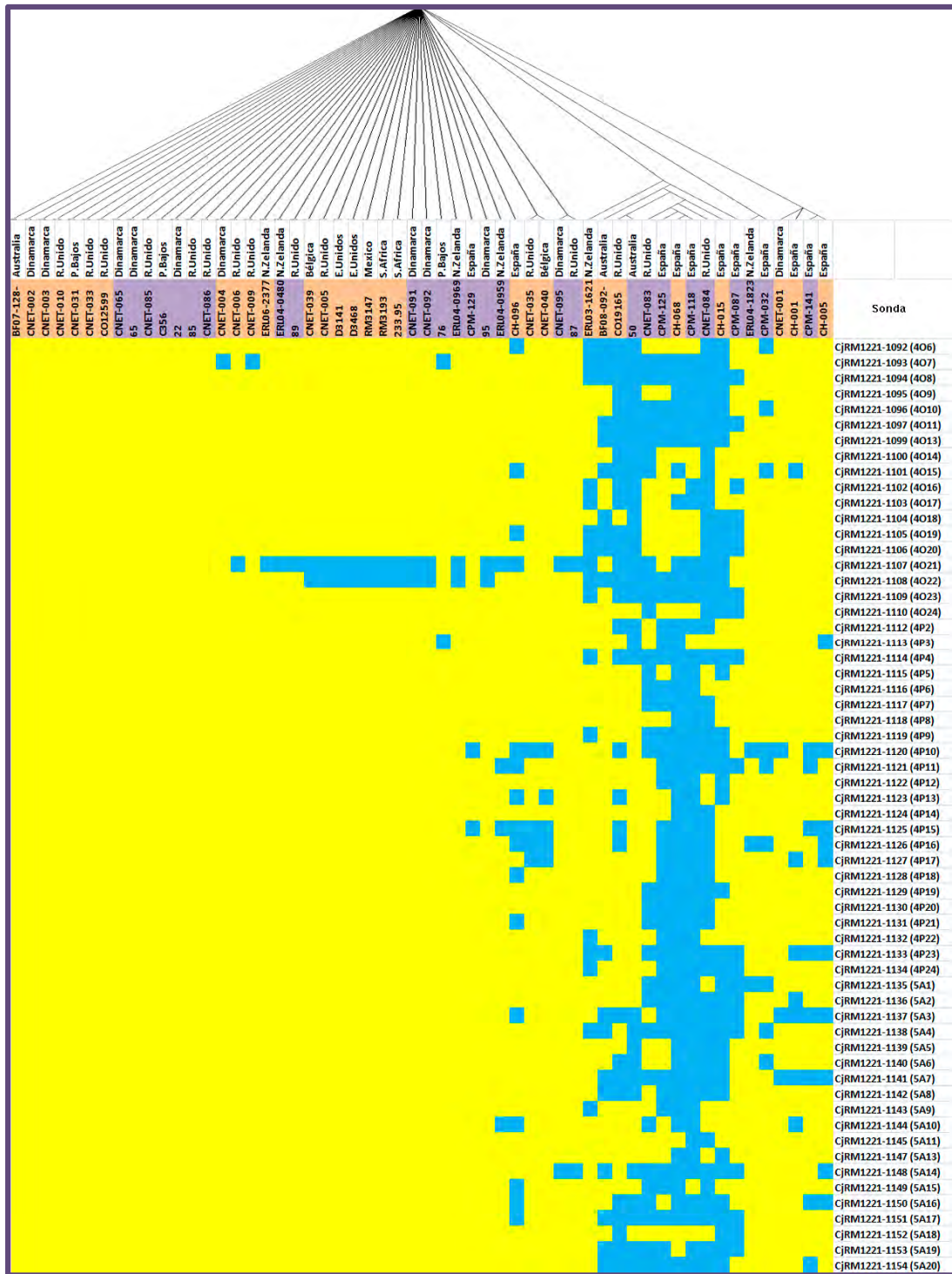


Figura 59. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE3. Azul, presencia; amarillo, ausencia/divergencia; morado, pollo; anaranjado, humanas.

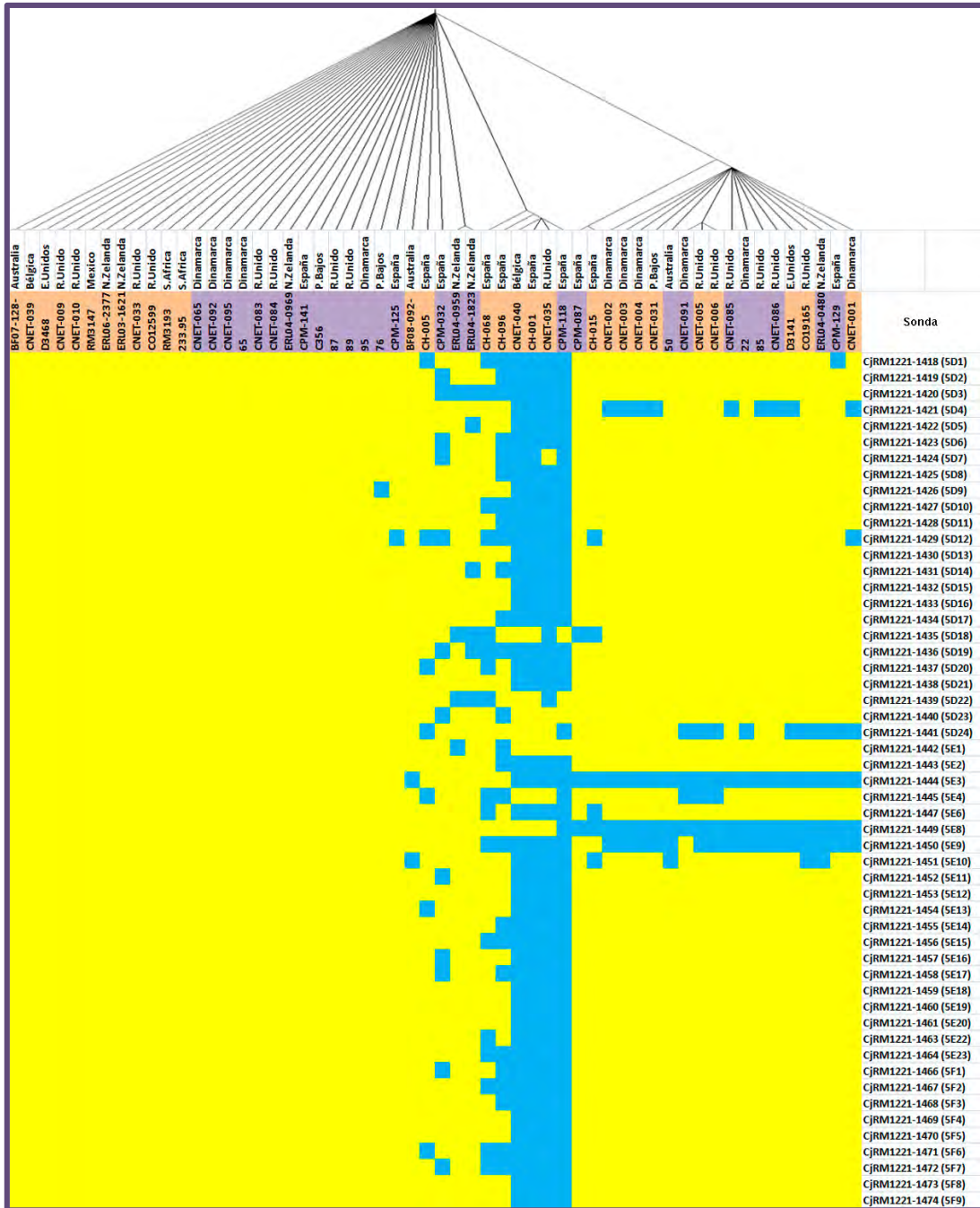


Figura 60. Árbol filogenómico generado por el programa Mr. Bayes 3.0. con los resultados de las sondas correspondientes a CJIE4. Azul, presencia; amarillo, ausencia/divergencia; morado, pollo; anaranjado, humanas.

Los resultados globales de las islas genómicas (CJIE) se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34. Resultados detallados de los datos obtenidos.

Origen	País	Cepa	ISLA				ISLA LIKE				ISLAS ANCLADAS
			1	2	3	4	1	2	3	4	2
HUMANA	AUSTRALIA	BF08-092-0156	-	+	+	-	+	-	-	+	-
HUMANA	AUSTRALIA	BF07-128-0091	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLLO	AUSTRALIA	50	-	+	+	-	+	-	-	+	-
HUMANA	BÉLGICA	CNET-039	-	-	-	-	+	-	+	-	-
HUMANA	BÉLGICA	CNET-040	+	-	-	+	-	+	+	-	-
HUMANA	DINAMARCA	CNET-001	-	-	-	-	+	-	+	+	+
HUMANA	DINAMARCA	CNET-002	-	-	-	-	-	-	-	+	+
HUMANA	DINAMARCA	CNET-003	-	-	-	-	-	-	-	+	+
HUMANA	DINAMARCA	CNET-004	-	-	-	-	-	-	+	+	+
POLLO	DINAMARCA	CNET-065	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLLO	DINAMARCA	CNET-091	+	+	-	-	-	-	+	+	-
POLLO	DINAMARCA	CNET-092	+	-	-	-	-	-	+	-	-
POLLO	DINAMARCA	CNET-095	-	-	-	-	-	+	+	-	-
POLLO	DINAMARCA	22	-	-	-	-	+	-	-	+	+
POLLO	DINAMARCA	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POLLO	DINAMARCA	95	-	-	-	-	-	-	+	-	-
POLLO	PAÍSES BAJOS	C356	+	-	-	-	-	+	-	-	-
HUMANA	PAÍSES BAJOS	CNET-031	+	-	-	-	-	-	-	+	+
POLLO	PAÍSES BAJOS	76	+	-	-	-	-	+	+	+	-
HUMANA	MEXICO	RM3147	-	-	-	-	+	-	+	-	-
HUMANA	NUEVA ZELANDA	ERL03-1621	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLLO	NUEVA ZELANDA	ERL04-0480	-	+	-	-	+	-	+	+	-
POLLO	NUEVA ZELANDA	ERL04-0959	+	-	-	-	-	+	+	+	-
POLLO	NUEVA ZELANDA	ERL04-0969	+	-	-	-	-	-	+	-	-
POLLO	NUEVA ZELANDA	ERL04-1823	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HUMANA	NUEVA ZELANDA	ERL06-2377	-	-	-	-	+	-	+	-	-
HUMANA	ESPAÑA	CH-001	+	-	-	+	-	+	+	-	-
HUMANA	ESPAÑA	CH-005	-	-	-	+	+	+	+	-	-
HUMANA	ESPAÑA	CH-015	-	+	+	-	+	-	-	+	-
HUMANA	ESPAÑA	CH-068	+	-	+	+	-	+	-	-	-
HUMANA	ESPAÑA	CH-096	+	-	-	+	-	+	+	-	-
POLLO	ESPAÑA	CPM-032	-	-	-	-	+	+	+	+	-
POLLO	ESPAÑA	CPM-087	-	-	+	-	+	+	-	+	-
POLLO	ESPAÑA	CPM-118	+	+	+	+	-	-	-	-	-
POLLO	ESPAÑA	CPM-125	+	-	+	-	-	+	-	+	-
POLLO	ESPAÑA	CPM-129	-	-	-	+	+	-	+	-	+
POLLO	ESPAÑA	CPM-141	+	-	-	-	-	+	+	-	-
HUMANA	SUDÁFRICA	233.95	+	-	-	-	-	-	+	-	-
HUMANA	SUDÁFRICA	RM3193	+	-	-	-	-	-	+	-	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-033	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-035	+	-	-	+	-	+	+	-	-
POLLO	REINO UNIDO	CNET-086	+	-	-	-	-	-	-	+	+
HUMANA	REINO UNIDO	CO12599	+	-	-	-	-	+	-	-	-
HUMANA	REINO UNIDO	CO19165	+	+	+	-	-	-	-	+	-
POLLO	REINO UNIDO	87	+	-	-	-	-	-	+	-	-
POLLO	REINO UNIDO	89	-	-	-	-	+	-	+	-	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-005	-	+	-	-	+	-	+	+	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-006	-	+	-	-	+	-	+	+	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-009	+	-	-	-	-	-	+	-	-
HUMANA	REINO UNIDO	CNET-010	+	-	-	-	-	-	-	-	-
POLLO	REINO UNIDO	CNET-083	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLLO	REINO UNIDO	CNET-084	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLLO	REINO UNIDO	CNET-085	+	-	-	-	-	-	-	+	+
POLLO	REINO UNIDO	85	+	-	-	-	-	-	-	+	+
HUMANA	ESTADOS UNIDOS	D3141	-	-	-	-	+	-	+	+	+
HUMANA	ESTADOS UNIDOS	D3468	-	-	-	-	+	-	+	-	-

+, presencia; -, ausencia

Tabla 35. Resultados globales en función de la procedencia geográfica.

País	Número de cepas	ISLA				ISLA LIKE				ISLAS ANCLADAS
		1	2	3	4	1	2	3	4	2
Australia	3	0	2	2	0	2	0	0	2	0
Bélgica	2	1	0	0	1	1	1	2	0	0
Dinamarca	11	2	1	0	0	2	6	6	6	5
P.Bajos	3	3	0	0	0	0	3	1	2	1
México	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
N.Zelanda	6	3	1	1	0	2	2	5	3	0
España	11	6	2	5	6	5	9	6	4	1
Sudáfrica	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0
R.Unido	15	9	3	3	1	3	5	6	6	3
E.Unidos	2	0	0	0	0	2	1	2	1	1

CJIE1 aparece como isla en 26 cepas y en 18 cepas como *isla like*. CJIE2 aparece como isla en 9 cepas, como isla anclada en 11 cepas y en 27 cepas como *isla like*. CJIE3 aparece como isla en 11 cepas y como *isla like* en 31 cepas. Por último, CJIE4 aparece en 8 cepas como isla y en 24 como *isla like*. Además todas las islas eran más comunes entre aislamientos europeos que entre aislamientos no europeos e incluso el número de genes detectados para cada isla era mayor en el caso de las cepas europeas. Respecto a la comparativa entre cepas humanas y pollo parece que la presencia de islas es semejante.

Como podemos observar en las figuras anteriores, tan sólo en 4 de entre todas las cepas estudiadas no se detectó ninguna isla. El conjunto de las cuatro islas fue detectado tan sólo en una cepa (CPM-118, España). La presencia del conjunto de islas CJIE1, CJIE2 y CJIE3 sólo se detectó en una cepa (CO19165, Reino Unido). De igual manera, los conjuntos de islas CJIE1-CJIE2 y CJIE1-CJIE3 solo estaban presentes en una cepa. CJIE1 y CJIE4 como CJIE2 y CJIE3 fueron detectadas en 4 y 3 cepas respectivamente. A nivel individual las islas CJIE1 y CJIE2 fueron detectadas en 17 y 3 cepas respectivamente mientras que CJIE3 y CJIE4 mostraron una presencia más baja siendo detectadas en 4 y dos cepas respectivamente.

El análisis filogenómico de cada isla agrupó las cepas que presentaban una isla concreta en un mismo *cluster* en todos los casos. Hubo excepciones para las cepas ERL04-1823, CH-096 y CPM-032 en el árbol de la isla CJIE1, para BF080920156 en el árbol de la isla CJIE2 y para CH-005 y CPM-129 en el árbol de la isla CJIE4. La categoría de islas ancladas fue determinada únicamente en el caso de la isla CJIE2, constituyendo igualmente un único cluster.

Con respecto al porcentaje de cepas que presentaron algún gen inequívocamente identificado como plasmídico o fágico se obtuvieron los siguientes resultados: para CJIE1 un 95 %, para CJIE2 un 66 %, para CJIE3 un 71 % y para CJIE4 un 87 %.

Por otro lado, de los 24 genes identificados como de origen fágico que están en la isla CJIE1, el 87 % de estos genes se detectaron en aproximadamente el 50 % de las cepas. Sin embargo, los genes *CJE0272*, *CJE0231* y *CJE0222* los presentaron menos del 20 % de las cepas. Para CJIE2, de los 7 genes identificados como de origen fágico, el 85 % se detectaron en un 50 % aproximadamente de las cepas excepto el gen *CJE0548* que estuvo presente en menos del 10 % de las cepas. En CJIE3, los 3 genes identificados como de origen plasmídico se detectaron con porcentajes muy dispares. Por último, de los 16 genes de origen fágico que están identificados en la isla CJIE4, el 88 % mostraron un bajo porcentaje de presencia entre las cepas.

Gaasbeek *et al.* (2009, 2010) detectaron la presencia de 3 nucleasas, que codifican DNAsas extracelulares en las islas CJIE1 (*CJE0256*), CJIE2 (*CJE0566*) y CJIE4 (*CJE1441*). Estos autores sugirieron que estas nucleasas actuaban como un inhibidor de la transformación natural en *C. jejuni* por lo que eran muy comunes entre cepas no transformables.

Los resultados obtenidos para estos genes se muestran en la Figura 61.

		AUSTRALIA	AUSTRALIA	MÉXICO	N.ZELANDA	N.ZELANDA	E. UNIDOS	ESPAÑA	R. UNIDO	AUSTRALIA	DINAMARCA	DINAMARCA	DINAMARCA	R. UNIDO	R. UNIDO	N.ZELANDA	N.ZELANDA	ESPAÑA	ESPAÑA	R. UNIDO	ESPAÑA	SUDÁFRICA	SUDÁFRICA	BELGICA	DINAMARCA	P. BAJOS	N.ZELANDA	ESPAÑA	ESPAÑA	P. BAJOS	R. UNIDO	R. UNIDO	DINAMARCA	DINAMARCA	DINAMARCA	ESPAÑA	ESPAÑA	R. UNIDO	R. UNIDO	E. UNIDOS	E. UNIDOS	N.ZELANDA	P. BAJOS	R. UNIDO	R. UNIDO	DINAMARCA	DINAMARCA	ESPAÑA								
		BF08-092-0156																																																						
CJIE1	CJRM1221-0256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CJIE2	CJRM1221-0566	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CJIE4	CJRM1221-1441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 61. Resultados obtenidos para las 3 nucleasas.

Como se muestra en la Figura 61, 19 cepas mostraban ausencia/divergencia para los tres genes. Se observó que 26 cepas eran positivas para al menos uno de los tres genes, 8 cepas positivas para dos de los tres genes y que 3 fueron positivas para los 3 genes.

Entre las 27 cepas positivas para CJIE1, 25 contenían el gen *CJE0256* y la cepa CNET-086 que mostraba ausencia/divergencia para este gen, sí tenía presente el gen *CJE0566*. Entre las 9 cepas positivas para CJIE2, 6 contenían el gen *CJE0566* y para CJIE4, entre las 8 cepas positivas para dicha isla, 3 contenía el gen *CJE1441*. Por último, entre algunas cepas que contenían *isla like* también se detectaron estos genes.



Discusión

1. Análisis genómico

Analizar el genoma completo de *C. jejuni* en un solo *microarray* es una tentativa ambiciosa. De hecho, hasta el momento pocos estudios lo han desarrollado. Además de la complejidad que conlleva esta técnica, es de destacar el elevado número de sondas necesarias para detectar el mayor número de genes posibles (cromosómicos y plasmídicos). Su puesta a punto supone un reto no sólo debido a los puntos críticos que presenta, sino también al elevado número de genes en estudio. Por ello, la optimización de las condiciones de hibridación y análisis de datos, basándonos en las cepas de referencia NCTC11168 y RM1221, se convirtió en nuestro primer objetivo.

Aún existiendo un protocolo general para esta técnica, como ocurre muy a menudo, las necesidades del usuario y laboratorio obligan a adaptar diferentes pasos. La optimización de un procedimiento de tanto interés universal no es de extrañar teniendo en cuenta la complejidad y número de sondas que posee este *microarray*, así como la falta de estudios de armonización de las diferentes variaciones de esta técnica, como se manifiesta en los trabajos realizados por Pearson *et al.* (2003), Champion *et al.* (2005) y Quiñones *et al.* (2008). Estas variaciones en nuestro caso han sido, en ocasiones, someras (modificaciones en las concentraciones de ciertos reactivos y cantidad de ADN) y en otros casos, han sido modificaciones más importantes (variación de temperatura, tiempo de hibridación, lavados y determinación del punto de corte).

En nuestra experiencia, uno de los pasos más críticos fue la determinación del punto de corte, valor que permite diferenciar entre tres categorías de genes: presentes, ausentes y divergentes. A pesar de ser un proceso muy referenciado (Taboada *et al.*, 2005; Pin *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2008; Carpaj *et al.*, 2009), la información sobre la metodología a seguir para establecer el punto de corte, no lo está de manera suficientemente detallada. Esto conlleva que diferenciar entre genes ausentes y divergentes sea una tarea no siempre abordable y que se opte muy a menudo por utilizar un punto de corte para definir únicamente

dos categorías de genes: presentes y ausentes/divergentes (Pearson *et al.*, 2003; Hannon *et al.*, 2008). En consonancia con esta tendencia, y como criterio general, en nuestro trabajo se optó por determinar y utilizar un único punto de corte y establecer las matrices de análisis de datos en función de la presencia y ausencia/divergencia de los genes en estudio. Dadas las características del *microarray* utilizado, cuyas sondas proceden de cepas diferentes, se establecieron dos valores para el punto de corte. Uno de ellos en función de la comparativa con la cepa mayoritaria (NCTC11168) y el otro de aplicación al resto de genes que constituían el *microarray*. Ambos valores están dentro del rango mayoritariamente usado por otros autores (Anjum *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2006; Quiñones *et al.*, 2008).

El segundo objetivo de este trabajo fue seleccionar una colección de cepas a fin de buscar genes vinculados a una situación concreta (marcadores genéticos). Para descartar que la presencia de estos genes, posibles marcadores, no estuviese relacionada con el origen clonal de las cepas se elaboró una colección de cepas genéticamente no relacionadas y de origen geográfico disperso (multigeográfico). En un principio, este objetivo se pensó abordar utilizando cuatro fuentes de aislamiento, humana, animal, alimentaria y ambiental. Sin embargo, debido a la dificultad de obtener cepas de estas cuatro fuentes de cada país, nos vimos obligados a centrar este criterio en dos tipos de fuente, humana y muestras de pollo.

La relación de clonalidad entre las cepas de *Campylobacter* se establece mediante técnicas de genotipificación. Partiendo de la idea de que no existe un único método universal para *Campylobacter* decidimos apoyarnos en más de una técnica (SVR-*flaA* y el MLST) para garantizar la exactitud de nuestros resultados.

El nivel de discriminación de la técnica SVR-*flaA* no fue suficiente para poner de manifiesto las diferencias clonales entre todas las cepas en estudio. Esta falta de discriminación se debe fundamentalmente a que esta región (SVR-*flaA*) está sometida a procesos de mutación y/o recombinación (Wang *et al.*, 1990; Alm *et al.*, 1991; Wassenaar *et al.*, 1993b; Alm *et al.*, 1993; Wassenaar *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1997; Wassenaar *et al.*,

2000ab; Wilson *et al.*, 2009). En cualquier caso, según nuestros resultados, la técnica SVR-*flaA* permitió una primera distribución por genotipos de la colección de cepas a estudio, resolviéndose otras diferencias gracias al análisis por MLST.

Adicionalmente, el análisis por SVR-*flaA* puso de manifiesto que podrían existir diferencias atribuibles al origen geográfico de las cepas. De los 27 alelos determinados por SVR-*flaA*, únicamente cuatro alelos fueron compartidos por cepas de diferentes países. En uno de los casos, alelo 32, las cepas pertenecían al mismo continente mientras que entre los otros tres casos (alelos 8, 36 y 320) el origen geográfico fue muy disperso. Las diferencias respecto del origen geográfico pueden estar condicionadas por el clima (Wassenaar *et al.*, 2009) o, por la propia diversidad genética de las cepas. A pesar de que existen pocos estudios que relacionen la variabilidad del gen *flaA* con respecto del origen geográfico de la cepa, la predominancia de determinados alelos en un país, ya había sido anteriormente referenciada (Wassenaar *et al.*, 2009).

Con el fin de matizar los resultados obtenidos por la técnica SVR-*flaA*, analizamos las cepas de manera complementaria por MLST. Aunque las dos técnicas poseen la misma base metodológica, el número de *loci* que se estudian con el MLST son 7 frente a un único *locus* que se estudia mediante SVR-*flaA*. El MLST fue capaz de tipificar con más detalle cepas que en un principio poseían un mismo alelo pero que finalmente no pertenecían al mismo complejo clonal. Esto indica que, pese a tener un mismo alelo para el gen *flaA*, el complejo clonal deja de manifiesto que no proceden de un mismo clon atendiendo a nuestro objetivo de encontrar similitudes o diferencias genéticas en cepas no relacionadas. Este es el caso de las cepas españolas en las que predominan los alelos 32 y 34 determinados por SVR-*flaA*, y que presentaron diferentes secuencias tipo por MLST. Gracias a la combinación de las técnicas SVR-*flaA* y MLST, en términos generales, observamos un nivel alto de heterogeneidad entre las 56 cepas en estudio.

Posteriormente, mediante el árbol filogenómico en función de la presencia o ausencia/divergencia de los genes representados en la cepa NCTC11168, se confirmó el

grado de dispersión genética teniendo en cuenta que no existía ninguna estructura clonal en función del origen geográfico o fuente de aislamiento. Todas las divisiones estaban establecidas con un alto grado de significación. Las agrupaciones obtenidas en nuestro árbol filogenómico, se podrían resumir en tres grandes clados que se subdividían en otros más pequeños que incluían cepas de diversos orígenes geográficos así como de diferentes fuentes y alelos del gen *flaA*. Aunque pudimos constatar algún pequeño clado en el cual las cepas, a pesar de compartir el mismo alelo del gen *flaA*, poseían diferentes orígenes geográficos, fuentes y complejos clonales. Por lo tanto, la colección elegida, aunque reducida en el número de cepas, nos permitió sostener los análisis posteriores con el fin de abordar nuestros objetivos.

Una vez optimizado el método y definida la colección de cepas en estudio, se abordó el tercero de los objetivos, es decir, analizar mediante CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays*. Este análisis nos proporcionó una gran cantidad de información. Inicialmente, se abordó a través del análisis de los árboles filogenéticos. Sin embargo, y como anteriormente ha sido mencionado, el primer árbol no nos proporcionó *clusters* que agruparan a las cepas bajo ninguno de los dos criterios utilizados: origen geográfico y fuente de aislamiento. Una primera impresión de estos resultados es que las cepas de origen humano y las de pollo presentan una alta similitud no pudiendo ser fácilmente diferenciables en función de la fuente. Además, el *microarray* también proporciona información adicional sobre genes no presentes en la cepa NCTC11168, los cuales también proporcionan variabilidad al genoma de *C. jejuni*. A la hora de analizar el árbol generado con todos los genes representados en el *microarray* (genoma universal), comprobamos una vez más que no se advierte ninguna asociación ni basada en la fuente de aislamiento ni en el origen geográfico.

Sin embargo, las cepas pertenecientes a un mismo complejo clonal quedaron claramente relacionadas en el mismo *cluster*. Esta asociación también quedó parcialmente de manifiesto en la comparativa realizada entre las cepas de España y Nueva Zelanda, donde se aprecia una asociación evidente entre las cepas españolas. La agrupación de las cepas

españolas, podría ser debida a que el origen geográfico concreto de todas estas cepas es el País Vasco, que comprende menor extensión que Nueva Zelanda, lo que proporcionaría una mayor probabilidad de interacción entre las cepas vascas.

2. Marcadores genéticos

Las estrategias para reducir la incidencia de *C. jejuni* en la cadena alimentaria están dificultadas por la falta de marcadores predictivos que resulten fiables. De hecho, es un objetivo que se han marcado muchos investigadores y aunque en algunos casos hayan propuesto algunos marcadores, éstos no han sido refrendados universalmente. En algunos casos, se ha llegado a vincular un marcador con la relación filogenómica, como es el caso de Champion *et al.* (2005) que propusieron, a partir de estudios filogenómicos comparativos de *C. jejuni*, un *cluster* de genes (*Cj1321-Cj1326*), localizados en el *locus* de glicosilación de la flagelina, como posible marcador de fuente de aislamiento entre cepas *livestock* y el gen *Cj1365c* que codifica una enzima serinoproteasa como marcador predictivo de patogenicidad.

Nuestros resultados no apoyan esta hipótesis. Por un lado, como ya hemos indicado, no encontramos ninguna asociación filogenómica basada en la fuente o en el origen geográfico y por otro, la prevalencia de estos genes no fue suficientemente discriminadora. El gen *Cj1365* fue detectado en el 74 % de las cepas de origen clínico, mientras que en las cepas de pollo resultó positivo en un 68 %. En cuanto a los genes *Cj1321-Cj1326*, fueron detectados en el 56 % de las cepas clínicas y en el 57 % de las cepas de pollo. La ausencia/divergencia del gen *Cj1365c* entre los aislamientos clínicos, puede ser interpretada como un diagnóstico etiológico incierto. La prevalencia del *cluster Cj1321-Cj1326* entre los aislamientos de pollo, fue más baja de lo esperado y, por lo tanto, pone en riesgo la propuesta de Champion *et al.* (2005) de considerar este *cluster* como posible marcador de fuente de aislamiento. A pesar de que la metodología utilizada no fuera la misma, nuestros resultados concuerdan con los descritos por Kärenlampi *et al.* (2007), que indican que este

cluster de genes no es un buen marcador genético de fuente de aislamiento. Además, estudios previos basados en la detección de estos genes por PCR (Fernández-Astorga *et al.*, 2007), confirmarían los obtenidos en este estudio y los obtenidos por Kärenlampi *et al.* (2007).

Kärenlampi *et al.* (2007) propusieron que las diferencias encontradas en el *cluster Cj1321-Cj1326* podían ser debidas al origen geográfico y no a la fuente de aislamiento, tal y como proponía Champion *et al.* (2005). Además, subrayaron la necesidad de confirmar esta hipótesis con resultados obtenidos por *microarrays* usando una variedad de cepas de *C. jejuni* de diversos orígenes geográficos. Nuestros resultados apoyarían la hipótesis formulada por Kärenlampi *et al.* (2007) sobre la influencia del origen geográfico de las cepas en los resultados. Así, el *cluster Cj1321-Cj1326* estaba ausente/divergente en casi la totalidad de las cepas no europeas mientras que estaba presente en más del 70 % de las cepas europeas.

En otros estudios la búsqueda de marcadores se ha realizado con independencia de las relaciones filogenéticas con un éxito variable. Tal es el caso del estudio realizado por González *et al.* (2008), quienes propusieron 4 genes como posibles marcadores genéticos de fuente de aislamiento. Entre sus conclusiones identificaron los genes *ggt* (γ -glutamiltanspeptidasa) y *dmsA* (subunidad A de la DMSO reductasa) como genes comunes entre las cepas humanas y de pollo, siendo muy poco comunes entre cepas bovinas. Por otro lado, propusieron los genes *Cj1585c* (oxidoreductasa) y *CJJ81176-1367/1371* (serinproteasa) como más habituales entre cepas bovinas que entre cepas humanas y pollo. Además, sugirieron que la diversidad metabólica era un factor muy importante en la adaptación al huésped.

Estos mismos autores proponen que tanto el gen *dmsA* como el gen *ggt* son importantes en la colonización de *C. jejuni* en humanos y pollo, ya que son genes que se observan en un porcentaje alto de cepas humanas y de pollo, a lo largo de los años. Sin embargo, entre nuestras cepas tanto humanas como de pollo el porcentaje de presencia (30 %) es mucho menor de lo esperado en comparación con los datos obtenidos por estos

autores (40-80 %). Esto puede ser debido, a que por un lado, este gen presenta un cierto grado de variabilidad que impide su detección o, por otro lado, estos genes no sean tan importantes en la capacidad de colonización de *C. jejuni*. Por lo tanto, los altos porcentajes obtenidos por González *et al.* (2009) estarían más relacionados con la región geográfica a la que pertenecen las cepas que con la capacidad de colonización. Además, es de destacar la ausencia de estos dos genes tanto en la cepa NCTC11168 de procedencia clínica, como en la cepa RM1221 de procedencia de pollo, apoyando la hipótesis de que este gen no tenga un papel importante en la colonización de *C. jejuni*.

Con respecto al gen *Cj1585c*, y volviendo a los resultados obtenidos por estos autores, fue detectado en bajos porcentajes, alrededor del 30 %, entre las cepas humanas y de pollo, mientras que entre nuestros resultados fueron de un 73 % y 60 %, respectivamente. Esta diferencia en los resultados, podría explicar las ramificadas cadenas de complejos de transporte de electrones que pueden ser capaces de utilizar múltiples donantes o aceptores de electrones (Weingarten *et al.*, 2008). De igual manera, nuestros datos sugieren una flexibilidad del sistema de oxidorreductasas.

Por último, el gen *CJJ81176-1367/1371* que codifica una serinproteasa putativa, correspondiente al gen *Cj1365c* propuesto por Champion *et al.* (2005), es detectado por González *et al.* (2009) en alrededor del 30 % de las cepas humanas y pollo. No obstante, en nuestras cepas su presencia osciló entre el 68 % y el 73 %, sugiriendo una vez más la importancia de este gen en la patogenicidad de *Campylobacter* tal y como propusieron Champion *et al.* (2005).

Nuestros resultados señalan al gen *neuA1* como un posible marcador, puesto que fue detectado en un 83 % de las cepas humanas y tan solo en un 50 % de las de pollo. Este gen codifica una proteína bifuncional de doble dominio denominada β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa/CMP-Neu5Ac sintasa. Esta proteína está relacionada con la biosíntesis de lipooligosacáridos (LOS) y concretamente con su sialización. También se le asigna una relación con la función nucleotidiltransferasa (N-acilneuraminato

citidililtransferasa). La sialización de los lipooligosacáridos se ha relacionado con el Síndrome de Guillain-Barre, por lo que parece razonable encontrar el gen *neuA1* en mayor medida entre cepas humanas. A pesar de carecer de datos clínicos de la mayoría de las cepas utilizadas, las dos cepas aisladas de pacientes con el Síndrome de Guillain-Barre (RM3147 y RM3193) poseían este gen. Nuestros datos destacan a este gen como un gen de gran potencial a estudio por PCR en un futuro.

Con el fin de determinar un marcador de origen geográfico se compararon, inicialmente, las cepas procedentes de los países con mayor número de aislamientos, es decir, Dinamarca, España, Nueva Zelanda y Reino Unido. En cada comparación por parejas, aparecieron genes claramente relacionados con un país, si bien, lo más destacable fueron los resultados obtenidos para Nueva Zelanda. Las cepas neozelandesas fueron las que exhibieron una mayor ausencia/divergencia de genes frente a las cepas de los otros tres países.

En la misma línea de comparaciones se agruparon las cepas de origen europeo y no europeo, encontrándose diferencias en 8 genes que resultaban ausentes/divergentes en casi la totalidad de las cepas no europeas. Dentro de estos genes, se encontraban los genes *Cj0617* y *Cj1297*, que codifican proteínas hipotéticas y el *cluster* de genes *Cj1321-Cj1326* mencionados anteriormente y descritos por Champion *et al.* (2005). Respecto a los genes *Cj0617* y *Cj1297* no podemos llegar a una conclusión ya que no disponemos de información sobre su función. Sin embargo, respecto al *cluster Cj1321-Cj1326*, tal y como hemos sugerido anteriormente, su presencia podría estar relacionada con el origen geográfico de la cepa.

La única relación filogenómica que encontramos fue la correspondiente a los complejos clonales. Esto podría ser indicativo de la existencia de marcadores específicos para cada complejo clonal concreto, o al menos para algunos de ellos. Esta búsqueda se abordó con los complejos clonales CC-45 y CC-21 ya que son los que estaban representados por mayor número de cepas. Nuestros resultados ponen de manifiesto una relación entre la presencia o ausencia/divergencia de un gen, o varios genes, y los complejos clonales CC-45

y CC-21. Dichos genes están relacionados con funciones muy dispares, incluyendo genes codificantes para proteínas relacionadas con la biosíntesis de los lipooligosacáridos (LOS), para ribonucleasas, para proteínas de membrana, para proteínas periplasmáticas y para peptidasas entre otros.

En cuanto a la búsqueda de relaciones entre complejos clonales o secuencias tipo y genes concretos cabe destacar que también ha sido anteriormente documentada (Taboada *et al.*, 2008). La relación entre genes concretos y un complejo clonal ha sido utilizada en otras ocasiones para relacionar los complejos clonales con una propiedad específica, como puede ser el tropismo por el huésped (Zautner *et al.*, 2011). Estos autores encontraron una clara conexión de ciertos genes metabólicos con los complejos clonales CC-21, CC-42, CC-45 y CC-257 entre otros. Aunque la fuente de sus cepas es más variada que la nuestra, al igual que en nuestra experiencia, también incluyeron cepas aisladas de humanos y pollos. Un análisis comparativo entre los resultados obtenidos por estos autores y los nuestros, proporcionó un perfil de presencia y ausencia/divergencia muy distinto. A modo de ejemplo, la presencia del gen *dtlp7* fue altamente relacionada por estos autores con el origen bovino de las cepas (60 %), encontrándose sólo en el 16 % del resto de las cepas. Sin embargo, y a pesar de que el tamaño de nuestra colección es notablemente más pequeño que el utilizado por estos autores, sorprende que este gen se detectara en todas nuestras cepas. Nuestros resultados indicarían que este gen no estaría relacionado con el origen bovino de las cepas como sugieren Zautner *et al.* (2011).

Otro estudio similar fue desarrollado por Hepworth *et al.* (2011), quienes relacionaban la presencia de los genes *Cj1321-Cj1325* con los complejos clonales CC-21 y CC-48 y la divergencia de dichos genes con los complejos clonales CC-42 y CC-257, entre otros. En general, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por estos autores excepto en que las dos cepas asignadas al CC-257 presentaron estos genes. Si bien esta diferencia puede ser debida al bajo número de cepas asignadas al CC-257.

3. Variabilidad genómica

Con respecto a los *microarrays* de ADN, como técnica utilizada para estudiar estos objetivos, cabe destacar que representan una alternativa tecnológica para comparar genomas completos, permitiendo conocer todos los genes presentes o ausentes en una cepa concreta, por comparación con el genoma de la cepa de referencia presente en el *microarray*. Las comparaciones de genomas completos identifican normalmente dos conjuntos de genes. Uno, los llamados *core genes*, que son compartidos por todas las cepas de una especie, y otro, los genes accesorios, que están presentes en una o más cepas de la especie y que a menudo resultan de la adquisición de nuevos genes (Dorrell *et al.*, 2005).

Mediante estudios comparativos con el genoma de la cepa NCTC11168, se ha determinado que aproximadamente el 84 % de los genes presentan un alto grado de conservación entre las cepas estudiadas (*core genes*), definiéndose éstos como especie específicos de *C. jejuni* (Dingle *et al.*, 2001; Suerbaum *et al.*, 2001; Doung *et al.*, 2009). Entre nuestras cepas, el 86 % de los genes presentaban un alto grado de conservación por lo que observamos que nuestros resultados son muy próximos a los valores determinados por otros autores.

Pearson *et al.* (2003) observaron que el número de genes variables (ausentes/divergentes) en *C. jejuni*, oscilaba entre el 2,6 % (40 genes) y el 10,2 % (163 genes) para cada una de las cepas analizadas, resultando un total de 269 genes variables (16,3 %). Estudios posteriores cifraron este porcentaje de genes variables entre el 21 % (Leonard *et al.*, 2003; Champion *et al.*, 2005) y el 36,6 % (Taboada *et al.* 2004). En nuestros resultados, el porcentaje de genes ausentes/divergentes pertenecientes a la cepa de *C. jejuni* NCTC11168, adquirió valores de hasta el 13,7 % (226 genes) para cada cepa. Lo que suponía un 30 % (504 genes) de genes variables totales. Esta variación en los resultados obtenidos podría deberse al número de cepas a estudio en cada uno de los trabajos mencionados. Ya que, obviamente cuantas más cepas estudiemos mayor variedad de

resultados podríamos obtener. Por otro lado, esta diferencia también podría ser consecuencia del número de sondas utilizadas en el *microarray*. Como es conocido, la mayor parte de los trabajos se realizan con *microarrays* basados exclusivamente en la cepa NCTC11168 si bien ya es sabido que ésta no representa el genoma universal de *C. jejuni*, ya que no estarían incluidos un gran número de genes identificados en diferentes cepas, tales como RM1221 y 81-176.

Un primer análisis de la variabilidad quedó patente en los resultados de los porcentajes obtenidos para cada cepa según la procedencia de las sondas dispuestas en el *microarray*. Al observar estos porcentajes podemos ver que aun siendo diferentes en el número de sondas representadas, la distribución de sus porcentajes de variabilidad es similar. Por otro lado, otra información importante derivada de este último análisis son las diferencias encontradas entre los diferentes países. Cabe destacar el caso de las cepas españolas, donde el porcentaje de hibridación fue notablemente alto frente a las sondas pertenecientes a la cepa RM1221, debido a su gran contenido en genes pertenecientes a islas genómicas que más adelante detallaremos. De igual manera, debemos subrayar la relación encontrada entre los porcentajes de hibridación y los complejos clonales. En este caso, las cepas pertenecientes al CC-45, mostraron un mayor porcentaje de hibridación con las sondas correspondientes a la cepa de *C. jejuni* 11828, mientras que las pertenecientes al CC-21 lo mostraron con respecto a la cepa NCTC11168.

Las zonas hipervariables son descritas como regiones más o menos extensas en el cromosoma que muestran un porcentaje de variación muy superior al resto del mismo. Estas zonas incluyen genes accesorios en su mayoría adquiridos probablemente por recombinación a lo largo de la evolución del cromosoma de *C. jejuni* (Alm *et al.*, 1999; Perna *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2003; Taboada *et al.*, 2004). De hecho, Pearson *et al.* (2003) describieron 7 grandes regiones de plasticidad hipervariables (PR) en el genoma de *C. jejuni*, y sugirieron que la disposición de los genes variables en regiones no es al azar y que su adquisición o pérdida ha ocurrido durante la evolución.

La cepa NCTC11168 posee un contenido G+C de 30,6 % en su genoma. Sin embargo, son de destacar las regiones donde existen diferencias, ya que ocurren en *loci* que son variables entre cepas. Por ejemplo, la cepa NCTC11168 posee un contenido G+C de 27,6 % en la región de la biosíntesis capsular, de 27,8 % en la región de la biosíntesis de LOS y de 34,3 % y 37,8 % en los genes de restricción y modificación *Cj1549* y *Cj1553*, respectivamente. Las diferencias en el contenido G+C en estas regiones indican que han podido ser adquiridas por intercambio genético horizontal e introducidas de manera relativamente reciente durante la evolución del genoma de *C. jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000; Dorrell *et al.*, 2001).

Las dificultades para comparar los resultados de estas regiones de plasticidad hipervariables derivan en las diferentes denominaciones que reciben en la literatura. A pesar de ello, y tomando como referencia las PR definidas por Pearson *et al.* (2003), es posible establecer algunas comparaciones entre nuestros resultados y los de otros autores.

En la región PR1 (*Cj0295-Cj0306c*), descrita también por Taboada *et al.* (2004) y Poly *et al.* (2004) (PZ2), encontramos genes que codifican el sistema de transporte del molibdeno (*modC Cj0300c*, *mobB Cj0301c* y *mobA Cj0303c*), genes de la biosíntesis del pantotenato (*panD Cj0296c*, *panC Cj0297c*, y *panB Cj0298c*), dos proteínas relacionadas con la biosíntesis de la biotina, una acetiltransferasa putativa, una betalactamasa putativa y una proteína hipotética.

El ácido pantoténico, en organismos superiores, es un precursor de la coenzima A (CoA) que aporta grupos acilo a diferentes vías metabólicas como las vías de oxidación de los ácidos grasos. En los microorganismos en cambio, el rol del ácido pantoténico no está bien estudiado ni descrito. Entre nuestros resultados, con respecto a los genes de la biosíntesis del pantotenato, pudimos observar su ausencia/divergencia en tres cepas de Reino Unido y en tres cepas de Nueva Zelanda. Sería precipitado sacar conclusiones de esta ausencia/divergencia encontrada, debido a que apenas existe información sobre el rol de esta biomolécula en microorganismos. Aun así, en un estudio anterior (Sambandamurthy *et al.*,

2002) se propuso una relación entre la ausencia del pantotenato en *Micobacterium tuberculosis* y su menor capacidad de infectar ratones.

Con respecto al molibdeno, en algunos microorganismos está relacionado con la reducción del nitrato por la nitrato reductasa. El uso del nitrato como aceptor terminal de electrones es importante para el crecimiento de *Campylobacter* en condiciones restrictivas de oxígeno (Sellars *et al.*, 2002). El gen *Cj0264c* (molibdeno oxidorreductasa) resultó ausente/divergente en diecinueve cepas, indicando la capacidad de *Campylobacter* de utilizar receptores de electrones alternativos para la respiración bajo condiciones altamente restrictivas de oxígeno. Es posible que la adquisición de algunos de estos genes sea una ventaja selectiva en nichos ecológicos específicos.

La región PR2 (*Cj0480-Cj0490*), definida también por Taboada *et al.* (2004) y nombrada como PZ3 por Poly *et al.* (2004), posee genes relacionados con la modificación y transporte de azúcares, y se encuentra flanqueada por genes truncados para una altronato hidrolasa putativa y un aldehído deshidrogenasa. Además el *locus* contiene genes que codifican una oxidorreductasa putativa, un transportador de azúcares y dos proteínas hipotéticas de función desconocida. Entre los resultados obtenidos en nuestra experiencia, la ausencia/divergencia se concentró entre las cepas no europeas y esto podría estar relacionado con alguna característica ecológica o medioambiental de los nichos ecológicos de las regiones mencionadas.

Por lo que refiere a la región PR3 (*Cj0727-Cj0741*) descrita también por Taboada *et al.* (2004), ésta contiene genes que codifican componentes de uno o más transportadores ABC y varias proteínas hipotéticas. En nuestros resultados, la ausencia/divergencia de los componentes de los transportadores ABC se detectó en cuatro cepas de Reino Unido y en una de Nueva Zelanda. Sin embargo, la ausencia/divergencia de las proteínas hipotéticas se encontró en dieciocho cepas.

La región PR4 (*Cj1135-Cj1145c*), descrita también por Dorrell *et al.* (2001), Taboada *et al.* (2004) y Poly *et al.* (2004) (PZ4), destaca por su papel fundamental en la biosíntesis y modificación de los lipooligosacáridos. Mediante secuenciación del genoma completo de la cepa de *C. jejuni* NCTC11168, se identificó el *cluster* de genes implicados en la biosíntesis de los LOS que se extiende desde el gen *Cj1131c* hasta *Cj1151c* (Linton *et al.*, 2000, 2002; Parkhill *et al.*, 2000). Aunque siendo más amplia, la mayor parte de estos genes están incluidos en la región PR4.

Ya es conocido que los LOS presentan en su estructura una zona relativamente conservada y una zona terminal que habitualmente varía entre cepas y pueden mimetizarse con los gangliósidos humanos en nervios periféricos (Moran y Penner, 1999). Este hecho ha sido relacionado con el síndrome de Guillain Barre (GBS) y Miller Fisher (van Koningsveld *et al.*, 2001; Willison *et al.*, 1999). Más concretamente, estas patologías del sistema nervioso periférico parten de la relación entre los LOS sializados de *C. jejuni* y su mimetismo con los gangliósidos de los nervios periféricos (Nachamkim *et al.*, 2002). Aunque en muy pocos casos la infección por *C. jejuni* derive en GBS se trata de una relación importante a estudio (Allos *et al.*, 1997).

Otros estudios con *microarrays* realizados sobre esta región, la identificaron como una de las zonas más variables dentro del genoma de *C. jejuni* (Dorrell *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2003). La sialización de los LOS se ha relacionado con genes (*Cj1141-Cj1143*, *neuB1*, *neuC1* y *neuA1*) que codifican una N-acetil neuramínico ácido sintasa, requerida para la biosíntesis del ácido siálico y con el gen *cst* que codifica la transferasa del ácido siálico; enzima encargada de sializar los LOS correspondientes (Gilbert *et al.*, 2001, 2002; Guerry *et al.*, 2002).

En la estructura genética del *locus* del lipooligosacárido, se encuentran además los genes *waaC*, *waaV*, *waaF*, *hldE* y *hldD* relacionados con procesos de biosíntesis de la secuencia interna del LOS. También se encuentra el gen *wlaN*, responsable de la adición del

residuo de galactosa terminal, al igual que los genes *Cj1136*, *Cj1138*, *Cj1139c* que codifican galactosiltransferasas putativas y el gen *Cj1135* que codifica una glicosiltransferasa putativa.

En cuanto a la región PR4, y como cabría esperar (Dorrell *et al.*, 2001), encontramos un alto porcentaje de presencia en los genes *waaC*, *waaV*, *waaF*, *hldE* y *hldD*, que flanquean dicha zona. Sin embargo, encontramos una alta ausencia/divergencia en la zona interna de esta región que incluye a los tres principales genes involucrados en los procesos de biosíntesis del ácido siálico (*neuABC*) y al gen involucrado en la transferencia del ácido siálico (*cst*). De hecho, solo en veinte cepas europeas estaban presentes los cuatro genes. La ausencia /divergencia encontrada en el resto de cepas y más concretamente en las cepas no europeas podría sugerir la importancia del origen geográfico a la hora de poseer un mecanismo u otro de sialización.

La región denominada PR5 (*Cj1296-Cj1342c*), también descrita por Dorrell *et al.* (2001) y Taboada *et al.* (2004), integra principalmente los genes relacionados con la biosíntesis de la flagelina (*flaA* y *flaB*), genes que codifican dos posibles proteínas flagelares (PseG y PseH) y otros que se relacionan con su modificación post-translacional (*pmtA*, *pmtB*, y *pseA*) (Thibault *et al.*, 2001).

Ya es de sobra conocido el papel crucial que adquiere la motilidad por flagelos en la colonización e invasión de las células del tracto gastrointestinal (Black *et al.*, 1988). Además, la flagelina es una proteína inmunodominante reconocida durante la infección y se ha sugerido como un antígeno inmunoprotector (Guerry *et al.*, 1991). Los filamentos flagelares de *Campylobacter* spp. están compuestos principalmente por flagelina FlaA y pequeñas trazas de flagelina FlaB. Los genes *flaAB* son transcritos independientemente, pero *flaA* es transcrito en niveles superiores que *flaB*. Análisis mutacionales de los genes *flaA* y *flaB* sugieren que FlaA es la proteína estructural principal del flagelo y FlaB es incorporada en menor cantidad por todo el filamento. Estos dos genes tienen una secuencia muy parecida (93 %) en la cepa NCTC11168.

En anteriores estudios han sido observadas glicosilaciones en al menos 13 serinas de la flagelina (Logan *et al.*, 1989). Estas glicosilaciones han sido relacionadas con un efecto inmunogénico (Power *et al.*, 1994). Involucrados en este proceso de glicosilación se han identificado varios genes (Guerry *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1999; Linton *et al.*, 2000), entre ellos los genes *ptmB* y *neuB3*, relacionados con la síntesis de Neu5Ac (ácido N-Acetilneuramínico), el ácido siálico predominante. Thibault *et al.* (2001) apuntaron la hipótesis de la conexión de Neu5Ac con las zonas glicosiladas de la flagelina.

Con respecto a los genes *neuB2* y *neuC2*, están involucrados tanto en la sialización de los LOS como en los procesos de sialización del flagelo (Linton *et al.*, 2000). Estos genes mostraron ausencia/divergencia en doce cepas. Por lo tanto, las variaciones en estos dos genes afectarían no solo a la estructura y función del flagelo sino también a la estructura y función de los LOS.

Con respecto a los genes *flaA* y *flaB*, como cabría esperar por su importancia en la colonización, encontramos una presencia generalizada en todas nuestras cepas. La variación se concentra en los genes *pmtA*, *pmtB*, y *pseA*. Además, dentro de esta misma región se localiza el *cluster* de genes *Cj1321-Cj1326*, propuesto por Champion *et al.* (2005) como posible marcador de fuente de aislamiento, que anteriormente ya ha sido descrito y discutido.

Esta región codifica además muchas proteínas hipotéticas, una proteína transportadora de acilos (*acpP2*, *acpP3*, *acpP4*) y una sintasa III beta-quetocil-acil transportadora (*fabH2*) que es esencial en la biosíntesis de ácidos grasos en *Streptomyces coelicolor* y *Lactobacillus plantarum* (Revill *et al.*, 2001; Kiatpapan *et al.*, 2001). El gen *fabH2* mostró ausencia/divergencia en cinco cepas. Sin embargo, *fabH2* es similar a *fabH* (*Cj0328c*) que se detectó en todas las cepas estudiadas. Es por ello que probablemente sea FabH la proteína esencial para la biosíntesis de los ácidos grasos y FabH2 sea alternativa y dispensable.

Continuando con la región PR6 (*Cj1415c-Cj1442*), también descrita por Dorrell *et al.* (2001), Taboada *et al.* (2004) y Poly *et al.* (2004) (PZ5), destacamos su importancia en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares (*Cj1413c-Cj1443c*). Esta región se encuentra flanqueada por genes del transporte de la cápsula similares a los encontrados en *Escherichia coli*, como por ejemplo *kpsS*, *kpsC* (*Cj1413c-Cj1414c*) y *kpsF*, *kpsD*, *kpsE*, *kpsT* y *kpsM* (*Cj1443c-Cj1448c*).

La cápsula y los polisacáridos que la componen, destacan por su importancia en la evasión de la respuesta inmune y virulencia de la bacteria. La estructura de estos polisacáridos les dota de un poder de mimetismo con los antígenos naturales de la célula huésped proporcionando a la bacteria una capacidad de evasión frente a mecanismos de defensa innatos, como la fagocitosis y otros mecanismos de la respuesta inmune del huésped (Karlyshev *et al.*, 2005).

Con respecto a la biosíntesis de la cápsula, adquieren un papel de vital importancia varios mecanismos de transporte de membrana, como las proteínas Kps, que se encargarán de translocar los polisacáridos hacia la cara externa de la membrana citoplasmática bacteriana. Considerando la región PR6 (*Cj1415-Cj1442*), los genes *kps* (*Cj1413c-Cj1415c* y *Cj1443c-Cj1448c*) se encuentran flanqueando al conjunto de genes encargados de la biosíntesis de los polisacáridos. Por lo general los genes *kps* son conservados y nuestros resultados avalan esta hipótesis.

El grado de variabilidad de esta región afecta a un gran número de cepas, encontrándose únicamente doce cepas humanas y cuatro de pollo que presentan todos los genes. Además, las cepas no europeas mostraron ausencia/divergencia casi en la totalidad de los genes, pudiendo estar esto relacionado con alguna característica ecológica o medioambiental de las regiones no europeas.

Por último, la región PR7 (*Cj1717-Cj1729*), descrita también por Taboada *et al.* (2004), contiene genes putativos de membrana, de proteínas periplásmicas, de proteínas

hipotéticas y algunos genes relacionados en la biosíntesis de la leucina. Además, contiene el gen *Cj1729c* que codifica una probable proteína del gancho del flagelo. Este prótido puede ser una proteína alternativa a la codificada por el gen *flgE* (*Cj0043*) que está presente en 57 cepas.

A modo de resumen del conjunto de los datos obtenidos, las siete regiones fueron detectadas con un alto grado de variabilidad, por lo que nuestros resultados coinciden con los propuestos por Pearson *et al.* (2003). Estas zonas comprenden más del 25 % de los genes detectados como variables respecto a la cepa NCTC11168. Además, PR4, PR5 y PR6 indican que la diversidad genómica está relacionada con la producción de estructuras de superficie y ésta puede jugar un papel importante a la hora de colonizar el intestino y/o eludir la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, las regiones PR2, PR3 y PR7 deberían ser más estudiadas, ya que poseen muchos genes con funciones todavía no descritas. En términos generales, el origen geográfico (europeo y no europeo) parece condicionar el contenido genético de estas regiones.

Por otro lado, Taboada *et al.* (2004) determinaron diecisiete regiones hipervariables entre las que se encontraban las regiones PR anteriormente descritas y además, *Cj0032-Cj0036*, *Cj0055c-Cj0059c*, *Cj0177-Cj0182*, *Cj0258-Cj0263*, *Cj0421-Cj0425*, *Cj0561c-Cj0571*, *Cj0625-Cj0629*, *Cj0967-Cj0975*, *Cj1543c-Cj1563c* y *Cj1677-Cj1679*. Debido a los resultados obtenidos profundizaremos más en dos de estas regiones propuestas por Taboada *et al.* (2004).

Una de estas dos regiones es la comprendida entre los genes *Cj0258-Cj0265*, también llamada PZ1 por Poly *et al.* (2004). Esta zona contiene ocho genes: un posible regulador, una dihidroorotasa (*pyrC*), una proteína metil aceptora de la señal transductora de quimiotaxis putativa, una molibdepterina oxidoreductasa, una proteína periplásmica de citocromo C putativa, una proteína transportadora de zinc, una metiltransferasa dependiente SAM putativa y una proteína hipotética. Entre las variaciones detectadas llama la atención la ausencia del gen *pyrC* en cinco de las cepas. Esto podría sugerir auxotrofia respecto a la

pirimidina. Sin embargo, estas cepas poseen un segundo gen *pyrC2* (dihidroorotasa) que podría sustituir la función del gen mencionado (Poly *et al.*, 2004). Por otro lado, los genes que codifican una proteína putativa periplásmica citocromo C de unión a grupos hemo (*Cj0625c*) y una molibdepterin oxidorreductasa (*Cj0624c*) dotan a *Campylobacter* de la capacidad de respirar bajo condiciones limitadas de oxígeno, utilizando nitrógeno o azufre como aceptores de electrones alternativos. La ausencia/divergencia de estos genes entre algunas cepas sugiere su incapacidad para utilizar estos aceptores de electrones (Poly *et al.*, 2004).

La otra región a mencionar comprende los genes *Cj1543c-Cj1563c*, y está relacionada con un sistema de restricción y modificación de tipo I. Estos genes proporcionan a la bacteria un mecanismo de protección frente a ADN ajeno (Murray *et al.*, 2000) por lo que la variación en esta zona puede estar relacionada con la mayor o menor capacidad de incorporar ADN ajeno. La elevada ausencia en estos sistemas facilitaría la incorporación de ADN ajeno, contribuyendo a la diversidad genética. En el caso de que fueran divergentes, podría significar que *C. jejuni*, siendo naturalmente transformable, haya desarrollado mecanismos múltiples para evitar la incorporación de ADN ajeno (Leonard *et al.*, 2003). *C. jejuni* llega a discriminar eficazmente entre el ADN replicado en cepas de *C. jejuni* y el replicado en otras especies, considerándolo como ajeno y eliminándolo con facilidad presumiblemente por los sistemas de restricción-modificación (Labigne-Roussel *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 2000). Además, a pesar de ser transformable naturalmente, en la práctica resulta complicado su transformación *in vitro* (Girbau *et al.*, 2007). La enzima responsable del sistema de tipo I es bifuncional y es un complejo con múltiples subunidades codificadas por los genes *hsdR*, *hsdM* y *hsdS*. Las subunidades HsdM y HsdS son suficientes para la actividad metiltransferasa, pero aún así se requiere de las tres subunidades para que ejerza la actividad endonucleasa (Miller *et al.*, 2005). Entre nuestros resultados, más del 64 % de las cepas mostraron ausencia/divergencia para estos tres genes, lo que nos lleva a pensar que deben funcionar otros mecanismos alternativos de restricción-modificación.

Otro aspecto que cobra interés es la variabilidad encontrada en genes relacionados por su función pero no adyacentes en el cromosoma. Entre estos, es de destacar los genes

Cj0031, *Cj0032*, *Cj0208*, *Cj0690*, *Cj0722c* y *Cj1051* relacionados con el sistema de restricción y modificación que describieron Dorrell *et al.* (2001).

Nuestros resultados fueron coincidentes con los obtenidos por Dorrell *et al.* (2001) ya que algunos de los genes relacionados con los sistemas de restricción y modificación de *C. jejuni* mostraron ausencia/divergencia entre nuestras cepas. La secuenciación de los genomas bacterianos como el de *E. coli*, también ha mostrado variabilidad en los sistemas de restricción y modificación (Perna *et al.*, 2001).

Con respecto a otros aspectos destacables de nuestros resultados, cabe subrayar dos zonas hipervariables (*Cj0814-Cj0819* y *Cj1158-Cj1160c*) no descritas hasta el momento y donde hemos podido observar una tasa acusada de ausencia/divergencia. Casi en su totalidad, estos genes codifican proteínas hipotéticas o putativas, por lo que sacar conclusiones sería precipitado. Sin embargo, y gracias a los recientes estudios realizados por Dorrell *et al.* (2011) pudimos comprobar que ambas regiones presentaban secuencias divergentes y/o deleciones en al menos dos cepas secuenciadas. Aun así, se dejan puertas abiertas a futuras interpretaciones a expensas de nuevos hallazgos sobre las funciones de dichos genes.

Otros genes individuales o pares de genes mostraron alta variabilidad (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538*, *Cj0617-Cj0618*). Estos genes, pertenecen en su mayoría a genes hipotéticos o putativos exceptuando *Cj0537-Cj0538*, que codifican las subunidades OorB y OorC de la 2-oxoglutarato sintasa. Se trata de una enzima perteneciente a la clase de las oxidoreductasas, relacionada tanto con el ciclo de Krebs como con la biosíntesis de ciertos aminoácidos. Además, Dorrell *et al.* (2011) describieron recientemente la región *Cj0617-Cj0618*, donde encontraron deleciones en un aislamiento procedente de pájaro.

La variabilidad genómica de *C. jejuni* se concentra principalmente en determinadas regiones del cromosoma, las ya definidas por otros autores y las dos nuevas regiones propuestas en este trabajo. Esta variabilidad se encuentra muy distribuida por todas las cepas

estudiadas por lo que confirmamos la gran diversidad del genoma de *C. jejuni*. Ahora bien, son las cepas no europeas las que presentan una mayor diversidad.

Otro punto de interés son los genes relacionados con la virulencia. Aunque no constituyen una región, sí forman una unidad funcional relacionada con la patogenicidad que contribuye a la variabilidad genómica. A pesar de la importancia de *C. jejuni* como patógeno, hoy en día los mecanismos de virulencia están todavía muy poco estudiados. Las propiedades específicas relacionadas con la adhesión, colonización, invasión y producción de toxinas parecen ser necesarias a la hora de producir infección (Konkel *et al.*, 2001). En nuestros resultados se seleccionaron *flaA*, *flaB*, *flaC*, *cadF*, *jlpA*, *racR*, *capA*, *tlyA*, *peb1a* y *dnaJ* como genes implicados en la adherencia y colonización; *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* como genes responsables de la producción de citotoxinas *virB11*, *ciaB*, *pldA* y *iamA* como genes responsables de la invasión y *wlaN* y *cgtB* como genes presuntamente relacionados con el síndrome de Guillain-Barre. El gen *ceuE*, que codifica una lipoproteína quelante del hierro, también fue seleccionado para este estudio.

Muchos de estos genes relacionados con la virulencia, realmente, y según nuestros resultados, no pueden ser genes accesorios sino que se tratan de genes *core*, ya que están presentes en todas las cepas. Tal es el caso de *cadF*, *ceuE*, *ciaB*, *dnaJ*, *flaA*, *flaB*, *flaC*, *iamA*, *jlpA*, *peb1a*, *pldA*, *racR*, *racS*. Además, esta observación coincidiría con los resultados obtenidos por otros autores (Dorrell *et al.*, 2001; Datta *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Talukder *et al.*, 2008; Flanagan *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2011), donde la mayoría de los genes estaban presentes en todas las cepas o mostraban una pequeña variación.

En el caso de que estos genes, que mostraron una alta prevalencia entre nuestras cepas, fueran responsables de la diferencia entre cepas virulentas y no-virulentas, se deberían buscar las diferencias, bien en las variaciones de secuencia del gen diferentes a las detectadas por nuestras sondas, o bien diferencias en el producto expresado. Pruebas de ello han sido proporcionadas por Duong y Konkel (2009) quienes afirmaron que la virulencia no se

puede predecir en base al genotipo, ya que la variación en la patogenicidad puede deberse a la expresión de ciertos genes a consecuencia de mutaciones, deleciones, inserciones y reordenamientos internos. Por lo tanto, la patogenicidad dependería de la variación en la secuencia de nucleótidos en dichos genes (como ocurre por ejemplo en *cdtABC*, *cadF*, *jlpA* y *peb1a*). Es por ello que deberían desarrollarse métodos específicos para detectar variaciones en la secuencia del gen que fueran responsables de la expresión. Estos autores también nombraron otros ejemplos en relación con los genes *cdt* (*Citolethal Distending Toxin*) y *cgtA* (β -1,4-*N*-acetylgalactosaminyl-transferase) en las cepas NCTC11168 y 81-176 respectivamente. También apuntaron las variaciones en factores sigma (RpoD, RpoN y FliA) que afectarían a la expresión de otros genes debido a cambios en la regulación de genes.

Con respecto al *cluster* integrado por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, diremos que están situados en tándem y que codifican la toxina CDT formada por tres subunidades de 30 KDa, 29 KDa y 21 KDa respectivamente (Pickett *et al.*, 1996). La toxina CDT actúa sobre diversas líneas celulares causando una distensión celular progresiva y posterior muerte de éstas (Jonhson y Lior, 1988; Bang *et al.*, 2001). En nuestros resultados obtuvimos una notable prevalencia de estos tres genes aunque no en la totalidad de las cepas. Esto coincide con resultados obtenidos por otros autores que demostraron la alta presencia de estos genes entre las cepas estudiadas (Bang *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2006; Ripabelli *et al.*, 2010). Sin embargo, en los genes que encontramos ausencia/divergencia, debido a que estos tres genes se encuentran muy conservados, cabe pensar que puedan deberse a su presencia como pseudogenes, que ya fueron descritos por Abuoun *et al.* (2005), Martínez *et al.* (2006) y Duong y Konkel (2009). Estos últimos autores describieron dos tipos de mutaciones en el *cluster* de los genes *cdt* que influían en la expresión de las proteínas codificadas por estos genes.

Por otro lado, y coincidiendo con estudios de otros autores (Datta *et al.*, 2003; Kordinas *et al.*, 2005; Asghar *et al.*, 2006; Talukder *et al.*, 2008) se observó una baja prevalencia, respecto al resto de genes relacionados con la virulencia *wlaN*, *cgtB*, *capA* y *virB11* entre los aislamientos de *C. jejuni*.

Con respecto a los genes *cgtB* (Gilbert *et al.*, 2000) y *wlaN* (Linton *et al.*, 2000) están involucrados en la biosíntesis de lipooligosacáridos (LOS) y el desencadenamiento del síndrome de Guillain-Barré mimetizándose con los gangliósidos humanos como anteriormente ha sido mencionado. En nuestros resultados, asumiendo que nuestro número de cepas no es tan amplio como el usado por otros autores y que, por lo tanto, los porcentajes de variación podrían estar sobrevalorados, destaca el 36 % de cepas que muestran presencia para el gen *wlaN*, frente a los 16 %, 17 % y 23 % que obtuvieron Kordinas *et al.* (2005), Feodoroff *et al.* (2010) y Gargiulo *et al.* (2011), respectivamente. Dada la importancia de este gen y su relación con Guillain-Barré, resulta preocupante el alto número de cepas que lo presentan en nuestra colección, tanto de origen humano como de pollo y, en cuanto al origen geográfico, especialmente las de origen europeo.

Por otro lado, el gen *cgtB* se detectó en un porcentaje menor (3 %) que el observado por Kordinas *et al.* (2005) y Oporto *et al.* (2011), 24,44 % y 21,3 % respectivamente. Estos resultados pueden ser debidos al origen disperso de nuestras cepas. También es de destacar que las dos cepas (3 %) que presentaron el *cgtB*, no presentaron el gen *wlaN*.

En cuanto a la proteína CapA, se trata de una proteína que posee función adhesiva y está codificada por los genes *Cj0628-Cj0629*. Su expresión depende de la presencia de ambos genes y de la pérdida de un codón de stop a consecuencia de la delección de una base en una zona homopolimérica, 5 pb de poly-T seguida de 10 pb de poly-G, situada entre los dos genes (Ashgar *et al.*, 2006). Ambos genes, coincidiendo con los estudios de Ashgar *et al.* (2006) y Flanagan *et al.* (2009), mostraron presencia en un 50 % de las cepas que resultaron ser europeas en su totalidad.

Otros elementos genómicos que contribuyen a la variabilidad son los genes presentes en los plásmidos pTet y pVir de la cepa 81-176. Con respecto al plásmido pTet y al gen característico de éste, el gen *tet0*, diremos que debe su nombre a que confiere resistencia a la tetraciclina. La proteína Tet0 pertenece al grupo de proteínas protectoras del ribosoma que confieren resistencia a tetraciclina mediante la metilación del ARN 30S (Connell

et al., 2003). En la mayor parte de las cepas, hasta ahora, el gen *tet0* estaba siempre asociado a un plásmido. Sin embargo, estudios más recientes han puesto de manifiesto la presencia de este gen en el cromosoma bacteriano (Dasti *et al.*, 2007). A pesar de que la secuenciación de la cepa NCTC11168 reveló que no contenía transposones, restos de fagos o elementos de secuencias de inserción y muy pocas secuencias repetitivas (Richardson y Park, 1997; Parkhill *et al.*, 2000), se vio que hasta en ausencia de homología, un ADN plasmídico heterólogo introducido en *Campylobacter* por transformación natural podría integrarse en el cromosoma al azar por recombinación ilegítima. Este hecho podría explicar la presencia del gen *tet0* en el cromosoma (Bossinger *et al.*, 1990; Friis *et al.*, 2006). Además, se ha detectado la presencia de otros elementos genéticos móviles, integrones, involucrados en la adquisición de genes de resistencia a antibióticos en *C. jejuni* (O'Halloran *et al.*, 2004).

Entre los plásmidos que proporcionan resistencia a la tetraciclina, los más estudiados en *Campylobacter* spp. son pTet y pCC31. Se han descritos dos posibles marcadores relacionados con la presencia de cada uno de ellos; el gen *cpp15* como marcador del plásmido pCC31 y el gen *cpp21* del pTet. Nuestro *microarray* no posee la sonda correspondiente al gen *cpp15*, pero sí la correspondiente al gen *cpp21*, hallado en seis de nuestras cepas. Esto indicaría la relación de estas cepas con el plásmido pTet.

Tal y como han observado otros autores (Hepworth *et al.*, 2011), los genes del plásmido pTet pueden ser detectados en mayor o menor medida en la cepa analizada. De hecho, en el estudio realizado por Hepworth *et al.* (2011) detectaron más del 75% de los genes que componen el plásmido pTet en un 5% de las cepas mientras que entre nuestros resultados estos valores se obtuvieron en un 11% de las cepas.

Continuando con el análisis de nuestros resultados, observamos que entre las quince cepas que mostraron presencia del gen *tet0*, seis cepas poseían los genes del origen de replicación (*cpp3*, *cpp4* y *repA*) con lo que podríamos pensar que se trataría bien del plásmido pTet bien del pCC31 o bien de alguno similar, ya que todos estos genes están presentes en ambos. Profundizando aun más en nuestros resultados, observamos que estas

seis cepas también poseían el gen *cmgB2*, necesario para la formación del pili. Esto último indicaría que la fuente del gen *tet0* podría ser plasmídica. En el resto de cepas que, aun poseyendo *cmgB2* no presentaban ninguno de los genes descritos, podría identificarse una fuente plasmídica diferente. Por otro lado, un 16 % de las cepas no contenían el gen *tet0*, pero si otros genes pertenecientes al plásmido pTet. Esto podría ser explicado mediante tres posibilidades; puede suceder que aun no poseyendo su gen característico la bacteria sí que posea dicho plásmido, o que el plásmido que posea sea otro diferente que comparta genes, o por otro lado, que en realidad el gen característico sea mosaico - como ya ha sido antes descrito en otras bacterias (van Hoek *et al.*, 2007) -, y no esté ausente, sino divergente. Estas situaciones, podrían ser posibles tanto con respecto al plásmido pTet como al plásmido pVir, que más tarde discutiremos.

Por otro lado, encontramos indicios que apoyarían la hipótesis de que la presencia del gen *tet0* no estaría directamente ligada a la presencia del plásmido y, por lo tanto, dicho gen podría adquirirse por alguna otra vía, ya que en cuatro de las cepas que contenían este gen no se detectó un alto número de genes pertenecientes al plásmido pTet. Concretamente observamos un caso (CH-001) en el que únicamente poseía el gen *tet0* y cuatro genes más que no estaban relacionados ni con el origen de replicación ni con la formación del pili. En este caso, podríamos apuntar a una posible localización cromosómica del gen *tet0*.

El caso más extremo lo observamos en la cepa CNET095 (Dinamarca), donde únicamente obtuvimos presencia del gen *tet0* y ningún otro gen relacionado con el plásmido pTet. Esto último apunta a una posible resistencia cromosómica como anteriormente ha sido mencionado.

Atendiendo al origen geográfico, en ninguna de las cepas no europeas (21 %) se detectó el gen *tet0*, aunque se encontró presencia de algunos genes plasmídicos. Mientras que el 35 % de las cepas europeas presentaba el gen *tet0*. Concretando aun más el 66 % de ellas era de origen español.

Estudios anteriores, detectaban el gen *tet0* en España en un 25 % (Gómez-Garcés *et al.*, 1995). Aun así, estos valores han ido incrementando considerablemente durante los últimos años. En el año 2007, en un estudio realizado por Alonso *et al.* constataron que la presencia del gen había aumentado a un 80%. Teniendo en cuenta que el uso de la tetraciclina como promotores del crecimiento en el pienso de animales se prohibió hace tiempo, se propone el uso terapéutico de la tetraciclina en el ámbito veterinario como posible causa del incremento de la resistencia a este antibiótico en *Campylobacter* spp.

Por lo que se refiere al plásmido pVir, ha sido implicado en la virulencia de *C. jejuni* (Bacon *et al.*, 2000). Aunque el gen más relevante de este plásmido sea *virB11*, también contiene genes homólogos de las proteínas Com y Vir, que están presumiblemente implicadas en la adsorción de ADN o en el transporte de proteínas mediante mecanismos de secreción de tipo IV. Más recientemente, Tracz *et al.* (2005) identificaron pVir en 17 de 104 (17 %) cepas clínicas de *C. jejuni* y encontraron que los aislamientos que contienen pVir, se asocian con la presencia de un plásmido de resistencia a la tetraciclina.

El gen *virB11* no fue detectado en ninguna de nuestras cepas mostrando ausencia/divergencia en todas ellas. Sin embargo, algunas cepas contenían algunos genes que pertenecen al plásmido pVir. Como ya hemos propuesto anteriormente para el plásmido pTet, podrían existir diferentes situaciones en las que se justificarían estos hechos. Además, por lo que refiere al plásmido completo, ninguna cepa hibridó con las sondas correspondientes al plásmido pVir. Estos resultados dejan de manifiesto el bajo número de cepas que contienen el plásmido pVir y coincide con los resultados obtenidos por otros autores donde la prevalencia de este plásmido es escasa (Schmidt-Ott *et al.*, 2005; Louwen *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2006; Talukder *et al.*, 2008; Hepworth *et al.*, 2011).

Por último, otros elementos que aportan variabilidad al genoma de *Campylobacter* son las llamadas islas genómicas o también denominadas CJIE. Concretamente, a la hora de estudiar estas islas, ha sido utilizado como criterio principal la presencia de integrasas o transposasas para definir estos elementos genómicos. Sin embargo, en muchos casos la

presencia de integrasas o transposasas definía islas, aun con un número bajo de genes, mientras que en otros casos, aun poseyendo un gran número de genes no se definía como una isla por no presentar una integrasa o transposasa. A estas islas se las denomina, según el NCBI, islas ancladas. Con independencia de si se considera isla o no, la presencia de genes de estas islas proporciona variabilidad al genoma, tal y como pudimos comparar tras nuestro análisis filogenómico.

Cabe destacar que otros autores como Quiñones *et al.*, (2008) y Hepworth *et al.* (2011) no detectaron en algunos casos la totalidad de los genes para cada isla. Lo mismo ocurrió entre nuestros resultados donde pocas veces obtuvimos cerca del 100% de los genes de cada isla.

Aun así, hemos podido comprobar una amplia distribución de las islas entre nuestras cepas. La presencia de estas islas o de genes relacionados con ellas está muy extendida entre las cepas de *C. jejuni*. Una evidencia de este fenómeno la tenemos en el hecho de que sólo hubo cuatro cepas de las 56 estudiadas que no poseían ningún gen para ninguna las cuatro islas. Resultados similares fueron obtenidos por Quiñones *et al.* (2008) a la hora de estudiar sus cepas.

Tal y como otros autores ya han destacado (Parker *et al.*, 2006; Quiñones *et al.*, 2008; Hepworth *et al.*, 2011), en nuestro estudio también, la isla más extendida entre las cepas resultó ser CJIE1.

La presencia de estas islas parece presentar una relación con el origen geográfico ya que encontramos mayor presencia entre las cepas europeas que entre las no europeas. Con respecto a las cepas europeas, de entre ellas debemos destacar las españolas ya que una de ellas es la única que presenta las cuatro islas. Además, prácticamente la totalidad de las cepas que poseen la isla CJIE4 son españolas. De igual manera, hemos de destacar las cepas del Reino Unido debido a que, aún no presentando ninguna cepa las cuatro islas, la gran mayoría de las cepas poseían alguna de ellas. Sin embargo, debemos subrayar el hecho

de que un alto porcentaje de las cepas de Dinamarca no presentaron evidencias de ninguna de las islas. Esto sumado al hecho de que no existan trabajos anteriores que relacionen cepas europeas y no europeas hace difícil establecer un análisis comparativo.

Por otro lado, a la hora de realizar el análisis filogenómico de las cuatro islas, la diversidad que encontramos dentro de cada una de ellas, permitió agrupar las cepas en un *cluster*. De hecho, las cepas que presentaban una isla concreta fueron agrupadas en un mismo *cluster* en todos los casos. A pesar de esta asociación y con respecto a la isla CJIE1, se pudieron percibir unas excepciones concretas (ERL04-1823, CH-096 y CPM-032) en las que se detectaba tan solo una de las dos transposasas de la isla CJIE1. Por ello, estas cepas no aparecían incluidas dentro del mismo cluster. Una posible explicación podría ser el bajo número de genes relacionados con dicha isla que poseían estas tres cepas aún poseyendo una de las dos transposasas. Algo parecido ocurrió al analizar la isla CJIE2 en la cepa BF08-0920156 y CJIE4 en las cepas CH-005 y CPM-129, que poseían la integrasa pero un bajo número de genes.

La categoría de islas ancladas fue determinada únicamente en el caso de la isla CJIE2, constituyendo igualmente un único *cluster* generalizado, con la excepción de la cepa 22, que debido al alto número de genes detectados fue incluida en el *cluster* de las cepas que poseían dicha isla.

Un análisis más detallado de la variabilidad de las islas, no solo requiere del número de genes presentes o ausentes/divergentes, sino también del tipo de genes a los que nos referimos. Ha sido muy referenciada la importancia de los profagos en relación a estas islas (Fouts *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2006). Entre otros motivos, debido a que se las considera una fuente de información sobre la incorporación de ADN exógeno en *C. jejuni*. Según estos mismos autores, las islas CJIE1, CJIE2 y CJIE4 procederían de fagos. Concretamente, CJIE1 procedería de un fago tipo Mu de *Campylobacter* y codificaría proteínas del propio bacteriófago. En el caso de CJIE2 y CJIE4 estarían compuestas por algunos genes que codificarían endonucleasas, metilasas o ciertos represores relacionados con fagos. Por

último, la isla CJIE3, podría proceder de un plásmido integrado, ya que su secuencia presenta alta similitud con la de un megaplásmido identificado en la cepa *C. coli* RM2228. Nuestros resultados avalarían dichos orígenes atendiendo a los porcentajes de cepas que mantienen algún gen inequívocamente identificado como de origen fágico o plasmídico, ya que en todos los casos obtenemos valores superiores al 66 %.

Profundizando en estos resultados, y tras analizar los porcentajes de cepas que conservan cada gen identificado como fágico o plasmídico en cada isla, concluimos que en términos generales y con respecto a CJIE1 y CJIE2, la pérdida de estos genes originarios de fagos no ha sido masiva, ya que exceptuando algunos genes puntuales, los porcentajes rondan el 50 %. De igual manera cabe destacar CJIE4, donde observamos un bajo porcentaje de mantenimiento de genes fágicos con lo que señalamos una pérdida más acusada. Por último, con respecto a CJIE3, observamos gran variación en dichos valores.

Otros genes de interés son las DNAsas que se encuentran en algunas islas. La especie *C. jejuni* se considera competente naturalmente para la captación de ADN y muestra una alta diversidad genética. Sin embargo, existen cepas no competentes naturalmente y varios linajes clonales relativamente estables. Gaasbeek *et al.* (2008), mediante análisis CGH utilizando *microarrays*, detectaron CJIE1 en mayor proporción entre las cepas no competentes naturalmente. Además, identificaron la presencia de un gen *dns* (*CJE0256*) dentro de esta isla que codifica una DNasa, por lo que la inhibición de la transformación natural en *C. jejuni* por actividad DNasa podría contribuir a la formación de líneas más estables en la población de *C. jejuni*. Un año más tarde, estos mismos autores, encontraron cepas no competentes naturalmente que carecían del gen *dns*. Sin embargo, poseían endonucleasas codificadas por *CJE0566* (CJIE2) y *CJE1441* (CJIE4) que inhibían la competencia natural.

Entre nuestras cepas, veinticinco fueron positivas para *CJE0256*, quince fueron positivas para *CJE0566* y once para *CJE1441*. Por lo que podemos sugerir que puede ser ventajosa la adquisición de islas genómicas que codifican nucleasas para la adaptación a

diferentes nichos ecológicos o para su supervivencia, ya que ayudaría en la resistencia a la infección por fagos y, por otro lado, la presencia de estas nucleasas colaboraría en la estabilidad genética.



Conclusiones

1. La genotipificación basada en el análisis mediante CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays*, resultó una técnica apta para poner de manifiesto la variabilidad genética entre cepas no clonales de *Campylobacter jejuni* procedentes de diferentes países muy alejados geográficamente.
2. Según el análisis CGH, las cepas de origen humano y pollo presentaron una alta similitud en cuanto a su contenido genético, no detectándose ningún marcador de fuente de aislamiento. La única relación filogenómica encontrada entre las cepas estudiadas se corresponde con los complejos clonales, encontrándose uno o varios genes claramente relacionados de manera exclusiva con un complejo clonal concreto. Este es el caso de los genes *C8J_0011- C8J_0014*, *Cj11828-0001 -0007* y *C8J_0009* relacionados con el complejo clonal 45 y los genes *Cj1135-Cj1145c*, *Cj1549c-Cj1553c* y *CJE1101* entre otros, relacionados con el complejo clonal 21.
3. La influencia geográfica se aprecia principalmente en la variabilidad genética global y/o en relación al porcentaje de hibridación según el origen de la sonda. Tal es el caso de las cepas neozelandesas o el conjunto de cepas de origen no europeo que mostraron los porcentajes más altos de ausencia de genes accesorios y el caso de las cepas españolas (País Vasco), entre las cepas de origen europeo, en las que se observa el mayor porcentaje de variabilidad genética en cuanto a genes plasmídicos (pTet) e islas genómicas (CJIE).
4. Se confirma la presencia y diversidad de las regiones de plasticidad hipervariables (PR) como base principal de la variabilidad genética en *C. jejuni*. Son de destacar no solo las regiones PR ya definidas por otros autores, sino también las dos nuevas regiones hipervariables identificadas en este estudio (*Cj0814-Cj0819* y *Cj1158-Cj1160c*), así como algunos genes dispersos detectados (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538* y *Cj0617-Cj0618*).

5. Los elementos genéticos CJIE (*C. jejuni Integrated Elements*), denominados islas genómicas, son igualmente responsables de gran parte de la variabilidad genética en *C. jejuni*. El contenido génico de estos elementos varía desde los que incluyen genes que codifican integrasas y transposasas, considerados islas genómicas propiamente, hasta los que sin incluir integrasas o transposasas contenían bien un alto porcentaje de genes, islas ancladas, o bien un bajo porcentaje de genes, islas *like*.
6. La alta prevalencia de genes plasmídicos o fágicos asociados a las islas genómicas apoya la hipótesis del origen plasmídico de la isla CJIE3 y del origen fágico de las islas CJIE1, CJIE2 y CJIE4. En estas últimas, el número de genes fágicos presentes varía según la isla, destacando CJIE4 como la isla con una pérdida más acusada de estos genes.
7. Considerando al conjunto de genes relacionados con la virulencia como una unidad funcional, es de destacar que no todos contribuyen por igual a la diversidad genética. Se confirma que una gran parte de ellos pertenecen a los genes *core*, por lo que las diferencias entre cepas virulentas y no virulentas deberían establecerse analizando la expresión de dichos genes mediante transcriptómica y proteómica.
8. Los dos plásmidos definidos en *C. jejuni*, pTet y pVir, también contribuyen a la variabilidad genética, pero en mucha menos proporción. Además, nuestros resultados avalan la posibilidad de que el gen *tet0*, responsable de la resistencia a tetraciclina, pudiera tener también una localización cromosómica.
9. La presencia de las islas genómicas (CJIE) en *C. jejuni* podría sugerir un papel biológico relacionado con la supervivencia. Tal es el caso de las islas que codifican nucleasas, ya que proporcionarían resistencia a la infección por fagos y además, colaborarían en la estabilidad genética evolutiva, al interferir negativamente en la competencia natural de *C. jejuni*, y por lo tanto, en su capacidad de adquirir ADN exógeno por transformación.

A horizontal decorative border at the bottom of the page. It features a central rectangular area with a light, textured background, possibly wood grain. This central area is flanked on both sides by dark, intricate silhouettes of various plants and flowers, including what appears to be a rose and some leafy branches. The word "Resumen" is centered within the light-colored area in a purple, serif font.

Resumen

Genomotipificación de *Campylobacter jejuni* mediante *microarrays* de ADN. Análisis de marcadores y diversidad genética

Campylobacter jejuni es una de las principales causas de diarrea bacteriana a nivel mundial y el antecedente más común en neuropatías periféricas como el síndrome Guillain Barré y Miller Fisher (Blaser *et al.*, 2000). A pesar de no multiplicarse en los alimentos o aguas, *Campylobacter* sí es capaz de dispersarse rápida y fácilmente sobre ellos, de tal forma que sólo unas pocas unidades sobre una pieza de pollo poco o insuficientemente cocinada pueden causar enfermedad (Altekruse *et al.*, 1999). El consumo de carne de ave contaminada y poco cocinada, agua no tratada e incluso el baño en aguas naturales han sido señalados como principales factores de riesgo en infecciones esporádicas adquiridas en el entorno doméstico (Schönberg-Norio *et al.*, 2004), con picos estacionales mayores en julio y agosto (Rautelin *et al.*, 2000).

Determinar las diferentes fuentes de infección de *Campylobacter* ha sido un objetivo largamente perseguido por Gobiernos, Instituciones y científicos en los últimos años. Como resultado de ello, se han desarrollado una vasta cantidad de sistemas de tipificación fenotípica y genotípica y un número importante de bases de datos. El rango de métodos moleculares utilizados para tipificación de *Campylobacter* es muy amplio e incluye la ribotipificación (Fayos *et al.*, 1992), la electroforesis en campo pulsado, PFGE, (Yan *et al.*, 1991); diversas técnicas basadas en la PCR, PCR-RFLP (Kokotovic & On, 1999; Wassenaar & Newell, 2000; Schouls *et al.*, 2003; Llovo *et al.*, 2003); o la secuenciación de genes, SVR del gen *flaA* (Meinersmann *et al.*, 1997) o genes *housekeeping*, MSLT (Sails *et al.*, 2003; Dingle *et al.*, 2005).

A pesar de todos los esfuerzos, las contribuciones realizadas no permiten determinar con exactitud las diferentes fuentes de infección, lo cual ha dificultado el establecimiento de

estrategias eficaces de control para reducir la presencia de *C. jejuni* en la cadena alimentaria. Ninguno de estos métodos permite analizar en profundidad la base genética de la variabilidad observada entre las cepas, puesto que la mayoría de estas técnicas sólo analizan una pequeña parte del genoma. Más recientemente, el interés se ha volcado en la utilización del genoma completo ya que la secuenciación del mismo ha permitido el desarrollo de *microarrays* que permiten estudiar multitud de genes, simultáneamente.

Debido a todo esto, la finalidad del trabajo fue determinar el grado de variabilidad (diversidad y/o posible plasticidad) genómica entre cepas de *Campylobacter jejuni* procedentes de diversas áreas geográficas y diferentes fuentes de aislamiento, al objeto de detectar posibles genes que pueda emplearse como marcadores genéticos. La base del análisis incluye una comparativa por CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays* de ADN que contienen el genoma universal de *C. jejuni*.

Para ello, nuestros objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Determinar las condiciones experimentales más adecuadas para la hibridación en el *microarray* de ADN, asegurando la reproducibilidad entre ensayos, minimizando la presencia de hibridaciones cruzadas y asegurando la discriminación entre las señales de fluorescencia para los genes presentes y los ausentes o divergentes.
2. Confeccionar una colección multigeográfica de cepas de *C. jejuni* que incluya aislamientos no clonales, según alelos de la región SVR (*Short Variable Region*) del gen *flaA*, aislados en muestras humanas y de pollo.
3. Analizar la colección de cepas seleccionadas mediante CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays* de ADN (genoma universal), con el fin de encontrar posibles marcadores predictivos.

4. Determinar el grado de variabilidad y estructura genética que presentan las cepas seleccionadas mediante métodos bayesianos de inferencia filogenética.

Una vez conseguidos los dos primeros objetivos, determinación de las condiciones experimentales más adecuadas para la hibridación y elaboración de una colección multigeográfica de cepas, se construyeron las matrices binarias que permitieron el análisis CGH y la discusión sobre el origen de la variabilidad del genoma y los posibles marcadores genéticos.

Los *microarrays* de ADN representan una alternativa tecnológica para comparar genomas completos, permitiendo conocer todos los genes presentes o ausentes en una cepa concreta por comparación con el genoma de la cepa de referencia presente en el *microarray*. Las comparaciones de genomas completos identifican normalmente dos conjuntos de genes. Uno, los llamados “*core genes*”, que son compartidos por todas las cepas de una especie, y otro, los genes accesorios que están presentes en una o más cepas de la especie y que a menudo resultan de la adquisición de nuevos genes (Dorrell *et al.*, 2005).

La observación inicial de variabilidad genética en *C. jejuni* (Dorrell *et al.*, 2001) ha sido ampliada en varios estudios con *microarrays* de ADN, los cuales sugieren que este microorganismo presenta altos niveles de diversidad genética y bajos niveles de plasticidad genética (Taboada *et al.*, 2004).

Mediante estudios comparativos con el genoma de la cepa NCTC11168, hemos determinado que aproximadamente el 86 % de los genes presentan un alto grado de conservación entre las cepas estudiadas, definiéndose éstos como especie específicos de *C. jejuni*. Los mayores porcentajes de genes ausentes/divergentes se localizaron en las regiones hipervariables descritas por otros autores (Dorrell *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2003; Taboada *et al.*, 2004; Poly *et al.*, 2004). Además, la presencia de cuatro islas genómicas descritas en la

cepa RM1221 y la posible adquisición de plásmidos contribuyeron también a la variabilidad genómica de nuestras cepas.

Por otro lado, tratamos de encontrar algún posible marcador genético vinculado tanto a un origen geográfico como a una fuente concreta. Anteriormente, Champion *et al.* (2005) propusieron, a partir de estudios filogenómicos comparativos, un cluster de genes (*Cj1321-Cj1326*) en *C. jejuni* como posible marcador de fuente de aislamiento. A pesar de las expectativas generadas esta hipótesis no se vió suficientemente contrastada ya que solo se encontraron en un 57 % de las cepas de pollo. Teniendo en cuenta todo ello y basándonos en la combinación de la tecnología de *microarrays* de ADN y los métodos bayesianos de inferencia filogenética, se intentó detectar posibles genes específicos de fuente de aislamiento, que posteriormente podrían ser fácilmente detectables mediante PCR. Aun y todo, no obtuvimos ningún marcador fiable entre los resultados obtenidos para nuestras cepas.

A partir de todo el trabajo realizado, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La genotipificación basada en el análisis mediante CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) utilizando *microarrays*, resultó una técnica apta para poner de manifiesto la variabilidad genética entre cepas no clonales de *Campylobacter jejuni* procedentes de diferentes países muy alejados geográficamente.
2. Según el análisis CGH, las cepas de origen humano y pollo presentaron una alta similitud en cuanto a su contenido genético, no detectándose ningún marcador de fuente de aislamiento. La única relación filogenómica encontrada entre las cepas estudiadas se corresponde con los complejos clonales, encontrándose uno o varios genes claramente relacionados de manera exclusiva con un complejo clonal concreto. Este es el caso de los genes *C8J_0011- C8J_0014*, *Cj11828-0001 -0007* y *C8J_0009* relacionados con el complejo clonal 45 y los genes *Cj1135-Cj1145c*, *Cj1549c-Cj1553c* y *CJE1101* entre otros, relacionados con el complejo clonal 21.

3. La influencia geográfica se aprecia principalmente en la variabilidad genética global y/o en relación al porcentaje de hibridación según el origen de la sonda. Tal es el caso de las cepas neozelandesas o el conjunto de cepas de origen no europeo que mostraron los porcentajes más altos de ausencia de genes accesorios y el caso de las cepas españolas (País Vasco), entre las cepas de origen europeo, en las que se observa el mayor porcentaje de variabilidad genética en cuanto a genes plasmídicos (pTet) e islas genómicas (CJIE).
4. Se confirma la presencia y diversidad de las regiones de plasticidad hipervariables (PR) como base principal de la variabilidad genética en *C. jejuni*. Son de destacar no solo las regiones PR ya definidas por otros autores, sino también las dos nuevas regiones hipervariables identificadas en este estudio (*Cj0814-Cj0819* y *Cj1158-Cj1160c*), así como algunos genes dispersos detectados (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538* y *Cj0617-Cj0618*).
5. Los elementos genéticos CJIE (*C. jejuni Integrated Elements*), denominados islas genómicas, son igualmente responsables de gran parte de la variabilidad genética en *C. jejuni*. El contenido génico de estos elementos varía desde los que incluyen genes que codifican integrasas y transposasas, considerados islas genómicas propiamente, hasta los que sin incluir integrasas o transposasas contenían bien un alto porcentaje de genes, islas ancladas, o bien un bajo porcentaje de genes, islas *like*.
6. La alta prevalencia de genes plasmídicos o fágicos asociados a las islas genómicas apoya la hipótesis del origen plasmídico de la isla CJIE3 y del origen fágico de las islas CJIE1, CJIE2 y CJIE4. En estas últimas, el número de genes fágicos presentes varía según la isla, destacando CJIE4 como la isla con una pérdida más acusada de estos genes.

7. Considerando al conjunto de genes relacionados con la virulencia como una unidad funcional, es de destacar que no todos contribuyen por igual a la diversidad genética. Se confirma que una gran parte de ellos pertenecen a los genes *core*, por lo que las diferencias entre cepas virulentas y no virulentas deberían establecerse analizando la expresión de dichos genes mediante transcriptómica y proteómica.
8. Los dos plásmidos definidos en *C. jejuni*, pTet y pVir, también contribuyen a la variabilidad genética, pero en mucha menos proporción. Además, nuestros resultados avalan la posibilidad de que el gen *tet0*, responsable de la resistencia a tetraciclina, pudiera tener también una localización cromosómica.
9. La presencia de las islas genómicas (CJIE) en *C. jejuni* podría sugerir un papel biológico relacionado con la supervivencia. Tal es el caso de las islas que codifican nucleasas, ya que proporcionarían resistencia a la infección por fagos y además, colaborarían en la estabilidad genética evolutiva, al interferir negativamente en la competencia natural de *C. jejuni*, y por lo tanto, en su capacidad de adquirir ADN exógeno por transformación.



DOKTOREGO-TESIA

*Campylobacter jejuni*ren genomotipifikazioa DNA *microarray*en bidez.

Markatzaileen eta dibertsitate genetikoaren analisia

Andrea Guridi Cortaberria

Vitoria-Gasteiz, 2011

A horizontal banner at the bottom of the page. The background is a map of the Basque region, with the word 'Eztabaida' written in blue text in the center. The banner is flanked by dark, silhouetted images of trees or branches.

Eztabaida

1. Analisi genomikoa

*C. jejuni*ren genoma *microarray* bakar baten bidez aztertzea ez da nolanhiko lana. Izan ere, momenturarte oso lan gutxitan egin da. Teknika honek suposatzen duen konplexutasunaz gain, azpimarratzekoa da gene (kromosomiko eta plasmidiko) kopuru ahalik eta handiena detektatzeko beharrezkoa den zunda kopuru altua. Teknikaren doitzeak erronka handia suposatzen du, dituen puntu kritikoak eta ikasitako gene kopuru altua dela eta. Horregatik, hibridazio baldintzen optimizazioa eta ondorengo datuen analisia, NCTC11168 eta RM1221 erreferentzia anduietan oinarrituta, gure lehenengo erronka bihurtu zen.

Teknika honentzako protokolo jeneral bat existitzen den arren, maiz gertatzen den legez, laborategiaren eta erabiltzailearen beharrezanek protokolo honen pauso batzuk moldatzera bultzatzen dute. Horrenbesteko garrantzi unibertsala duen prozedura bat optimizatu beharra ez da harrizkekoa, konplexutasuna eta suposatzen duen zunda kopurua dela eta. Halaber, teknika orokorraren inguruko eredu berri guztiak bateratuko dituen ikasketen faltak zailago egiten du lan hau Champion *et al.* (2005), Quiñones *et al.* (2008) eta Pearson *et al.* -en (2003) ikasketek adierazten duten moduan. Geure kasuan, moldaketa hauek era desberdinekoak izan ziren. Alde batetik, batzuk azalekoak izan ziren, hala nola, erreaktiboaren kontzentrazioen eta DNA kopuruan aldaketa batzuk, eta beste aldetik, garrantzi handiagoko aldaketa batzuk, tenperaturan eta hibridazio denboran, garbiketa prozesuan eta ebaketa puntuen ezartzean egindako aldaketak kasu.

Gure ikasketan ebaketa puntuen definizioa izan zen punturik kritikoena. Balore hauek hiru kategoria desberdinen artean bereizten lagunduko digute: genearen presentzia, absentsia eta dibergentsia. Gai oso erreferentziatu bat izan arren (Taboada *et al.*, 2005; Pin *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2008; Carpaj *et al.*, 2009), ebaketa puntu hauek lortzeko jarraitu behar den metodologia ez dago behar bezain sakondua. Hau dela eta geneen absentsia eta dibergentziaren artean desberdintzea ez da lan makala eta ondorioz ebaketa puntu bakar bat erabiltzera bultzatzen gaitu, genearen presentzia eta absentsia/dibergentziaren artean

desberdinduz (Pearson *et al.*, 2003; Hannon *et al.*, 2008). Joera honekin bat eginez eta irizpide orokor modura, gure lanean ebaketa puntu bakarra erabiltzea eta, ikasitako geneentzako, lortutako presentzia eta absentsia/dibergentziaren arabeko datuen analisirako matrizeak eraikitzea erabaki genuen. Erabilitako *microarray*aren ezaugarriak direla eta, zeinaren zundak andui desberdinetatik eratorriak diren, bi balio definitu ziren ebaketa puntua aztertzeko; bata anduia ugarienarekiko (NCTC11168) alderaketa aztertzeko eta bestea *microarraya* eratzen duten gainontzeko geneengan aplikatzeko. Bi balore hauek gainontzeko ikerlariak euren ikasketetan ugarien erabilitakoen tartekoak dira (Anjum *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2006; Quiñones *et al.*, 2008).

Lan honen bigarren erronka, egoera konkretu bati lotutako geneak (markatzaile genetikoak) bilatzeko helburuarekin, anduia bilduma bat aukeratzea izan zen. Gene hauen presentzia, markatzaile posibleak, anduien jatorri klonalarekin erlazionatuta ez egotea baztertzeko, genetikoki erlazorik gabeko eta jatorri geografiko anitzeko (multigeografiko) bilduma bat eraiki zen. Hasieran, helburu hau bideratzeko lau iturri desberdin erabiltzea pentsatu zen; giza, animalia, elikagai eta ingurugiro iturriak. Hala baina, herri bakoitzeko lau iturri hauetatiko laginak lortzea suposatuko zuen zailtasuna zela eta, bi iturritara mugatzea erabaki genuen; giza eta oilasko iturriak.

Campylobacteren anduien arteko erlazio klonala definitzeko genotipifikazio teknikak erabiltzen dira. Genotipifikaziorako sistema bateratu bakar bat existitzen ez dela kontutan hartuz, gure emaitzen esangarritasuna bermatzeko asmoarekin teknika bat baino gehiagotan oinarrituko ginela erabaki genuen (SVR-*flaA* eta MLST).

Itxaron zitekeenez, SVR-*flaA* teknikaren bereizmen maila ez zen aztertutako anduien arteko desberdintasun klonalak agertarazteko adinakoa, gune hau mutazio eta/edo birkonbinazio prozesuen menpean baitago (Wang *et al.*, 1990; Alm *et al.*, 1991; Wassenaar *et al.*, 1993b; Alm *et al.*, 1993; Wassenaar *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1997; Wassenaar *et al.*, 2000ab; Wilson *et al.*, 2009). Edozein kasutan, gure emaitzen arabera, SVR-*flaA* teknikak genotipoetan oinarritutako aurre sailkapen bat lortzea bideratu zuen, beste desberdintasun

batzuk MLST bidezko analisiaren bitartez argituko zirelarik. Edozein kasutan, gure emaitzetan ikus dezakegunez, SVR-*flaA* teknikak ikasitako anduien genotipoa oinarritutako aurre-distribuzio bat ahalbidetu zuen, gainontzeko desberdintasunak MLST teknikak ebatzi bazituen ere.

Ondorio gehigarri modura, SVR-*flaA* teknikak jatorri geografikoari lotutako desberdintasunak existitu daitezkeela aditzera eman zuen. SVR-*flaA* teknikaren bidez determinatutako 27 aleloetatik soilik 4 alelo konpartitzen ziren herri desberdinetako anduien artean. 32. aleloaren kasuan, kontinente bereko anduiak izan ziren. Bitartean, beste hiru aleloentzako (8, 36 eta 320) jatorri geografiko oso sakabanatua izan zen. Jatorri geografikoarekiko desberdintasunak, klimarekin (Wassenaar *et al.*, 2009) edota anduien dibertsitatearekin lotuta egon daiteke. *flaA* genearen aldakortasuna jatorri geografikoarekin erlazionatzen duten ikasketa gutxi existitu arren, herri berebean aurkitutako alelo baten errepikapena erreferentziatua zegoen aurrenetik ere (Wassenaar *et al.*, 2009).

SVR-*flaA* teknikak eskainitako emaitzetan gehiago sakontzeko asmoarekin, era osagarri moduan MLST teknika erabili genuen. Bi teknikak oinarri metodologiko bera izan arren, MLST teknikak 7 *loci* aztertzen ditu, SVR-*flaA* teknikak aztertzen duen *loci* bakarraren aurrean. MLST-k, hasiera batean alelo berbera zuten anduiak sakonago tipifikatzeko gai izan zen eta, azkenik konplexu klonal berekoak ez zirela adierazi zuen. Honi esker ikus dezakegu *flaA* genearekiko alelo bera izan arren, bai sekuentzia tipoak bai konplexu klonalak adierazten zuten legez, ez dutela klon berean euren jatorria. Kasu hau andui espainiarrena da, non 32 eta 34 aleloak gailentzen diren SVR-*flaA* teknikaren bidez identifikatuz eta sekuentzia tipo desberdinak aurkeztu zituztenak MLST bidez. SVR-*flaA* eta MLST teknikari esker, orokorrean, heterogenitate maila altua ikusi ahal izan genuen ikasitako 56 anduien artean.

Geroago, NCTC11168 anduiaren geneen presentzia edo absentzia/dibergentzia oinarritutako zuhaitz filogenomikoaren bidez, sakabanatze genetikoa baieztatu zen, jatorri geografikoan edo iturrian oinarritutako estruktura genetikorik existitzen ez zela kontutan hartuz. Banaketa guztiak esangarritasun maila altuarekin definituak zeuden. Gure zuhaitz

filogenetikoan lortutako taldekatzeak hiru klado handitan laburtu daitezke, zeintzuk beste talde txikiagotan azpibanatzen ziren, zeinetan bai jatorri geografiko sakabanatuetako bai iturri eta *flaA* genearen alelo desberdineko anduiak batzen ziren. Klado txiki batzuetan alelo bera konpartitzen zela ikusi genuen arren, talde horretako anduiak jatorri geografiko, iturri eta konplexu klonal desberdinekoak ziren. Beraz, aukeratutako bilduma, anduien kopuruan txikia zen arren, gure analisiak ahalbidetu zituen ezarritako helburuei heltzeko asmoarekin.

Behin metodoa eta anduia bilduma aukeratuak izan ziren, hirugarren helburuari ekin genion, hau da, CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) bidez *microarray*ak erabiliz gure bilduma aztertzea. Analisi honek informazio ugari eskaini zigun. Hasiera batean, zuhaitz filogenomikoen analisiaren bidez bideratu zen. Hala ere, eta lehenago aipatu den bezala, lehenengo zuhaitzak ez zigun proposatutako irizpideetan oinarritutako (jatorri geografikoa eta iturria) inolako kladorik eskaini. Eraitza hauen aurre-inpresio batek, edozein herritan, bai giza iturriko bai oilasko iturriko anduien arteko antza handi dela adierazten digu, eta beraz, saila izango dela hauek desberdintzea. Hala ere, *microarray*aren teknikak informazio gehigarriaz hornitu gintuen NCTC11168 anduiak ez dituen gene konkritu batzuei buruz, zeintzuek aldakortasuna ematen dioten *C. jejuni*ren genomari. *Microarray*an zeuden gene guzti hauekin (genoma unibertsala) eraikitako zuhaitza aztertzean, berriro ere ikusten dugu ez dela inolako bereizketarik agertzen, ez iturrian ezta jatorri geografikoan ere oinarritutakoa.

Hala ere, konplexu klonal berari zegozkion anduiak *cluster* berean bateratuak agertu ziren. Espainia eta Zeelanda Berriko anduien artean egindako azterketan ere argi ikusi zen erlazio hau, non taldekatze nabarmen bat sumatzen zen anduia espainiarren artean. Taldekatze hau anduia espainiar guztiak Euskal Herrikoak direlako izan daiteke, alegia geografikoki azalera askoz txikiagokoak dira Zeelanda Berriarekin alderatuz, beraz interakzio aukera gehiago daude Euskal Herriko anduien artean.

2. Markatzaile genetikoak

Markatzaile igarle fidagarriak ez existitzeak *C. jejuni* elika-katean duen intzidentzia murrizteko estrategien bilatzea zailtzen du. Izan ere, ikerlari askok proposatutako helburuetariko bat da eta, batzuk markatzaile posible batzuk proposatu dituzten arren, ez dira unibertsalki berretsi. Kasu batzuetan markatzaile konkretu bat erlazio filogenomikoarekin lotu izan da, Champion *et al.* –ek (2005) egin zuten kasu. *C. jejuni*ren ikasketa filogenomikoetan oinarrituz, geneen *cluster* bat (*Cj1321-Cj1326*) proposatu zuten, flagelinaren glikosilazioaren *locusean* kokatzen zena, *livestock*eko anduien artean bakartze iturriaren markatzaile posible gisa. Era berean, *Cj1365* genea, entzima serinproteasa bat kodifikatzen duena, patogenotasunaren markatzaile igorletzat proposatu zen.

Gure emaitzek ez dute hipotesi hau berretzen. Alde batetik, esan dugun moduan, ez genuen aurkitu inolako erlaziorik iturrian edota jatorri geografikoan oinarritua eta beste alde batetik, gene hauen prebalentzia ez zen bereizmenak egiteko adinakoa. *Cj1365* genea jatorri klinikoko anduien % 74-an detektatu zen, oilasko jatorria zutenen % 68-an izan zen bitartean. *Cj1321-Cj1326* geneen kasuan, % 56-ko detekzioa jatorri klinikoko anduien artean eta % 57-koa oilasko jatorrikoen artean izan zen. Andui klinikoen artean *Cj1365c* genearen absentsia/dibergentzia diagnostiko etiologiko akastun baten ondorio izan daiteke. Oilasko anduien arteko *Cj1321-Cj1326 cluster*aren prebalentzia esperotakoa baino askoz baxuagoa izan zen, honek Champion *et al.* –ek (2005) proposatutakoa – *cluster* honen erlazioa bakartze iturriarekin - arriskuan jartzen du. Erabilitako metodologia berdina izan ez arren, gure emaitzak eta Kärenlampi *et al.* -ek (2007) proposatutakoak antzekoak izan ziren, geneen *cluster* hau ez dela bakartze iturriarentzako markatzaile egokia. Gainera, PCR bidezko gene hauen detekzioarako aurretiko ikasketek (Fernández-Astorga *et al.*, 2007) gure emaitzen lortutakoa eta baita Kärenlampi *et al.* (2007) lortutakoa berretsiko luke.

Kärenlampi *et al.* –ek (2007), *Cj1321-Cj1326 cluster*ean topatutako desberdintasunak jatorri geografikoaren ondorio izan zitezkeela proposatu zuten eta ez bakartzearen

iturriarenak, Champion *et al.* –ek (2005) proposatu zuten modura. Gainera, hipotesi hau *microarray*en bidez lortutako datuekin berresteko beharra azpimarratu zuten, jatorri geografiko desberdinetako *C. jejuni*ren anduiak erabiliz. Gure emaitzek Kärelampi *et al.* -en (2007) hipotesia baieztatuko lukete, anduien jatorri geografikoak emaitzengan duen eraginari buruz. Horrela, *Cj1321-Cj1326 cluster*a absente/dibergente agertu zen ia anduia ez europar guztietan eta presente anduia europarren % 70 –ean.

Beste ikerketa batzuetan, markatzaileen bilaketa erlazio filogenetikoekiko independenteki aztertua izan da, arrakasta maila aldakorrarekin. Kasu, González *et al.* –ena (2008), 4 gene proposatu zituztenak bakartze iturriaren markatzaile posible gisa. Beraien ondorioen artean *ggt* (γ -glutamyltranspeptidasa) eta *dmsA* (DMSO erreduktasaren A azpi-unitatea) giza eta oilasko anduien artean, behietatiko iturria zuten anduien artean baino maizago agertzen zirela esan zuten. Bestalde, *Cj1585c* (oxidoerreduktasa) eta *CJJ81176-1367/1371* (serinproteasa) geneak maizago identifikatu zituzten behi jatorria zuten anduien artean giza eta oilasko iturria zutenen artean baino. Gainera, dibertsifikazio metabolikoa, ostalariari moldatzeko faktore garrantzitsutzat proposatu zuten.

Autore hauek *dmsA* eta *ggt* geneak proposatu zituzten *C. jejuni*ren gizaki eta oilaskoetan kolonizaziorako faktore garrantzitsutzat, giza eta oilasko anduietan, urteetan zehar portzentai altuan topatu izan diren geneak baitira. Hala ere, gure giza eta oilasko anduien artean lortutako portzentaiak (% 30) itxarondakoa eta autore hauek lortu zutena (% 40-80) baino baxuagoak izan ziren. Hau, alde batetik gene honek nolabaiteko aldakortasun maila izan dezakeenaren ondorio izan daiteke, eta ondorioz detektatzeko zailtasun handiagoa aurkeztea. Beste alde batetik, gerta daiteke benetan, gene hauek *C. jejuni*ren kolonizazio ahalmenarako horren garrantzitsuak ez izatea. Beraz, González *et al.* –ek (2009) lortutako baloreak, anduien jatorri geografikoarekin erlazionatuagoak egongo lirateke kolonizazio ahalmenarekin baino. Gainera, azpimarratzekoa da gene hauen absentsia bai NCTC11168 anduian, jatorri klinikokoa eta baita RM1221 anduian, oilasko jatorrikoa. Azken honek ere, gene hauen papera *C. jejuni*ren kolonizazioan horren garrantzitsua ez dela berretsiko luke.

Cj1585c geneari dagokionez, eta autore hauen emaitzetara bueltatuz, portzentai baxuetan detektatua izan zen (% 30) giza eta oilasko anduien artean, gure kasuan % 73 eta % 60 -an, hurrenez hurren, detektatuak izan ziren bitartean. Lortutako datuen arteko alde honen gakoa bakterio hauek eduki ditzaketen elektroio garraio kate adarkatu eta aldakorretan (Weingarten *et al.*, 2008) eta baita ere izan ditzaketen elektroio emaile eta hartzaile anitzetan egon daiteke. Era berean gure datuek oxidoerreduktasek izan dezaketen aldakortasun maila berresten dute.

Azkenik, ustezko serinproteasa bat kodetzen duen *CJJ81176-1367/1371* genea, Champion *et al.* -ek (2005) proposatutako *Cj1365c* geneari dagokiona, giza eta oilasko anduien artean % 30-aren inguruan detektatua izan zen González *et al.* -en (2009) taldearengatik. Ordea, gure kasuan % 68 eta % 73-aren artean egon zen, berriro ere bere garrantzia *Campylobacteren* patogenotasunean proposarazten, Champi3n *et al.* -ek (2005) egin zuten legez.

Gure emaitzek *neuA1* genea proposatu zuten markatzaile posible giza, giza anduien % 83 -an topatu baitzen eta soilik oilasko anduien % 50 -ean. Gene honek, β -1,4-N-azetilgalaktosaminiltransferasa/CMP-Neu5Ac sintasa izeneko eta, domeinu eta funtzio bikoitzeko proteina bat kodetzen du. Proteina hau lipooligosakaridoen (LOS) eta konkretuki beraien sializazioarekin erlazionatua dago. Nukleotidiltransferasa (N-azilneuraminato zitidiltransferasa) funtzioarekin ere, erlazionatua izan da. Lipooligosakaridoen sializazioa Guillain-Barre sindromearekin parekatu izan da. Hori dela eta azaldu daiteke *neuA1* genea giza anduien artean topatzea portzentai altuagoan. Erabilitako anduia gehienen datu klinikorik izan ez arren, Guillain-Barre sindromea zuten bi gaixoengandik lortutako bi anduiek (RM3147 eta RM3193) gene hau aurkeztu zuten. Gure datuek gene hau azpimarratzen dute etorkizuneko PCR bidezko beste ikerketa berrien helburu giza.

Jatorri geografikoarekin erlazionatutako markatzaile posible bat topatzeko helburuarekin, hasiera batetik, bakartze kopuru gehien zituzten herrietatik eratorritako anduiak alderatu genituen, hau da, Danimarka, Espainia, Zeelanda Berria eta Erresuma Batua.

Bikoteka egindako konparaketa bakoitzean, herri bakoitzarekin erlazionatutako geneak identifikatu ziren, Zeelanda Berriko anduiekin lortutako datuak aipagarrienak izan zirelarik. Herri honetako anduiak izan ziren absentzi/dibergentzia mailarik handiena aurkeztu zutenak beste herrietakoekin alderatuz.

Konparaketa ildo berean, jatorri europar eta ez europarreko anduiak taldekatu ziren, azken talde honetan absente/dibergente topatu ziren 8 gene desberdinu zirelarik. Gene hauen artean, *Cj0617* eta *Cj1297* - proteina hipotetikoak kodetzen dituztenak - eta *Cj1321-Cj1326* gene *cluster*a - atzerago izendatua eta Champion *et al.* -ek (2005) deskribatua -. *Cj0617* eta *Cj1297* geneei dagokienez ezin dugu konklusio askorik atera, beraien funtzioa ezagutzen ez baitugu. Alabaina, *Cj1321-Cj1326* gene *cluster*aren inguruan, lehen esan bezala, bere presentzia anduiaren jatorri geografikoarekin erlazionatua egon daiteke.

Aurkitu genuen erlazio filogenomiko bakarra, konplexu klonalei zegokion. Honek, konplexu klonal konkretu batekin erlazionatutako markatzaileak existituko liritekeela suposa dezake, edo konplexueteriko bat edo bestentzako behintzat. Ikerketa hau CC-45 eta CC-21 konplexu klonalekin bideratu zen, izan ere, hauek ziren erabilitako anduien artean hedatuenak zirenak. Gure emaitzek agerian utzi zuten gene bat edo hainbaten presentzia edo absentzia/dibergentzia eta CC-45 eta CC-21 konplexuen arteko erlazio posiblea. Gene hauen funtzioen artean aniztasun handia topatu genuen; besteak beste, lipooligosakaridoen (LOS) biosintesiarekin erlazionatutakoak, ribonucleasak, mintz proteinak, peptidasak eta proteina periplasmakoak kodetzen dituzten geneak.

Konplexu klonalen edo sekuentzia tipoen eta gene konkretuen arteko erlazioaren bilaketari buruz, lehendik ere dokumentatuak izan direla aipatzekoa da (Taboada *et al.*, 2008). Erlazioa hau lehenago ere erabilia izan da konplexu klonal bat eta ezaugarri espezifiko bat parekatzeko; ostalariarekiko tropismoa kasu (Zautner *et al.*, 2011). Autore hauek gene metaboliko batzuen erlazioa topatu zuten konplexu klonal konkretu bat izatearekin; CC-21, CC-42, CC-45 eta CC-257 konplexuak adibidez. Beraiek erabilitako anduien artean aniztasun handiagoa egon arren, gure kasuan egin genuen lez, giza eta oilasko iturrietatik egindako

bakartzeak erabili zituzten. Konparaketa analisi bat egin ostean autore hauen eta gure emaitzen artean, presentzia eta absentsia/dibergentzia perfil desberdinak oso topatu genituen. Adibide gisa, autore hauen datuetan *dtlp7* genearen presentziak erlazio oso hertsia (% 60) aurkeztu zuen behi iturriarekin; gainontzeko anduien artean % 16 -an bakarrik topatu zen bitartean. Gure emaitzetan aitzitik, eta guk erabilitako andui bildumaren tamaina beste autoreek erabilitakoa baino txikiagoa den arren, aipatzekoa da gene hau gure anduia guztietan topatu izana. Azken honek gene honen eta behi jatorriaren arteko erlazioa, Zautner *et al.* -ek (2011) proposatutakoa, bertan behera utziko luke.

Pareko beste ikerketa bat Hepwoth *et al.* -ena (2011) izan zen, *Cj1321-Cj1325* geneen presentzia CC-21 eta CC-48 konplexu klonalekin erlazionatu zutenak eta ordea, CC-42 eta CC-257 -rekin gene hauen dibergentzia. Orokorrean, gure emaitzak autore hauenekin bat datoz, CC-257 -ari zegozkion bi anduietan gene hauen presentzia topatu genuen arren. Desberdintasun hau azken konplexu honi zegozkion andui kopuru txikiaren ondorio izan daiteke.

3. Aldakortasun genomikoa

DNA *microarray*ei dagokionez, helburu hauek ikertzeko teknika bezala, genoma osoak konparatzeko teknologia ordezkarria dela azpimarratu behar dugu, *microarray*ak daukan anduia erreferentziaren genomarekiko alderaketaren bidez gene konkretu baten presentzia edo absentsia detektatzea ahalbidetzen duena. Genoma osoen konparaketa hauek bi taldetan sailkatzen dituzte geneak. Lehen taldean, *core* geneena deitua, espezie bereko anduia guztientzat amankomunak diren geneak sartzen diren bitartean, bigarren taldean, gene osagarriena deitua, espezi bereko anduia bat edo gehiagotan presente dauden geneak sailkatzen dira, eta azken hauek gene berrien eskuratzearen ondorio izaten dira (Dorrell *et al.*, 2005).

NCTC11168 anduiaren genomarekiko alderaketa ikasketen bidez, gutxi gorabehera gene guztien % 84 -k kontserbazio maila altu bat aurkezten dute (*core* geneak) ikasitako anduien artean; horrela, gene hauek *C. jejuni* espeziearen espezifiko izendatzen dira (Dingle *et al.*, 2001; Suerbaum *et al.*, 2001; Doung *et al.*, 2009). Gure emaitzetan gene hauen kontserbazioa % 86 -koa izan zen, beraz beste autore batzuk lortutako kontserbazio maila altuarekin bat etorri zen.

Pearson *et al.*-ek (2003) *C. jejuni* aldakortasuna (absentzia/dibergentzia) erakutsi zuten geneen kopurua % 2,6 (40 gene) eta % 10,2 (163 gene) artean topatu zuten ikertutako anduia bakoitzarentzako, 269 gene aldakor identifikatuz guztira (% 16,3). Geroagoko beste ikerketa batzuek, gene aldakorren balore hauek % 21 -aren (Leonard *et al.*, 2003; Champion *et al.*, 2005) eta % 36,6 -aren (Taboada *et al.*, 2004) inguruan kokatu zituzten. Gure emaitzetan, *C. jejuni*ren NCTC11168 anduiarekin bat datozen eta absentzia/dibergentzia aurkeztu zuten geneen balorea % 13,7 -rainokoa (226 gene) izan zen andui bakoitzarentzat; % 30 -eko (504 gene) gene aldakor kopurua suposatzen zuena guztira. Lortutako emaitzen desberdintasun hau, ikerketa bakoitzean erabilitako anduien kopuruaren ondorio izan daiteke. Izan ere, gero eta anduia kopuru handiagoa erabili, orduan eta aldakortasun maila altuagoa topa dezakegu. Bestalde, diferentzia honen beste arrazoi posible bat, *microarray*ean erabilitako zunda kopuruan egon daiteke. Jakina denez, lan guztien gehiengoa NCTC11168 anduian oinarritutako *microarray*ekin egiten da, anduia hau *C. jejuni*ren genoma unibertsalaren ordezkari ez izan arren, beste andui batzuetan, RM1221 eta 81-176 kasu, identifikatuak izan diren beste gene batzuk izango ez lituzkeelako.

Aldakortasunaren lehengo analisi bat, andui bakoitzarentzat lortutako portzentaien emaitzetan ikus zitekeen *microarray*an zeuden zunden jatorriaren arabera. Balore hauek aztertzean, ikertutako zunden kopurua desberdina izan arren, euren portzentaien baloreak antzeko sakabanatzea aurkeztu zutela ikus zitekeen. Bestalde, analisi honetatik lortutako beste informazio aipagarri bat herri desberdinen artean lortutako aldea izan zen. Anduia espainiarren kasua nabarmena da, non RM1221 anduiaren zundekiko izan zuten hibridazio maila altua aipatzekoa den, aurrerago azalduko ditugun irla genomikoen gene askoren

presentzia dela eta. Era berean, azpimarratzekoa da hibridazio portzentaien eta konplexu klonalen artean lortutako erlazioa. Kasu honetan, *C. jejuni*ren 11828 anduiaren zundekin hibridazio maila altuago aurkeztu zuten CC-45 konplexuari zegozkion anduiak. Ordea, CC-21 konplexuari zegozkion anduiek, NCTC11168 anduiaren zundekin aurkeztu zuten maila altuena.

Gune hiperaldakorrak, gainontzeko genomak baino aldakortasun portzentai altuagoa aurkezten duten eskualdea laburragoak naiz luzeagoak dira. Eskualde hauek gene osagarri kopuru handia izaten dute, *C. jejuni*ren kromosomaren eboluzioan zehar birkonbinazio bidez eskuratutakoak gehiengoa (Alm *et al.*, 1999; Perna *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2003; Taboada *et al.*, 2004). Izan ere, Pearson *et al.* -en (2003) taldeak plastikotasun hiperaldakorreko zazpi eskualde (PR) deskribatu zituen *C. jejuni*ren genomaren eta gene aldakorrek gune hauetan zuten kokapena zorizkoa ez zela proposatu zuten eta hauen eskuratze edo galera eboluzioan zehar gertatutako prozesua izan dela adierazi zuten.

NCTC11168 anduiak % 30,6 -ko G+C kopurua dauka bere genomaren. Hala ere, azpimarratzekoak dira desberdintasunak existitzen diren guneak, anduien artean aldakorrak diren *loci*etan gertatzen baitira. Adibidez, NCTC11168 anduiak % 27,6 -ko G+C kopurua dauka kapsularen biosintesiaren eskualdean, % 27,8 -koa LOS-en biosintesiaren eskualdean eta errestrikzio eta modifikaziorako geneetan, Cj1549 eta Cj1553, % 34,3 eta % 37,8 -koa hurrenez hurren. Eremu hauetan aurkitutako G+C kopuruaren aldeak, truke genetiko horizontalaren bidez eskuratuak izan direla suposarazi dezakete eta era berean, *C. jejuni*ren genomaren eboluzioan era nahiko berrian gertatu izan dela (Parkhill *et al.*, 2000; Dorrell *et al.*, 2001).

Plastikotasun hiperaldakorreko eremu hauetan aurkitutako datuak konparatzeko zailtasuna literaturan jasotzen diren izendatze mota desberdinen erabileran datza. Hala ere, Pearson *et al.* -ek (2003) definitutako PR-ak erreferentziatzak hartuta, posiblea da gure datuen eta beste autore batzuen arteko konparaketak egitea, hurrengo paragrafoetan egingo dugun legez.

PR1 eremuan (Cj0295-Cj0306c), Taboada *et al.* -ek (2004) eta Poly *et al.* -ek (2004) ere deskribatu zutena - azken honek PZ2 bezala izendatua zuen arren - molibdenoaren garraio sistemaren geneak (*modC* Cj0300c, *mobB* Cj0301c eta *mobA* Cj0303c), pantotenatoaren biosintesiaren geneak (*panD* Cj0296c, *panC* Cj0297c, eta *panB* Cj0298c), biotinaren biosintesiarekin erlazionatutako bi gene, ustezko azetiltransferasa bat, ustezko betalaktamasa bat eta proteina hipotetiko bat aurkitzen dugu.

Azido pantotenikoa, goi mailako organismoetan adibidez, gantz azidoen bide metabolikoaren moduko beste bide batzuetara aziloak eskeintzen dizkien A koentzimaren (CoA) aitzindaria da. Mikroorganismoetan ordea, azido pantotenikoaren papera ez dago egokiro deskribatua. Gure emaitzen artean, azido pantotenikoaren biosintesiaren geneei dagokienez, bere absentsia/dibergentzia aurkitu genuen Erresuma Batuko hiru anduietan eta Zeelanda Berriko beste hirutan. Topatutako absentsia/dibergentzia honen esanahia azaldu nahi izatea presatsua izango litzateke, biomolekula honen papera ezaguna ez baita mikroorganismoetan. Hala eta guztiz ere, aurreko ikasketa batean (Sambandamurthy *et al.*, 2002) *Micobacterium tuberculosis*en pantotenatoaren absentsia, bakterio honen arratoiak infektatzeko gaitasunaren murriztearekin erlazionatua izan zen.

Bestalde, molibdenoari dagokionez, nitrato erreduktasaren bidezko nitratoaren erredukzio prozesuekin erlazionatua izan da zenbait mikroorganismotan. Nitratoaren erabilera azken elektroi hartzaile bezala, garrantzitsua da oxigeno murriztuko medioetan *Campylobacter*en hazkuntzarako (Sellars *et al.*, 2002). Cj0264c genea (molibdeno erreduktasa) absentsia/dibergentzia erakutsi zuen 19 anduietan, oxigenoa murriztailea den medioetan elektroi azken hartzaile desberdinak *Campylobacter*rek izan dezakeelako ahalmena suposaraziz. Posiblea izango litzateke beraz, gene hauetariko batzuen eskuratzea ingurune edo nitxo ekologiko konkretuetara moldatzeko abantaila hautatzailea izatea.

PR2 eremuak (Cj0480-Cj0490), Taboada *et al.* -ek (2004) eta Poly *et al.* -ek (2004) ere aipatua - azken honek PZ3 deitua- azukreen modifikazio eta garraioarekin erlazionatutako geneak ditu eta ustezko altronasa hidrolasa eta aldehido deshidrogenasa batentzako gene

ebakinak albo banatan mugatua agertzen da. Gainera, ustezko oxidoerreduktasa bat, azukreen garraiatzaile bat eta funtzio ezezaguneko bi proteina hipotetiko kodetzen duten geneak bertan kokatzen dira. Gure emaitzetan, absentsia/dibergentzia gehiena anduia ez europarretan topatu genuen eta hau, nitxo ekologiko bateko ezaugarri konkretuetarako moldaketa estrategia bezala erlazionatua izan daiteke.

PR3 eremuari dagokionez (*Cj0727-Cj0741*), Taboada *et al.*-ek (2004) ere deskribatua, ABC garraiatzaile bat edo gehiagoren osagarriren bat eta zenbait proteina hipotetiko kodetzen dituzten geneak batzen ditu. Gure emaitzetan, ABC garraiatzaileekin erlazionatutako geneen absentsia/dibergentzia Erresuma Batuko lau anduietan eta Zeelanda Berriko batean detektatu zen. Haatik, proteina hipotetikoaren absentsia/dibergentzia hamazortzi anduietan topatu zen.

PR4 eremuarekin jarraituz (*Cj1135-Cj1145c*), baita Dorrell *et al.* -ek (2001), Taboada *et al.* -ek (2004) eta Poly *et al.* -ek (2004) ere deskribatua – azken honek PZ4 deitu bazion ere – lipoolisosakaridoen biosintesiarekin eta eraldaketarekin duen erlazioagatik bereizten da. *C. jejuni* NCTC11168 anduiaren genomaren sekuentziazio osoaren bidez, LOS-en biosintesian inplikaturako geneen *clustera* identifikatu zen, *Cj1131c* eta *Cj1151c* geneen artean (Linton *et al.*, 2000, 2002; Parkhill *et al.*, 2000). Tarte honek, PR4 baino zabalera handiagoa eduki arren, gene gehienak ditu azken eremu honen baitan.

Ezaguna da jadanik, LOS -ek gune erlatiboki kontserbatuak aurkezten dituztela eta amaiera gune bat dutela, zeina anduien artean aldakorra den eta giza nerbio periferikoen gangliosidoekin mimetismoa lor dezakeen (Moran eta Penner, 1999). Azken hau, Guillain Barre (GBS) eta Miller Fisher-en (Van Koningsveld *et al.*, 2001; Willison *et al.*, 1999) sindromeekin erlazionatua izan da. Konkretuki, nerbio sistema periferikoaren gaixotasun hauek *C. jejuni*ren sializatutako LOS -etan eta beraien gangliosidoekin mimetizatzeo ahalmenean oinarritzen dira (Nachamkin *et al.*, 2002). Kasu gutxitan *C. jejuni*ren infekzioak GBS sindromean amaitzen duen arren, ikasi eta sakondu beharreko erlazio garrantzitsu bat da (Allos *et al.*, 1997).

*Microarray*en bidez PR4 eremuarengan egindako beste ikasketa batzuetan, *C. jejuni*ren genomán dagoen gune hiperaldakorrena bezala deskribatua izan da (Dorrell *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2003). LOS-en sializazioa, azido sialikoaren biosintesiarekin erlazionatutako N-azetil neuraminiko azido sintasa entzima kodetzen duten geneekin (*Cj1141-Cj1143*, *neuB1*, *neuC1* eta *neuA1*) eta LOS-ak sializatzeaz arduratzen den azido sialikoaren tranferasa kodetzen duen *cst* genearekin erlazionatzen da (Gilbert *et al.*, 2001, 2002; Guerry *et al.*, 2002).

Honez gain, lipooligosakaridoen *locus*aren egitura genetikoan, LOS-en barne sekuentziaren biosintesiarekin erlazionatuta dauden *waaC*, *waaV*, *waaF*, *hldE* eta *hldD* geneak topatzen dira. Baita ere *wlaN* genea; bukaerako galaktosa hondakina jartzeaz arduratzen dena, eta *Cj1136*, *Cj1138* eta *Cj1139c* geneak; ustezko galaktosiltransferasak kodetzen dituztenak, eta *Cj1135* genea; glikosiltransferasa bat kodetzen duena, topa ditzakegu.

PR4 eremuarekin jarraituz, eta itzarotekoa zenez (Dorrell *et al.*, 2001), eremua mugatzen duten *waaC*, *waaV*, *waaF*, *hldE* eta *hldD* geneen presentzia altu bat detektatu genuen. Alabaina, azido sialikoaren biosintesiarekin erlazionatuta dauden hiru geneengan (*neuABC*) eta azido sialikoaren tranferentziarekin erlazionatutako *cst* geneengan absentzia/dibergentzia maila altua topatu genuen. Izan ere, hogeitau ordu europarretan soilik aurkitu genituen lau geneak. Gainontzeko andueta, eta batez ere andui ez europarretan topatutako absentzia/dibergentziak, konexioa izan dezake jatorri geografikoarekin eta sializazio mekanismo desberdinak izatearekin.

PR5 eremuarekin hasteko (*Cj1296-Cj1342c*), Dorrell *et al.* -ek (2001) eta Taboada *et al.* -ek (2004) ere deskribatua, flagelinaren biosintesiarekin erlazionatutako geneak (*flaA*, *flaB*), flageloarekin erlazionatutako bi proteina posible (PseG eta PseH) eta beraien eraldaketa post-translazionalean parte hartzen duten geneak (*pmtA*, *pmtB* eta *pseA*) batzen dituela azpimarratu beharra dago (Thibault *et al.*, 2001).

Aski ezaguna da flageloaren mugikortasun egokiak hesteetako zelulen kolonizazioan eta inbasioan duen paper garrantzitsua (Black *et al.*, 1988). Gainera, flagelina infekzioan zehar ezagutua den proteina immunomemperatzaile bat da eta proposatua izan da antigeno immunobabesle gisa (Guerry *et al.*, 1991). *Campylobacter* spp. -ren filamentu flagelarrak flagelina FlaA-z printzipalki eta flagelina FlaB-ren aztarnez osatuak daude. *flaAB* geneak independenteki transkribatzen dira naiz eta *flaA*, *flaB* baino maila gorenagoetan egiten den. *flaA* eta *flaB* geneetan egindako analisi mutazionalek agerian utzi zuten FlaA proteina estrukturala dela, FlaB kopuru txikiagoan ezarria den bitartean filamentu osoan zehar. Bi gene hauek, NCTC11168 anduian, oso antzeko sekuentzia dute (% 93).

Lehenagoko ikerketetan flagelinaren, gutxienez hamairu serinatan, glikolisazioak ikusiak izan dira (Logan *et al.*, 1989). Glikosilazio hauek efektu immunogeniko batekin erlazionatuak izan dira (Power *et al.*, 1994). Glikosilazio prozesu honen parte hartzaile bezala zenbait gene identifikatu dira (Guerry *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1999; Linton *et al.*, 2000), besteak beste *ptmB* eta *neuB3*; Neu5Ac (azil N-azetilneuraminiko), azido sialiko ohikoenaren sintesiarekin erlazionatuak. Thibault *et al.* -ek (2001) Neu5Ac eta flagelinaren gune glikosilatuen arteko erlazioaren hipotesia proposatu zuten.

neuB2 eta *neuC2* geneei dagokienez, bai LOS-n sializazioan zein flageloaren sializazioarekin erlazionatuak daude (Linton *et al.*, 2000). Gene hauek absentzi/dibergentzia aurkeztu zuten hamabi anduiatan. Beraz, gene hauen eraldaketek eragina izango lukete, ez bakarrik flageloaren egitura eta funtzioan, baita LOS-en estruktura eta funtzioan ere.

flaA eta *flaB* genetara bueltatuz, kolonizazioan duten berebiziko garrantzia dela eta itxaron genezakeenez, presentzia orokor bat topatu genuen gure anduia guztietan. Aldaketa *pmtA*, *pmtB*, eta *pseA* geneetan metatzen da. Gainera, eskualde beraren barnean *Cj1321-Cj1326* geneen *cluster*a kokatzen da; Champion *et al.*-ek (2005) bakartze iturriaren markatzaile posible gisa proposatua, lehenago deskribatua eta eztabaidatua izan dena.

Eremu honek, gainera, proteina hipotetiko asko, aziloen proteina garraiatzaile bat (*acpP2*, *acpP3* eta *acpP4*) eta, *Streptomyces coelicolor* eta *Lactobacillus plantarum* bakterioetan gantz azidoen biosintesirako ezinbestekoa den (Revill *et al.*, 2001; Kiatpapan *et al.*, 2001) beta-ketoazil-azil III sintasa garraiatzaile bat (*fabH2*) kodetzen du. *fabH2* geneak absentzia/dibergentzia erakutsi zuen bost anduiatan. Haatik, *fabH2* eta *fabH* (*Cj0328c*) oso antzekoak dira, eta azken hau aztertutako anduia guztietan detektatu zen. Hori dela eta pentsatzekoa da FabH dela funtsezko proteina gantz azidoen biosintesirako eta, ordea FabH2, ordezkoa eta ez ezinbestekoa izango litzateke.

PR6 eremuarekin jarraituz (*Cj1415c-Cj1442*), Dorrell *et al.* –ek (2001), Taboada *et al.* –ek (2004) eta Poly *et al.* –ek (2004) ere deskribatua – azken honek PZ5 deitu bazion ere-, kapsulako polisakaridoen biosintesiarekin duen erlazioa azpimarratzekoa da (*Cj1413c-Cj1443c*). Eskualde hau alboetatik mugatuz, kapsularen garraioarekin erlazionatutako geneak topatzen ditugu, *Escherichia colin* topatu ditzakegunen tankerakoak; *kpsS*, *kpsC* (*Cj1413c-Cj1414c*) eta *kpsF*, *kpsD*, *kpsE*, *kpsT* eta *kpsM* (*Cj1443c-Cj1448c*) adibidez.

Kapsula bera eta hau osatzen duten polisakaridoak, erantzun immunologikoaren saihestea eta bakterioaren birulentziarekin duten garrantziagatik bereizten dira. Polisakarido hauen egiturak zelula ostalariaren antigeno naturalekiko mimetismo ahalmena ematen die, sortzetiko defentsa mekanismoen kontra, adibidez fagozitosia eta zelula ostalariaren bestelako erantzun immunologikoak saihesteko ahalmenaz hornituz (Karlyshev *et al.*, 2005).

Kapsularen biosintesiari dagokionez, mintzeko garraiatzaile batzuk paper garrantzitsua jokatzen dute, bakterioaren mintz plasmaticoaren kanpoaldera polisakaridoak translokatzear arduratzen den Kps proteina bezala. PR6 eskualdea aztertuz (*Cj1415-Cj1442*), polisakaridoen biosintesi arduratzen diren geneak mugatzen, mutur banatan, *kps* geneak daude (*Cj1413c-Cj1415c* eta *Cj1443c-Cj1448c*). Orokorrean *kps* geneak oso kontserbatuak dira eta gure emaitzek berau berrezten dute.

Eskualde honen aldakortasun mailak anduia kopuru handi bati eragiten die, soili hamabi giza anduia eta lau oilasko anduietan topatzen dugularik. Gainera, anduia ez europarrek absentsia/dibergentzia aurkeztu zuten ia gene guztietan, eskualde ez europarretako ezaugarri ekologikoren batekin erlazionatuta egon daitekeelarik.

Azkenik, PR7 eskualdeak (Cj1717-Cj1729), Taboada *et al.* -ek (2004) ere deskribatua, ustezko mintz proteinak, proteina periplasmakoak, proteina hipotetikoak eta leuzinaren biosintesiarekin erlazionatutako geneak bateratzen ditu. Gainera, flageloaren kakoaren proteina posible bat kodetzen duen Cj1729c genea ere, bertan kokatzen da. Protido hau *flgE* (Cj0043) geneak kodetzen duen proteinarekiko - 57 anduiatan topatu duguna - ordezeko bat izan daiteke.

Lortutako datuen laburpen gisa, zazpi eremuentzako aldakortasun maila altuak detektatu genituen, hauek Pearson *et al.* -ek (2003) proposatutakoarekin bat datoz. Gune hauek NCTC11168 anduiarekin alderatuz, topatutako gene aldakorren % 25 baino gehiago batzen dute. Gainera, PR4, PR5 eta PR6, dibertsitate genetikoa, azaleko egituren produkzioarekin lotuta dagoela erakusten dute eta ondorioz, hestea kolonizatze edota ostalariaren erantzun immunologikoa saihestean berebiziko garrantzia izan dezake. Hala ere, PR2, PR3 eta PR7 eskualdeak gehiago ikasi beharko lirateke, izan ere, oraindik deskribatu gabeko funtziodun geneak dituztelako. Orokorki, jatorri geografikoak (europar eta ez europar) eskualde hauen eduki genetikoa baldintzatzen duela dirudi.

Beste alde batetik, Taboada *et al.* -ek (2004) hamazazpi eskualde hiperaldakor deskribatu zituzten, zeinen artean lehenago aztertutako PR -ak dauden eta gainera, Cj0032-Cj0036, Cj0055c-Cj0059c, Cj0177-Cj0182, Cj0258-Cj0263, Cj0421-Cj0425, Cj0561c-Cj0571, Cj0625-Cj0629, Cj0967-Cj0975, Cj1543c-Cj1563c eta Cj1677-Cj1679. Lortutako emaitzek bultzaturik Taboada *et al.* -ek (2004) proposatutako eskualde hauetariko bitan sakondu beharko dugu.

Hauetariko lehenengo eskualdea *Cj0258-Cj0265* geneen artean mugatutakoa da, PZ1 ere deitua Poly *et al.* -engatik (2004). Eredu honek zortzi gene batzen ditu: erregulatzailerik posible bat, dihidroorotasa (*pyrC*) bat, usteko kimiotaxiaren transdukzioaren seinalearen proteina metil hartzaile bat, molibdepterin oxidorreduktasa bat, usteko zitokromo C-ren proteina periplasmatikoa bat, zink-aren proteina garraiatzaile bat, usteko SAM menpeko metiltransferasa bat eta proteina hipotetiko bat. Detektatutako aldaketan artean azpimarratzekoa da *pyrC* genearen absentsia anduietako bostetan. Honek primidinarekiko auxotrofia suposa dezake. Hala ere, anduia hauek bigarren gene bat daukate (*pyrC2*; dihidroorotasa) lehen aipatutakoaren funtzioa ordezkatu lezakeena (Poly *et al.*, 2004). Bestalde, hemo taldeei lotzeko zitokromo C usteko proteina periplasmatikoa bat kodetzen duen genea (*Cj0625c*) eta molibdepterin oxidorreduktasa bat kodetzen duen genearekin batera (*Cj0624c*), *Campylobacter* bakterioari oxigenoaren egoera mugatuetan arnasteko aukera ematen diote, nitrogenoa edo sulfura erabiliz ordezko elektroio hartzaile gisa. Anduien artean topatutako absentsia/dibergentziak elektroioen hartzaile hauek erabiltzeko ezintasuna suposarazten du (Poly *et al.*, 2004).

Aipatu beharreko beste eremua *Cj1543c-Cj1563c* geneek mugatutakoa da, eta I motako murrizketa eta eraldaketa sistema batekin erlazionatua dago. DNA arrotzarekiko babes mekanismo batez hornitzen dute bakterioa (Murray *et al.*, 2000) beraz, gune honetako aldakortasunak DNA arrotza eskuratzeko ahalmen txikiagoa edo handiagoa emango lioke. Sistema hauen absentsia altuak DNA arrotzaren eskuragarritasuna erraztuko luke, dibertsitate genetikoa bultzatuz. Dibergentzia aurkitzekotan, *C. jejuni* naturalki transformagarria izanda, DNA arrotzaren gehitzearen aurkako babes sistema desberdinak garatu izanaren azalpena izan daiteke (Leonard *et al.*, 2003). *C. jejuni* primeran bereizten du espezie bereko beste anduia batean erreplikatu izan den DNA eta beste espezi desberdin batean izan denaren artean, azken hau arrotzat hartuz eta, seguruenik murrizketa-eraldaketa sistemengatik deuseztatuz (Labigne-Roussel *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 2000). Gainera, naturalki transformagarria izan arren, praktikan zaila da bere transformazio *in vitro* egoeran (Girbau *et al.*, 2007). I sistemaren arduraduna den entzima, bifuntzionala da eta *hsdR*, *hsdM* eta *hsdS* geneek kodetutako azpiunitate anitzeko konplexu bat da. Metiltransferasa

aktibitaterako HsdM eta HsdS azpiunitateak nahiko diren arren, hiru azpiunitateen beharra dauka endonukleasa aktibitatea edukitzeko (Miller *et al.*, 2005). Gure emaitzen artean, anduien % 64 baino gehiagok absentsia/dibergentzia aurkeztu zuten hiru gene hauentzako, zeinak ordezeko murrizketa-eraldaketa mekanismoak erabiltzen dituela pentsarazten digun.

Garrantzia irabazten duen beste puntu bat, kromosoman bata bestearen aldamenean egon ez arren, erlazionatutako funtzioak dituzten geneetan aurkitutako aldakortasuna da. Hauen artean, *Cj0031*, *Cj0032*, *Cj0208*, *Cj0690*, *Cj0722c* eta *Cj1051* azpimarratzekoak dira; Dorrell *et al.* -ek (2001) deskribatutako murrizketa-eraldaketa mekanismoarekin erlazionatutakoak.

Gure emaitzak Dorrell *et al.* -ek (2001) proposatutakoekin bat datoz, izan ere *C. jejuni*ren murrizketa-eraldaketa sistemekin erlazionatutako geneetariko batzuk gure anduien artean ere absentsia/dibergentzia aurkeztu zuten. *E. coli*renaren moduko genoma bakteriarren sekuentziarioak ere aldakortasuna erakutsi du murrizketa-eraldaketa sistemengan (Perna *et al.*, 2001).

Gure emaitzen artean aipatzeko beste puntu bat, orain arte deskribatu gabeko eta absentsia/dibergentzia maila nabarmen bat erakutsi zuten bi eremu hiperaldakorren aurkitzea izango litzateke. Ia osotasunean, gene hauek proteina hipotetiko edo ustezkoak kodetzen dituzte, beraz ondorioak ateratzea arinegi egitea izango litzateke. Hala ere, eta Dorrell *et al.* -ek (2011) egindako ikasketei esker, gutxienez sekuentziatutako bi anduia, bi eremuetan dibergentziak edota delezioak aurkezten zituztela ikusi ahal izan genuen. Hala ere, atear irekita uzten zaizkie interpretazio berriei, gene hauen funtzioak identifikatzen direnean.

Beste banakako edo bikotekako geneek aldakortasun altua erakutsi zuten (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538*, *Cj0617-Cj0618*). Gene hauen gehiengoa gene hipotetiko eta ustezkoak da, *Cj0537-Cj0538* izan ezik. Azken hauek, 2-oxoglutarato sintasaren OorB eta OorC azpiunitateak kodetzen dituzte. Oxidoerreduktasen familiari dagokion entzima da eta bai Krebs-en zikloarekin eta baita aminoazidoen biosintesiarekin ere erlazionatuak daude.

Gainera, Dorrel *et al.* -ek (2011) *Cj0617-Cj0618* eremua deskribatu zuten, non delezioak topatu zituzten txori iturriko bakartze batean.

*C. jejuni*ren aldakortasun genomikoa kromosomaren gune konkretuetan metatzen da gehien bat; beste autore batzuk jada deskribatutakoetan eta lan honetan proposatutako bi eremu berrietan. Aldakortasun hau oso sakabanatua aurkitzen dugu ikasitako anduien artean. Hori dela eta, *C. jejuni*ren genomaren dibertsitate maila altua berrezten dugu, anduia ez europarretan maila altuena izanda.

Beste puntu garrantzitsu bat birulentziarekin erlazionatutako geneak dira. Berez eremu bat definitzen ez badute ere, patogenotasunarekin erlazionatutako unitate funtzional bat suposatzen dute aldakortasun genomikoan lagunduz. *C. jejuni* patogeno moduan garrantzitsua izanda ere, birulentziaren mekanismoak gutxi ikasiak daude. Atxikidura, kolonizazio, inbasioa eta toxinen produkzioarekin erlazionatutako ezaugarri espezifikoak infekzioa sortzeko beharrezkoak direla dirudi (Konkel *et al.*, 2001). Gure emaitzetan *flaA*, *flaB*, *flaC*, *cadF*, *jlpA*, *racR*, *capA*, *tlyA*, *peb1a* eta *dnaJ* hautatu ziren atxikiduran eta kolonizazioan inplikaturako geneak legeez. Berriz, *cdtA*, *cdtB* eta *cdtC* zitotoxinekin erlazionatu ziren. *virB11*, *ciaB*, *pldA* eta *iamA*, inbasioarekin eta *wlaN* eta *cgtB*, Guillain-Barre sindromearekin erlazionatu ziren bezala. Burdinaren lipoproteina kelatzaile bat kodetzen duen *ceuE* genea ere hautatua izan zen.

Birulentziarekin erlazionatutako gene hauetariko asko, finean, eta gure emaitzen arabera, ez lirateke osagarriak izango, *core* motakoak baizik, anduia guztietan baitaude; *cadF*, *ceuE*, *ciaB*, *dnaJ*, *flaA*, *flaB*, *flaC*, *iamA*, *jlpA*, *peb1a*, *pldA*, *racR*, *racS* kasu. Gainera, ikusketa hau beste autore batzuk proposatutakoarekin bat etorriko litzateke (Dorrell *et al.*, 2001; Datta *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Talukder *et al.*, 2008; Flanagan *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2011), non gene hauetariko gehiengoa anduia guztietan agertu zen edo aldaketa txikiekin.

Gene hauek, gure anduien artean prebalentzia maila altua erakutsi zutenak, anduia birulento eta ez birulentoen artean desberdintzearen erantzule izatekotan, geneen sekuentzia eta erabilitako zunden sekuentzien arteko desberdintasunak edota adierazitako produktuetan desberdintasuna aztertu beharko litzateke. Duong eta Konkel -ek (2009) hau berrezten zuten probak eskaini zituzten birulentzia genotipoan oinarrituta aurrestea ezinezkoa zela esatean, izan ere, patogenotasunean aldakortasuna, gene konkretu batzuen mutazio, delezio, inserzio edota barne berrantolaketen ondoriozko espresioari zor zekiokela esan zuten. Hala izanda, patogenotasuna gene hauen nukleotido sekuentzien arabera izango litzateke, *cdt*, *cadF*, *jlpA* eta *peb1a* geneetan gertatzen den bezala. Hori dela eta, genearen espresioaren erantzule izango liratekeen sekuentziaren aldaketak detektatzeko metodoak garatu beharko lirateke. Autore hauek, beste adibide batzuk proposatu zituzten *cdt* (*Citolethal Distending Toxin*) eta *cgtA* (β -1,4-N-acetylgalactosaminyl-transferase) geneekin erlazionatuak, NCTC11168 eta 81-176 anduietan hurrenez hurren. Erregulazioan eraginez, beste gene batzuen espresioan aldaketak sortu lituzketen sigma faktoreen aldakortasuna (RpoD, RpoN eta FliA) adierazi zuten ere.

cdtA, *cdtB* eta *cdtC* geneak batzen dituen *clusterari* dagokionez, *tandemean* kokatua daudela eta 30 KDa, 29 KDa eta 21 KDa-eko, hurrenez hurren, hiru azpi-unitatez osatutako CDT toxina kodetzen dutela esango dugu (Pickett *et al.*, 1996). CDT toxinak, zelula lerro desberdinengan distentsio bat eragiten du azkenean heriotza eraginez (Jonhson eta Lior, 1988; Bang *et al.*, 2001). Gure emaitzetan hiru gene hauen agertze maila nabarmen bat lortu genuen anduia guztietan izan ez bazen ere. Hau beste autore batzuen emaitzekin bat zetorren (Bang *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2006; Ripabelli *et al.*, 2010). Haatik, absentsia/dibergentzia topatu genuen geneetan, hiru gene hauek oso kontserbatua aurkitzen direla eta, sasi gene moduak aurkitzearen ondorio izan daiteke, Abuoun *et al.* (2005), Martínez *et al.* (2006) eta Duong eta Konkel -ek (2009) lehenago deskribatu zituztenak. Azken autore hauek *cdt* geneen *clusterean* kokatutako eta hauek kodetutako proteinen funtzioan eragiten zuten bi mutazio mota deskribatu zituzten.

Bestalde, eta beste autore batzuen emaitzek bat etorriaz (Datta *et al.*, 2003; Kordinas *et al.*, 2005; Asghar *et al.*, 2006; Talukder *et al.*, 2008), *C. jejuni*ren bakartzeen artean presentzia maila baxua ikusi genuen (*wlaN*, *cgtB*, *capA* eta *virB11*), birulentziarekin erlazionatutako gainontzeko geneekin alderatuz.

cgtB (Gilbert *et al.*, 2000) eta *wlaN* (Linton *et al.*, 2000) geneei dagokionez, lipooligosakaridoen biosintesiarekin (LOS) erlazionatuta daude eta baita, lehenago esan den moduan, giza gangliosidoekin mimetizatuz, Guillain-Barre sindromearen agertzearekin. Gure emaitzetan, gure anduia bilduma beste autore batzuek erabilitakoa bezain handia ez dela kontuan harturik eta beraz, aldakortasun portzentaiak gain baloratuak egon daitezkeela aintzakotzat hartuz, azpimarragarria da *wlaN* genearentzako lortutako % 36 -a, Kordinas *et al.* (2005), Feodoroff *et al.* (2010) eta Gargiulo *et al.* -ek (2011) lortutako % 16, % 17 eta % 23 -rekin, hurrenez hurren, alderatuz. Gene honen garrantzia eta bere erlazioa Guillain-Barre -ren sindromearekin kontutan hartuz, urduritzekoa suertatzen da gure anduien artean presentzia topatu dugun kasu kopuru altua, bai giza zein oilasko iturria dutenen artean, baita jatorri geografiko desberdinen artean ere; batez ere jatorri euorparrekoen artean.

Bestalde, *cgtB* genea Kordinas *et al.* (2005) eta Oporto *et al.* -ek (2011) - % 24,44 eta % 21,3, hurrenez hurren – lortutakoak baino balore txikiago batean topatu zen (% 3). Hau, gure anduien jatorri sakabanatuaren ondorio izan daiteke. Aipatzekoa da *cgtB* genea aurkeztu zuten bi anduiek (% 3), ez zutela *wlaN* genea aurkeztu.

CapA proteinari dagokionez, atxikidura funtzioa duen proteina bat dela eta *Cj0628-Cj0629* geneek kodetua dela esan behar dugu. Beronen espresioa, bai bi geneen presentziaren baitan, baita bi geneen artean kokatzen zen gune homopolimeriko batean (5 pb poly-T, 10 pb poly-G-z jarraituak) gertatutako delezio baten ondoriozko stop kodoi baten desagertzearen baitan dago (Ashgar *et al.*, 2006). Bi geneek, Ashgar *et al.* (2006) eta Flanagan *et al.* -ek (2009) egindako ikasketekin bat etorriaz, presentzia erakutsi zuten anduien % 50 -ean, guztiak jatorri euorparrekoak izanik.

Aldakortasunean eragiten duten beste elementu genomiko batzuk, 81-176 anduiaren pTet eta pVir plasmidoetako geneak dira. pTet plasmidoarekin hasiz eta honen gene bereizgarriari dagokionez (*tet0*), tetraziklinarekiko erresistentziaz hornitzeagatik izen hau jasotzen duela azpimarratu behar da. Tet0 proteinak, ARN 30S-ren metilazioz tetraziklinarekiko erresistente bihurtzen du bakterioa; erribosomaren babes proteinen familiari dagokio (Connell *et al.*, 2003). Anduia gehienetan, momentuz, *tet0* genea plasmido batekin erlazionatua agertzen zen. Hala ere, ikasketa berriagoek gene honen presentzia kromosoma bakteriarrean kokatu izan dute (Dasti *et al.*, 2007). NCTC11168 anduiarengan egindako sekuentziarioek, transposoirik, fagoen aztarnarik edota inolako insertsio sekuentziarik ez zegoela adierazi zuten arren - sekuentzia errepikakor gutxi zeudela bezala (Richardson eta Park, 1997; Parkhill *et al.*, 2000) - homologiarik ez egonda ere, *Campylobacteren* transformazio naturalaren bidez sartutako plasmido heterologoko DNA molekula bat, zoriz eta errekonbinazio ez legitimo baten bidez, bakterioaren kromosoman integratu zitekeela ikusi zen. Honek *tet0* genearen presentzia kromosoman azalduko luke (Bossinger *et al.*, 1990 ; Friis *et al.*, 2006). Gainera, beste elementu mugikorren presentzia detektatu da; integroiak, antibiotikoen erresistentziaren geneen eskuratzearekin lotuak (O'Halloran *et al.*, 2004).

Tetraziklinarekiko erresistentzia ematen duten plasmidoen artean, *Campylobacteren* gehien ikasitakoak pTet eta pCC31 dira. Lehendik ere, bakoitzaren presentziarekin erlazionatutako markatzaile posible bana deskribatu ziren; *cpp15* gene, pCC31 plasmidoaren markatzaile gisa eta *cpp21*-a pTet-ena alegia. Gure *microarrayak* ez du *cpp15* genearekiko zunda, bai ordea *cpp21* genearena; gure anduien arteko seitan topatua. Honek anduia hauen eta pTet plasmidoaren presentziaren arteko erlazioa suposatuko luke.

Beste autore batzuei gertatu izan zaien moduan (Hepworth *et al.*, 2011), pTet plasmidoaren geneak neurri handia edota txikian topa daitezke aztertutako anduietan. Izan ere, Hepworth *et al.* -ek (2011) egindako ikerketan, soilik anduien % 5 -ean ikusi zen pTet plasmidoaren geneen % 75 baino gehiago, gure emaitzetan anduien % 11 ikusi zen bitartean.

Gure analisiaren emaitzekin jarraituz, ikus dezakegu nola *tet0* genearen presentzia aurkeztu zuten hamabost anduien artean seik erreplikazio jatorriaren geneak ere aurkeztu zituzten (*cpp3*, *cpp4* eta *repA*). Hau dela eta, pentsatu dezakegu bai pTet edota pCC31 plasmidoei buruz, edota antzeko baten bati buruz hitz egiten ari garela, izan ere gene hauek guzti hauek plasmido bitzuek dituzte. Gure emaitzetan gehiago sakonduz, sei anduia hauek, piliaren eraketarako beharrezkoa den *cmgB2* genea ere badutela ikusi genuen. Honek, *tet0* genearen jatorria plasmido bat izan zela adierazi lezake. Gainontzeko anduien artean, *cmgB2* genea eduki arren besteatariko gene bat ere aurkeztu ez zutenak, iturri plasmidiko desberdin bat identifika genezake. Bestalde, anduien % 16 ez zuten *tet0* genea aurkeztu baina bai pTet plasmidoari dagozkion beste gene batzuk. Hau hiru gertaera posiblek azaldu lezakete; gerta daiteke, gene karakteristikoa eduki ez arren plasmidoa edukitzea, edo daukan plasmidoa, gene amankomunak dituen plasmido desberdin bat edukitzea, edo beste alde batetik gerta daiteke gene bereizgarria mosaikoa izatea – lehengo ikasketa batzuetan beste bakterioetan deskribatuak izan diren legez (van Hoek *et al.*, 2007) -, eta ez egotea absente, baizik eta dibergente. Aukera hauek posible izan daitezke bai pTet zein pVir plasmidoekin. Azken hau geroago eztabaidatuko dugu.

Bestalde, aztarnak topatzen ditugu *tet0* genearen presentziak ez lukeela derrigorrez plasmidoaren presentzia inplikatu eta hala izanda, gene hau beste bide baten bitartez eskuratua izan daitekeela, izan ere, gene hau identifikatu zen anduietariko lauk, ez zuten pTet plasmidoari zegokion gene kopuru handi bat aurkeztu. Zehazki, kasu batean (CH-001) soilik *tet0* genea gehi, ez erreplikazio jatorriarekin ezta piliaren eraketarekin erlazionatutako beste lau gene identifikatu genituen. Kasu honetan *tet0* genea posibleki kromosoman kokatuko genukeen.

Kasurik puntakoena, CNET095 anduian (Danimarka) ikusten dugu, non bakar bakarrik *tet0* genearen presentzia topatu genuen eta ez plasmidoarekin erlazionatutako beste gene batena ere. Hau nolabaiteko erresistentzia kromosomiko batera gidatzen gaitu.

Jatorri geografikoari dagokionez, anduia ez-europarretako batean ere ez (% 21) ez zen *tet0* genea aurkitu, nahiz eta gene plasmidiko batzuen presentzia topatu zen. Bitartean, anduia europarren % 35 *tet0* genea aurkeztu zuten. Gehiago zehaztearren, hauetariko % 66 espainiar jatorria zuten.

Lehenagoko ikasketek, *tet0* genea Espainian % 25 batean identifikatu zuten (Gómez-Garcés *et al.*, 1995). Hala ere, balore hauek azken urteetan zehar areagotzen joan dira. 2007 urtean, Alonso *et al.* -ek egindako ikasketa batean gene honen presentzia % 80 batean areagotu zela ikusi zuten. Tetraziklinaren erabilera, pentsuetan erabilitako hazkuntzaren bultzatzaile modura, duela asko galarazi zela kontutan hartuz, *Campylobacter* spp. anduietan antibiotiko honekiko erresistentziaren areagotzearen erantzule modura, albaitaritzan agente terapeutiko moduan erabiltzea proposatzen da.

pVir plasmidoari dagokionez, *C. jejuni*ren birulentziarekin erlazionatua izan da (Bacon *et al.*, 2000). Plasmido honen gene bereizgarriena *virB11* izan arren, ADN xurgapenean edo IV motako irazketa mekanismoen bidez proteinen garraioan inplikaturako Com eta Vir proteinen gene homologoak ere baditu. Orain dela gutxi, Tracz *et al.* -ek (2005) pVir identifikatu zuten jatorri klinikoko *C. jejuni*ren ehun eta lau anduietatik hamazazpitan (% 17), eta pVir aurkeztu zuten bakartzeak, tetraziklinarekiko erresistentziaz hornitzen zituen plasmido baten presentziarekin lotu zituzten.

virB11 geneak absentzia/dibergentzia aurkeztu zuen gure anduia guztietan. Hala ere, zenbaitzuk plasmidoari zegozkion zenbait gene aurkeztu zituzten. Lehenago ere, pTet plasmidoarentzako proposatu dugun moduan, ikusketa hauek azalduko lituzketen gertaera posible desberdinak egon daitezke. Gainera, plasmido osoari dagokionez, anduia batek ere ez, ez zuen pVir plasmidoari dagozkion zundekin hibridatu. Honek, agerian uzten du pVir plasmidoa aurkeztu duen anduia kopuru txikia eta beste autore batzuen emaitzekin bat dator, non plasmido honen presentzia oso txikia izan zen ere (Schmidt-Ott *et al.*, 2005; Louwen *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2006; Talukder *et al.*, 2008; Hepworth *et al.*, 2011).

Bukatzeko, *Campylobacteren* genomari aldakortasuna ematen dioten beste elementu batzuk, irla genomiko edo baita ere CJIE deritzenak dira. Zehazki, irla hauek ikasteko orduan integrasen edota transposasen presentziaren neurketa erabili da. Hala ere, kasu batzuetan, integrasen edota transposasen presentziak irlak definitzen zituzten, gene kopuru txikia eduki arren. Beste kasu batzuetan ordea, nahiz eta gene irlari zegokion gene asko eduki arren, ez zen irlaren presentzia definitzen ez integrasarik ezta transposasarik ere ez edukitzeagatik. Irla hauei, NCBI-k dioenez, irla ainguratuak deritze. Irlatzat hartzearen edo ez hartzearen menpekotasunik gabe, hauen geneen presentziak aldakortasun maila handiagoa ematen dio genomari, gure analisi filogenomikoen ostean berretsi genuen legez.

Azpimarratzekoa da beste autore batzuk, Quiñones *et al.* (2008) eta Hepworth *et al.* (2011) bezala, kasu batzuetan ez zutela irla bakoitzaren geneen osotasuna topatu. Berdina gertatu zen gure emaitzen artean, non gutxitan topatu genuen irla bakoitzaren gene guztien % 100 topatu.

Hala ere, gure anduiengan irlen sakabanatze maila handi bat identifikatu ahal izan dugu. Irla hauen presentzia eta beraiekin erlazionatutako geneen presentzia oso zabaldua dago *C. jejuni*ren anduien artean. Hau egiaztatzen duen faktore bat, ikasitako berrogei eta hamasei anduien artean soilik lauk, irla batentzako ere ez, gene bat ere ez aurkeztean dugu. Antzeko datuak lortu zituen Quiñones *et al.* -ek (2008) bere anduiak ikastean.

Beste autore batzuk ere berretsi dutenez (Parker *et al.*, 2006; Quiñones *et al.*, 2008; Hepworth *et al.*, 2011), gure emaitzek ere adierazi zuten irlarik hedatuena anduien artean CJIE1 izan zela.

Irla hauen presentzia jatorri geografikoari lotuta dagoelakoaren antza ematen du, izan ere, anduia europarren artean presentzia maila altuago topatu genuen ez europarretan baino. Anduia europarren artean espainiarrak azpimarratu behar ditugu, beraien artean batean lau irlak topatu baikenituen. Gainera, CJIE4 irla aurkezten duten anduien gehiengoa espainiarrak dira. Era berean, Erresuma Batuko anduiak aipatu behar ditugu, zeintzuak, batek ere ez lau

irlak aurkeztu ez arren, gehienek irletariko baten bat aurkezten zuten. Halaber, Danimarkako anduien kopuru altu batek irla bat edo besteren aztarna bat ere ez zutela aurkeztu esan behar da. Honek, anduia europarrak eta ez europarrak konparatzen dituen lehenagoko lanik ez existitzearekin batera, konparaketa analisiak egitea zailtzen du.

Bestalde, lau irlen analisi filogenomikoa egiterakoan, bakoitzaren barnean topatzen dugun dibertsitateak, anduiak *cluster* batean taldekatzea ahalbidetu zuen. Izan ere, irla konkretu bat aurkezten zuten anduia guztiak *cluster* berean taldekatuak izan ziren. Asoziazio honetaz aparte eta CJIE1 irlari dagokionez, salbuespen konkretu batzuk antzeman ziren (ERL04-1823, CH-096 eta CPM-032) non irla honen bi transposasetariko bakarra detektatu zen. Hori dela eta, anduia hauek ez zeuden *cluster* berean taldekatuak. Honen azalpen posible bat anduia hauek aurkeztutako, eta irla honi zegozkion gene kopuru baxuan egon daiteke, naiz eta transposasetariko bat eduki. Tankerako zerbait gertatu zen BF08-0920156 anduiarekin, CJIE2 irla ikastean eta CH-005 eta CPM-129 anduiekin, CJIE4 aztertzean; integrasak eduki arren gene kopuru baxua aurkeztu zuten.

Irla ainguratuen kategoria CJIE2 irlaren kasuan bakarrik identifikatu zen, *cluster* orokor bakar bat azalduz, 22 anduiaren salbuespenarekin. Azken hau, aurkeztu zuen gene kopuru altua dela eta, esandako irla aurkezten zuten anduien *cluster* berean taldekatua izan zen.

Irlen aldakortasunaren azterketa sakonago batek, gene presente eta absente/dibergenteen kopuruaz gain, ari garen gene motari buruzko informazioa edukitzea ere suposatzen du. Irla hauei dagokionez, profagoen garrantzia oso erreferentziatua izan da (Fouts *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2006). Beste arrazoen artean, *C. jejuni* DNA exogenoaren eskuratzearen informatzailatzat jotzen delako. Autore hauen esanetan, CJIE1, CJIE2 y CJIE4 irlak fago jatorria edukiko lukete. Zehazki, CJIE1 irla *Campylobacteren* *Mu* motako fago batetatik etorriko litzateke eta bakteriofago beraren proteinak kodetuko litzuke. CJIE2 eta CJIE4 irlen kasuan fagoekin erlazonatutako endonukleasak, metilasak eta zenbait errepresore kodetuko litzuketen geneez osatuak egongo lirateke. Azkenik, CJIE3 irla

integratutako plasmido batetatik eratorria egongo litzateke, bere sekuentziak *C. coliren* RM2228 anduian identifikatutako megaplasmido batenarekin daukan antzekotasuna dela eta. Gure emaitzek jatorri hau berretsiko lukete, jatorri fagiko edo plasmidikoa duten geneak aurkeztu dituzten anduia kopurua altua dela eta (kasu guztietan % 66 baino gehiagokoa).

Datu hauen baitan sakontzen eta isla bakoitzarentzat fagiko edo plasmidiko bezala definitutako gene bakoitza mantentzen duten anduien portzentaiak ikertu ondoren, orokorki ondorioztatu dezakegu, CJIE1 eta CJIE2 irlekiko, fago jatorriko gene hauen galera ez dela masiboa izan. Izan ere, gene puntual batzuk izan ezik, % 50 inguruko baloreak aurkeztu baitzituzten. Era berean, CJIE4 aipatu behar dugu, non gene fagiko hauen mantentze balio baxuak lortu ziren, galera nabarmenago bat igartzen delarik. Azkenik, CJIE3 irlan baloreak oso anitzak izan ziren.

Garrantzia duten beste gene batzuk DNAsak dira, irla batzuetan agertzen direnak. *C. jejuni* espeziea naturalki kompetentea suposatzen da DNA eskuratzeko eta dibertsitate genetiko maila altua aurkezten du. Halere, naturalki kompetenteak ez diren anduiak existitzen dira eta erlatiboki egonkor mantendu diren leinu klonal desberdinak. Gaasbeek *et al.* -ek (2008), CGH analisisien bidez *microarrayak* erabiliz, CJIE1 topatu zuten proportzio altuenean anduia ez naturalki kompetenteen artean. Gainera, irla honen barnean zegoen *dns* (*CJE0256*) genea identifikatu zuten, zeinak DNasa bat kodetzen zuen. Honek, *C. jejuni* anduian transformazio naturala inhibituko luke DNasa honen bidez, eta era berean, honek leinu klonal egonkorak mantentzeko ahalmenaz hornituko lituzke. Urte bat geroago, autore hauek naturalki kompetenteak ez ziren anduiak topatu zituzten *dns* genea izan ez arren. Ordean, endonukleasak kodetzen zituzten *CJE0566* (CJIE2) eta *CJE1441* (CJIE4) geneak aurkezten zituzten, kompetentzia natural hau inhibitzen zutenak.

Gure anduien artean, hogeita bost positiboak izan ziren *CJE0256* genearekiko, hamabost *CJE0566* -rekiko eta hamaika *CJE1441* -rekiko. Horregatik ondoriozta dezakegu, endonukleasak kodetzen dituzten irla hauen eskuraztea, abantailatsua izan daitekeela nitxo ekologiko desberdinetara moldatzeko eta bizirauteko, izan ere, fagoen infekzioekiko defentsa

mekanismo bat izango litzateke. Beste alde batetik, nukleasa hauen presentziak egonkortasun genetikoa ahalbidetuko luke.

A horizontal decorative bar at the bottom of the page. It features a dark background with silhouettes of DNA double helix structures and various nucleotide bases (A, T, C, G) scattered across it. In the center, the word "Ondorioak" is written in a purple, serif font.

Ondorioak

1. *Microarrayak* erabiliz, CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) bidezko analisietan oinarritutako genomotipifikazioa, geografikoki oso banatuak dauden herri desberdineko eta ez klonalak diren *C. jejuni* anduietan aldakortasun genetikoa determinatzeko teknika aproposa suertatu zen.
2. CGH analisiak zioenez, giza eta oilasko anduien artean antzekotasun handia topatu zen edukitze genetikoari dagokionez, bakartze iturriaren markatzaile posiblerik detektatu ez zelarik. Aztertutako anduien artean aurkitutako erlazio filogenomiko bakarra konplexu klonalei zegokion, konplexu konkretu bati hertsiki lotutako gene bat edo gehiago argi identifikatuz. Hau *C8J_0011- C8J_0014*, *Cj11828-0001 -0007* eta *C8J_0009* geneen kasua da; 45 konplexu klonalarekin lotuak, eta *Cj1135-Cj1145c*, *Cj1549c-Cj1553c* eta *CJE1101* besteak beste; 21 konplexuarekin erlazionatuak.
3. Influentzia geografikoa, printzipalki aldakortasun genetiko orokorrean edota zundaren jatorriaren araberrako hibridazio portzentaian ikus daiteke. Zeelanda Berriko anduiak edota jatorri ez europarreko anduien osotasuna kasu, zeintzuek gene osagarrien absentsia portzentai altuenak aurkeztu zituzten eta bestalde, anduia espainiarren kasua (Euskadi), anduia europarren artean, zeintzuak gene plasmidiko (pTet) eta irla genomikoei (CJIE) dagokionez aldakortasun genetikoaren portzentai altuenak aurkeztu zituzten.
4. Plastikotasun hiperaldakorreko eremuen (PR) presentzia eta aniztasuna, *C. jejuni*ren aldakortasun genetikoaren oinarri printzipal modura berrezten da. Azpimarratzekoak dira, ez bakarrik beste autore batzuk definitutako PR eremuak, baizik eta lan honetan identifikatutako bi eremu hiperaldakor berriak ere (*Cj0814-Cj0819* eta *Cj1158-Cj1160c*), sakabanatuta detektatutako zenbait gene bezala (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538* eta *Cj0617-Cj0618*).

5. CJIE elementu genetikoak (*C. jejuni Integrated Elements*), irla genetikoak deituak, *C. jejuni*n topatuko genukeen aldakortasun genetikoaren arduradunak dira era berean. Elementu hauen edukitze genikoa, integrasak eta transposasak kodetzen dituzten geneak dituztenetik (irla genetiko moduan izendatuak), integrasak edo transposasak eduki ez arren, hauen gene kopuru altu bat zituztenetaraino (irla ainguratuak deritzenak) edota gene kopuru baxu bat zutenetaraino (*like* irlak) zioan.
6. Irla genomikoei lotuta dauden gene plasmidiko edo fagikoen prebalentzia altuak, CJIE3 irlaren jatorri plasmidikoaren hipotesia eta CJIE1, CJIE2 eta CJIE4 irlen jatorri fagikoarena berrezten du. Azken hauetan, gene fagikoen kopurua aldakorra da irlen artean, CJIE4 delarik gene hauen galera nabarmenago bat aurkezten duena.
7. Birulentziarekin erlazionatutako geneen osotasuna unitate funtzional modura hartuz, aipatzekoa da denek ez dutela era berean parte hartzen dibertsitate genetikoan. Hauen gehiengo bat *core* geneak direla berrezten da, beraz anduia birulento eta ez birulentoen artean desberdintzeko gene hauen espresioa, transkriptomika edota proteomika bidez aztertu beharko litzateke.
8. *C. jejuni*n identifikatutako bi plasmidoak, pTet eta pVir, aldakortasun genetikoan parte hartzen dute ere, baina maila baxuagoan. Gainera, gure emaitzek, *tet0* genearen, tetraziklinaren erresistentziaren erantzule, kokatze kromosomiko posible bat berrezten dute.
9. Irla genomikoen (CJIE) presentziak *C. jejuni*n, biziraupenarekin erlazionatutako paper biologiko garrantzitsu bat suposarazi dezake. Nukleasak kodetzen dituzten irlen kasu, fagoen infekzioarekiko erresistentzia emango luketelako eta gainera, egonkortasun genetiko ebolutiboan lagunduko luketelako, *C. jejuni*ren kompetentzia naturalarengan negatiboki arituz eta ondorioz, DNA exogenoa bereganatzeko ahalmenean eraginez.



Laburpena

***Campylobacter jejuni*ren genomotipifikazioa DNA *microarray*en bidez. Markatzaileen eta dibertsitate genetikoaren analisisia**

Campylobacter jejuni gaur egungo beherako bakteriarren zio nagusienetakoa da mundu mailan eta era berean Guillain Barré eta Miller Fisher bezalako gaitz neurologiko periferikoen aitzindari ohikoena (Blaser *et al.*, 2000). Jakietan edo uretan ugaltzeko gaitasunik izan ez arren, hauengan azkar eta erraz zabaltzeko kapaza da *Campylobacter*. Horrela, gutxi edo gutxiegi kuzinatutako oilasko pusketa batean unitate gutxi batzuekin nahikoa da gaitza sortzeko (Altekruse *et al.*, 1999). Hegaztien haragi kutsatua eta gutxi kuzinatua eta tratatu gabeko ur edota ur naturaletan bainatzea, etxe inguruetan gertatutako noizbehinkako infekzioen arrisku faktore nagusienetarikoen artean kokatu dira (Schönberg-Norio *et al.*, 2004), urtaroko balio gorenenak uztailan eta abuztuan izanda (Rautelin *et al.*, 2000).

*Campylobacter*en infekzio iturri desberdinen bilatzea, azken urteotan Gobernu, Instituzio eta zientzialariek asko jarraitu eta desiratutako helburu bat izan da. Horren emaitza moduan, tipifikazio fenotipiko eta genotipikorako hamaika sistema garatu dira, eta era berean datu base kopuru handi bat. *Campylobacter*en tipifikazioan erabilitako sistemen motak oso anitzak dira, adibidez: ribotipifikazioa (Fayos *et al.*, 1992), eremu pultsatuko elektroforesia edo PFGE (Yan *et al.*, 1991), PCR-an oinarritutako teknikak, PCR-RFLP bezala (Kokotovic & On, 1999; Wassenaar & Newell, 2000; Schouls *et al.*, 2003; Llovo *et al.*, 2003) edota geneen sekuentziazioan oinarritutako teknikak, SVR-*flaA* (Meinersmann *et al.*, 1997) edota *housekeeping* geneetan oinarritutako MLST bezala (Sails *et al.*, 2003; Dingle *et al.*, 2005).

Egindako esfortzu guzti hauek ere, eskainitako kontribuzioek ez dute ahalbidetzen infekzio iturria zehaztea, honek elika-katean *C. jejuni*ren presentzia murrizteko kontrol estrategia eraginkorren bilatzea asko zaildu du. Metodo hauetariko batek ere ez du anduien artean ikusitako aldakortasunaren oinarri genetikoan sakontzea ahalbidetu, hauetariko

gehienak genomaren zati txiki baten analisisira mugatuta baitaude. Oraintsu, genoma osoaren azterketarengan jarri da interesa, honen sekuentziazioak *microarray*en garatzea suposatu baitu gene ugariaren azterketarako, aldi berean.

Hau guzti hau dela eta, eta markatzaile genetiko gisa erabiltzeko geneak identifikatzeko asmoarekin, jatorri geografiko eta bakartze iturri desberdinetatiko *Campylobacter jejuni* anduien artean aldakortasun genomikoa (dibertsitatea edota plastikotasun posiblea) determinatzea izan zen helburu lan honetan. Egindako analisiak CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) bidez, *C. jejuni*ren genoma unibertsala daukaten ADN *microarray*ak erabiliz, egindako konparaketak jasotzen ditu.

Honetarako, gure helburu espezifikoak honakoak izan ziren:

1. DNA *microarray*an gertatutako hibridazioentzako baldintza esperimental egokienak determinatu, entseguen arteko erreproduzigarritasuna bermatzeko, gurutzatutako hibridazioak murrizteko eta fluoreszentzia seinaleen artean geneen presentziak eta absentziak edo dibergentzia bereizteko.
2. *flaA* genearen SVR (*Short Variable Region*) eremuaren aleloetan oinarrituta, giza eta oilasko laginetatik bakandutako eta bakartze ez klonalak dituen *C. jejuni* anduien bilduma multigeografiko bat eraiki.
3. Markatzaile igarle posibleak topatzeko asmoarekin, anduia bilduma CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) bidez, DNA *microarray*ak (genoma unibertsala) erabiliz, analizatzea.
4. Aukeratutako anduiek aurkezten duten aldakortasun maila eta estruktura genetikoa determinatu inferentzia filogenetikoan oinarritutako metodo bayesiarrak erabiliz.

Lehenengo bi helburuak lortu zirelarik - hibridaziorako baldintza esperimental egokien determinazioa eta anduien bilduma multigeografiko baten eraiketa - CGH analisisa eta genomaren aldakortasunaren jatorriari eta markatzaile genetiko posibleei buruzko eztabaida baimendu zuten matrize bitarrak eraiki ziren.

ADN *microarray*ek genoma osoak konparatzeko teknologia ordezkarria suposatzen dute, *microarray*an dagoen erreferentzia genomarekin alderatuz gure anduiaren presente edo absente dauden geneak ezagutzen lagunduz. Genoma osoen konparaketek, normalean bi gene mota detektatzen dituzte. Alde batetik "core geneak" deritzenak, espezi bereko anduia guztiek konpartituak, eta beste alde batetik "gene osagarriak", espezi bateko anduia batean edo bat baino gehiagotan egon daitezkeenak eta, normalean, gene berrien eskuratzetik datozenak (Dorrell *et al.*, 2005).

*C. jejuni*n egindako aldakortasun genetikoaren lehen ikusi bat (Dorrell *et al.*, 2001) DNA *microarray*ekin egindako ikasketen bidez sakonduak izan da, zeintzuek mikroorganismo honek dibertsitate genetiko maila altua aurkeztzen dutela agerian utzi duten eta berriz, plastikotasun maila baxua (Taboada *et al.*, 2004).

NCTC11168 anduiarekin egindako analisi konparatiboen bitartez, aztertutako anduiaren artean geneen % 86 kontserbazio maila altua dutela erakusten dute, hauek *C. jejuni*ren espezie espezifikoko modura definituz. Gene absente/dibergenteen portzentai altuenak beste autoreek deskribatutako eremu hiperaldakorretan detektatu ziren (Dorrell *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2003; Taboada *et al.*, 2004; Poly *et al.*, 2004). Gainera, RM1221 anduiaren deskribatutako lau irla genomikoen presentziak eta plasmidoen eskuragarritasun posibleak ere gure anduiaren aldakortasun genetikoa sustatu zuten.

Beste alde batetik, jatorri geografikoarekin eta bakartze iturriarekin erlazionatutako markatzaile genetiko posible baten topatzean saiatu ginen. Lehendik ere, Champion *et al.*-ek (2005), ikasketa filogenomiko konparatiboen bitartez, geneen *cluster* konkretu bat (*Cj1321-Cj1326*) *C. jejuni*ren bakartze iturriaren markatzaile posible modura proposatu zuten.

Esperotako emaitzak alde batera utziz, hipotesi hau ez zen nahikoa kontrastatzea lortu, izan ere, soilik oilaskoen % 57-an topatu izan zen. Hau guzti hau kontutan hartuta eta DNA *microarray*en teknologia eta inferentzia filogenetiko bayesiarrean oinarritutako metodoak konbinatuz, bakartze iturriarekin erlazonatutako gene espezifikoak identifikatzen saiatu ginen, geroago PCR bidez erraz detektagarriak izango liratekeenak. Hala ere, gure anduien artean ez genuen markatzaile fidagarri bat ere topatu.

Lan hau guzti hau kontutan hartuta, ondorengo ondorioetara iritzi zen:

1. *Microarray*ak erabiliz, CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) bidezko analisisetan oinarritutako genomotipifikazioa, geografikoki oso banatuak dauden herri desberdineko eta ez klonalak diren *C. jejuni* anduietan aldakortasun genetikoak determinatzeko teknika aproposa suertatu zen.
2. CGH analisiak zioenez, giza eta oilasko anduien artean antzekotasun handia topatu zen edukitze genetikoari dagokionez, bakartze iturriaren markatzaile posiblerik detektatu ez zelarik. Aztertutako anduien artean aurkitutako erlazio filogenomiko bakarra konplexu klonalei zegokion, konplexu konkretu bati hertsiki lotutako gene bat edo gehiago argi identifikatuz. Hau *C8J_0011- C8J_0014*, *Cj11828-0001 -0007* eta *C8J_0009* geneen kasua da; 45 konplexu klonalarekin lotuak, eta *Cj1135-Cj1145c*, *Cj1549c-Cj1553c* eta *CJE1101* besteak beste; 21 konplexuarekin erlazonatuak.
3. Influentzia geografikoa, printzipalki aldakortasun genetiko orokorrean edota zundaren jatorriaren araberrako hibridazio portzentaian ikus daiteke. Zeelanda Berriko anduiak edota jatorri ez europarreko anduien osotasuna kasu, zeintzuek gene osagarrien absentzia portzentai altuenak aurkeztu zituzten eta bestalde, anduia espainiarren kasua (Euskadi), anduia europarren artean, zeintzuek gene plasmidiko (pTet) eta irla genomikoei (CJIE) dagokionez aldakortasun genetikoaren portzentai altuenak aurkeztu zituzten.

4. Plastikotasun hiperaldakorreko eremuen (PR) presentzia eta aniztasuna, *C. jejuni*ren aldakortasun genetikoaren oinarri printzipal modura berrezten da. Azpimarratzekoak dira, ez bakarrik beste autore batzuk definitutako PR eremuak, baizik eta lan honetan identifikatutako bi eremu hiperaldakor berriak ere (*Cj0814-Cj0819* eta *Cj1158-Cj1160c*), sakabanatuta detektatutako zenbait gene bezala (*Cj0170-Cj0171*, *Cj0537-Cj0538* eta *Cj0617-Cj0618*).
5. CJIE elementu genetikoak (*C. jejuni Integrated Elements*), irla genetikoak deituak, *C. jejuni*n topatuko genukeen aldakortasun genetikoaren arduradunak dira era berean. Elementu hauen edukitze genikoa, integrasak eta transposasak kodetzen dituzten geneak dituztenetatik (irla genetiko moduan izendatuak), integrasak edo transposasak eduki ez arren, hauen gene kopuru altu bat zituztenetaraino (irla ainguratuak deritzenak) edota gene kopuru baxu bat zutenetaraino (*like* irlak) zioan.
6. Irla genomikoei lotuta dauden gene plasmidiko edo fagikoen prebalentzia altuak, CJIE3 irlaren jatorri plasmidikoaren hipotesia eta CJIE1, CJIE2 eta CJIE4 irlen jatorri fagikoarena berrezten du. Azken hauetan, gene fagikoen kopurua aldakorra da irlen artean, CJIE4 delarik gene hauen galera nabarmenago bat aurkezten duena.
7. Birulentziarekin erlazionatutako geneen osotasuna unitate funtzional modura hartuz, aipatzekoa da denek ez dutela era berean parte hartzen dibertsitate genetikoan. Hauen gehiengo bat *core* geneak direla berrezten da, beraz anduia birulento eta ez birulentoen artean desberdintzeko gene hauen espresioa, transkriptomika edota proteomika bidez aztertu beharko litzateke.
8. *C. jejuni*n identifikatutako bi plasmidoak, pTet eta pVir, aldakortasun genetikoan parte hartzen dute ere, baina maila baxuagoan. Gainera, gure emaitzek, *tet0* genearen, tetraziklinaren erresistentziaren erantzule, kokatze kromosomiko posible bat berrezten dute.

9. Irla genomikoen (CJIE) presentziak *C. jejuni*n, biziraupenarekin erlazionatutako paper biologiko garrantzitsu bat suposarazi dezake. Nukleasak kodetzen dituzten irlen kasu, fagoen infekzioarekiko erresistentzia emango luketelako eta gainera, egonkortasun genetiko ebolutiboan lagunduko luketelako, *C. jejuni*ren kompetentzia naturalarengan negatiboki arituz eta ondorioz, DNA exogenoa bereganatzeko ahalmenean eraginez.

A decorative horizontal bar at the bottom of the page. It features a central wooden-texture background with the word 'Bibliografía' in purple. The bar is flanked by dark, abstract patterns that include silhouettes of leaves and branches, as well as faint DNA double helix structures and the letters 'C', 'A', 'G', 'T' in various colors.

Bibliografía

1. **A Bryant, P., Venter, D., Robins-Browne, R., and N. Curtis.** 2004. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases *Lancet Infectious Diseases* 4: 100–111.
2. **Abuoun, M., Manning, G., Cawthraw, S.A., Ridley, A., Ahmed, I.H., Wassenaar, T.M., and D.G. Newell .** 2005. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infection and Immunity* 73(5):3053-62.
3. **Açik, M.N., and B. Cetinkaya.** 2006. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *Journal of Medical Microbiology* 55(Pt 3):331-4.
4. **Alfredson, D.A., and V. Korolik.** 2003. Sequence analysis of a cryptic plasmid pCJ419 from *Campylobacter jejuni* and construction of an *Escherichia coli*-*Campylobacter* shuttle vector. *Plasmid* 50(2):152-60.
5. **Allos, B.M.** 1997. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *Journal of Infection Disease* 176 Suppl 2:S125-8.
6. **Alm, R. A., Guerry, P., and T.J. Trust.** 1993. Significance of duplicated flagellin genes in *Campylobacter*. *Journal of Molecular Biology* 230: 359-363.
7. **Alm, R.A., and T.J. Trust.** 1999. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *Journal of Molecular Medicine* 77(12):834-46.
8. **Alm, R.A., Guerry, P., Power, M.E., Lior, H., and T.J. Trust.** 1991. Analysis of the role of flagella in the heat-labile Lior serotyping scheme of thermophilic *Campylobacters* by mutant allele exchange. *Journal of Clinical Microbiology* 29(11):2438-45.
9. **Altekruse, S.F., and L.K. Tollefson.** 2003. Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223(4):445-52.

10. **Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I. and D.L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni* – An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* Vol.5, No.1: 28-35.
11. **Anjum, M.F., Lucchini, S., Thompson, A., Hinton, J.C., and M.J. Woodward.** 2003. Comparative genomic indexing reveals the phylogenomics of *Escherichia coli* pathogens. *Infection and Immunity* 71(8):4674-83.
12. **Ashgar, S.S., Oldfield, N.J., Wooldridge, K.G., Jones, M.A., Irving, G.J., Turner, D.P., and D.A. Ala'Aldeen.** 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal of Bacteriology* 189(5):1856-65.
13. **Bachtiar, B.M., Coloe, P.J., and B.N. Fry.** 2007. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49: 149—154.
14. **Bacon, D.J., Alm, R.A., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J., and P. Guerry.** 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity* 68(8):4384-90.
15. **Bacon, D.J., Alm, R.A., Hu, L., Hickey, T.E., Ewing, C.P., Batchelor, R.A., Trust, T.J., and P. Guerry.** 2002. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity* 70(11):6242-50.
16. **Bacon, D.J., Szymanski, C.M., Burr, D.H., Silver, R.P., Alm, R.A., and P. Guerry.** 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology* 40: 769—777.
17. **Bang, D.D., Borck, B., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., and M. Madsen.** 2004. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Food Protection* 67(10):2171-7.

18. **Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., and M. Madsen.** 2003. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Applied Microbiology* 94(6):1003-14.
19. **Bang, D.D., Scheutz, F., Ahrens, P., Pedersen, K., Blom, J., and M. Madsen.** 2001. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. *Journal of Medical Microbiology* 50(12):1087-94.
20. **Batchelor, R.A., Pearson, B.M., Friis, L.M., Guerry, P., and J.M. Wells.** 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* 150(Pt 10):3507-17.
21. **Begue, P., Broussin, B., Carros, I., and H. Vu Thien.** 1989. Pathologie intestinale á *Campylobacter*. *Medical Maladie Infections* 19: 48-54.
22. **Behringer, M., Miller, W.G., and O.A. Oyarzabal.** 2011. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *Journal of Microbiological Methods* 84(2):194-201.
23. **Benz, I., and M.A. Schmidt.** 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* 45(2):267-76.
24. **Biswas, D., Hannon, S.J., Townsend, H.G., Potter, A., and B.J. Allan.** 2011. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *International Microbiology* 14:25-32.
25. **Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., and M.J. Blaser.** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases* 157: 472-479.

26. **Blaser MJ.** 2000. *Campylobacter jejuni* and related species. p. 2276-2285. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R.D. Dolin (Ed). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pen.
27. **Blaser, M.J.** 1995. *Campylobacter* and related species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors, *Principles and practice of infectious diseases*, vol. 2. New York, NY: Churchill Livingstone; pp. 1948-56
28. **Blaser, M.J.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Infectious Diseases* 176 (Suppl 2): S103-5
29. **Bolton, F.J., Coates, D. and D.N. Hutchinson.** 1985. Thirteen month survey of campylobacters in a river system subject to sewage effluent discharge, pp. 278-279. In *Campylobacter III*. Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Lior, H. and B. Rowe (ed.). Public Health Laboratory Service, London.
30. **Borucki, M.K., Kim, S.H., Call, D.R., Smole, S.C., and F. Pagotto.** 2004. Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5270–5276.
31. **Borucki, M.K., Krug, M.J., Muraoka, W.T., and R. Call.** 2003. Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray. *Veterinary Microbiology* 4: 351–362.
32. **Bryan, F.L., and M.P. Doyle.** 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection* 58: 326-344.
33. **Burnens, A.P., Wagner, J., Lior, H., Nicolet, J., and J. Frey.** 1995. Restriction fragment length polymorphisms among the flagellar genes of the Lior heat-labile serogroup reference strains and field strains of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Epidemiology and Infection* 114(3):423-31.

34. **Call, D.R., Borucki, M.K., and F.J. Loge.** 2003. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *Journal of Microbiological Methods* 53: 235–243.
35. **Canton, P., Hoen, B., Gerard, A., May, T. and P. Burdin.** 1989. Infections à *Campylobacter* d'origine intestinale, manifestations extra-digestives. *Medical Maladie Infections* 19: 43-47.
36. **Carpaij, N., Fluit, A.C., Lindsay, J.A., Bonten, M.J., and R.J. Willems.** 2009. New methods to analyse microarray data that partially lack a reference signal. *BMC Genomics* 13; 10: 522.
37. **Carter, B., Wu, G., Woodward, M.J., and M.F. Anjum.** 2008. A process for analysis of microarray comparative genomics hybridisation studies for bacterial genomes. *BMC Genomics* 29; 9:53.
38. **Cassat, J.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Murphy, E., Projan, S., and M.S. Smeltzer.** 2005. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* musculoskeletal isolates. *Journal of Bacteriology* 187: 576–592.
39. **Champion, O.L., Gaunt, M.W., Gundogdu, O., Elmi, A., Witney, A.A., Hinds, J., Dorrell, N., and B.W. Wren.** 2005. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 102(44):16043-8.
40. **Chang, N. and D.E. Taylor.** 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *Sall* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *Journal of Bacteriology* 172: 5211-5217.
41. **Connell, S.R., Trieber, C.A., Dinos, G.P., Einfeldt, E., Taylor, D.E., and K.H. Nierhaus.** 2003. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO Journal* 22(4):945-53.

42. **Dasti, J.I., Gross, U., Pohl, S., Lugert, R., Weig, M., and R. Schmidt-Ott** . 2007. Role of the plasmid-encoded tet(O) gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology* 56(Pt 6):833-7.
43. **Datta, S., Niwa, H., and K. Itoh**. 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology* 52(Pt 4):345-8.
44. **de Boer, P., Duim, B., Rigter, A., van Der Plas, J., Jacobs-Reitsma, W.F., and J.A. Wagenaar**. 2000. Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal Clinical Microbiology* 38(5):1940-6.
45. **De cesare, A., Sheldon, B.W., Smith, K.S., and L.A. Jaykus**. 2003. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection* 66(9):1587-94
46. **Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., and J. Sternon**. 1972. Acute enteritis due to related *vibrio*: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases* 125(4): 390-392.
47. **Denes, A.S., Lutze-Wallace, C.L., Cormier, M.L., and M.M. Garcia**. 1997. DNA fingerprinting of *Campylobacter fetus* using cloned constructs of ribosomal RNA and surface array protein genes. *Veterinary Microbiology* 54(2):185-93.
48. **Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., and P. Colin**. 1999. Development of a m-PCR for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 406-410.
49. **Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Bootsma, H. J., Willems, R. J. L., Urwin, R., and M.C.J. Maiden**. 2001. Multilocus

- Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 14-23.
50. **Dingle, K. E., F. M. Colles, D. Falush, and M. C. J. Maiden.** 2005. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 43:340–347.
51. **Djordjevic, S. P., Unicomb, L. E., Adamson, P. J., Mickan, L., Rios, R., and the Australian Campylobacter Subtyping Study Group.** 2007. Clonal Complexes of *Campylobacter jejuni* Identified by Multilocus Sequence Typing Are Reliably Predicted by Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses of the *flaA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 102–108.
52. **Dorrell, N., Hinchliffe, S.J., and B.W. Wren.** 2005. Comparative phylogenomics of pathogenic bacteria by microarray analysis. *Current Opinion in Microbiology* 8: 1–7.
53. **Dorrell, N., Mangan, J.A., Laing, K.G., Hinds, J., Linton, D., Al-Ghusein, H., Barrell, B.G., Parkhill, J., Stoker, N.G., Karlyshev, A.V., Butcher, P.D., and B.W. Wren.** 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Research* 11(10):1706-15.
54. **Duim, B., Vandamme, P.A., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J.R., and J.A. Wagenaar.** 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 147(Pt 10):2729-37.
55. **Duong, T., and M.E. Konkel.** 2009. Comparative studies of *Campylobacter jejuni* genomic diversity reveal the importance of core and dispensable genes in the biology of this enigmatic food-borne pathogen. *Current Opinion Biotechnology* 20(2):158-65.
56. **Effler, P., leong, M.C., Kimura, A., Nakata, M., Burr, R., and E. Cremer.** 2001. Sporadic *Campylobacter jejuni* infection in Hawaii: associations with prior antibiotic use and commercially prepared chicken. *Journal of Infectious Diseases* 183(7):1152-5

57. **Engberg, J., On, S.L., Harrington, C.S., and P. Gerner-Smidt.** 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 286-291
58. **Escherich, T.** 1886. Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (Articles adding to the knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies). *Münchener Med Wochenschrift* 1886, 33: 815-817.
59. **Fayos, A., Owen, R.J., Desai, M., and J. Hernandez.** 1992. Ribosomal RNA gene restriction fragment diversity amongst Lior biotypes and Penner serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters* 74: 87–93.
60. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on pylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 783-791.
61. **Feodoroff, B., Ellström, P., Hyytiäinen, H., Sarna, S., Hänninen, M.L., and H. Rautelin.** 2010. *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathogens* 2(1):22.
62. **Fernández-Astorga, A., Guridi, A., Martínez, I., Girbau, C., Churruca, E., and R. Alonso.** 2007. Potenciales marcadores genéticos de *Campylobacter jejuni* asociados a patogénesis y fuente de infección. XXI Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Sevilla 2007.
63. **Fields, P.I., and D.L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni*. *Clinics in Laboratory Medicine* 19(3):489-504, v.
64. **Fitzgerald, C., Hesel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J., and P.I. Fields.** 2001. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *Journal of Clinical Microbiology* 39(7):2386-90.

65. **Flanagan, R.C., Neal-McKinney, J.M., Dhillon, A.S., Miller, W.G., and M.E. Konkel.** 2009. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and Immunity* 77(6):2399-407.
66. **Foley, S.L., Lynne, A.M., and R. Nayak.** 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 9(4):430-40.
67. **Foley, S.L., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Rhodes, B, Fedorka-Cray, P.J., Simjee, S, and S. Zhao.** 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates obtained from food animal sources. *Journal of Clinical Microbiology* 44(10):3569-77.
68. **Fouts, D.E.** 2006. Phage_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences. *Nucleic Acids Research* 34(20):5839-51.
69. **Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Mandrell, R.E., Miller, W.G., Rasko, D.A., Ravel, J., Brinkac, L.M., DeBoy, R.T., Parker, C.T., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Sullivan, S.A., Shetty, J.U., Ayodeji, M.A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M.C., Badger, J.H., Fraser, C.M., and K.E. Nelson.** 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *campylobacter* species. *PLoS Biology* 3(1):e15.
70. **Franklin, R.B., Taylor, D.R., and A.L. Mills.** 1999. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA RAPD. *Journal of Microbiological Methods* 35: 225–235.
71. **Friedman, C.R., Hoekstra, R.M., Samuel M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., et al.** 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter jejuni* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases* 38(Suppl. 3):S285-96

72. Friis, C., Wassenaar, T.M., Javed, M.A., Snipen, L., Lagesen, K., Hallin, P.F., Newell, D.G., Toszeghy, M., Ridley, A., Manning, G., and D.W. Ussery. 2010. Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1. *PLoS One* 5(8):e12253.
73. Friis, L.M., Pin, C., Taylor, D.E., Pearson, B.M., and J.M. Wells. 2007. A role for the *tet(O)* plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. *Plasmid* 57(1):18-28.
74. Fry, B.N., Feng, S., Chen, Y.Y., Newell, D.G., Coloe, P.J., and V. Korolik. 2000. The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infection and Immunity* 68(5):2594-601.
75. Frye, J.G., Lindsey, R.L., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, F., McClelland, M., Jackson, C.R., Englen, M.D., Meinersmann, R.J., Berrang, M.E., Davis, J.A., Barrett, J.B., Turpin, J.B., Thitaram, S.N., and P.J. Fedorka-Cray. 2010. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database. *Microbial Drug Resistance* 16(1):9-19.
76. Gaasbeek, E.J., Wagenaar, J.A., Guilhabert, M.R., van Putten, J.P., Parker, C.T., and F.J. van der Wal. 2010. Nucleases encoded by the integrated elements CJIE2 and CJIE4 inhibit natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 192(4):936-41.
77. Gaasbeek, E.J., Wagenaar, J.A., Guilhabert, M.R., Wösten, M.M., van Putten, J.P., van der Graaf-van Bloois, L., Parker, C.T., and F.J. van der Wal. 2009. A DNase encoded by integrated element CJIE1 inhibits natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 191(7):2296-306.
78. Garaizar, J., Rementeria, A., and S. Porwollik. 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47(2):178-89.

79. **Gargiulo, A., Sensale, M., Marzocco, L., Fioretti, A., Menna, L.F., and L. Dipineto.** 2011. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and cytolethal distending toxin (CDT) genes in common teals (*Anas crecca*). *Veterinary Microbiology* 150(3-4):401-4.
80. **Giannino, M.L., Aliprandi, M., Feligini, M., Vanoni, L., Brasca, M., and F. Fracchetti.** 2009. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *Journal of Microbiology Methods* 78(2):181-8.
81. **Gilbert, M., Brisson, J.R., Karwaski, M.F., Michniewicz, J., Cunningham, A.M., Wu, Y., Young, N.M., and W.W. Wakarchuk.** 2000. Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *Journal of Biological Chemistry* 275(6):3896-906.
82. **Gilbert, M., Karwaski, M.F., Bernatchez, S., Young, N.M., Taboada, E., Michniewicz, J., Cunningham, A.M., and W.W. Wakarchuk.** 2002. The genetic bases for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 277(1):327-37.
83. **Girbau, C.** 2007. Glicoproteínas y viabilidad celular en *Campylobacter jejuni*. Tesis Doctoral.
84. **Gomez-Garces, J.L., Cogollos, R., and J.L. Alos.** 1995. Susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Campylobacter jejuni* to 11 oral antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39(2):542-44.
85. **Gonzalez, I., Grant, K. A., Richardson, P. T., Park, S. F., and M. D. Collins.** 1997. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 759-763.

86. **Gonzalez, M., Hakkinen, M., Rautelin, H., and M.L. Hänninen.** 2009. Bovine *Campylobacter jejuni* strains differ from human and chicken strains in an analysis of certain molecular genetic markers. *Applied Environmental Microbiology* 75(4):1208-10.
87. **Guerry, P., Alm, R.A., Power, M.E., Logan, S.M. and T.J. Trust.** 1991. Role of flagellin genes in *Campylobacter* mobility. *Journal of Bacteriology* 173: 4757-4764.
88. **Guerry, P., Doig, P., Alm, R.A., Burr, D.H., Kinsella, N., and T.J. Trust.** 1996. Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin. *Molecular Microbiology* 19(2):369-78.
89. **Guerry, P., Szymanski, C.M., Prendergast, M.M., Hickey, T.E., Ewing, C.P., Pattarini, D.L., and A.P. Moran.** 2002. Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro. *Infection and Immunity* 70(2):787-93.
90. **Hänninen, M.L., Pajarre, S., Klossner, M.L., and H. Rautelin.** 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 36(6):1787-9.
91. **Hänninen, M.L., Perko-Mäkelä, P., Pitkälä, A., and H. Rautelin.** 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *Journal of Clinical Microbiology* 38(5):1998-2000.
92. **Hannon, S.J., Taboada, E.N., Russell, M.L., Allan, B., Waldner, C., Wilson, H.L., Potter, A., Babiuk, L., and H.G. Townsend .** 2008. Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 47(2):410-20.
93. **Harrington, C.S., Thomson-Carter, F.M., and P.E. Carter.** 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology* 35(9):2386-92.

94. **Hendrixson, D.R., and V.J. DiRita.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology* 52(2):471-84.
95. **Hepworth, P.J., Ashelford, K.E., Hinds, J., Gould, K.A., Witney, A.A., Williams, N.J., Leatherbarrow, H., French, N.P., Birtles, R.J., Mendonca, C., Dorrell, N., Wren, B.W., Wigley, P., Hall, N., and C. Winstanley.** 2011. Genomic variations define divergence of water/wildlife-associated *Campylobacter jejuni* niche specialists from common clonal complexes. *Environmental Microbiology* 13(6):1549-60.
96. **Hernández Haba, J.** 1993. Incidence and control of *Campylobacter* in foods. *Microbiología SEM* 9: 57-65.
97. **Hickey, T.E., Majam, G., and P. Guerry.** 2005. Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity* 73(8):5194-7.
98. **Hickey, T.E., McVeigh, A.L., Scott, D.A., Michielutti, R.E., Bixby, A., Carroll, S.A., Bourgeois, A.L., and P. Guerry.** 2000. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 68(12):6535-41.
99. **Hochman, A.** 1997. Programmed cell death in prokaryotes. *Critical Reviews in Microbiology* 23: 207-214.
100. **Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R.O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., Clark, C., Perbost, C., Jarvie, T., Du, L., and J.E. Gal.** 2006. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infection and Immunity* 74(8):4694-707.
101. **Hou, Y.M.** 1999. Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends in Biochemical Sciences* 24(8):295-8.
102. **Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., and J.P. Bollback.** 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294(5550):2310-4.

103. **Hugdahl, M.B., Beery, J.T., and M.P. Doyle.** 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 56(6):1560-6.
104. **Hughes, T.R., Mao, M., and A.R. Jones.** 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology* 19: 342–347.
105. **Iriarte, M.P., and R.J. Owen.** 1996. Repetitive and arbitrary primer DNA sequences in PCR-mediated fingerprinting of outbreak and sporadic isolates of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 15(1):17-22.
106. **Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., and K. Nygård.** 2008. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infectious Diseases* 24;8:128.
107. **Jesse, T.W., Pittenger-Alley, L.G., and M.D. Englen.** 2006. Sequence analysis of two cryptic plasmids from an agricultural isolate of *Campylobacter coli*. *Plasmid* 55(1):64-9.
108. **Johnson, W.M., and H. Lior.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microbial Pathogenesis* 4(2):115-26.
109. **Jolley K. A., Feil E. J., Chan M. S., and M.C. Maiden.** 2001. Sequence Type Analysis and Recombinational Tests (START). *Bioinformatics* 17: 1230-1231.
110. **Joyce, E.A., Chan, K., Salama, N.R., and S. Falkow.** 2002. Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation. *Nature Reviews Genetics* 3: 462–473.
111. **Kado, C.I., and S.T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology* 145: 1365-1373.
112. **Kärenlampi, R., Rautelin, H., and M.L. Hänninen.** 2007. Evaluation of genetic markers and molecular typing methods for prediction of sources of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infections. *Applied and Environmental Microbiology* 73(5):1683-5.

113. **Karlyshev, A.V., Champion, O.L., Churcher, C., Brisson, J.R., Jarrell, H.C., Gilbert, M., Brochu, D., St Michael, F., Li, J., Wakarchuk, W.W., Goodhead, I., Sanders, M., Stevens, K., White, B., Parkhill, J., Wren, B.W., and C.M. Szymanski.** 2005. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. *Molecular Microbiology* 55(1):90-103.
114. **Karlyshev, A.V., Ketley, J.M., and B.W. Wren.** 2005. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiology Reviews* 29(2):377-90.
115. **Kiatpapan, P., Kobayashi, H., Sakaguchi, M., Ono, H., Yamashita, M., Kaneko, Y., and Y. Murooka.** 2001. Molecular characterization of *Lactobacillus plantarum* genes for beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (fabH) and acetyl coenzyme A carboxylase (accBCDA), which are essential for fatty acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1):426-33.
116. **Kim, N.W., Bingham, H., Khawaja, R., Louie, H., Hani, E., Neote, K. and V.L. Chan.** 1992. Physical map of *Campylobacter jejuni* TGH9011 and localization of 10 genetic markers by use of pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 174: 3494-3498.
117. **King, E. O.** 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *Journal of Infectious Diseases* 101: 119-128.
118. **Kokotovic, B. and S.L. On.** 1999. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Letters* 173: 77-84.
119. **Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson, D.E, Jr, and W. Jr.** 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 24(5):953-63.
120. **Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., and J. Mickelson.** 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is

dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology* 186(11):3296-303.

121. **Konkel, M.E., Monteville, M.R., Rivera-Amill, V., and L.A. Joens.** 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues Intestinal Microbiology* 2(2):55-71.

122. **Kordinas, V., Nicolaou, C., Ioannidis, A., Papavasileiou, E., John Legakis, N., and S. Chatzipanagiotou.** 2005. Prevalence of four virulence genes in *Campylobacter jejuni* determined by PCR and sequence analysis. *Molecular Diagnosis* 9(4):211-5.

123. **Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van Strijp, J.A.G. and C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls.** 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity* 66: 3672-3679.

124. **Labigne-Roussel, A., Harel, J., and L. Tompkins.** 1987. Gene transfer from *Escherichia coli* to *Campylobacter* species: development of shuttle vectors for genetic analysis of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 169(11):5320-3.

125. **Lechner, D., Lathrop, G.M., and I.G. Gut.** 2002. Large-scale genotyping by mass spectrometry: experience, advances and obstacles. *The Current Opinion Chemical Biology* 6: 31–38.

126. **Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J., and T.J. Trust.** 1986. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infection and Immunity* 51: 536-546

127. **Leonard, E.E. 2nd, Takata, T., Blaser, M.J., Falkow, S., Tompkins, L.S., and E.C. Gaynor.** 2003. Use of an open-reading frame-specific *Campylobacter jejuni* DNA microarray as a new genotyping tool for studying epidemiologically related isolates. *The Journal of Infectious Diseases* 187(4):691-4.

128. **Leonard, E.E. 2nd, Tompkins, L.S., Falkow, S., and I. Nachamkin.** 2004. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barré syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. *Infection and Immunity* 72(2):1199-203.
129. **Lévesque S., Frost E., Aarheit R. D., and S. Michaud.** 2008. Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Chickens, Raw Milk, and Environmental Water in Quebec, Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 3404-3411
130. **Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A.V., Cronshaw, A.D., and B.W. Wren.** 2002. Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 43(2):497-508.
131. **Linton, D., Karlyshev, A.V., Hitchen, P.G., Morris, H.R., Dell, A., Gregson, N.A., and B.W. Wren.** 2000. Multiple N-acetyl neuraminic acid synthetase (*neuB*) genes in *Campylobacter jejuni*: identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide. *Molecular Microbiology* 35(5):1120-34.
132. **Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J., and J. Stanley.** 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2568-2572.
133. **Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J. and P. Gill.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *Journal Clinical Microbiology* 15, 761-768.
134. **Lipshutz, R.J., Fodor, S.P.A., Gingeras, T.R., and D.J. Lockhart.** 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 21 (Suppl):20–24.
135. **Llovo J, Mateo E, Muñoz A, Urquijo M, On SLW, A. Fernández-Astorga.** 2003. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* isolates involved in a neonatal outbreak indicates nosocomial transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 41:3926–3928.

136. **Logan, J.M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A.J., and J. Stanley.** 2000. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *International Journal of Systematic Bacteriology* 50: 865-872.
137. **Logan, J.M.J., Edwards, K.J., Saunders, N.A., and J. Stanley.** 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of bioprobes in real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2227-2232.
138. **Logan, S.M., Trust, T.J., and P. Guerry.** 1989. Evidence for posttranslational modification and gene duplication of *Campylobacter* flagellin. *Journal of Bacteriology* 171(6):3031-8.
139. **Louwen, R.P., van Belkum, A., Wagenaar, J.A., Doorduyn, Y., Achterberg, R., and H.P. Endtz.** 2006. Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Journal of Clinical Microbiology* 44(5):1867-8.
140. **Ma, L.C., Fang, C.T., Lee, C.Z., Shun, C.T., and J.T. Wang.** 2005. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *Journal of Infectious Diseases* 192: 117–128.
141. **Madden, R.H., Moran, L., and P. Scates.** 1996. Sub-typing of animal and human *Campylobacter* spp. using RAPD. *Letters in Applied Microbiology* 23(3):167-70.
142. **Maiden, M. C. J.** 2006. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60: 561-588.
143. **Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., and B.G. Spratt.** 1998. Multilocus Sequence Typing: a Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America* 95: 3140-3145.

144. **Marchant, J., Wren, B., and J. Ketley.** 2002. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. *Trends in Microbiology* 10(4):155-9.
145. **Martínez, I., Mateo, E., Churruca, E., Girbau, C., Alonso, R., and A. Fernández-Astorga.** 2006. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *International Journal of Medical Microbiology* 296(1):45-8.
146. **Mateo, E., Cárcamo, J., Urquijo, M., Perales, I., and A. Fernández-Astorga.** 2005. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Research in Microbiology* 156: 568-574.
147. **McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and S. Kjelleberg.** 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology and Ecology* 25: 1-9.
148. **McFaydean, J. and S. Stockman.** 1913. Report of the departmental committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to enquire into epizootic abortion, pp. 1-64. Appendix to Part II. Abortion in sheep. His Majesty's Stationery Office, London.
149. **McGovern, K.J., Blanchard, T.G., Gutierrez, J.A., Czinn, S.J., Krakowka, S., and P. Youngman.** 2001. gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infection and Immunity* 69(6):4168-73.
150. **Meinersmann, R.J., Hesel, L.O., Fields, P.I., and K.L. Hiatt.** 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 35(11):2810-4.
151. **Merchant-Patel, S., Blackall, P.J., Templeton, J., Price, E.P., Tong, S.Y., Huygens, F., and P.M. Giffard.** 2010. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Applied Environmental Microbiology* 76(2):493-9.

152. **Metropolis, N., and S. Ulam.** 1949. The Monte Carlo method. *Journal of the American Statistical Association* 44(247):335-41.
153. **Micheli, M.R., Bova, R., Pascale, E., and E. D'Ambrosio.** 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA RAPD method. *Nucleic Acids Research* 22 : 1921-1922.
154. **Miller, W.G., Pearson, B.M., Wells, J.M., Parker, C.T., Kapitonov, V.V., and R.E. Mandrell.** 2005. Diversity within the *Campylobacter jejuni* type I restriction-modification loci. *Microbiology* 151(Pt 2):337-51.
155. **Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Mégraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., and P. Whyte.** 2005. *Campylobacter*. *Veterinary Research* 36: 351-382.
156. **Moorhead, S.M., and G.A. Dykes.** 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Letters in Applied Microbiology* 34(1): 72-6
157. **Moran, A.P., and J.L. Penner.** 1999. Serotyping of *Campylobacter jejuni* based on heat-stable antigens: relevance, molecular basis and implications in pathogenesis. *Journal of Applied Microbiology* 86(3):361-77.
158. **Moreno, Y., Ferrús, M.A., Vanoostende, A., Hernández, M., Montes, R.M., and J. Hernández.** 2002. Comparison of 23S polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiology Letters* 211(1):97-103.
159. **Mortimer, C.K., Peters, T.M., Gharbia, S.E., Logan, J.M., and C. Arnold.** 2004. Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology* 4: 31.

160. **Müller, J., Schulze, F., Müller, W., and I. Hänel.** 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Veterinary Microbiology* 113(1-2):123-9.
161. **Murray, NE.** 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology* 64(2):412-34.
162. **Nachamkin I.** 2003. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press; pp. 902-14.
163. **Nachamkin, I., Bohachick, K., and C.M. Patton.** 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1531-1536.
164. **Nachamkin, I., Liu, J., Li, M., Ung, H., Moran, A.P., Prendergast, M.M., and K: Sheikh.** 2002. *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré syndrome preferentially expresses a GD(1a)-like epitope. *Infection and Immunity* 70(9):5299-303.
165. **Nauerby, B., Pedersen, K., Dietz, H.H., and M. Madsen.** 2000. Comparison of Danish isolates of *Salmonella enteric* serovar enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs *Ernaceus europaeus* and humans by plasmid profiling and pulse field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3631-3635.
166. **Nei, M., and S. Kumar.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
167. **Newell, D.G., McBride, H. and J.M. Dolby.** 1985. Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. *Journal of Hygiene* 95: 217-227
168. **Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., and S.L. On.** 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3800–3810.

169. **Nuijten, P.J.M., Bartels, C., Bleumink-Pluym, N.M.C., Gaastra, W. and B.A.M. Van der Zeijst.** 1990. Size and physical map of the *Campylobacter jejuni* chromosome. *Nucleic Acids Research* 18: 6211-6214.
170. **Nyström, T.** 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence and death. *Archives of Microbiology* 176: 159-164.
171. **O'Halloran, F., Lucey, B., Cryan, B., Buckley, T., and S. Fanning.** 2004. Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(6):952-7.
172. **Olsen, J.E., Brown, D.J., Skov, M.N., and J.P. Christensen.** 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Veterinary Questions* 15: 125-135.
173. **Oporto, B., Juste, R.A., López-Portolés, J.A., and A. Hurtado.** 2011. Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from healthy livestock and their links to human isolates in Spain. *Zoonoses and Public Health* 58(5):365-75.
174. **Park, SF.** 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 74(3):607-25.
175. **Parker, C.T., Gilbert, M., Yuki, N., Endtz, H.P., and R.E. Mandrell.** 2008. Characterization of lipooligosaccharide-biosynthetic loci of *Campylobacter jejuni* reveals new lipooligosaccharide classes: evidence of mosaic organizations. *Journal of Bacteriology* 190(16):5681-9.
176. **Parker, C.T., Horn, S.T., Gilbert, M., Miller, W.G., Woodward, D.L., and R.E. Mandrell.** 2005. Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. *Journal of Clinical Microbiology* 43(6):2771-81.
177. **Parker, C.T., Quiñones, B., Miller, W.G., Horn, S.T., and R.E. Mandrell.** 2006. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to

genomic elements similar to those present in *C. jejuni* strain RM1221. *Journal of Clinical Microbiology* 44(11):4125-35.

178. Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., and B.G. Barrell. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403(6770):665-8.

179. Pearson, B.M., Pin, C., Wright, J., l'Anson, K., Humphrey, T., and J.M. Wells. 2003. Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS Letters* 554(1-2):224-30.

180. Pei, Z., Burucoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, X.Z., Kopecko, D.J., Bourgeois, A.L., Fauchere, J.L., and M.J. Blaser. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infection and Immunity* 66(3):938-43.

181. Penner, J.L., and J.N. Hennessy. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus subsp. jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 12(6):732-7.

182. Perna, N.T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamosis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., and F.R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409(6819):529-33.

183. Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., and R. Perin. 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in

animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 82(3):281-7.

184. **Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erdem, A.N., and H. Zeytin.** 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infection and Immunity* 64(6):2070-8.

185. **Pin, C., Reuter, M., Pearson, B., Friis, L., Overweg, K., Baranyi, J., and J. Wells.** 2006. Comparison of different approaches for comparative genetic analysis using microarray hybridization. *Applied Microbiology Biotechnology* 72(4):852-9.

186. **Poly, F., and P. Guerry.** 2008a. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology* 24(1):27-31. (1).

187. **Poly, F., Read, T.D., Chen, Y.H., Monteiro, M.A., Serichantalergs, O., Pootong, P., Bodhidatta, L., Mason, C.J., Rockabrand, D., Baqar, S., Porter, C.K., Tribble, D., Darsley, M., and P. Guerry.** 2008b. Characterization of two *Campylobacter jejuni* strains for use in volunteer experimental-infection studies. *Infection and Immunity* 76(12):5655-67.

188. **Poly, F., Threadgill, D., and A. Stintzi.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *Journal of Bacteriology* 186(14):4781-95.

189. **Poly, F., Threadgill, D., and A. Stintzi.** 2005. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176-specific genes. *Journal of Clinical Microbiology* 43(5):2330-8.

190. **Porwollik, S., Frye, J., Florea, L.D., Blackmer, F., and M. Mc Clelland.** 2003. A non-redundant microarray of genes for two related bacteria. *Nucleic Acids Research* 31: 1869–1876.

191. **Power, M.E., Guerry, P., McCubbin, W.D., Kay, C.M., and T.J. Trust.** 1994. Structural and antigenic characteristics of *Campylobacter coli* FlaA flagellin. *Journal of Bacteriology* 176(11):3303-13.
192. **Price, E.P., Thiruvenkataswamy, V., Mickan, L., Unicomb, L., Rios, R.E., Huygens, F., and P.F. Giffard.** 2006. Genotyping of *Campylobacter jejuni* using seven singlenucleotide polymorphisms in combination with *flaA* short variable region sequencing. *Journal of Medical Microbiology* 8: 1061–1070.
193. **Quackenbush, J.** 2001. Computational analysis of microarray data. *Nature Reviews Genetics* 2: 418–426.
194. **Quiñones, B., Guilhabert, M.R., Miller, W.G., Mandrell, R.E., Lastovica, A.J., and C.T. Parker.** 2008. Comparative genomic analysis of clinical strains of *Campylobacter jejuni* from South Africa. *PLoS One* 3(4):e2015.
195. **Ramírez, R., Chávez, L., Santillán, J.L., and S. Guzmán.** 2003. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico* Vol XXVII.
196. **Rannala, B., and Z. Yang.** 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43(3):304-11.
197. **Rautelin, H., and M.-L. Hänninen.** 2000. *Campylobacters*: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries. *Annals of Medicine* 32:440–445.
198. **Revill, W.P., Bibb, M.J., Scheu, A.K., Kieser, H.J., and D.A. Hopwood.** 2001. Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 183(11):3526-30.
199. **Richardson, P.T., and S.F. Park.** 1997. Integration of heterologous plasmid DNA into multiple sites on the genome of *Campylobacter coli* following natural transformation. *Journal of Bacteriology* 179(5):1809-12.

200. **Ripabelli, G., Tamburro, M., Minelli, F., Leone, A., and M.L. Sammarco.** 2009. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 33(4):355-64.
201. **Roberts, I.S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 50: 285—315
202. **Roos, A., Dieltjes, P., Vossen, R.H., Daha, M.R., and P. de Knijff.** 2006. Detection of three single nucleotide polymorphisms in the gene encoding mannose-binding lectin in a single pyrosequencing reaction. *Journal of Immunological Methods* 309:1-2: 108–114.
203. **Ruiz, J., Marco, F., Oliveira, I., Vila, J., and J. Gascón.** 2007. Trends in antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. causing traveler's diarrhea. *APMIS* 115(3):218-24.
204. **Sails, A. D., B. Swaminathan, and P. I. Fields.** 2003. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:4733–4739.
205. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.
206. **Salloway, S., Mermel, L.A., Seamans, M., Aspinall, G.O., Nam Shin, J.E., Kurjanczyk, L.A., and J.L. Penner.** 1996. Miller-Fisher syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. *Infection and Immunity* 64(8): 2945-2949.
207. **Sambandamurthy, V.K., Wang, X., Chen, B., Russell, R.G., Derrick, S., Collins, F.M., Morris, S.L., Jacobs, and Jr. W.R.** 2002. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nature Medicine* 8(10):1171-4.

208. **Schmidt, M. A., Riley, L.W. and I. Benz.** 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *TRENDS in Microbiology* Vol.11 No.12: 554—561.
209. **Schmidt, M.A., Riley, L.W., I. Benz.** 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends in Microbiology* 11(12):554-61.
210. **Schmidt-Ott, R., Pohl, S., Burghard, S., Weig, M., U. Gross.** 2005. Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *Journal of Infection* 50(1):12-21.
211. **Schönberg-Norio, D., J. Takkinen, M.-L. Hänninen, M.-L. Katila, S.-S. Kaukoranta, L. Mattila, and H. Rautelin.** 2004. Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerging Infection Diseases* 10:1474–1477.
212. **Schouls, L. M., S. Reulen, B. Duim, J. A. Wagenaar, R. J. L. Willems, K. E. Dingle, F. M. Colles, and J. D. A. van Embden.** 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *Journal of Clinical Microbiology* 41:15–26.
213. **Sebald, M. and M. Verón.** 1963. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annales l'Institut Pasteur* 105: 897-910.
214. **Sellars, M.J., Hall, S.J., and D.J. Kelly.** 2002. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *Journal of Bacteriology* 184(15):4187-96.
215. **Skirrow, M.B., and M.J. Blazer.** 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. *Campylobacter* 2nd Edition. Nachamkin, I, and M.J. Blaser (ed). American Society for Microbiology, King, E. O. 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *Journal of Infectious Diseases* 101: 119-128

216. **Smibert, R.M.** 1984. Genus *Campylobacter* Sebald y Véron, 1: 111-118. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th ed. Krieg, N.R. and H.G. Holt (ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
217. **Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal.** 1973. *Numerical taxonomy*. San Francisco, W.H. Freeman.
218. **Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E., and J.S.G. Dooley.** 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology* 41: 297-302.
219. **Stahl, M., and A. Stintzi.** 2011. Identification of essential genes in *C. jejuni* genome highlights hyper-variable plasticity regions. *Functional and Integrative Genomics*.
220. **Stucki, U. R. S., Joachim, F. , Nicolet, J., and A. Burnens.** 1995. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 855-859.
221. **Stull, T.L., LiPuma, J.J., and T.D. Edlind.**1988. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria:ribosomal RNA. *Journal Infection Disease* 157:280–6.
222. **Suerbaum, S., Lohrengel, M., Sonnevend, A., Ruberg, F., and M. Kist.** 2001. Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 183(8):2553-9.
223. **Swofford, D. L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). *Sinauer Associates*, Sunderland MA.
224. **Szymanski, C.M., King, M., Haardt, M., and G.D. Armstrong.** 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 63(11):4295-300.
225. **Szymanski, C.M., Yao, R., Ewing, C.P., Trust, T.J., and P. Guerry.** 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 32(5):1022-30.

226. **Taboada, E.N., Acedillo, R.R., Carrillo, C.D., Findlay, W.A., Medeiros, D.T., Mykytczuk, O.L., Roberts, M.J., Valencia, C.A., Farber, J.M., and J.H. Nash.** 2004. Large-scale comparative genomics meta-analysis of *Campylobacter jejuni* isolates reveals low level of genome plasticity. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10):4566-76.
227. **Taboada, E.N., Acedillo, R.R., Luebbert, C.C., Findlay, W.A., and J.H. Nash.** 2005. A new approach for the analysis of bacterial microarray-based Comparative Genomic Hybridization: insights from an empirical study. *BMC Genomics* 6:78.
228. **Taboada, E.N., Mackinnon, J.M., Luebbert, C.C., Gannon, V.P., Nash, J.H., and K. Rahn.** 2008. Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*. *BMC Evolutionary Biology* 8;8:229.
229. **Talukder, K.A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I.J., Dutta, D.K., Hossain, S., Nur-E-Kamal, A., Nair, G.B., Cravioto, A., Sack, D.A., and H.P. Endtz.** 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1485-8.
230. **Tamura, K., and M. Nei.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
231. **Taylor, D.E.** 1992. Genetics of *Campylobacter* y *Helicobacter*. *Annuals Reviews in Microbiology* 46: 35-64.
232. **Taylor, D.E., Garner, R.S. and B.J. Allan.** 1983. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 24, 930-935.
233. **Taylor, D.J. and R.R. Al-Mashat.** 1985. Enteric infections with catalase positive *Campylobacter* in cattle, sheep and pigs. Pp. 193-206. In *Campylobacter infection in man and animals*. Butzler, J.P. (ed.). *CRC Press, Boca Raton*.

234. **Tenkate, T.D. and R.J. Stafford.** 2001. Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: a matched case-control study. *Epidemiology and Infection* 127: 399-404.
235. **Tenover, F.C., Williams, S., Gordon, K.P., Nolan, C., and J.J. Plorde.** 1985. Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 27(1):37-41.
236. **Thibault, P., Logan, S.M., Kelly, J.F., Brisson, J.R., Ewing, C.P., Trust, T.J., and P. Guerry.** 2001. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *Journal of Biological Chemistry* 276(37):34862-70.
237. **Tracz, D.M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska, K., and D.E. Taylor.** 2005. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerging Infection Disease* 11(6):838-43.
238. **Urwin, R. and M.C.J. Maiden.** 2003. Multi-locus Sequence Typing: a Tool for Global Epidemiology. *Trends in Microbiology* 11: 479-487.
239. **van Bakel, H., and F.C. Holstege.** 2004. In control: systematic assessment of microarray performance. *EMBO Reports* 5(10):964-9.
240. **Van Koningsveld, R., Van Doorn, P.A., Schmitz, P.I., and F.G. Van der Meché.** 2001. Changes in referral pattern and its effect on outcome in patients with Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 56(4):564-6.
241. **Van Vliet, A.H.M., and J.M. Ketley.** 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology* 92: 433-442.
242. **Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and J. De Ley.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(1):88-103.

243. **Véron, M. and R. Chatelain.** 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23: 122-134
244. **Vincent, R., Dumas, J., and N. Picard.** 1947. Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibron. Avortement consécutif. *Bulletin de l'Académie de Médecine* Paris, 90—92.
245. **Wagner, D., Maser, J., Moric, I., Boechat, N., Vogt, S., Gicquel, B., Lai, B., Reyrat, J.M., and L. Bermudez.** 2005. Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 151(Pt 1):323-32.
246. **Wang, Y. and D.E. Taylor.** 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *Journal of Bacteriology* 172: 949-955.
247. **Wassenaar, T. M., S. L. W. On, and R. Meinersmann.** Genotyping and the consequence of genetic instability. 2000a. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacters*, in press. ASM Press, Washington, D.C.
248. **Wassenaar, T.M.** 1997. Toxin production by *Campylobacter*. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 466-476
249. **Wassenaar, T.M., and D.G. Newell.** 2000b. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1-9.
250. **Wassenaar, T.M., Fernández-Astorga, A., Alonso, R., Marteinson, V.T., Magnússon, S.H., Kristoffersen, A.B., and M. Hofshagen.** 2009. Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Letters in Applied Microbiology* 49(3):388-95.
251. **Wassenaar, T.M., Fry, B.N., and B.A. van der Zeijst.** 1993a. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene* 132(1):131-5.

252. **Wassenaar, T.M., Fry, B.N., and B.A. van der Zeijst.** 1995. Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology* 141: 95-101.
253. **Wassenaar, T.M., van der Zeijst, B.A.M., Ayling, R., and D.G. Newell.** 1993b. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *Journal of General Microbiology* 139, 1171-1175
254. **Weiner, M.P., and T.J. Hudson.** 2002. Introduction to SNPs: discovery of markers for disease. *Biotechniques* (Suppl. 4-3).
255. **Weingarten, R.A., Grimes, J.L., and J.W. Olson.** 2008. Role of *Campylobacter jejuni* respiratory oxidases and reductases in host colonization. *Applied Environmental Microbiology* 74(5):1367-75.
256. **Willison, H.J., and G.M. O'Hanlon.** 1999. The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 100(1-2):3-12.
257. **Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Hart, C.A., Diggle, P.J. and P. Fearnhead.** 2009. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. *Molecular Biology and Evolution* 26:385-397.
258. **Yan, W., N. Chang, and D. E. Taylor.** 1991. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *Journal of Infection Diseases* 163:1068-1072.
259. **Young, K.T., Davis, L.M., and V.J. Dirita.** 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 5(9):665-79.
260. **Yuki, N.** 1997. Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré syndrome and Miller Fisher syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* 176 Suppl 2:S150-3.

261. **Zautner, A.E., Herrmann, S., Corso, J., Tareen, A.M., Alter, T., and U. Gross.** 2011. Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. *Applied Environmental Microbiology* 77(7):2359-65.
262. **Zhang, M.J., Gu, Y.X., Ran, L., and J.Z. Zhang.** 2007. [Multi-PCR identification and virulence genes detection of *Campylobacter jejuni* isolated from China]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 28(4):377-80.
263. **Zhang, W., Jayarao, B.M., and S.J. Knabel.** 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology* 70(2):913-20.
264. **Zhang, W., Qi, W., Albert, T.J., Motiwala, A.S., Alland, D., and E.K. Hyytia-Trees.** 2006. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Research* 16: 757–767.
265. **Zilbauer, M., Dorrell, N., Elmi, A., Lindley, K.J., Schuller, S., Jones, H.E., Klein, N.J., Nunez, G., Wren, B.W., and M. Bajaj-Elliott.** 2007. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cellular Microbiology* 9, 2541.
266. **Ziprin, R.L., Young, C.R., Stanker, L.H., Hume, M.E., and M.E. Konkel.** 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Diseases* 43(3):586-9.



Anexos

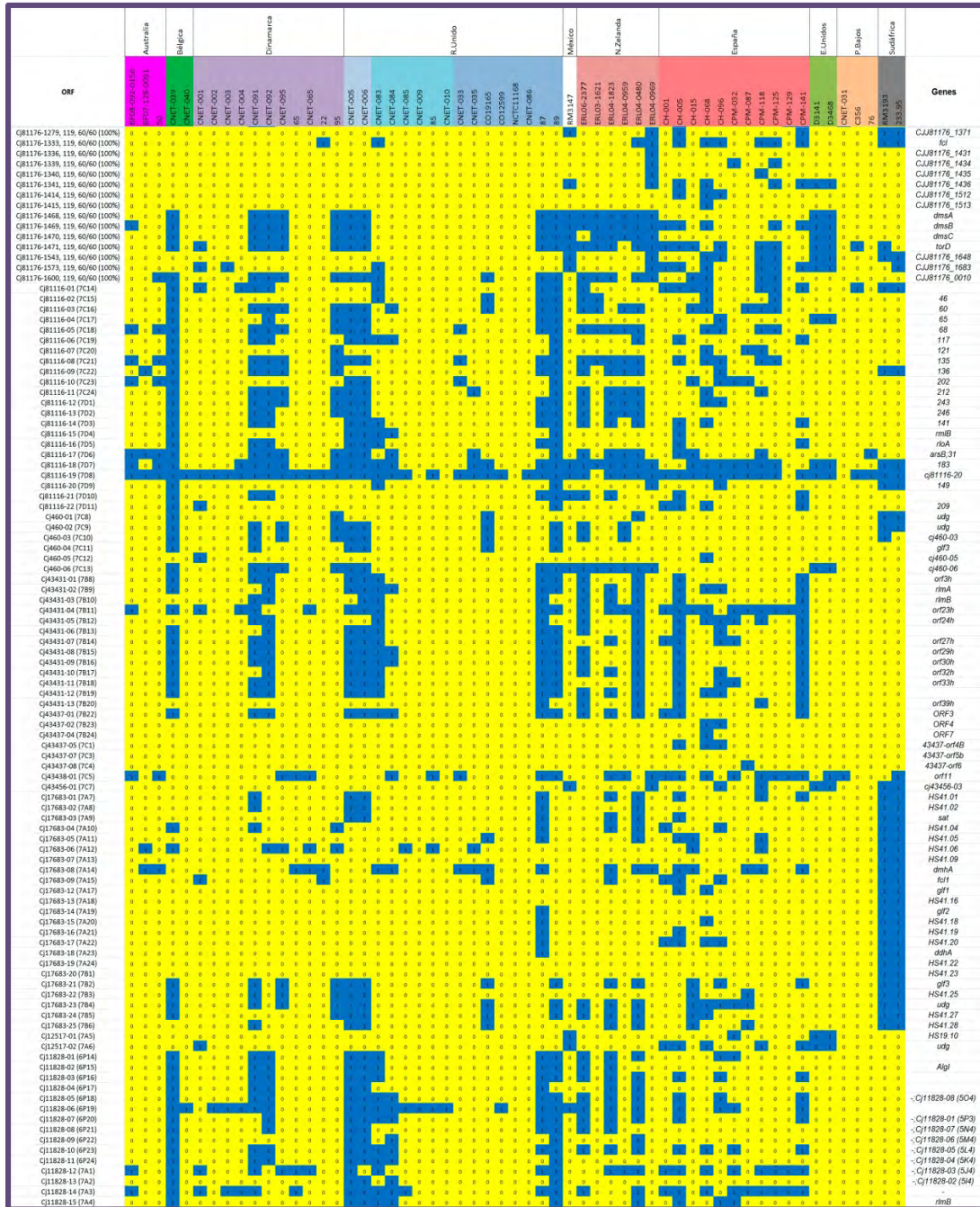


Figura 63. Matriz binaria de los resultados de hibridación correspondiente a las sondas procedentes del resto de cepas. 1= Presencia en la cepa problema y 0= Ausencia/Divergencia en la cepa problema y N=Indeterminado. Australia (púrpura), Bélgica (verde), Dinamarca (morado), Reino Unido (Escocia, Irlanda del Norte e Inglaterra) (azules), México (blanco), Nueva Zelanda (rojo énfasis), España (rosa), Estados Unidos (verde oliva), Países Bajos (anaranjado) y Sudáfrica (gris).

GeneID	C11168 ORF	CRIM121 ORF	Q81-176 ORF	Synonyms
C11168-0001 (IA1)	C11168-0001, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0010, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0001, 119, 60/60 (100%)	dnaA.CJ0001.CJE0001.CJ81176_0027.CJ80001.C11168-0001 (IA1)
C11168-0002 (IA2)	C11168-0002, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0002, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0002, 119, 60/60 (100%)	dnaN.CJ0002.CJE0002.CJ81176_0026.CJ80002.C11168-0002 (IB1)
C11168-0004 (IA3)	C11168-0004, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0015, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0015, 119, 60/60 (100%)	CJ0003.CJE0003.CJ81176_0034.CJ80003.C11168-0004 (ID1)
C11168-0005 (IA4)	C11168-0005, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0005, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0005, 119, 60/60 (100%)	CJ0005.CJE0005.CJ81176_0031.CJ80005.C11168-0005 (IE1)
C11168-0006 (IA5)	C11168-0006, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0006, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0006, 109, 58/59 (96%)	CJ0006.CJE0006.CJ81176_0032.CJ80006.C11168-0006 (IF1)
C11168-0007 (IA6)	C11168-0007, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0007, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0007, 119, 60/60 (100%)	CJ0007.CJE0007.CJ81176_0033.CJ80007.C11168-0007 (IG1)
C11168-0008 (IA7)	C11168-0008, 119, 60/60 (100%)			CJ0008.CJ1168-0008 (IH1)
C11168-0009 (IA8)	C11168-0009, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0008, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0009, 119, 60/60 (100%)	gldD.CJ0009.CJE0009.CJ81176_0035.CJ80009.C11168-0009 (IA2)
C11168-0011 (IA9)	C11168-0011, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0010, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0010, 119, 60/60 (100%)	comEA.CJ0111.CJE0101.CJ81176_0037.CJ80011.C11168-0011 (IC2)
C11168-0013 (IA10)	C11168-0013, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0012, 87, 7, 56/60 (93%)	Q81-176-0013, 87, 7, 56/60 (93%)	ind.CJ0013.CJ1168-0013 (IE2)
C11168-0014 (IA11)	C11168-0014, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0013, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0014, 119, 60/60 (100%)	CJ0014.CJE0014.CJ81176_0041.CJ80014.C11168-0014 (IF2)
C11168-0015 (IA12)	C11168-0015, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0015, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0015, 119, 60/60 (100%)	CJ0015.CJE0015.CJ81176_0042.CJ80015.C11168-0015 (IG2)
C11168-0016 (IA13)	C11168-0016, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0016, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0016, 119, 60/60 (100%)	CJ0016.CJE0016.CJ81176_0043.CJ80016.C11168-0016 (IH2)
C11168-0019 (IA14)	C11168-0019, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0019, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0019, 119, 60/60 (100%)	CJ0019.CJE0019.CJ81176_0046.CJ80019.C11168-0019 (IC3)
C11168-0021 (IA15)	C11168-0021, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0021, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0021, 119, 60/60 (100%)	CJ0021.CJE0021.CJ81176_0048.CJ80021.C11168-0021 (IE3)
C11168-0024 (IA16)	C11168-0024, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0024, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0024, 119, 60/60 (100%)	nraA.CJ0024.CJE0024.CJ81176_0051.CJ80024.C11168-0024 (IH3)
C11168-0025 (IA17)	C11168-0025, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0025, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0025, 119, 60/60 (100%)	CJ0025.CJE0025.CJ81176_0052.CJ80025.C11168-0025 (IA4)
C11168-0026 (IA18)	C11168-0026, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0026, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0026, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0026.CJE0026.CJ81176_0053.CJ80026.C11168-0026 (IB4)
C11168-0027 (IA19)	C11168-0027, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0027, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0027, 119, 60/60 (100%)	pyrG.CJ0027.CJE0027.CJ81176_0054.CJ80027.C11168-0027 (IC4)
C11168-0028 (IA20)	C11168-0028, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0028, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0028, 119, 60/60 (100%)	recJ.CJ0028.CJE0028.CJ81176_0055.CJ80028.C11168-0028 (ID4)
C11168-0029 (IA21)	C11168-0029, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0029, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0029, 109, 55/55 (100%)	anaA.CJ0029.CJE0029.C11168-0029 (IE4)
C11168-0030 (IA22)	C11168-0030, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0030, 119, 60/60 (100%)		CJ0030.CJE0030.C11168-0030 (IF4)
C11168-0031 (IA23)	C11168-0031, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0031, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0031, 119, 60/60 (100%)	CJ0031.CJE0031.CJ81176_0068.CJ80031.C11168-0031 (IG4)
C11168-0032 (IA24)	C11168-0032, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0032, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0032, 111, 59/60 (98%)	CJ0032.CJ1168-0032 (IH4)
C11168-0034 (IA25)	C11168-0034, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0034, 109, 58/59 (96%)	Q81-176-0034, 111, 59/60 (98%)	CJ0034.CJE0034.CJ81176_0072.CJ80034.C11168-0034 (IB5)
C11168-0035 (IA26)	C11168-0035, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0035, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0035, 111, 59/60 (98%)	CJ0035.CJE0035.CJ81176_0073.CJ80035.C11168-0035 (IC5)
C11168-0036 (IA27)	C11168-0036, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0036, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0036, 111, 59/60 (98%)	CJ0036.CJE0036.CJ81176_0074.CJ80036.C11168-0036 (ID5)
C11168-0037 (IA28)	C11168-0037, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0037, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0037, 111, 59/60 (98%)	CJ0037.CJE0037.CJ81176_0075.CJ80037.C11168-0037 (IE5)
C11168-0038 (IA29)	C11168-0038, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0038, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0038, 111, 59/60 (98%)	CJ0038.CJE0038.CJ81176_0076.CJ80038.C11168-0038 (IF5)
C11168-0042 (IB6)	C11168-0042, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0042, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0042, 119, 60/60 (100%)	CJ0042.CJE0042.CJ81176_0082.CJ80042.C11168-0042 (IG5)
C11168-0043 (IB7)	C11168-0043, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0043, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0043, 119, 60/60 (100%)	flgE.flgE.1.CJ0043.CJE0043.CJ81176_0081.CJ80043.C11168-0043 (IC6)
C11168-0044 (IB8)	C11168-0044, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0044, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0044, 119, 60/60 (100%)	trmM4.CJE0044.CJ81176_0082.CJ80044.C11168-0044 (ID6)
C11168-0045 (IB9)	C11168-0045, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0045, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0045, 119, 60/60 (100%)	CJ0045.CJE0045.CJ81176_0083.CJ80045.C11168-0045 (IE6)
C11168-0053 (IB10)	C11168-0053, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0048, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0052, 119, 60/60 (100%)	trmM.CJ0053.CJE0048.CJ81176_0090.CJ80052.C11168-0053 (I66)
C11168-0054 (IB11)	C11168-0054, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0048, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0053, 119, 60/60 (100%)	CJ0054.CJE0049.CJ81176_0091.CJ80053.C11168-0054 (IH6)
C11168-0055 (IB12)	C11168-0055, 119, 60/60 (100%)		Q81-176-0054, 119, 60/60 (100%)	CJ0055.CJ81176_0092.CJ80054.C11168-0055 (IA7)
C11168-0056 (IB13)	C11168-0056, 119, 60/60 (100%)		Q81-176-0055, 119, 60/60 (100%)	CJ0056.CJ81176_0093.CJ80055.C11168-0056 (IB7)
C11168-0058 (IB14)	C11168-0058, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0055, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0057, 119, 60/60 (100%)	CJ0058.CJE0055.CJ81176_0096.CJ80057.C11168-0058 (ID7)
C11168-0059 (IB15)	C11168-0059, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0056, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0058, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0059.CJE0056.CJ81176_0097.CJ80059.C11168-0059 (IE7)
C11168-0060 (IB16)	C11168-0060, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0057, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0059, 119, 60/60 (100%)	flm.CJ0060.CJE0057.CJ81176_0098.CJ80059.C11168-0060 (IF7)
C11168-0061 (IB17)	C11168-0061, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0058, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0060, 119, 60/60 (100%)	flaA.CJ0061.CJE0058.CJ81176_0099.CJ80060.C11168-0061 (IG7)
C11168-0062 (IB18)	C11168-0062, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0059, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0061, 119, 60/60 (100%)	CJ0062.CJE0059.CJ81176_0100.CJ80061.C11168-0062 (IH7)
C11168-0063 (IB19)	C11168-0063, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0060, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0062, 119, 60/60 (100%)	CJ0063.CJE0060.CJ81176_0101.CJ80062.C11168-0063 (IA8)
C11168-0065 (IB20)	C11168-0065, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0062, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0064, 119, 60/60 (100%)	flkK.CJ0065.CJE0062.CJ81176_0103.CJ80064.C11168-0065 (IC8)
C11168-0067 (IB21)	C11168-0067, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0063, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0064, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0067.CJE0063.CJ81176_0105.CJ80066.C11168-0067 (IE8)
C11168-0068 (IB22)	C11168-0068, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0063, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0067, 115, 58/58 (100%)	pspA.pspA.CJ0068.CJE0065.CJ81176_0106.CJ80067.C11168-0068 (IF8)
C11168-0070 (IB23)	C11168-0070, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0067, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0069, 119, 60/60 (100%)	CJ0070.CJE0067.CJ81176_0109.CJ80069.C11168-0070 (IG8)
C11168-0072 (IB24)	C11168-0072, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0070, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0072, 119, 60/60 (100%)	CJ0072.CJE0069.CJ81176_0110.CJ80070.C11168-0072 (IA9)
C11168-0074 (IB25)	C11168-0074, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0071, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0074, 119, 60/60 (100%)	CJ0074.CJE0070.CJ81176_0111.CJ80072.C11168-0074 (IC9)
C11168-0076 (IB26)	C11168-0076, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0072, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0074, 119, 60/60 (100%)	flgP.CJ0076.CJE0072.CJ81176_0113.CJ80074.C11168-0076 (IE9)
C11168-0077 (IB27)	C11168-0077, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0073, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0075, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0077.CJE0073.CJ81176_0114.CJ80075.C11168-0077 (IF9)
C11168-0079 (IB28)	C11168-0079, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0073, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0077, 119, 60/60 (100%)	comC7.CJ0079.CJE0075.CJ81176_0116.CJ80077.C11168-0079 (IG9)
C11168-0080 (IB29)	C11168-0080, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0076, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0078, 119, 60/60 (100%)	CJ0080.CJE0076.CJ81176_0117.CJ80078.C11168-0080 (IA10)
C11168-0081 (IB30)	C11168-0081, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0077, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0078, 119, 60/60 (100%)	cydE.CJ0081.CJE0077.CJ81176_0118.CJ80079.C11168-0081 (IB10)
C11168-0082 (IB31)	C11168-0082, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0078, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0080, 119, 60/60 (100%)	cydE.CJ0082.CJE0078.CJ81176_0119.CJ80080.C11168-0082 (IC10)
C11168-0086 (IB32)	C11168-0086, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0081, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0082, 119, 60/60 (100%)	ung.CJ0086.CJE0081.CJ81176_0121.CJ80084.C11168-0086 (IE10)
C11168-0087 (IB33)	C11168-0087, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0082, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0084, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0087.CJE0082.CJ81176_0123.CJ80086.C11168-0087 (IF10)
C11168-0088 (IB34)	C11168-0088, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0083, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0084, 119, 60/60 (100%)	dcuA.CJ0088.CJE0083.CJ81176_0123.CJ80084.C11168-0088 (IG10)
C11168-0089 (IB35)	C11168-0089, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0084, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0085, 111, 59/60 (98%)	CJ0089.CJE0084.CJ81176_0124.CJ80085.C11168-0089 (IH10)
C11168-0091 (IB36)	C11168-0091, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0085, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0085, 119, 60/60 (100%)	CJ0090.CJE0085.CJ81176_0125.CJ80086.C11168-0091 (IA11)
C11168-0092 (IB37)	C11168-0092, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0087, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0088, 119, 60/60 (100%)	CJ0092.CJE0087.CJ81176_0127.CJ80088.C11168-0092 (IC11)
C11168-0093 (IB38)	C11168-0093, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0088, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0089, 119, 60/60 (100%)	CJ0093.CJE0088.CJ81176_0128.CJ80089.C11168-0093 (ID11)
C11168-0094 (IB39)	C11168-0094, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0090, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0091, 119, 60/60 (100%)	CJ0094.CJE0089.CJ81176_0129.CJ80090.C11168-0094 (IE11)
C11168-0095 (IB40)	C11168-0095, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0091, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0092, 119, 60/60 (100%)	rnaA.CJ0095.CJE0090.CJ81176_0130.CJ80091.C11168-0095 (IF11)
C11168-0096 (IB41)	C11168-0096, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0092, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0092, 119, 60/60 (100%)	CJ0096.CJE0091.CJ81176_0131.CJ80092.C11168-0096 (IG11)
C11168-0098 (IB42)	C11168-0098, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0093, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0093, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0098.CJE0093.CJ81176_0133.CJ80094.C11168-0098 (IA12)
C11168-0100 (IB43)	C11168-0100, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0095, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0096, 119, 60/60 (100%)	CJ0100.CJE0095.CJ81176_0135.CJ80096.C11168-0100 (IC12)
C11168-0101 (IB44)	C11168-0101, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0096, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0097, 119, 60/60 (100%)	CJ0101.CJE0096.CJ81176_0136.CJ80097.C11168-0101 (ID12)
C11168-0103 (IB45)	C11168-0103, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0098, 111, 59/60 (98%)	Q81-176-0100, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0103.CJE0098.CJ81176_0138.CJ80099.C11168-0103 (IE12)
C11168-0104 (IB46)	C11168-0104, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0099, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0100, 119, 60/60 (100%)	atpH.CJ0104.CJE0099.CJ81176_0139.CJ80100.C11168-0104 (IG12)
C11168-0105 (IB47)	C11168-0105, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0100, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0101, 119, 60/60 (100%)	atpA.CJ0105.CJE0100.CJ81176_0140.CJ80101.C11168-0105 (IH12)
C11168-0106 (IB48)	C11168-0106, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0101, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0102, 119, 60/60 (100%)	hlyX.CJ0106.CJE0101.CJ81176_0141.CJ80102.C11168-0106 (IF12)
C11168-0107 (IB49)	C11168-0107, 119, 60/60 (100%)	CRIM121-0102, 119, 60/60 (100%)	Q81-176-0103, 119, 60/60	



C1168-0227 (G6)	C1168-0227, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0278, 119, 60/60 (100%)	C81176-0209, 119, 60/60 (100%)	and.CJ0227.CJE0278.CJ81176.0252.CJB0209.C1168-0227 (C14)
C1168-0228 (G7)	C1168-0228, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0279, 103, 58/60 (96%)	C81176-0210, 103, 58/60 (96%)	pcm.CJ0228.CJE0279.CJ81176.0253.CJB0210.C1168-0228 (D14)
C1168-0229 (G8)	C1168-0229, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0280, 119, 60/60 (100%)	C81176-0211, 119, 60/60 (100%)	CJ0229.CJE0280.CJ81176.0254.CJB0211.C1168-0229 (E14)
C1168-0231 (G10)	C1168-0231, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0282, 119, 60/60 (100%)	C81176-0213, 119, 60/60 (100%)	me.CJ0231.CJE0282.CJ81176.0256.CJB0213.C1168-0231 (G14)
C1168-0233 (G10)	C1168-0233, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0284, 103, 58/60 (96%)	C81176-0215, 119, 60/60 (100%)	pyf.CJ0233.CJE0284.CJ81176.0258.CJB0215.C1168-0233 (A15)
C1168-0234 (G11)	C1168-0234, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0285, 119, 60/60 (100%)	C81176-0216, 119, 60/60 (100%)	lfr.CJ0234.CJE0285.CJ81176.0259.CJB0216.C1168-0234 (B15)
C1168-0235 (G12)	C1168-0235, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0286, 111, 59/60 (98%)	C81176-0217, 119, 60/60 (100%)	sec.CJ0235.CJE0286.CJ81176.0260.CJB0217.C1168-0235 (C15)
C1168-0237 (G13)	C1168-0237, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0287, 119, 60/60 (100%)	C81176-0219, 119, 60/60 (100%)	pyt.CJ0237.CJE0288.CJ81176.0262.CJB0219.C1168-0237 (E15)
C1168-0240 (G14)	C1168-0240, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0291, 103, 58/60 (96%)	C81176-0223, 103, 58/60 (96%)	iscs.CJ0240.CJE0291.CJ81176.0265.CJB0223.C1168-0240 (H15)
C1168-0241 (G15)	C1168-0241, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0292, 119, 60/60 (100%)	C81176-0224, 105, 50/57 (88%)	ICJ0241.CJE0292.CJ81176.0266.CJB0224.C1168-0241 (A16)
C1168-0244 (G16)	C1168-0244, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0294, 111, 59/60 (98%)	C81176-0226, 111, 59/60 (98%)	rpmr.CJ0244.CJE0294.CJ81176.0268.CJB0226.C1168-0244 (C16)
C1168-0246 (G17)	C1168-0246, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0297, 111, 59/60 (98%)	C81176-0228, 111, 59/60 (98%)	CJ0246.CJ81176.0272.CJB0228.C1168-0246 (E16)
C1168-0247 (G18)	C1168-0247, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0298, 111, 59/60 (98%)	C81176-0230, 103, 58/60 (96%)	CJ0247.CJE0297.CJ81176.0274 (F16)
C1168-0248 (G18)	C1168-0248, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0299, 111, 59/60 (98%)	C81176-0231, 111, 59/60 (98%)	ICJ0248.CJE0298.CJ81176.0275.CJB0231.C1168-0248 (G16)
C1168-0251 (G20)	C1168-0251, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0301, 115, 58/58 (100%)	C81176-0234, 119, 60/60 (100%)	CJ0251.CJE0301.CJ81176.0278.CJB0234.C1168-0251 (B17)
C1168-0255 (G22)	C1168-0255, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0305, 119, 60/60 (100%)	C81176-0238, 119, 60/60 (100%)	exa.AJh.CJ0255.CJE0305.CJ81176.0282.CJB0238.C1168-0255 (F17)
C1168-0257 (G22)	C1168-0257, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0307, 119, 60/60 (100%)	C81176-0240, 119, 60/60 (100%)	rpmr.CJ0257.CJE0307.CJ81176.0284.CJB0240.C1168-0257 (H17)
C1168-0258 (G23)	C1168-0258, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0308, 60, 51/58 (87%)	C81176-0241, 119, 60/60 (100%)	CJ0258.CJ81176.0285.CJB0241.C1168-0258 (A18)
C1168-0259 (G24)	C1168-0259, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0311, 119, 60/60 (100%)	C81176-0242, 119, 60/60 (100%)	pyvc.CJ0259.CJ81176.0286.CJB0242.C1168-0259 (B18)
C1168-0261 (H13)	C1168-0261, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0312, 119, 60/60 (100%)	C81176-0243, 111, 59/60 (98%)	zwt.CJ0261.CJE0313.CJ81176.0290.CJB0243.C1168-0261 (C18)
C1168-0261 (H2)	C1168-0261, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0311, 119, 60/60 (100%)	C81176-0244, 119, 60/60 (100%)	CJ0261.CJ81176.0288.CJB0244.C1168-0261 (D18)
C1168-0262 (H3)	C1168-0262, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0313, 119, 60/60 (100%)	C81176-0245, 119, 60/60 (100%)	CJ0262.CJ81176.0289.CJB0245.C1168-0262 (E18)
C1168-0263 (H4)	C1168-0263, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0314, 119, 60/60 (100%)	C81176-0246, 119, 60/60 (100%)	zwt.CJ0263.CJE0313.CJ81176.0290.CJB0246.C1168-0263 (F18)
C1168-0267 (H5)	C1168-0267, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0316, 119, 60/60 (100%)	C81176-0250, 111, 59/60 (98%)	CJ0267.CJE0316.CJ81176.0294.CJB0250.C1168-0267 (B19)
C1168-0268 (H6)	C1168-0268, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0317, 119, 60/60 (100%)	C81176-0251, 119, 60/60 (100%)	CJ0268.CJE0317.CJ81176.0295.CJB0251.C1168-0268 (C19)
C1168-0268 (H18)	C1168-0268, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0317, 119, 60/60 (100%)	C81176-0252, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0268.CJE0318.CJ81176.0296.CJB0252.C1168-0268 (D19)
C1168-0273 (H8)	C1168-0273, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0322, 111, 59/60 (98%)	C81176-0256, 111, 59/60 (98%)	fab2.CJ0273.CJE0322.CJ81176.0300.CJB0256.C1168-0273 (H19)
C1168-0274 (H9)	C1168-0274, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0323, 111, 59/60 (98%)	C81176-0257, 111, 59/60 (98%)	lpxA.CJ0274.CJE0323.CJ81176.0301.CJB0257.C1168-0274 (A20)
C1168-0276 (H10)	C1168-0276, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0324, 119, 60/60 (100%)	C81176-0258, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0276.CJE0325.CJ81176.0303.CJB0259.C1168-0276 (C20)
C1168-0277 (H11)	C1168-0277, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0326, 111, 59/60 (98%)	C81176-0260, 111, 59/60 (98%)	mre.CJ0277.CJE0326.CJ81176.0304.CJB0260.C1168-0277 (D20)
C1168-0280 (H12)	C1168-0280, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0328, 119, 60/60 (100%)	C81176-0262, 119, 60/60 (100%)	chvW.CJ0280.CJ81176.0306.CJB0262.C1168-0280 (F20)
C1168-0281 (H13)	C1168-0281, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0331, 119, 60/60 (100%)	C81176-0265, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0281.CJE0332.CJ81176.0307.CJB0263.C1168-0281 (G20)
C1168-0282 (H14)	C1168-0282, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0330, 119, 60/60 (100%)	C81176-0264, 119, 60/60 (100%)	serB.CJ0282.CJE0330.CJ81176.0308.CJB0264.C1168-0282 (H20)
C1168-0283 (H15)	C1168-0283, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0331, 119, 60/60 (100%)	C81176-0265, 119, 60/60 (100%)	chvW.CJ0283.CJE0331.CJ81176.0309.CJB0265.C1168-0283 (A21)
C1168-0286 (H16)	C1168-0286, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0332, 119, 60/60 (100%)	C81176-0266, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0286.CJE0333.CJ81176.0312.CJB0266.C1168-0286 (D21)
C1168-0287 (H17)	C1168-0287, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0335, 119, 60/60 (100%)	C81176-0269, 119, 60/60 (100%)	greA.CJ0287.CJE0335.CJ81176.0313.CJB0269.C1168-0287 (E21)
C1168-0288 (H18)	C1168-0288, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0336, 119, 60/60 (100%)	C81176-0270, 111, 59/60 (98%)	lpxB.CJ0288.CJ81176.0314.CJB0270.C1168-0288 (F21)
C1168-0288 (H19)	C1168-0288, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0337, 119, 60/60 (100%)	C81176-0271, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0288.CJE0337.CJ81176.0315.CJB0271.C1168-0288 (G21)
C1168-0290 (H20)	C1168-0290, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0338, 119, 60/60 (100%)	C81176-0272, 119, 60/60 (100%)	glt.CJ0290.CJ81176.0316.CJB0272.C1168-0290 (H21)
C1168-0295 (H23)	C1168-0295, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0341, 81.8, 53/57 (65%)	C81176-0275, 73.8, 43/45 (95%)	CJ0295.C1168-0295 (E22)
C1168-0296 (H24)	C1168-0296, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0342, 113, 57/57 (100%)	C81176-0276, 113, 57/57 (100%)	panC.CJ0296.CJE0342.CJ81176.0320.CJB0276.C1168-0296 (G22)
C1168-0299 (H24)	C1168-0299, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0344, 119, 60/60 (100%)	C81176-0278, 111, 59/60 (98%)	CJ0299.CJ81176.0322.CJB0278.C1168-0299 (A23)
C1168-0300 (H1)	C1168-0300, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0345, 119, 60/60 (100%)	C81176-0279, 63.9, 44/48 (91%)	mre.CJ0300.CJE0345.CJ81176.0322.CJB0279.C1168-0300 (B23)
C1168-0301 (H2)	C1168-0301, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0346, 63.4, 44/48 (91%)	C81176-0279, 63.9, 44/48 (91%)	rpmr.CJ0301.C1168-0301 (C23)
C1168-0302 (H3)	C1168-0302, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0348, 50.1, 40/45 (89%)	C81176-0281, 50.1, 40/45 (89%)	CJ0302.C1168-0302 (E23)
C1168-0303 (H4)	C1168-0303, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0349, 52, 39/42 (90%)	C81176-0282, 52, 39/42 (90%)	mre.CJ0303.CJ81176.0324.CJB0282.C1168-0303 (F23)
C1168-0306 (H7)	C1168-0306, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0351, 69.9, 38/39 (97%)	C81176-0283, 69.9, 38/39 (97%)	inf.CJ0306.C1168-0306 (H23)
C1168-0306 (H18)	C1168-0306, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0351, 69.9, 38/39 (97%)	C81176-0284, 69.9, 38/39 (97%)	inf.CJ0306.CJ81176.0326.CJB0286.C1168-0306 (B24)
C1168-0309 (H19)	C1168-0309, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0352, 119, 60/60 (100%)	C81176-0287, 119, 60/60 (100%)	CJ0309.CJE0354.CJ81176.0331.CJB0287.C1168-0309 (C24)
C1168-0310 (H10)	C1168-0310, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0355, 103, 58/60 (96%)	C81176-0288, 119, 60/60 (100%)	CJ0310.CJE0355.CJ81176.0332.CJB0288.C1168-0310 (D24)
C1168-0312 (H11)	C1168-0312, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0356, 119, 60/60 (100%)	C81176-0290, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0312.CJE0357.CJ81176.0334.CJB0290.C1168-0312 (F24)
C1168-0316 (H12)	C1168-0316, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0361, 119, 60/60 (100%)	C81176-0294, 119, 60/60 (100%)	phxA.CJ0316.CJE0361.CJ81176.0338.CJB0294.C1168-0316 (A13)
C1168-0317 (H13)	C1168-0317, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0362, 115, 58/58 (100%)	C81176-0295, 115, 58/58 (100%)	hsc.CJ0317.CJE0362.CJ81176.0339.CJB0295.C1168-0317 (H13)
C1168-0318 (H14)	C1168-0318, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0363, 119, 60/60 (100%)	C81176-0296, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0318.CJE0363.CJ81176.0340.CJB0296.C1168-0318 (C14)
C1168-0323 (H15)	C1168-0323, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0368, 111, 59/60 (98%)	C81176-0301, 111, 59/60 (98%)	CJ0323.CJ81176.0345.CJB0301.C1168-0323 (E14)
C1168-0324 (H16)	C1168-0324, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0369, 119, 60/60 (100%)	C81176-0302, 119, 60/60 (100%)	ufp.CJ0324.CJE0369.CJ81176.0346.CJB0302.C1168-0324 (F14)
C1168-0326 (H17)	C1168-0326, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0371, 119, 60/60 (100%)	C81176-0304, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0326.CJE0371.CJ81176.0348.CJB0304.C1168-0326 (H17)
C1168-0326 (H18)	C1168-0326, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0374, 119, 60/60 (100%)	C81176-0307, 119, 60/60 (100%)	plxB.CJ0326.CJE0374.CJ81176.0351.CJB0307.C1168-0326 (I14)
C1168-0330 (H19)	C1168-0330, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0375, 119, 60/60 (100%)	C81176-0308, 119, 60/60 (100%)	rpmr.CJ0330.CJE0375.CJ81176.0352.CJB0308.C1168-0330 (F15)
C1168-0331 (H20)	C1168-0331, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0376, 119, 60/60 (100%)	C81176-0309, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0331.CJE0376.CJ81176.0353.CJB0309.C1168-0331 (G15)
C1168-0332 (H12)	C1168-0332, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0377, 119, 60/60 (100%)	C81176-0310, 119, 60/60 (100%)	ndk.CJ0332.CJE0377.CJ81176.0354.CJB0310.C1168-0332 (J15)
C1168-0333 (H22)	C1168-0333, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0380, 119, 60/60 (100%)	C81176-0313, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0333.CJE0380.CJ81176.0357.CJB0313.C1168-0333 (H15)
C1168-0333 (H23)	C1168-0333, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0381, 119, 60/60 (100%)	C81176-0314, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0333.CJE0381.CJ81176.0358.CJB0314.C1168-0333 (I15)
C1168-0339 (H24)	C1168-0339, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0384, 119, 60/60 (100%)	C81176-0317, 119, 60/60 (100%)	CJ0339.CJ81176.0363.CJB0317.C1168-0339 (C16)
C1168-0341 (J1)	C1168-0341, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0386, 119, 60/60 (100%)	C81176-0319, 111, 59/60 (98%)	CJ0341.CJE0386.CJ81176.0365.CJB0319.C1168-0341 (H16)
C1168-0342 (J2)	C1168-0342, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0387, 119, 60/60 (100%)	C81176-0320, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0342.CJE0387.CJ81176.0366.CJB0320.C1168-0342 (I16)
C1168-0344 (J3)	C1168-0344, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0392, 71.9, 36/36 (100%)	C81176-0322, 119, 60/60 (100%)	CJ0344.CJ81176.0368.CJB0322.C1168-0344 (N16)
C1168-0345 (J4)	C1168-0345, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0394, 119, 60/60 (100%)	C81176-0323, 119, 60/60 (100%)	rpf.CJ0345.CJE0394.CJ81176.0369.CJB0323.C1168-0345 (O16)
C1168-0346 (J5)	C1168-0346, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0396, 119, 60/60 (100%)	C81176-0325, 119, 60/60 (100%)	inf.CJ0346.CJE0396.CJ81176.0373.CJB0325.C1168-0346 (P16)
C1168-0347 (J6)	C1168-0347, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0398, 119, 60/60 (100%)	C81176-0326, 119, 60/60 (100%)	rpf.CJ0347.CJE0398.CJ81176.0371.CJB0326.C1168-0347 (Q17)
C1168-0348 (J7)	C1168-0348, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0397, 119, 60/60 (100%)	C81176-0328, 119, 60/60 (100%)	rpf.CJ0348.CJE0397.CJ81176.0372.CJB0328.C1168-0348 (R17)
C1168-0350 (J8)	C1168-0350, 119, 60/60			

C1168-0664 (C219)	C1168-0664, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0766, 119, 60/60 (100%)	C81176-0624, 119, 60/60 (100%)	rpK.CJ0664.CJE0766.CJ81176.0691.CJB0624.C1168-0664 (2E19)
C1168-0665 (C219)	C1168-0665, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0767, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-0625, 103, 56/60 (96%)	argG.CJ0665.CJE0767.CJ81176.0692.CJB0625.C1168-0665 (2F19)
C1168-0667 (C220)	C1168-0667, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0770, 111, 59/60 (98%)	C81176-0628, 119, 60/60 (100%)	CJ0667.CJE0768.CJ81176.0693.CJB0628.C1168-0667 (2A20)
C1168-0668 (C221)	C1168-0668, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0771, 111, 59/60 (98%)	C81176-0629, 111, 59/60 (98%)	CJ0668.CJE0769.CJ81176.0694.CJB0629.C1168-0668 (2B20)
C1168-0669 (C222)	C1168-0669, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0772, 111, 59/60 (98%)	C81176-0630, 111, 59/60 (98%)	CJ0669.CJE0770.CJ81176.0695.CJB0630.C1168-0669 (2C20)
C1168-0670 (C223)	C1168-0670, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0773, 48.1, 19/60 (32%)	C81176-0631, 97.5, 48/60 (80%)	ronC.CJ0670.CJE0771.CJ81176.0696.CJB0629.C1168-0670 (2B20)
C1168-0672 (C224)	C1168-0672, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0774, 111, 59/60 (98%)	C81176-0632, 111, 59/60 (98%)	CJ0672.CJ0672.CJ81176.0702.CJB0632.C1168-0672 (2D20)
C1168-0676 (D21)	C1168-0676, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0775, 119, 60/60 (100%)	C81176-0633, 111, 59/60 (98%)	kdaA.CJ0676.CJE0774.CJ81176.0699.CJB0632.CJ1168-0676 (2E20)
C1168-0678 (D22)	C1168-0678, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0776, 111, 59/60 (98%)	C81176-0634, 111, 59/60 (98%)	kdaC.CJ0678.CJE0776.CJ81176.0701.CJB0634.CJ1168-0678 (2G20)
C1168-0679 (D23)	C1168-0679, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0777, 119, 60/60 (100%)	C81176-0635, 119, 60/60 (100%)	kdaD.kdaP.CJ0679.CJE0777.CJ81176.0702.CJB0635.C1168-0679 (2H20)
C1168-0681 (D24)	C1168-0681, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0778, 119, 60/60 (100%)	C81176-0636, 119, 60/60 (100%)	CJ0681.CJE0775.CJ81176.0704.CJB0637.C1168-0681 (2B21)
C1168-0682 (D25)	C1168-0682, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0780, 103, 58/60 (96%)	C81176-0638, 103, 58/60 (96%)	CJ0682.CJE0780.CJ81176.0705.CJB0638.C1168-0682 (2C21)
C1168-0685 (D26)	C1168-0685, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0783, 119, 60/60 (100%)	C81176-0642, 119, 60/60 (100%)	cpaA.CJ0685.CJE0783.CJ81176.0708.CJB0642.C1168-0685 (2F21)
C1168-0686 (D27)	C1168-0686, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0784, 119, 60/60 (100%)	C81176-0643, 119, 60/60 (100%)	hspC.pcpC.CJ0686.CJE0785.CJ81176.0709.CJB0643.C1168-0686 (2G21)
C1168-0687 (D28)	C1168-0687, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0785, 119, 60/60 (100%)	C81176-0644, 119, 60/60 (100%)	flhC.CJ0687.CJE0786.CJ81176.0710.CJB0644.C1168-0687 (2H21)
C1168-0690 (D29)	C1168-0690, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0789, 119, 60/60 (100%)	C81176-0647, 119, 60/60 (100%)	flhG90.CJ0690.CJ81176.0713.CJB0647.CJ1168-0690 (2C22)
C1168-0691 (D20)	C1168-0691, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0790, 119, 60/60 (100%)	C81176-0648, 119, 60/60 (100%)	CJ0691.CJE0789.CJ81176.0714.CJB0649.C1168-0691 (2D22)
C1168-0692 (D1)	C1168-0692, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0791, 119, 60/60 (100%)	C81176-0649, 119, 60/60 (100%)	CJ0692.CJE0791.CJ81176.0715.CJB0649.C1168-0692 (2E22)
C1168-0693 (D21)	C1168-0693, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0792, 119, 60/60 (100%)	C81176-0650, 119, 60/60 (100%)	mnwV.CJ0693.CJE0792.CJ81176.0716.CJB0650.C1168-0693 (2F22)
C1168-0694 (D21)	C1168-0694, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0793, 119, 60/60 (100%)	C81176-0651, 119, 60/60 (100%)	rsA.CJ0694.CJE0793.CJ81176.0717.CJB0651.C1168-0694 (2G22)
C1168-0695 (D21)	C1168-0695, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0794, 119, 60/60 (100%)	C81176-0652, 119, 60/60 (100%)	rsA.CJ0695.CJE0794.CJ81176.0718.CJB0652.C1168-0695 (2H22)
C1168-0696 (D21)	C1168-0696, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0795, 119, 60/60 (100%)	C81176-0653, 119, 60/60 (100%)	hsc.CJ0696.CJE0795.CJ81176.0719.CJB0653.C1168-0696 (2A23)
C1168-0697 (D21)	C1168-0697, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0796, 119, 60/60 (100%)	C81176-0654, 119, 60/60 (100%)	hsc2.CJ0697.CJE0796.CJ81176.0720.CJB0654.C1168-0697 (2B23)
C1168-0700 (D21)	C1168-0700, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0800, 103, 58/60 (96%)	C81176-0657, 111, 59/60 (98%)	CJ0700.CJE0800.CJ81176.0723.CJB0657.C1168-0700 (2E23)
C1168-0701 (D17)	C1168-0701, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0801, 103, 58/60 (96%)	C81176-0658, 119, 60/60 (100%)	CJ0701.CJE0801.CJ81176.0724.CJB0658.C1168-0701 (2F23)
C1168-0702 (D19)	C1168-0702, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0802, 111, 59/60 (98%)	C81176-0659, 111, 59/60 (98%)	puE.CJ0702.CJE0802.CJ81176.0725.CJB0659.C1168-0702 (2G23)
C1168-0704 (D20)	C1168-0704, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0804, 119, 60/60 (100%)	C81176-0661, 119, 60/60 (100%)	glvC.CJ0704.CJE0804.CJ81176.0727.CJB0661.C1168-0704 (2A24)
C1168-0705 (D21)	C1168-0705, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0805, 111, 59/60 (98%)	C81176-0662, 119, 60/60 (100%)	hsc.CJ0705.CJE0805.CJ81176.0728.CJB0662.C1168-0705 (2B24)
C1168-0706 (D22)	C1168-0706, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0806, 119, 60/60 (100%)	C81176-0663, 119, 60/60 (100%)	CJ0706.CJE0806.CJ81176.0731.CJB0663.C1168-0706 (2C24)
C1168-0709 (D23)	C1168-0709, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0809, 111, 59/60 (98%)	C81176-0666, 119, 60/60 (100%)	flh.CJ0709.CJE0809.CJ81176.0732.CJB0666.C1168-0709 (2F24)
C1168-0710 (D24)	C1168-0710, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0810, 119, 60/60 (100%)	C81176-0667, 111, 59/60 (98%)	rsfP.CJ0710.CJE0810.CJ81176.0733.CJB0667.C1168-0710 (2G24)
C1168-0711 (E1)	C1168-0711, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0811, 119, 60/60 (100%)	C81176-0668, 119, 60/60 (100%)	flh.CJ0711.CJE0811.CJ81176.0734.CJB0668.C1168-0711 (2H24)
C1168-0713 (E2)	C1168-0713, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0813, 119, 60/60 (100%)	C81176-0670, 119, 60/60 (100%)	lmd.CJ0713.CJE0813.CJ81176.0736.CJB0670.C1168-0713 (2I23)
C1168-0715 (E3)	C1168-0715, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0815, 119, 60/60 (100%)	C81176-0672, 119, 60/60 (100%)	CJ0715.CJE0815.CJ81176.0738.CJB0672.C1168-0715 (2L23)
C1168-0716 (E4)	C1168-0716, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0816, 119, 60/60 (100%)	C81176-0673, 119, 60/60 (100%)	hspC.CJ0716.CJE0816.CJ81176.0739.CJB0673.C1168-0716 (2M23)
C1168-0717 (E5)	C1168-0717, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0817, 119, 60/60 (100%)	C81176-0674, 119, 60/60 (100%)	CJ0717.CJE0817.CJ81176.0740.CJB0674.C1168-0717 (2N23)
C1168-0718 (E6)	C1168-0718, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0818, 119, 60/60 (100%)	C81176-0675, 119, 60/60 (100%)	hspX.CJ0718.CJE0818.CJ81176.0741.CJB0675.C1168-0718 (2O23)
C1168-0719 (E7)	C1168-0719, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0819, 119, 60/60 (100%)	C81176-0676, 119, 60/60 (100%)	hspC.CJ0719.CJE0819.CJ81176.0742.CJB0676.C1168-0719 (2P23)
C1168-0720 (E8)	C1168-0720, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0820, 119, 60/60 (100%)	C81176-0677, 119, 60/60 (100%)	flh.CJ0720.CJE0820.CJ81176.0743.CJB0677.C1168-0720 (2Q24)
C1168-0721 (E9)	C1168-0721, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0821, 111, 59/60 (98%)	C81176-0678, 119, 60/60 (100%)	CJ0721.CJE0821.CJ81176.0744.CJB0678.C1168-0721 (2R24)
C1168-0722 (E1)	C1168-0722, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0821, 87.7, 56/60 (93%)	C81176-0679, 111, 59/60 (98%)	CJ0722.CJE0822.CJ81176.0745.CJB0679.C1168-0722 (2S24)
C1168-0723 (E11)	C1168-0723, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0823, 119, 60/60 (100%)	C81176-0680, 119, 60/60 (100%)	CJ0723.CJE0823.CJ81176.0746.CJB0680.C1168-0723 (2A25)
C1168-0724 (E12)	C1168-0724, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0824, 87.7, 56/60 (93%)	C81176-0681, 119, 60/60 (100%)	hsc.CJ0724.CJ81176.0747.CJB0681.C1168-0724 (2M24)
C1168-0725 (E13)	C1168-0725, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0825, 119, 60/60 (100%)	C81176-0682, 119, 60/60 (100%)	hsc2.CJ0725.CJE0825.CJ81176.0748.CJB0682.C1168-0725 (2N24)
C1168-0726 (E14)	C1168-0726, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0826, 119, 60/60 (100%)	C81176-0683, 111, 59/60 (98%)	coaA.CJ0726.CJE0826.CJ81176.0749.CJB0683.C1168-0726 (2O24)
C1168-0727 (E15)	C1168-0727, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0827, 111, 59/60 (98%)	C81176-0684, 111, 59/60 (98%)	CJ0727.CJE0827.CJ81176.0750.CJB0684.C1168-0727 (2P24)
C1168-0728 (E16)	C1168-0728, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0828, 119, 60/60 (100%)	C81176-0685, 119, 60/60 (100%)	CJ0728.CJE0828.CJ81176.0751.CJB0685.C1168-0728 (2Q24)
C1168-0729 (E17)	C1168-0729, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0829, 119, 60/60 (100%)	C81176-0686, 119, 60/60 (100%)	CJ0729.CJE0829.CJ81176.0752.CJB0686.C1168-0729 (2R24)
C1168-0730 (E18)	C1168-0730, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0830, 119, 60/60 (100%)	C81176-0687, 119, 60/60 (100%)	CJ0730.CJE0830.CJ81176.0753.CJB0687.C1168-0730 (2S24)
C1168-0731 (E19)	C1168-0731, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0831, 87.7, 56/60 (93%)	C81176-0688, 119, 60/60 (100%)	CJ0731.CJE0831.CJ81176.0754.CJB0688.C1168-0731 (2T24)
C1168-0732 (E20)	C1168-0732, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0833, 111, 59/60 (98%)	C81176-0689, 119, 60/60 (100%)	CJ0732.CJE0833.CJ81176.0756.CJB0690.C1168-0732 (2U24)
C1168-0734 (E21)	C1168-0734, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0834, 119, 60/60 (100%)	C81176-0691, 119, 60/60 (100%)	hspX.CJ0734.CJE0834.CJ81176.0757.CJB0691.C1168-0734 (2O25)
C1168-0735 (E22)	C1168-0735, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0835, 119, 60/60 (100%)	C81176-0692, 119, 60/60 (100%)	CJ0735.CJE0835.CJ81176.0758.CJB0692.C1168-0735 (2P25)
C1168-0736 (E23)	C1168-0736, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0836, 103, 58/60 (96%)	C81176-0693, 119, 60/60 (100%)	CJ0736.CJE0836.CJ81176.0759.CJB0693.C1168-0736 (2Q25)
C1168-0737 (E24)	C1168-0737, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0837, 103, 58/60 (96%)	C81176-0694, 111, 59/60 (98%)	CJ0737.CJE0837.CJ81176.0760.CJB0694.C1168-0737 (2R25)
C1168-0738 (F1)	C1168-0738, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0838, 119, 60/60 (100%)	C81176-0695, 119, 60/60 (100%)	CJ0738.CJE0838.CJ81176.0761.CJB0695.C1168-0738 (2S25)
C1168-0739 (F2)	C1168-0739, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0838, 119, 60/60 (100%)	C81176-0696, 119, 60/60 (100%)	CJ0739.CJ1168-0739 (2P26)
C1168-0740 (F3)	C1168-0740, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0838, 119, 60/60 (100%)	C81176-0697, 119, 60/60 (100%)	CJ0740.CJE0838.CJ1168-0740 (2M26)
C1168-0741 (F4)	C1168-0741, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0840, 111, 59/60 (98%)	C81176-0698, 119, 60/60 (100%)	CJ0741.CJ1168-0741 (2N26)
C1168-0742 (F5)	C1168-0742, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0840, 111, 59/60 (98%)	C81176-0699, 119, 60/60 (100%)	CJ0742.CJ1168-0742 (2P26)
C1168-0743 (F6)	C1168-0743, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0841, 119, 60/60 (100%)	C81176-0700, 119, 60/60 (100%)	hspC.CJ0743.CJE0843.CJ81176.0773.CJB0700.C1168-0743 (2I27)
C1168-0744 (F7)	C1168-0744, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0842, 36.2, 18/60 (50%)	C81176-0703, 36.2, 18/60 (50%)	torB3.torB.CJ0745.CJE0845.CJ1168-0745 (2K27)
C1168-0745 (F8)	C1168-0745, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0845, 119, 60/60 (100%)	C81176-0706, 119, 60/60 (100%)	coaA.CJ0755.CJE0847.CJ1168-0755 (2L27)
C1168-0753 (F28)	C1168-0753, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0847, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-0709, 119, 60/60 (100%)	hspC.CJ0757.CJE0849.CJ81176.0773.CJB0700.C1168-0757 (2M17)
C1168-0755 (F29)	C1168-0755, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0848, 119, 60/60 (100%)	C81176-0710, 119, 60/60 (100%)	hspC.CJ0759.CJE0850.CJ81176.0775.CJB0701.C1168-0759 (2O17)
C1168-0757 (F31)	C1168-0757, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0849, 119, 60/60 (100%)	C81176-0711, 119, 60/60 (100%)	aspB.CJ0761.CJE0851.CJ81176.0777.CJB0702.C1168-0761 (2P17)
C1168-0758 (F32)	C1168-0758, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0850, 119, 60/60 (100%)	C81176-0712, 101, 57/60 (95%)	aspB.pspC.CJ0762.CJE0852.CJ81176.0778.CJB0703.C1168-0762 (2Q18)
C1168-0759 (F33)	C1168-0759, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0850, 119, 60/60 (100%)	C81176-0713, 111, 59/60 (98%)	aspB.pspC.CJ0763.CJE0853.CJ81176.0779.CJB0704.C1168-0763 (2R18)
C1168-0762 (F34)	C1168-0762, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0853, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-0714, 119, 60/60 (100%)	aspB.pspC.CJ0764.CJE0854.CJ81176.0780.CJB0705.C1168-0764 (2S18)
C1168-0763 (F35)	C1168-0763, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0854, 119, 60/60 (100%)	C81176-0715, 119, 60/60 (100%)	aspB.pspC.CJ0765.CJE0855.CJ81176.0781.CJB0706.C1168-0765 (2T18)
C1168-0764 (F36)	C1168-0764, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0855, 119, 60/60 (100%)	C81176-0716, 119, 60/60 (100%)	aspB.pspC.CJ0766.CJE0856.CJ81176.0782.CJB0707.C1168-0766 (2U18)

C1168-1082c (P7)	C1168-1082a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1225, 111, 59/60 (98%)	C81176-1011, 111, 59/60 (98%)	hnd.CJ1082c.CJE1225.CJ81176, 1100.C.BJ1011.C1168-1082c (348)
C1168-1083c (P7)	C1168-1083a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1226, 115, 58/58 (100%)	C81176-1012, 115, 58/58 (100%)	CJ1083c.CJE1226.CJ81176, 1101.C.BJ1012.C1168-1083c (349)
C1168-1085c (P7)	C1168-1085a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1228, 119, 60/60 (100%)	C81176-1014, 119, 60/60 (100%)	mtd.CJ1085c.CJE1228.CJ81176, 1103.C.BJ1014.C1168-1085c (350)
C1168-1087c (P7)	C1168-1087a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1230, 119, 60/60 (100%)	C81176-1016, 119, 60/60 (100%)	anf.CJ1087c.CJE1230.CJ81176, 1105.C.BJ1016.C1168-1087c (351)
C1168-1090c (P7)	C1168-1090a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1233, 107, 57/58 (98%)	C81176-1018, 119, 60/60 (100%)	CJ1090c.CJE1233.CJ81176, 1108.C.BJ1019.C1168-1090c (358)
C1168-1091c (P7)	C1168-1091a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1234, 119, 60/60 (100%)	C81176-1020, 119, 60/60 (100%)	leus.CJ1091c.CJE1234.CJ81176, 1109.C.BJ1020.C1168-1091c (341)
C1168-1092c (P7)	C1168-1092a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1235, 119, 60/60 (100%)	C81176-1022, 119, 60/60 (100%)	sec.DJ1092c.CJE1235.CJ81176, 1110.C.BJ1021.C1168-1092c (353)
C1168-1093c (P7)	C1168-1093a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1236, 119, 60/60 (100%)	C81176-1024, 119, 60/60 (100%)	sec.DJ1093c.CJE1236.CJ81176, 1111.C.BJ1022.C1168-1093c (341)
C1168-1095 (P7)	C1168-1095a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1238, 119, 60/60 (100%)	C81176-1024, 119, 60/60 (100%)	int.cue.CJ1095c.CJE1238.CJ81176, 1113.C.BJ1024.C1168-1095c (351)
C1168-1097 (P7)	C1168-1097a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1240, 119, 60/60 (100%)	C81176-1026, 119, 60/60 (100%)	CJ1097.CJE1240.CJ81176, 1115.C.BJ1026.C1168-1097c (351)
C1168-1098 (P7)	C1168-1098a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1241, 119, 60/60 (100%)	C81176-1027, 119, 60/60 (100%)	pyr.B.CJ1098.CJE1241.CJ81176, 1116.C.BJ1027.C1168-1098c (351)
C1168-1099 (P7)	C1168-1099a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1242, 119, 60/60 (100%)	C81176-1028, 119, 60/60 (100%)	pep.F.CJ1099.CJE1242.CJ81176, 1117.C.BJ1028.C1168-1099c (341)
C1168-1100 (P7)	C1168-1100a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1243, 119, 60/60 (100%)	C81176-1029, 119, 60/60 (100%)	CJ1100.CJE1243.CJ81176, 1118.C.BJ1029.C1168-1100c (351)
C1168-1101 (P7)	C1168-1101a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1244, 119, 60/60 (100%)	C81176-1030, 119, 60/60 (100%)	CJ1101.CJE1244.CJ81176, 1119.C.BJ1030.C1168-1101c (341)
C1168-1103 (P7)	C1168-1103a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1246, 119, 60/60 (100%)	C81176-1032, 119, 60/60 (100%)	chs.CJ1103.CJE1246.CJ81176, 1121.C.BJ1032.C1168-1103c (351)
C1168-1107 (P7)	C1168-1107a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1250, 119, 60/60 (100%)	C81176-1036, 103, 58/60 (98%)	das.CJ1107.CJE1250.CJ81176, 1125.C.BJ1036.C1168-1107c (351)
C1168-1108 (P7)	C1168-1108a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1251, 111, 59/60 (98%)	C81176-1037, 111, 59/60 (98%)	cha.CJ1108.CJE1251.CJ81176, 1126.C.BJ1037.C1168-1108c (351)
C1168-1110 (P7)	C1168-1110a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1253, 119, 60/60 (100%)	C81176-1038, 119, 60/60 (100%)	CJ1110.CJE1253.CJ81176, 1128.C.BJ1039.C1168-1110c (351)
C1168-1111c (P7)	C1168-1111a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1254, 119, 60/60 (100%)	C81176-1040, 119, 60/60 (100%)	pas.A.CJ1111c.CJE1254.CJ81176, 1129.C.BJ1040.C1168-1111c (351)
C1168-1112c (P7)	C1168-1112a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1255, 119, 60/60 (100%)	C81176-1041, 119, 60/60 (100%)	ms.B.CJ1112c.CJE1255.CJ81176, 1130.C.BJ1041.C1168-1112c (351)
C1168-1113 (P7)	C1168-1113a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1256, 111, 59/60 (98%)	C81176-1042, 111, 59/60 (98%)	CJ1113.CJE1256.CJ81176, 1131.C.BJ1042.C1168-1113c (351)
C1168-1114c (P7)	C1168-1114a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1257, 119, 60/60 (100%)	C81176-1043, 111, 59/60 (98%)	pas.A.CJ1114c.CJE1257.CJ81176, 1132.C.BJ1043.C1168-1114c (351)
C1168-1115c (P7)	C1168-1115a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1258, 119, 60/60 (100%)	C81176-1044, 119, 60/60 (100%)	CJ1115.CJE1258.CJ81176, 1133.C.BJ1044.C1168-1115c (351)
C1168-1120c (P7)	C1168-1120a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1263, 119, 60/60 (100%)	C81176-1048, 119, 60/60 (100%)	pal.F.CJ1120c.CJE1263.CJ81176, 1138.C.BJ1048.C1168-1120c (351)
C1168-1121c (P7)	C1168-1121a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1264, 119, 60/60 (100%)	C81176-1050, 119, 60/60 (100%)	pgf.E.wak.CJ1121c.CJE1264.CJ81176, 1139.C.BJ1049.C1168-1121c (351)
C1168-1122c (P7)	C1168-1122a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1265, 111, 59/60 (98%)	C81176-1051, 111, 59/60 (98%)	wal.CJ1122c.CJE1265.CJ81176, 1140.C.BJ1051.C1168-1122c (351)
C1168-1124c (P7)	C1168-1124a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1266, 119, 60/60 (100%)	C81176-1052, 119, 60/60 (100%)	pef.F.wal.CJ1124c.CJE1266.CJ81176, 1141.C.BJ1052.C1168-1124c (351)
C1168-1125c (P7)	C1168-1125a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1267, 119, 60/60 (100%)	C81176-1053, 119, 60/60 (100%)	gnt.CJ1125.CJE1267.CJ81176, 1142.C.BJ1053.C1168-1125c (351)
C1168-1131c (P7)	C1168-1131a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1273, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-1060, 119, 60/60 (100%)	gnt.CJ1131c.CJE1273.CJ81176, 1148.C.BJ1060.C1168-1131c (351)
C1168-1132c (P7)	C1168-1132a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1274, 111, 59/60 (98%)	C81176-1061, 119, 60/60 (100%)	wak.CJ1132c.CJE1274.CJ81176, 1149.C.BJ1061.C1168-1132c (351)
C1168-1135 (P7)	C1168-1135a, 119, 60/60 (100%)	CRM121-1277, 111, 59/60 (98%)	C81176-1064, 111, 59/60 (98%)	CJ1135.CJE1277.CJ81176, 1152.C.BJ1064.C1168-1135c (351)
C1168-1137c (P7)	C1168-1137a, 119, 60/60 (100%)			CJ1137.CJ1168-1137c (351)
C1168-1138 (P7)	C1168-1138a, 119, 60/60 (100%)			wal.N.CJ1138.C1168-1138c (351)
C1168-1139c (P7)	C1168-1139a, 119, 60/60 (100%)			wal.N.CJ1139c.C1168-1139c (351)
C1168-1140 (P7)	C1168-1140a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1140.CJ1168-1140c (351)
C1168-1141 (P7)	C1168-1141a, 119, 60/60 (100%)			neu.B.CJ1141.C1168-1141c (351)
C1168-1142 (P7)	C1168-1142a, 119, 60/60 (100%)			neu.CJ1142.C1168-1142c (351)
C1168-1143 (P7)	C1168-1143a, 119, 60/60 (100%)			neu.A.cda.CJ1143.C1168-1143c (351)
C1168-1144 (P7)	C1168-1144a, 119, 60/60 (100%)			CJ1144.C1168-1144c (351)
C1168-1145c (P7)	C1168-1145a, 119, 60/60 (100%)			CJ1145.C1168-1145c (351)
C1168-1146c (P7)	C1168-1146a, 119, 60/60 (100%)			wav.CJ1146c.CJE1262.CJ81176, 1146.C.BJ1046.C1168-1146c (351)
C1168-1148 (P7)	C1168-1148a, 119, 60/60 (100%)			anf.B.CJ1148.CJE1263.CJ81176, 1148.C.BJ1048.C1168-1148c (351)
C1168-1149c (P7)	C1168-1149a, 119, 60/60 (100%)			gnt.A.gnt.A.C1149c.CJE1264.CJ81176, 1146.C.BJ1049.C1168-1149c (351)
C1168-1153 (P7)	C1168-1153a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1153.CJE1265.CJ81176, 1147.C.BJ1050.C1168-1153c (351)
C1168-1156 (P7)	C1168-1156a, 119, 60/60 (100%)			CJ1156.CJE1266.CJ81176, 1149.C.BJ1052.C1168-1156c (351)
C1168-1158c (P7)	C1168-1158a, 119, 60/60 (100%)			CJ1158.CJE1267.CJ81176, 1150.C.BJ1053.C1168-1158c (351)
C1168-1159c (P7)	C1168-1159a, 119, 60/60 (100%)			CJ1159.CJ1168-1159c (351)
C1168-1160c (P7)	C1168-1160a, 119, 60/60 (100%)			CJ1160.CJ1168-1160c (351)
C1168-1161c (P7)	C1168-1161a, 119, 60/60 (100%)			CJ1161.CJE1268.CJ81176, 1176.C.BJ1058.C1168-1161c (351)
C1168-1162c (P7)	C1168-1162a, 119, 60/60 (100%)			CJ1162.CJE1269.CJ81176, 1177.C.BJ1059.C1168-1162c (351)
C1168-1164c (P7)	C1168-1164a, 119, 60/60 (100%)			CJ1164.CJE1270.CJ81176, 1179.C.BJ1061.C1168-1164c (351)
C1168-1165c (P7)	C1168-1165a, 119, 60/60 (100%)			CJ1165.CJE1271.CJ81176, 1180.C.BJ1062.C1168-1165c (351)
C1168-1167 (P7)	C1168-1167a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1167.CJ1168-1167c (351)
C1168-1168 (P7)	C1168-1168a, 119, 60/60 (100%)			CJ1168.CJ1168-1168c (351)
C1168-1169c (P7)	C1168-1169a, 119, 60/60 (100%)			CJ1169.CJ1168-1169c (351)
C1168-1170c (P7)	C1168-1170a, 119, 60/60 (100%)			omp.S.CJ1170.CJE1304.C1168-1170c (351)
C1168-1171c (P7)	C1168-1171a, 119, 60/60 (100%)			CJ1171.CJE1305.CJ81176, 1183.C.BJ1065.C1168-1171c (351)
C1168-1172c (P7)	C1168-1172a, 119, 60/60 (100%)			CJ1172.CJ1306.CJ81176, 1187.C.BJ1069.C1168-1172c (351)
C1168-1174 (P7)	C1168-1174a, 119, 60/60 (100%)			CJ1174.CJ1307.CJ81176, 1189.C.BJ1101.C1168-1174c (351)
C1168-1175c (P7)	C1168-1175a, 119, 60/60 (100%)			CJ1175.CJ1308.CJ81176, 1190.C.BJ1102.C1168-1175c (351)
C1168-1176c (P7)	C1168-1176a, 119, 60/60 (100%)			tbl.A.CJ1176.CJE1310.CJ81176, 1191.C.BJ1103.C1168-1176c (351)
C1168-1177c (P7)	C1168-1177a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1177.CJE1311.CJ81176, 1192.C.BJ1104.C1168-1177c (351)
C1168-1178c (P7)	C1168-1178a, 119, 60/60 (100%)			CJ1178.CJE1312.CJ81176, 1193.C.BJ1105.C1168-1178c (351)
C1168-1179c (P7)	C1168-1179a, 119, 60/60 (100%)			B.R.CJ1179.CJE1313.CJ81176, 1194.C.BJ1106.C1168-1179c (351)
C1168-1180c (P7)	C1168-1180a, 119, 60/60 (100%)			CJ1180.CJE1314.CJ81176, 1195.C.BJ1107.C1168-1180c (351)
C1168-1181c (P7)	C1168-1181a, 119, 60/60 (100%)			CJ1181.CJE1315.CJ81176, 1196.C.BJ1108.C1168-1181c (351)
C1168-1182c (P7)	C1168-1182a, 119, 60/60 (100%)			pep.B.CJ1182c.CJE1316.CJ81176, 1197.C.BJ1109.C1168-1182c (351)
C1168-1186c (P7)	C1168-1186a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1186.CJE1317.CJ81176, 1201.C.BJ1113.C1168-1186c (351)
C1168-1187c (P7)	C1168-1187a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1187.CJE1318.CJ81176, 1202.C.BJ1114.C1168-1187c (351)
C1168-1189c (P7)	C1168-1189a, 119, 60/60 (100%)			ceb.CJ1189c.CJE1323.CJ81176, 1204.C.BJ1116.C1168-1189c (351)
C1168-1190c (P7)	C1168-1190a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1190c.CJE1324.CJ81176, 1205.C.BJ1117.C1168-1190c (351)
C1168-1191c (P7)	C1168-1191a, 119, 60/60 (100%)			CJ1191.CJE1325.CJ81176, 1206.C.BJ1118.C1168-1191c (351)
C1168-1193c (P7)	C1168-1193a, 119, 60/60 (100%)			CJ1193.CJE1327.CJ81176, 1208.C.BJ1120.C1168-1193c (351)
C1168-1195c (P7)	C1168-1195a, 119, 60/60 (100%)			pyr.C.CJ1195c.CJE1329.CJ81176, 1210.C.BJ1122.C1168-1195c (351)
C1168-1196c (P7)	C1168-1196a, 119, 60/60 (100%)			anf.A.CJ1196c.CJE1330.CJ81176, 1211.C.BJ1123.C1168-1196c (351)
C1168-1197c (P7)	C1168-1197a, 119, 60/60 (100%)			amb.CJ1197c.CJE1331.CJ81176, 1212.C.BJ1124.C1168-1197c (351)
C1168-1198 (P7)	C1168-1198a, 119, 60/60 (100%)			CJ1198.CJE1332.CJ81176, 1213.C.BJ1125.C1168-1198c (351)
C1168-1199 (P7)	C1168-1199a, 119, 60/60 (100%)			CJ1199.CJE1333.CJ81176, 1214.C.BJ1126.C1168-1199c (351)
C1168-1200 (P7)	C1168-1200a, 119, 60/60 (100%)			CJ1200.CJE1334.CJ81176, 1215.C.BJ1127.C1168-1200c (351)
C1168-1201 (P7)	C1168-1201a, 119, 60/60 (100%)			mie.E.CJ1201.CJE1335.CJ81176, 1216.C.BJ1128.C1168-1201c (351)
C1168-1202 (P7)	C1168-1202a, 119, 60/60 (100%)			CJ1202.CJE1336.CJ81176, 1217.C.BJ1129.C1168-1202c (351)
C1168-1204c (P7)	C1168-1204a, 119, 60/60 (100%)			atp.B.CJ1204c.CJE1338.CJ81176, 1219.C.BJ1131.C1168-1204c (351)
C1168-1205c (P7)	C1168-1205a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1205.CJE1339.CJ81176, 1220.C.BJ1132.C1168-1205c (351)
C1168-1207c (P7)	C1168-1207a, 119, 60/60 (100%)			mie.CJ1207.CJE1342.CJ81176, 1222.C.BJ1135.C1168-1207c (351)
C1168-1208 (P7)	C1168-1208a, 119, 60/60 (100%)			CJ1208.CJE1343.CJ81176, 1223.C.BJ1136.C1168-1208c (351)
C1168-1209 (P7)	C1168-1209a, 119, 60/60 (100%)			CJ1209.CJE1344.CJ81176, 1224.C.BJ1137.C1168-1209c (351)
C1168-1212c (P7)	C1168-1212a, 119, 60/60 (100%)			CJ1212.CJ1345.CJ81176, 1234.C.BJ1148.C1168-1212c (441)
C1168-1213c (P7)	C1168-1213a, 119, 60/60 (100%)			CJ1213.CJ1346.CJ81176, 1235.C.BJ1149.C1168-1213c (441)
C1168-1214c (P7)	C1168-1214a, 119, 60/60 (100%)			chl.CJ1214.CJE1348.CJ81176, 1237.C.BJ1141.C1168-1214c (441)
C1168-1215 (P7)	C1168-1215a, 119, 60/60 (100			

CJ1168-1307 (3F12)	CJ1168-1307, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1496, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1233, 87, 7, 56/60 (93%)	CJ1307-CJE1486-CJ1168-1307 (4G12)
CJ1168-1308 (3F13)	CJ1168-1308, 119, 60/60 (100%)		CB1176-1237, 11, 58/60 (100%)	acpP4-CJ1308-CJ1168-1307, 1326-CJ1237-cj81-176, 123-CJ1168-1308 (4H12)
CJ1168-1309 (3F14)	CJ1168-1309, 119, 60/60 (100%)			CJ1309-CJ1168-1309e (4I1)
CJ1168-1311 (3F15)	CJ1168-1311, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1506, 103, 58/60 (96%)	CB1176-1239, 103, 58/60 (96%)	CJ1311-CJ1168-1311 (4J1)
CJ1168-1313 (3F16)	CJ1168-1313, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1510, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1243, 119, 60/60 (100%)	hHhHhHhL1CJ1315-CJE1506-CJ1168-1311, 1326-CJ1237-cj81-176, 123-CJ1168-1313e (4O1)
CJ1168-1316 (3F17)	CJ1168-1316, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1511, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1244, 119, 60/60 (100%)	psaA-CJ1316-CJE1511-CJ1168-1316, 1333-CJ1244-cj81-176, 130-CJ1168-1316e (4P1)
CJ1168-1317 (3F18)	CJ1168-1317, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1512, 71, 9, 54/60 (90%)	CB1176-1245, 119, 60/60 (100%)	psfA-CJ1317-CJE1512-CJ1168-1317, 1334-CJ1245-cj81-176, 131-CJ1168-1317 (4Q1)
CJ1168-1318 (3F19)	CJ1168-1318, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1513, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1247, 75, 8, 53/60 (89%)	mafJ-CJ1318-CJ1168-1318 (4R1)
CJ1168-1319 (3F20)	CJ1168-1319, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1514, 119, 60/60 (100%)		CJ1319-CJE1513-CJ1168-1319 (4K2)
CJ1168-1320 (3F21)	CJ1168-1320, 119, 60/60 (100%)			CJ1320-CJE1514-CJ1168-1320 (4L2)
CJ1168-1321 (3F22)	CJ1168-1321, 119, 60/60 (100%)			CJ1321-CJ1168-1321 (4M2)
CJ1168-1322 (3F23)	CJ1168-1322, 119, 60/60 (100%)			CJ1322-CJ1168-1322 (4N2)
CJ1168-1323 (3F24)	CJ1168-1323, 119, 60/60 (100%)			CJ1323-CJ1168-1323 (4O2)
CJ1168-1324 (3G1)	CJ1168-1324, 119, 60/60 (100%)			CJ1324-CJ1168-1324 (4P2)
CJ1168-1325 (3G2)	CJ1168-1325, 119, 60/60 (100%)			CJ1325-CJ1168-1325 (4Q2)
CJ1168-1326 (3G3)	CJ1168-1326, 119, 60/60 (100%)			CJ1326-CJ1168-1326 (4R2)
CJ1168-1327 (3G4)	CJ1168-1327, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1516, 103, 58/60 (96%)		neuB-gmrc-CJ1327-CJE1516-CJ1168-1327 (4K3)
CJ1168-1328 (3G5)	CJ1168-1328, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1517, 111, 59/60 (98%)		neuC-neuC-CJ1328-CJE1517-CJ1168-1328 (4L3)
CJ1168-1329 (3G6)	CJ1168-1329, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1518, 119, 60/60 (100%)		CJ1329-CJE1518-CJ1168-1329 (4M3)
CJ1168-1332 (3G7)	CJ1168-1332, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1521, 103, 58/60 (96%)		phnA-CJ1332-CJE1521-CJ1168-1332 (4P3)
CJ1168-1333 (3G8)	CJ1168-1333, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1522, 87, 7, 53/60 (94%)	CB1176-1247, 36, 2, 18/18 (100%)	psaD-CJ1333-CJ1168-1333 (4Q4)
CJ1168-1335 (3G9)	CJ1168-1335, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1524, 107, 57/60 (95%)	CB1176-1247, 75, 8, 53/60 (91%)	mafA-CJ1335-CJ1168-1335 (4K4)
CJ1168-1336 (3G10)	CJ1168-1336, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1528, 103, 58/60 (96%)	CB1176-1249, 36, 2, 19/19 (100%)	mafB-CJ1336-CJ1168-1336 (4L4)
CJ1168-1339 (3G11)	CJ1168-1339, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1528, 103, 58/60 (96%)	CB1176-1250, 56, 46/52 (88%)	flaA-CJ1339-CJE1528-CJ1168-1339e (4P4)
CJ1168-1340 (3G12)	CJ1168-1340, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1529, 105, 56/57 (98%)		mafC-CJ1340-CJE1529-CJ1168-1340 (4Q4)
CJ1168-1341 (3G13)	CJ1168-1341, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1530, 87, 7, 53/60 (94%)		mafD-CJ1341-CJ1168-1341e (4R4)
CJ1168-1342 (3G14)	CJ1168-1342, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1531, 87, 7, 56/60 (93%)		mafJ-CJ1342-CJ1168-1342e (4J5)
CJ1168-1344 (3G15)	CJ1168-1344, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1533, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1254, 111, 59/60 (98%)	gspC-gsp44-CJE1533-CJ1168-1344, 1343-CJ1254-CJ1168-1344e (4L5)
CJ1168-1345 (3G16)	CJ1168-1345, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1534, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1255, 111, 59/60 (98%)	CJ1345-CJE1534-CJ1168-1345, 1344-CJ1255-CJ1168-1345e (4M5)
CJ1168-1347 (3G17)	CJ1168-1347, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1536, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1257, 119, 60/60 (100%)	cdsA-CJ1347-CJE1536-CJ1168-1347, 1346-CJ1257-CJ1168-1347e (4O5)
CJ1168-1351 (3G18)	CJ1168-1351, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1540, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1261, 119, 60/60 (100%)	phA-CJ1351-CJE1540-CJ1168-1351, 1350-CJ1261-CJ1168-1351e (4K6)
CJ1168-1354 (3G19)	CJ1168-1354, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1541, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1267, 119, 60/60 (100%)	CJ1354-CJE1541-CJ1168-1354, 1353-CJ1264-CJ1168-1354e (4N6)
CJ1168-1356 (3G20)	CJ1168-1356, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1545, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1267, 119, 60/60 (100%)	CJ1356-CJE1545-CJ1168-1356, 1358-CJ1267-CJ1168-1356e (4P6)
CJ1168-1367 (3G21)	CJ1168-1367, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1546, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1268, 119, 60/60 (100%)	nhaA-CJ1367-CJE1546-CJ1168-1367, 1359-CJ1268-CJ1168-1367e (4Q7)
CJ1168-1369 (3G22)	CJ1168-1369, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1548, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1269, 119, 60/60 (100%)	nhaB-CJ1369-CJE1548-CJ1168-1369, 1360-CJ1269-CJ1168-1369e (4R7)
CJ1168-1369 (3G23)	CJ1168-1369, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1548, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1270, 119, 60/60 (100%)	pkp-CJ1369-CJE1548-CJ1168-1369, 1361-CJ1270-CJ1168-1369e (4K7)
CJ1168-1361c (3G24)	CJ1168-1361c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1553, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1271, 119, 60/60 (100%)	CJ1361c-CJE1553-CJ1168-1361c, 1363-CJ1271-CJ1168-1361c (4M7)
CJ1168-1362 (3H1)	CJ1168-1362, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1554, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1272, 119, 60/60 (100%)	nhaC-CJ1362-CJE1554-CJ1168-1362, 1364-CJ1272-CJ1168-1362e (4N7)
CJ1168-1363 (3H2)	CJ1168-1363, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1555, 111, 56/56 (100%)	CB1176-1273, 119, 60/60 (100%)	hnaA-CJ1363-CJ1168-1363, 1365-CJ1273-CJ1168-1363e (4O7)
CJ1168-1364 (3H3)	CJ1168-1364, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1556, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1274, 119, 60/60 (100%)	gmsC-CJ1364-CJE1556-CJ1168-1364, 1366-CJ1274-cj81-176, 141-CJ1168-1364e (4P7)
CJ1168-1365 (3H4)	CJ1168-1365, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1557, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1275, 119, 60/60 (100%)	nhaD-CJ1365-CJE1557-CJ1168-1365, 1367-CJ1275-CJ1168-1365e (4Q8)
CJ1168-1366 (3H5)	CJ1168-1366, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1558, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1276, 119, 60/60 (100%)	gmsS-CJ1366-CJE1558-CJ1168-1366, 1368-CJ1276-CJ1168-1366e (4J8)
CJ1168-1367 (3H6)	CJ1168-1367, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1559, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1277, 119, 60/60 (100%)	CJ1367-CJE1559-CJ1168-1367, 1369-CJ1277-CJ1168-1367e (4K8)
CJ1168-1369 (3H7)	CJ1168-1369, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1560, 71, 9, 54/60 (90%)	CB1176-1278, 61, 9, 50/59 (88%)	CB1168-1369 (4L8)
CJ1168-1369 (3H8)	CJ1168-1369, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1561, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1280, 111, 59/60 (98%)	CJ1369-CJE1561-CJ1168-1369, 1372-CJ1280-cj81-176, 143-CJ1168-1369e (4M8)
CJ1168-1370 (3H9)	CJ1168-1370, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1562, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1281, 103, 58/60 (96%)	CJ1370-CJE1562-CJ1168-1370, 1373-CJ1281-CJ1168-1370e (4N8)
CJ1168-1373 (3H10)	CJ1168-1373, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1565, 95, 6, 57/60 (95%)	CB1176-1284, 103, 58/60 (96%)	CJ1373-CJE1565-CJ1168-1373, 1376-CJ1284-CJ1168-1373e (4Q8)
CJ1168-1374c (3H11)	CJ1168-1374c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1566, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1285, 119, 60/60 (100%)	CJ1374c-CJE1566-CJ1168-1374c, 1377-CJ1285-CJ1168-1374c (4R8)
CJ1168-1375 (3H12)	CJ1168-1375, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1567, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1286, 119, 60/60 (100%)	CJ1375-CJE1567-CJ1168-1375, 1378-CJ1286-CJ1168-1375e (4J8)
CJ1168-1376 (3H13)	CJ1168-1376, 119, 60/60 (100%)			CJ1376-CJ1168-1376 (4L8)
CJ1168-1377c (3H14)	CJ1168-1377c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1568, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1287, 119, 60/60 (100%)	CJ1377c-CJE1568-CJ1168-1377c, 1379-CJ1287-CJ1168-1377c (4M8)
CJ1168-1378 (3H15)	CJ1168-1378, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1569, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1288, 119, 60/60 (100%)	seaA-CJ1378-CJE1569-CJ1168-1378, 1380-CJ1288-CJ1168-1378e (4N8)
CJ1168-1380 (3H16)	CJ1168-1380, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1571, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1293, 119, 60/60 (100%)	CJ1380-CJE1571-CJ1168-1380, 1382-CJ1293-CJ1168-1380e (4P8)
CJ1168-1383c (3H17)	CJ1168-1383c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1574, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1293, 119, 60/60 (100%)	CJ1383c-CJE1574-CJ1168-1383c, 1385-CJ1293-CJ1168-1383e (4K10)
CJ1168-1385 (3H18)	CJ1168-1385, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1575, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1294, 119, 60/60 (100%)	CJ1384-CJE1575-CJ1168-1384, 1386-CJ1294-CJ1168-1384e (4L10)
CJ1168-1386 (3H20)	CJ1168-1386, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1577, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1295, 119, 60/60 (100%)	hpaA-CJ1385-CJE1576-CJ1168-1385, 1387-CJ1295-CJ1168-1385e (4M10)
CJ1168-1387c (3H21)	CJ1168-1387c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1578, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1296, 119, 60/60 (100%)	CJ1387c-CJE1577-CJ1168-1387c, 1388-CJ1296-CJ1168-1387c (4N10)
CJ1168-1392 (3H22)	CJ1168-1392, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1579, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1297, 119, 60/60 (100%)	CJ1387-CJE1578-CJ1168-1392, 1389-CJ1297-CJ1168-1387e (4O10)
CJ1168-1393 (3H23)	CJ1168-1393, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1581, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1300, 111, 59/60 (98%)	metC-CJ1393-CJ1168-1393 (4K11)
CJ1168-1394 (3H24)	CJ1168-1394, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1582, 36, 2, 19/19 (100%)	CB1176-1301, 109, 58/59 (98%)	CJ1394-CJ1168-1394 (4L11)
CJ1168-1395 (3H1)	CJ1168-1395, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1576, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1302, 111, 59/60 (98%)	CJ1395-CJE1583-CJ1168-1395, 1394-CJ1302-CJ1168-1395e (4M11)
CJ1168-1399c (3H2)	CJ1168-1399c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1586, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1305, 111, 59/60 (98%)	hydA2-CJ1399c-CJE1586-CJ1168-1399c, 1398-CJ1305-CJ1168-1399c (4P11)
CJ1168-1400 (3H3)	CJ1168-1400, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1587, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1306, 111, 59/60 (98%)	fabJ-CJ1400-CJE1589-CJ1168-1400, 1399-CJ1306-CJ1168-1400e (4Q11)
CJ1168-1401c (3H4)	CJ1168-1401c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1588, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1307, 119, 60/60 (100%)	CJ1401c-CJE1588-CJ1168-1401c, 1400-CJ1307-CJ1168-1401e (4J11)
CJ1168-1402c (3H5)	CJ1168-1402c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1589, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1308, 119, 60/60 (100%)	pkp-CJ1402c-CJE1589-CJ1168-1402c, 1401-CJ1308-CJ1168-1402c (4K12)
CJ1168-1403c (3H6)	CJ1168-1403c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1590, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1309, 119, 60/60 (100%)	gmsA-CJ1403c-CJE1590-CJ1168-1403c, 1402-CJ1309-CJ1168-1403e (4L12)
CJ1168-1404 (3H7)	CJ1168-1404, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1591, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1310, 119, 60/60 (100%)	hpaB-CJ1404-CJE1591-CJ1168-1404, 1403-CJ1310-CJ1168-1404e (4M12)
CJ1168-1405 (3H8)	CJ1168-1405, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1592, 111, 59/60 (98%)	CB1176-1311, 103, 58/60 (96%)	CJ1405-CJE1592-CJ1168-1405, 1404-CJ1311-CJ1168-1405e (4N12)
CJ1168-1406 (3H9)	CJ1168-1406, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1593, 87, 7, 56/60 (93%)	CB1176-1312, 119, 60/60 (100%)	CJ1406-CJ1168-1406, 1405-CJ1312-CJ1168-1406e (4O12)
CJ1168-1410 (3H10)	CJ1168-1410, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1597, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1312, 119, 60/60 (100%)	hpaC-CJ1406-CJE1597-CJ1168-1410, 1409-CJ1312-CJ1168-1410e (4J13)
CJ1168-1411c (3H11)	CJ1168-1411c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1598, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1317, 111, 59/60 (98%)	CJ1411c-CJE1598-CJ1168-1411c, 1410-CJ1317-CJ1168-1411c (4K13)
CJ1168-1412 (3H12)	CJ1168-1412, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1599, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1318, 119, 60/60 (100%)	CJ1412-CJE1599-CJ1168-1412, 1411-CJ1318-CJ1168-1412e (4L13)
CJ1168-1413c (3H13)	CJ1168-1413c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1600, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1319, 119, 60/60 (100%)	CJ1413c-CJE1600-CJ1168-1413c, 1412-CJ1319-CJ1168-1413e (4M13)
CJ1168-1414c (3H14)	CJ1168-1414c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1601, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1320, 111, 59/60 (98%)	hpaC-CJ1414c-CJE1601-CJ1168-1414c, 1413-CJ1319-CJ1168-1414e (4N13)
CJ1168-1415 (3H15)	CJ1168-1415, 119, 60/60 (100%)		CB1176-1321, 111, 59/60 (98%)	evyS-CJ1415-CJE1602-CJ1168-1415, 1412-CJ1321-cj81-176, 1430-CJ1168-1415e (4H13)
CJ1168-1422c (3H16)	CJ1168-1422c, 119, 60/60 (100%)		CB1176-1325, 119, 60/60 (100%)	CJ1422c-CJE1603-CJ1168-1422c, 1419-CJ1325-cj81-176, 154-CJ1168-1422e (4E14)
CJ1168-1421c (3H17)	CJ1168-1421c, 119, 60/60 (100%)			CJ1421c-CJ1168-1421e (4F14)
CJ1168-1422c (3H18)	CJ1168-1422c, 119, 60/60 (100%)			CJ1422c-CJ1168-1422e (4G14)
CJ1168-1423c (3H19)	CJ1168-1423c, 119,			



C1168-1513c (DL18)	C1168-1513b, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1685, 103, 58/60 (96%)	C81176-1407, 111, 59/60 (98%)	CJ1533c;CJE1685;CJ81176, 1505;CJB1407;C1168-1513c (AN13)
C1168-1515c (DL19)	C1168-1515b, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1688, 110, 59/60 (98%)	C81176-1409, 111, 59/60 (98%)	nsP;CJ1515c;CJE1688;CJ81176, 1507;CJB1409;C1168-1515c (4P13)
C1168-1516 (3L20)	C1168-1516, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1689, 103, 58/60 (96%)	C81176-1410, 103, 58/60 (96%)	CJ1516c;CJE1689;CJ81176, 1508;CJB1410;C1168-1516 (4D14)
C1168-1518 (3L21)	C1168-1518, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1692, 105, 55/60 (92%)	C81176-1413, 105, 55/60 (92%)	moaA;CJ1518c;C1168-1518 (4K14)
C1168-1519 (3L22)	C1168-1519, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1693, 119, 60/60 (100%)	C81176-1413, 119, 60/60 (100%)	moaA2;CJ1519c;CJE1693;CJ81176, 1511;CJB1413;C1168-1519 (4L14)
C1168-1520 (3L23)	C1168-1520, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1694, 119, 60/60 (100%)	C81176-1413, 119, 60/60 (100%)	CJ1520c;C1168-1520 (4M14)
C1168-1521c (3L24)	C1168-1521, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1695, 119, 60/60 (100%)	C81176-1413, 119, 60/60 (100%)	cas2;CJ1521c;CJE1695;CJ81176, 1512;CJB1414;C1168-1521c (4N14)
C1168-1522c (3L25)	C1168-1522, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1695, 119, 60/60 (100%)	C81176-1413, 119, 60/60 (100%)	cas1;CJ1522c;CJE1695;CJ81176, 1512;CJB1414;C1168-1522c (4O14)
C1168-1523c (3M2)	C1168-1523, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1697, 111, 59/60 (98%)	C81176-1416, 119, 60/60 (100%)	CJ1523c;CJE1697;C1168-1523c (4P14)
C1168-1528 (3M3)	C1168-1528, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1699, 119, 60/60 (100%)	C81176-1416, 119, 60/60 (100%)	puM;CJ1528c;CJE1700;CJ81176, 1514;CJB1416;C1168-1528 (4J15)
C1168-1529c (3M4)	C1168-1529, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1700, 119, 60/60 (100%)	C81176-1421, 119, 60/60 (100%)	CJ1534c;CJE1705;CJ81176, 1519;CJB1421;C1168-1534c (4O15)
C1168-1534c (3M5)	C1168-1534, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1705, 119, 60/60 (100%)	C81176-1423, 119, 60/60 (100%)	gAU;CJ1539c;CJE1707;CJ81176, 1521;CJB1423;C1168-1539c (4I16)
C1168-1536c (3M6)	C1168-1536, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1707, 119, 60/60 (100%)	C81176-1424, 119, 60/60 (100%)	moaA;CJ1536c;CJE1708;CJ81176, 1522;CJB1424;C1168-1536c (4J16)
C1168-1537c (3M7)	C1168-1537, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1708, 119, 60/60 (100%)	C81176-1426, 119, 60/60 (100%)	CJ1539c;CJE1710;CJ81176, 1524;CJB1426;C1168-1539c (4L16)
C1168-1539c (3M8)	C1168-1539, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1710, 119, 60/60 (100%)	C81176-1426, 119, 60/60 (100%)	CJ1541c;CJE1712;CJ81176, 1526;CJB1428;C1168-1541c (4M16)
C1168-1541 (3M9)	C1168-1541, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1712, 119, 60/60 (100%)	C81176-1428, 119, 60/60 (100%)	CJ1542c;CJE1713;CJ81176, 1527;CJB1429;C1168-1542c (4O16)
C1168-1542 (3M10)	C1168-1542, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1713, 119, 60/60 (100%)	C81176-1430, 119, 60/60 (100%)	CJ1543c;CJE1714;CJ81176, 1528;CJB1430;C1168-1543c (4P16)
C1168-1543 (3M11)	C1168-1543, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1714, 119, 60/60 (100%)	C81176-1431, 119, 60/60 (100%)	CJ1544c;CJE1715;CJ81176, 1529;CJB1431;C1168-1544c (4I17)
C1168-1544c (3M12)	C1168-1544, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1715, 119, 60/60 (100%)	C81176-1432, 119, 60/60 (100%)	CJ1545c;CJE1716;CJ81176, 1530;CJB1432;C1168-1545c (4J17)
C1168-1545c (3M13)	C1168-1545, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1716, 119, 60/60 (100%)	C81176-1433, 119, 60/60 (100%)	CJ1546c;CJE1717;CJ81176, 1531;CJB1433;C1168-1546c (4K17)
C1168-1546 (3M14)	C1168-1546, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1717, 119, 60/60 (100%)	C81176-1436, 119, 60/60 (100%)	hdsR;CJ1546c;CJ81176, 1534;CJB1436;C1168-1546c (4I17)
C1168-1549c (3M15)	C1168-1549, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1719, 119, 60/60 (100%)	C81176-1437, 119, 60/60 (100%)	hdsM;CJ1550c;CJ81176, 1535;CJB1437;C1168-1550c (4O17)
C1168-1550c (3M16)	C1168-1550, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1720, 119, 60/60 (100%)	C81176-1438, 119, 60/60 (100%)	hdsS;CJ1551c;CJ81176, 1536;CJB1438;C1168-1551c (4P17)
C1168-1551c (3M17)	C1168-1551, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1721, 119, 60/60 (100%)	C81176-1440, 119, 60/60 (100%)	moaB;CJ1552c;CJ81176, 1538;CJB1439;C1168-1552c (4I18)
C1168-1552c (3M18)	C1168-1552, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1722, 119, 60/60 (100%)	C81176-1442, 119, 60/60 (100%)	CJ1556c;CJ81176, 1542;CJB1442;C1168-1556c (4L18)
C1168-1553c (3M19)	C1168-1553, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1723, 119, 60/60 (100%)	C81176-1445, 119, 60/60 (100%)	hdsM;CJ1553c;CJ81176, 1539;CJB1440;C1168-1553c (4I18)
C1168-1556 (3M20)	C1168-1556, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1724, 119, 60/60 (100%)	C81176-1445, 119, 60/60 (100%)	CJ1558c;CJ81176, 1542;CJB1442;C1168-1558c (4L18)
C1168-1558 (3M21)	C1168-1558, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1730, 119, 60/60 (100%)	C81176-1445, 119, 60/60 (100%)	hdsR;CJ1561;CJ81176, 1545;CJB1444;C1168-1561 (4O18)
C1168-1561 (3M22)	C1168-1561, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1731, 117, 59/59 (100%)	C81176-1445, 119, 60/60 (100%)	CJ1562c;C1168-1562 (4P18)
C1168-1562 (3M23)	C1168-1562, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1731, 58, 38/41 (92%)	C81176-1446, 119, 60/60 (100%)	CJ1563c;CJE1734;CJ81176, 1547;CJB1446;C1168-1563c (4I19)
C1168-1563c (3M24)	C1168-1563, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1734, 111, 59/60 (98%)	C81176-1446, 119, 60/60 (100%)	CJ1565c;CJE1736;CJ81176, 1550;CJB1448;C1168-1565c (4K19)
C1168-1566c (3N1)	C1168-1566, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1736, 119, 60/60 (100%)	C81176-1449, 119, 60/60 (100%)	nuoM;CJ1566c;CJE1737;CJ81176, 1551;CJB1449;C1168-1566c (4L19)
C1168-1566c (3N2)	C1168-1566, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1737, 111, 59/60 (98%)	C81176-1449, 119, 60/60 (100%)	nuoN;CJ1567c;CJE1738;CJ81176, 1552;CJB1450;C1168-1567c (4M19)
C1168-1567c (3N3)	C1168-1567, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1738, 111, 59/60 (98%)	C81176-1451, 119, 60/60 (100%)	nuoC;CJ1570c;CJE1739;CJ81176, 1553;CJB1451;C1168-1570c (4K20)
C1168-1569c (3N4)	C1168-1569, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1739, 119, 60/60 (100%)	C81176-1451, 119, 60/60 (100%)	nuoT;CJ1571c;CJE1742;CJ81176, 1556;CJB1454;C1168-1571c (4I20)
C1168-1571c (3N5)	C1168-1571, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1742, 119, 60/60 (100%)	C81176-1455, 119, 60/60 (100%)	hdsM;CJ1572c;CJE1743;CJ81176, 1557;CJB1455;C1168-1572c (4J20)
C1168-1572c (3N6)	C1168-1572, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1743, 119, 60/60 (100%)	C81176-1456, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1573c;CJE1744;CJ81176, 1558;CJB1456;C1168-1573c (4K20)
C1168-1574c (3N8)	C1168-1574, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1745, 119, 60/60 (100%)	C81176-1457, 119, 60/60 (100%)	CJ1574c;CJE1745;CJ81176, 1559;CJB1457;C1168-1574c (4L20)
C1168-1575c (3N9)	C1168-1575, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1747, 119, 60/60 (100%)	C81176-1459, 119, 60/60 (100%)	nuoD;CJ1576c;CJE1747;CJ81176, 1561;CJB1459;C1168-1576c (4P20)
C1168-1577c (3N10)	C1168-1577, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1748, 119, 60/60 (100%)	C81176-1461, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1577c;CJE1748;CJ81176, 1562;CJB1461;C1168-1577c (4K20)
C1168-1578c (3N11)	C1168-1578, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1749, 115, 58/58 (100%)	C81176-1461, 119, 60/60 (100%)	nuoB;CJ1578c;CJE1749;CJ81176, 1563;CJB1461;C1168-1578c (4P20)
C1168-1579c (3N12)	C1168-1579, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1750, 119, 60/60 (100%)	C81176-1462, 119, 60/60 (100%)	hdsA;CJ1579c;CJE1750;CJ81176, 1564;CJB1462;C1168-1579c (4I21)
C1168-1582c (3N13)	C1168-1582, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1751, 119, 60/60 (100%)	C81176-1462, 119, 60/60 (100%)	hdsM;CJ1582c;CJ81176, 1567;CJB1465;C1168-1582c (4I21)
C1168-1583c (3N14)	C1168-1583, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1752, 119, 60/60 (100%)	C81176-1466, 119, 60/60 (100%)	CJ1583c;CJE1754;CJ81176, 1568;CJB1466;C1168-1583c (4M21)
C1168-1584c (3N15)	C1168-1584, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1755, 71, 5/5 (91%)	C81176-1467, 111, 59/60 (98%)	CJ1584c;CJ81176, 1569;CJB1467;C1168-1584c (4N21)
C1168-1585c (3N16)	C1168-1585, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1756, 119, 60/60 (100%)	C81176-1471, 111, 59/60 (98%)	CJ1585c;CJE1758;CJ81176, 1569;CJB1469;C1168-1585c (4O21)
C1168-1588c (3N17)	C1168-1588, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1759, 119, 60/60 (100%)	C81176-1474, 111, 59/60 (98%)	CJ1588c;CJE1759;CJ81176, 1576;CJB1474;C1168-1588c (4J22)
C1168-1593 (3N18)	C1168-1593, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1765, 119, 60/60 (100%)	C81176-1479, 119, 60/60 (100%)	psk;CJ1593c;CJE1765;CJ81176, 1580;CJB1479;C1168-1593c (4O22)
C1168-1594 (3N19)	C1168-1594, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1766, 119, 60/60 (100%)	C81176-1484, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1594c;CJE1766;CJ81176, 1581;CJB1484;C1168-1594c (4P22)
C1168-1596 (3N20)	C1168-1596, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1768, 119, 60/60 (100%)	C81176-1482, 119, 60/60 (100%)	piQ;CJ1596c;CJE1768;CJ81176, 1583;CJB1482;C1168-1596c (4J23)
C1168-1597 (3N21)	C1168-1597, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1769, 119, 60/60 (100%)	C81176-1483, 119, 60/60 (100%)	hdsG;CJ1597c;CJE1769;CJ81176, 1584;CJB1483;C1168-1597c (4K23)
C1168-1598 (3N22)	C1168-1598, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1770, 119, 60/60 (100%)	C81176-1485, 119, 60/60 (100%)	CJ1598c;CJE1770;CJ81176, 1585;CJB1484;C1168-1598c (4L23)
C1168-1601 (3N23)	C1168-1601, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1773, 119, 60/60 (100%)	C81176-1487, 119, 60/60 (100%)	hdsA;CJ1601c;CJE1773;CJ81176, 1588;CJB1487;C1168-1601c (4O23)
C1168-1602 (3N24)	C1168-1602, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1774, 119, 60/60 (100%)	C81176-1488, 119, 60/60 (100%)	CJ1602c;CJE1774;CJ81176, 1589;CJB1488;C1168-1602c (4P23)
C1168-1604 (3O1)	C1168-1604, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1775, 111, 59/60 (98%)	C81176-1488, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1604c;CJE1775;CJ81176, 1591;CJB1489;C1168-1604c (4I23)
C1168-1606c (3O2)	C1168-1606, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1778, 119, 60/60 (100%)	C81176-1492, 119, 60/60 (100%)	mp;CJ1606c;CJE1778;CJ81176, 1593;CJB1492;C1168-1606c (4L24)
C1168-1607 (3O3)	C1168-1607, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1779, 119, 60/60 (100%)	C81176-1494, 119, 60/60 (100%)	ispD;CJ1607c;CJE1779;CJ81176, 1593;CJB1493;C1168-1607c (4M24)
C1168-1608 (3O4)	C1168-1608, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1781, 119, 60/60 (100%)	C81176-1494, 119, 60/60 (100%)	hdsM;CJ1608c;CJ81176, 1596;CJB1494;C1168-1608c (4J24)
C1168-1609 (3O5)	C1168-1609, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1781, 119, 60/60 (100%)	C81176-1495, 119, 60/60 (100%)	CJ1609c;CJE1781;CJ81176, 1596;CJB1495;C1168-1609c (4O24)
C1168-1610 (3O6)	C1168-1610, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1782, 119, 60/60 (100%)	C81176-1496, 119, 60/60 (100%)	paq;CJ1610c;CJE1782;CJ81176, 1597;CJB1496;C1168-1610c (4P24)
C1168-1611 (3O7)	C1168-1611, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1783, 119, 60/60 (100%)	C81176-1496, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1611c;CJE1783;CJ81176, 1598;CJB1497;C1168-1611c (4O24)
C1168-1612 (3O8)	C1168-1612, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1784, 119, 60/60 (100%)	C81176-1496, 119, 60/60 (100%)	piA;CJ1612c;CJE1784;CJ81176, 1599;CJB1498;C1168-1612c (5E1)
C1168-1613c (3O9)	C1168-1613, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1785, 119, 60/60 (100%)	C81176-1499, 117, 59/59 (100%)	CJ1613c;CJE1785;CJ81176, 1600;CJB1499;C1168-1613c (5C1)
C1168-1614 (3O10)	C1168-1614, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1786, 103, 58/60 (96%)	C81176-1499, 119, 60/60 (100%)	CJ1614c;CJE1786;CJ81176, 1601;CJB1499;C1168-1614c (5D1)
C1168-1615 (3O11)	C1168-1615, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1787, 119, 60/60 (100%)	C81176-1501, 115, 58/58 (100%)	chb;CJ1615c;CJE1787;CJ81176, 1602;CJB1501;C1168-1615c (5E1)
C1168-1616 (3O12)	C1168-1616, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1788, 119, 60/60 (100%)	C81176-1502, 119, 60/60 (100%)	hdsC;CJ1616c;CJE1788;CJ81176, 1603;CJB1502;C1168-1616c (5F1)
C1168-1617 (3O13)	C1168-1617, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1789, 119, 60/60 (100%)	C81176-1503, 119, 60/60 (100%)	CJ1617c;CJE1789;CJ81176, 1604;CJB1503;C1168-1617c (5G1)
C1168-1618c (3O14)	C1168-1618, 119, 60/60 (100%)	CRM122		

C11828-04 (EP17)	C11168-0735, 36.2, 18/18 (100%)	CJRM1221-0835, 36.2, 18/18 (100%)	C81176-0692, 36.2, 18/18 (100%)	-C11828-08 (SP4) -C11828-08 (SO4)
C11828-05 (EP18)				
C11828-06 (EP19)	C11168-1143, 56, 31/32 (96%)		C81176-1066, 40.1, 26/28 (92%)	-C11828-01 (SP3) -C11828-07 (SN4) -C11828-06 (SM4) -C11828-05 (SL4) -C11828-04 (SK4) -C11828-03 (SJ4) -C11828-02 (SI4)
C11828-07 (EP20)				
C11828-08 (EP21)				
C11828-09 (EP22)				
C11828-10 (EP23)				
C11828-11 (EP24)				
C11828-12 (7A1)				
C11828-13 (7A2)				
C11828-14 (7A3)				
C11828-15 (7A4)				
C12517-01 (7A5)				
C12517-02 (7A6)				
C17683-01 (7A7)				rmB
C17683-02 (7A8)				HS18, 10; CIP19-01 (SP11) udq; HS19, 12
C17683-03 (7A9)				HS41, 01
C17683-04 (7A10)				HS41, 02
C17683-05 (7A11)				sat; HS41, 03
C17683-06 (7A12)				HS41, 04
C17683-07 (7A13)				HS41, 05
C17683-08 (7A14)				HS41, 06
C17683-09 (7A15)				HS41, 09
C17683-10 (7A16)				dmA; HS41, 11
C17683-11 (7A17)	C11168-1430c, 117, 59/59 (100%)		C81176-1332, 87.7, 56/60 (93%)	E11; HS41, 12
C17683-12 (7A18)				HS41, 14
C17683-13 (7A19)				gf1; HS41, 15
C17683-14 (7A20)				HS41, 16
C17683-15 (7A21)				gf2; HS41, 17
C17683-16 (7A22)				HS41, 18
C17683-17 (7A23)				HS41, 19
C17683-18 (7A24)				HS41, 20
C17683-19 (7A25)				dmA; HS41, 21
C17683-20 (7B1)				HS41, 22
C17683-21 (7B2)				HS41, 23
C17683-22 (7B3)				dmA; HS41, 24
C17683-23 (7B4)				HS41, 25
C17683-24 (7B5)				udq; HS41, 26
C17683-25 (7B6)				HS41, 27
C17683-26 (7B7)	C11168-1438c, 44.1, 37/42 (88%)			HS41, 28
C43431-01 (7B8)				HS41, 29
C43431-02 (7B9)				orf; C43431-01 (SM5)
C43431-03 (7B10)				rmA; orf21h; C43431-02 (SN5)
C43431-04 (7B11)				rmB; orf22h; C43431-03 (SO5)
C43431-05 (7B12)				orf23h
C43431-06 (7B13)	C11168-0350, 40.1, 20/20 (100%)	CJRM1221-0399, 40.1, 20/20 (100%)	C81176-0328, 40.1, 20/20 (100%)	orf24h
C43431-07 (7B14)				orf25h
C43431-08 (7B15)				orf27h
C43431-09 (7B16)				orf29h
C43431-10 (7B17)				orf30h
C43431-11 (7B18)				orf32h
C43431-12 (7B19)				orf33h
C43431-13 (7B20)				orf34h
C43431-14 (7B21)	C11168-1306c, 36.2, 18/18 (100%)	CJRM1221-1494, 36.2, 18/18 (100%)	C81176-1231, 36.2, 18/18 (100%)	orf35h
C43431-15 (7B22)				43432-orf3a
C43431-16 (7B23)	C11168-1135, 61.9, 34/35 (97%)	CJRM1221-1277, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-1064, 56, 28/28 (100%)	ORF3
C43431-17 (7B24)				ORF4
C43431-18 (7B25)				ORF7
C43431-19 (7B26)				43437-orf4B
C43431-20 (7C1)				43437-orf5A
C43431-21 (7C2)				43437-orf5B
C43431-22 (7C3)	C11168-1139c, 46.1, 41/47 (87%)	CJRM1221-1280, 97.6, 55/57 (96%)	C81176-1068, 61.9, 52/59 (88%)	43437-orf6
C43431-23 (7C4)				orf1
C43431-24 (7C5)				43438-orf5
C43431-25 (7C6)				43438-orf5
C43431-26 (7C7)	C11168-1143, 87.7, 56/60 (93%)			43438-orf5
C460-01 (7C8)				43438-orf5
C460-02 (7C9)				43438-orf5
C460-03 (7C10)				43438-orf5
C460-04 (7C11)				43438-orf5
C460-05 (7C12)				43438-orf5
C460-06 (7C13)				43438-orf5
C81116-01 (7C14)	C11168-0821, 38.2, 19/19 (100%)	CJRM1221-0724, 38.2, 19/19 (100%)	C81176-1468, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81116-02 (7C15)				43438-orf5
C81116-03 (7C16)				43438-orf5
C81116-04 (7C17)				43438-orf5
C81116-05 (7C18)				43438-orf5
C81116-06 (7C19)				43438-orf5
C81116-07 (7C20)				43438-orf5
C81116-08 (7C21)				43438-orf5
C81116-09 (7C22)				43438-orf5
C81116-10 (7C23)				43438-orf5
C81116-11 (7C24)				43438-orf5
C81116-12 (7D1)				43438-orf5
C81116-13 (7D2)				43438-orf5
C81116-14 (7D3)				43438-orf5
C81116-15 (7D4)				43438-orf5
C81116-16 (7D5)				43438-orf5
C81116-17 (7D6)				43438-orf5
C81116-18 (7D7)				43438-orf5
C81116-19 (7D8)				43438-orf5
C81116-20 (7D9)				43438-orf5
C81116-21 (7D10)	C11168-1698, 40.1, 29/32 (90%)	CJRM1221-0032, 46.1, 23/23 (100%)	C81176-0617, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0010 (8K6)	C11168-0003, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0003, 111, 59/60 (98%)	C81176-1247, 103, 52/52 (100%)	43438-orf5
C81176-0012 (8K9)	C11168-0010c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0009, 119, 60/60 (100%)	C81176-1484, 48.1, 30/32 (93%)	43438-orf5
C81176-0017 (8K10)	C11168-0017c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0011, 119, 60/60 (100%)	C81176-0012, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0020 (8K11)	C11168-0020c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0017, 119, 60/60 (100%)	C81176-0017, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0023 (8K12)	C11168-0023, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0020, 111, 59/60 (98%)	C81176-0023, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0029 (8K13)	C11168-0029, 95.6, 57/60 (95%)	CJRM1221-0023, 109, 58/59 (98%)	C81176-0029, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0030 (8K14)				43438-orf5
C81176-0031 (8K15)				43438-orf5
C81176-0032 (8K16)	C11168-1344c, 36.2, 21/22 (95%)	CJRM1221-0029, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-0031, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0033 (8K17)				43438-orf5
C81176-0034 (8K18)				43438-orf5
C81176-0036 (8K19)				43438-orf5
C81176-0037 (8K20)				43438-orf5
C81176-0038 (8K21)	C11168-0038, 111, 59/60 (98%)	CJRM1221-0038, 111, 59/60 (98%)	C81176-0037, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0044 (8K22)	C11168-0039c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0038, 111, 59/60 (98%)	C81176-0044, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0045 (8K23)	C11168-0040, 111, 59/60 (98%)	CJRM1221-0038, 111, 59/60 (98%)	C81176-0045, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0046 (8K24)	C11168-0041, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0040, 119, 60/60 (100%)	C81176-0046, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0051 (8L1)	C11168-0046, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0046, 119, 60/60 (100%)	C81176-0051, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0056 (8L2)	C11168-0057, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0054, 119, 60/60 (100%)	C81176-0056, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0061 (8L3)	C11168-0062c, 111, 56/56 (100%)	CJRM1221-0059, 111, 56/56 (100%)	C81176-0061, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0063 (8L4)	C11168-0064c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0061, 111, 59/60 (98%)	C81176-0063, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0065 (8L5)	C11168-0066c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0063, 119, 60/60 (100%)	C81176-0065, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0068 (8L6)	C11168-0069, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0068, 119, 60/60 (100%)	C81176-0068, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0073 (8L7)	C11168-0075c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0077, 119, 60/60 (100%)	C81176-0073, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0076 (8L8)	C11168-0078c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0074, 119, 60/60 (100%)	C81176-0076, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0081 (8L9)	C11168-0085c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0080, 111, 59/60 (98%)	C81176-0081, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0095 (8L10)	C11168-0099, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0094, 111, 59/60 (98%)	C81176-0095, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0098 (8L11)	C11168-0107, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0097, 117, 59/59 (100%)	C81176-0098, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0118 (8L12)				43438-orf5
C81176-0125 (8L13)	C11168-0129c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0905, 119, 60/60 (100%)	C81176-0118, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0126 (8L14)	C11168-0130, 111, 59/60 (98%)	CJRM1221-0124, 119, 60/60 (100%)	C81176-0125, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0131 (8L15)	C11168-0135, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0130, 119, 60/60 (100%)	C81176-0126, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0135 (8L16)	C11168-0139, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0134, 119, 60/60 (100%)	C81176-0131, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0136 (8L17)	C11168-0140, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0135, 119, 60/60 (100%)	C81176-0135, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0139 (8L18)	C11168-0143c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0138, 119, 60/60 (100%)	C81176-0136, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0143 (8L19)	C11168-0147c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0143, 119, 60/60 (100%)	C81176-0139, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0149 (8L21)	C11168-0153c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0149, 119, 60/60 (100%)	C81176-0143, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0167 (8L20)	C11168-0172c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0165, 119, 60/60 (100%)	C81176-0146, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0170 (8L23)	C11168-0175c, 111, 59/60 (98%)	CJRM1221-0168, 103, 58/60 (96%)	C81176-0149, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0171 (8L24)				43438-orf5
C81176-0175 (8M1)	C11168-0185c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0169, 52, 26/26 (100%)	C81176-0170, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0176 (8M2)	C11168-0186c, 111, 59/60 (98%)	CJRM1221-0178, 119, 60/60 (100%)	C81176-0171, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0180 (8M3)	C11168-0190c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0179, 111, 59/60 (98%)	C81176-0176, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0181 (8M4)	C11168-0193c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0183, 111, 59/60 (98%)	C81176-0180, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0187 (8M5)	C11168-0196c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0189, 119, 60/60 (100%)	C81176-0181, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0197 (8M6)	C11168-0206, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0191, 111, 59/60 (98%)	C81176-0187, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0198 (8M7)	C11168-0207, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0200, 119, 60/60 (100%)	C81176-0197, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0199 (8M8)	C11168-0208, 119, 60/60 (100%)		C81176-0198, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0210 (8M9)	C11168-0223, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0206, 119, 60/60 (100%)	C81176-0199, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0212 (8M11)	C11168-0236c, 119, 60/60 (100%)	CJRM1221-0281, 109, 55/55 (100%)	C81176-0210, 119, 60/60 (100%)	43438-orf5
C81176-0225 (8M1				

C81176-0232 (M116)	C11168-0249, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0299, 119, 60/60 (100%)	C81176-0232, 119, 60/60 (100%)	CJ0249-CJE0299-CJ81176_0276_CJB0232_C11168-0249 (H116)
C81176-0233 (M115)	C11168-0250, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0300, 111, 59/60 (98%)	C81176-0233, 119, 60/60 (100%)	CJ0250-CJE0300-CJ81176_0277_CJB0233_C11168-0250 (A117)
C81176-0235 (M117)	C11168-0252, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0302, 111, 59/60 (98%)	C81176-0235, 119, 60/60 (100%)	moac-CJ0252-CJE0302-CJ81176_0279_CJB0235_C11168-0252 (I1C17)
C81176-0247 (M118)	C11168-0254, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0324, 119, 60/60 (100%)	C81176-0247, 119, 60/60 (100%)	CJ0246-CJ81176_0281_CJB0247_C11168-0256 (H118)
C81176-0248 (M118)	C11168-0255, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0255, 119, 60/60 (100%)	C81176-0248, 119, 60/60 (100%)	CJ0286-CJE0315-CJ81176_0293_CJB0248_C11168-0266 (A119)
C81176-0249 (M202)	C11168-0261, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0315, 111, 59/60 (98%)	C81176-0249, 119, 60/60 (100%)	CJ0270-CJE0319-CJ81176_0302_CJB0270_C11168-0270 (F119)
C81176-0251 (M21)	C11168-0271, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0320, 119, 60/60 (100%)	C81176-0251, 119, 60/60 (100%)	CJ0271-CJE0320-CJ81176_0298_CJB0254_C11168-0271 (F119)
C81176-0252 (M20)	C11168-0272, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0321, 103, 58/60 (96%)	C81176-0252, 119, 60/60 (100%)	CJ0272-CJE0321-CJ81176_0299_CJB0255_C11168-0272 (I1G19)
C81176-0256 (M24)	C11168-0274, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0324, 119, 60/60 (100%)	C81176-0256, 119, 60/60 (100%)	hva-CJ0276-CJE0324-CJ81176_0302_CJB0256_C11168-0276 (E20)
C81176-0261 (M21)	C11168-0279, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0327, 119, 60/60 (100%)	C81176-0261, 119, 60/60 (100%)	carB-CJ0275-CJE0327-CJ81176_0305_CJB0261_C11168-0279 (E20)
C81176-0272 (M2)	C11168-0281, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0338, 119, 60/60 (100%)	C81176-0272, 119, 60/60 (100%)	phT-phT-CJ0291-CJ81176_0316_CJB0272_C11168-0291 (A122)
C81176-0274 (M2)	C11168-0284, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0340, 119, 60/60 (100%)	C81176-0274, 119, 60/60 (100%)	hva-CJ0342-CJE0340-CJ81176_0316_CJB0274_C11168-0294 (I022)
C81176-0282 (M4)	C11168-0307, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0349, 119, 60/60 (100%)	C81176-0282, 119, 60/60 (100%)	phE-CJ0298-CJE0343-CJ81176_0321_CJB0277_C11168-0298 (H22)
C81176-0289 (M7)	C11168-0311, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0356, 119, 60/60 (100%)	C81176-0289, 119, 60/60 (100%)	lba-CJ0307-CJE0352-CJ81176_0339_CJB0285_C11168-0307 (A24)
C81176-0291 (M8)	C11168-0313, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0358, 119, 60/60 (100%)	C81176-0291, 119, 60/60 (100%)	ipy-CJ0311-CJE0356-CJ81176_0333_CJB0289_C11168-0311 (E24)
C81176-0292 (M9)	C11168-0314, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0359, 111, 59/60 (98%)	C81176-0292, 119, 60/60 (100%)	CJ0313-CJE0358-CJ81176_0335_CJB0291_C11168-0313 (G24)
C81176-0293 (M10)	C11168-0315, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0360, 119, 60/60 (100%)	C81176-0293, 119, 60/60 (100%)	lva-A-CJ0314-CJE0359-CJ81176_0336_CJB0292_C11168-0314 (H24)
C81176-0297 (M11)	C11168-0319, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0364, 119, 60/60 (100%)	C81176-0297, 119, 60/60 (100%)	lva-CJ0315-CJE0360-CJ81176_0337_CJB0293_C11168-0315 (H19)
C81176-0298 (M12)	C11168-0320, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0366, 119, 60/60 (100%)	C81176-0298, 119, 60/60 (100%)	lva-CJ0316-CJE0361-CJ81176_0338_CJB0294_C11168-0316 (M13)
C81176-0299 (M13)	C11168-0321, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0368, 111, 59/60 (98%)	C81176-0299, 119, 60/60 (100%)	lva-CJ0317-CJE0362-CJ81176_0339_CJB0295_C11168-0317 (M13)
C81176-03 (D14)	C11168-0322, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0367, 119, 60/60 (100%)	C81176-03, 119, 60/60 (100%)	perR-CJ0322-CJE0367-CJ81176_0344_CJB0300_C11168-0322 (H13)
C81176-0300 (M14)	C11168-0327, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0372, 119, 60/60 (100%)	C81176-0300, 119, 60/60 (100%)	CJ0327-CJE0372-CJ81176_0349_CJB0305_C11168-0327 (M14)
C81176-0301 (M15)	C11168-0333, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0378, 119, 60/60 (100%)	C81176-0301, 119, 60/60 (100%)	lva-A-CJ0333-CJE0378-CJ81176_0355_CJB0311_C11168-0333 (K15)
C81176-0312 (M17)	C11168-0334, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0379, 119, 60/60 (100%)	C81176-0312, 119, 60/60 (100%)	apc-CJ0334-CJE0379-CJ81176_0356_CJB0312_C11168-0334 (L15)
C81176-0315 (M18)	C11168-0337, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0382, 119, 60/60 (100%)	C81176-0315, 119, 60/60 (100%)	moA-CJ0337-CJE0382-CJ81176_0359_CJB0316_C11168-0337 (O15)
C81176-0316 (M19)	C11168-0338, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0383, 119, 60/60 (100%)	C81176-0316, 119, 60/60 (100%)	poA-CJ0338-CJE0383-CJ81176_0360_CJB0316_C11168-0338 (P15)
C81176-0320 (M20)	C11168-0342, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0390, 119, 60/60 (100%)	C81176-0320, 119, 60/60 (100%)	lva-A-CJ0342-CJE0390-CJ81176_0366_CJB0320_C11168-0342 (L16)
C81176-0321 (M21)	C11168-0343, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0391, 119, 60/60 (100%)	C81176-0321, 119, 60/60 (100%)	lva-CJ0349-CJE0398-CJ81176_0373_CJB0327_C11168-0349 (K17)
C81176-0322 (M22)	C11168-0344, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0422, 119, 60/60 (100%)	C81176-0322, 119, 60/60 (100%)	CJ0373-CJE0422-CJ81176_0397_CJB0350_C11168-0373 (L20)
C81176-0323 (M23)	C11168-0345, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0424, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-0323, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0399_CJB0362
C81176-0324 (M24)	C11168-0347, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0425, 119, 60/60 (100%)	C81176-0324, 119, 60/60 (100%)	CJ0375-CJE0425-CJ81176_0400_CJB0353_C11168-0375 (M20)
C81176-0326 (M25)	C11168-0349, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0428, 103, 58/60 (96%)	C81176-0326, 119, 60/60 (100%)	CJ0376-CJE0428-CJ81176_0403_CJB0356_C11168-0376 (P20)
C81176-0327 (M26)	C11168-0352, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0431, 119, 60/60 (100%)	C81176-0327, 119, 60/60 (100%)	moB-CJ0382-CJE0431-CJ81176_0405_CJB0358_C11168-0382 (K21)
C81176-0328 (M27)	C11168-0354, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0433, 119, 60/60 (100%)	C81176-0328, 119, 60/60 (100%)	carB-CJ0384-CJE0433-CJ81176_0407_CJB0360_C11168-0384 (M21)
C81176-0329 (M28)	C11168-0359, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0444, 111, 59/60 (98%)	C81176-0329, 119, 60/60 (100%)	serS-CJ81176_0412_CJB0365
C81176-0331 (M30)	C11168-0365, 107, 54/64 (100%)	CRM1221-0438, 107, 54/64 (100%)	C81176-0331, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0418_CJB0371
C81176-0332 (M31)	C11168-0367, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0448, 111, 59/60 (98%)	C81176-0332, 119, 60/60 (100%)	CJ0385-CJE0448-CJ81176_0422_CJB0375_C11168-0399 (L23)
C81176-0333 (M32)	C11168-0406, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0455, 119, 60/60 (100%)	C81176-0333, 119, 60/60 (100%)	CJ0406-CJE0455-CJ81176_0430_CJB0382_C11168-0406 (K24)
C81176-0334 (M33)	C11168-0411, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0460, 111, 59/60 (98%)	C81176-0334, 119, 60/60 (100%)	CJ0411-CJE0460-CJ81176_0435_CJB0387_C11168-0411 (P24)
C81176-0335 (M34)	C11168-0418, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0467, 119, 60/60 (100%)	C81176-0335, 119, 60/60 (100%)	CJ0415-CJE0464-CJ81176_0439_CJB0391_C11168-0415 (E20)
C81176-0337 (M35)	C11168-0419, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0468, 119, 60/60 (100%)	C81176-0337, 119, 60/60 (100%)	CJ0418-CJE0467-CJ81176_0441_CJB0393_C11168-0418 (G21)
C81176-0339 (M36)	C11168-0421, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0481, 111, 59/60 (98%)	C81176-0339, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0445_CJB0397
C81176-0341 (M37)	C11168-0422, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0482, 111, 59/60 (98%)	C81176-0341, 119, 60/60 (100%)	H521_17_0337_119_170a_165c
C81176-0343 (M38)	C11168-0425, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0481, 111, 59/60 (98%)	C81176-0343, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0451_CJB0403
C81176-0344 (M39)	C11168-0432, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0482, 111, 59/60 (98%)	C81176-0344, 119, 60/60 (100%)	moD-CJ0432-CJE0442-CJ81176_0456_CJB0404_C11168-0432 (E23)
C81176-0345 (M40)	C11168-0435, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0484, 119, 60/60 (100%)	C81176-0345, 119, 60/60 (100%)	CJ0442-CJE0442-CJ81176_0459_CJB0404_C11168-0442 (G24)
C81176-0346 (M41)	C11168-0437, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0485, 111, 59/60 (98%)	C81176-0346, 119, 60/60 (100%)	rho-CJ0451-CJE0501-CJ81176_0477_CJB0421_C11168-0451 (ZF5)
C81176-0347 (M42)	C11168-0442, 107, 57/58 (98%)	CRM1221-0502, 111, 59/60 (98%)	C81176-0347, 119, 60/60 (100%)	hva-CJ0452-CJE0502-CJ81176_0477_CJB0422_C11168-0452 (ZG5)
C81176-0348 (M43)	C11168-0449, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0509, 119, 60/60 (100%)	C81176-0348, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0489_CJB0425
C81176-0349 (M44)	C11168-0458, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0508, 113, 57/57 (100%)	C81176-0349, 119, 60/60 (100%)	moA-CJ0458-CJE0508-CJ81176_0483_CJB0428_C11168-0458 (ZG6)
C81176-0350 (M45)	C11168-0461, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0511, 119, 60/60 (100%)	C81176-0350, 119, 60/60 (100%)	CJ0461-CJE0511-CJ81176_0486_CJB0431_C11168-0461 (ZHG)
C81176-0351 (M46)	C11168-0462, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0512, 119, 60/60 (100%)	C81176-0351, 119, 60/60 (100%)	CJ0462-CJE0512-CJ81176_0489_CJB0434_C11168-0462 (ZG7)
C81176-0352 (M47)	C11168-0469, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0519, 119, 60/60 (100%)	C81176-0352, 119, 60/60 (100%)	CJ0469-CJE0519-CJ81176_0494_CJB0439_C11168-0469 (ZHG)
C81176-0353 (M48)	C11168-0478, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0526, 119, 60/60 (100%)	C81176-0353, 119, 60/60 (100%)	rho-CJ0476-CJE0526-CJ81176_0507_CJB0446_C11168-0476 (ZG8)
C81176-0354 (M49)	C11168-0479, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0529, 119, 60/60 (100%)	C81176-0354, 119, 60/60 (100%)	CJ0483-CJE0542-CJ81176_0516_CJB0449_C11168-0483 (ZG9)
C81176-0355 (M50)	C11168-0485, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0608, 119, 60/60 (100%)	C81176-0355, 119, 60/60 (100%)	ybb-CJ0500-CJE0608-CJ81176_0521_CJB0459_C11168-0500 (ZG11)
C81176-0356 (M51)	C11168-0486, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0612, 106, 56/60 (95%)	C81176-0356, 119, 60/60 (100%)	moB-CJ81176_0522_CJB0460_C11168-0522 (ZG11)
C81176-0357 (M52)	C11168-0487, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0617, 111, 59/60 (98%)	C81176-0357, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0524_CJB0462
C81176-0358 (M53)	C11168-0488, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0618, 119, 60/60 (100%)	C81176-0358, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0525_CJB0464
C81176-0359 (M54)	C11168-0489, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0619, 119, 60/60 (100%)	C81176-0359, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0526_CJB0466
C81176-0360 (M55)	C11168-0491, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0621, 119, 60/60 (100%)	C81176-0360, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0527_CJB0468
C81176-0361 (M56)	C11168-0492, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0622, 119, 60/60 (100%)	C81176-0361, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0528_CJB0469
C81176-0362 (M57)	C11168-0493, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0623, 119, 60/60 (100%)	C81176-0362, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0529_CJB0471
C81176-0363 (M58)	C11168-0494, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0624, 119, 60/60 (100%)	C81176-0363, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0530_CJB0469
C81176-0364 (M59)	C11168-0495, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0625, 119, 60/60 (100%)	C81176-0364, 119, 60/60 (100%)	CJ0505-CJE0512-CJ81176_0533_CJB0472_C11168-0505 (ZC12)
C81176-0365 (M60)	C11168-0496, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0626, 119, 60/60 (100%)	C81176-0365, 119, 60/60 (100%)	CJ0506-CJE0513-CJ81176_0534_CJB0473_C11168-0506 (ZD12)
C81176-0366 (M61)	C11168-0497, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0627, 119, 60/60 (100%)	C81176-0366, 119, 60/60 (100%)	parC-CJ0514-CJE0521-CJ81176_0542_CJB0481_C11168-0514 (G11)
C81176-0367 (M62)	C11168-0498, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0628, 119, 60/60 (100%)	C81176-0367, 119, 60/60 (100%)	CJ0530-CJE0534-CJ81176_0552_CJB0494_C11168-0530 (ZK3)
C81176-0368 (M63)	C11168-0499, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0629, 119, 60/60 (100%)	C81176-0368, 119, 60/60 (100%)	parC-CJ0535-CJE0538-CJ81176_0560_CJB0499_C11168-0535 (ZP3)
C81176-0369 (M64)	C11168-0501, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0631, 119, 60/60 (100%)	C81176-0369, 119, 60/60 (100%)	rho-CJ0543-CJE0547-CJ81176_0568_CJB0507_C11168-0543 (ZP4)
C81176-0370 (M65)	C11168-0504, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0634, 119, 60/60 (100%)	C81176-0370, 119, 60/60 (100%)	hva-CJ0547-CJE0551-CJ81176_0572_CJB0511_C11168-0547 (ZL5)
C81176-0371 (M66)	C11168-0507, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0635, 119, 60/60 (100%)		

CJ1176-0845 (6C19)	CJ1168-0911, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-0989, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-0845, 119, 60/60 (100%)	CJ0911.C.E0989.CJ1176.0919.CJ0845.CJ1168-0911 (305)
CJ1176-0851 (6C20)	CJ1168-0917, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-0995, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0851, 119, 60/60 (100%)	estA.CJ0917.C.E0995.CJ1176.0924.CJ0851.CJ1168-0917 (3M6)
CJ1176-0859 (6C21)	CJ1168-0925, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1003, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0859, 119, 60/60 (100%)	mb.CJ0925.C.E1003.CJ1176.0932.CJ0859.CJ1168-0925 (3M13)
CJ1176-0866 (6C22)	CJ1168-0933, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1011, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0866, 119, 60/60 (100%)	pb.CJ0932.C.E1009.CJ1176.0938.CJ0866.CJ1168-0932 (3L14)
CJ1176-0867 (6C23)	CJ1168-0935, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1011, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0867, 119, 60/60 (100%)	pyv.CJ0933.C.E1011.CJ1176.0940.CJ0867.CJ1168-0933 (3M14)
CJ1176-0871 (6C24)			CJ1176-0871, 119, 60/60 (100%)	CJ0871.cj021
CJ1176-0872 (6D1)			CJ1176-0872, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0946.CJ0872.cj022.cj1-178u.57
CJ1176-0873 (6D2)			CJ1176-0873, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0947.CJ0873.cj023.cj1-178u.58
CJ1176-0874 (6D3)			CJ1176-0874, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0949.CJ0874.cj024.cj1-178u.60
CJ1176-0875 (6D4)			CJ1176-0875, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0950.CJ0875.cj025.cj1-178u.61
CJ1176-0876 (6D5)			CJ1176-0876, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0952.CJ0876.cj026.cj1-178u.63c
CJ1176-0877 (6D6)			CJ1176-0877, 119, 60/60 (100%)	CJE1155.CJ1176.0952.CJ0877.cj027
CJ1176-0878 (6D7)			CJ1176-0878, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.0953.CJ0878.cj028.cj1-178u.64
CJ1176-0880 (6D8)	CJ1168-0938c, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1016, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-0880, 119, 60/60 (100%)	ass.CJ0938c.CJE1016.CJ1176.0955.CJ0880.CJ1168-0938c (3J15)
CJ1176-0883 (6D9)	CJ1168-0941c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1019, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0883, 119, 60/60 (100%)	CJ0941c.CJE1019.CJ1176.0965.CJ0883.cj1-178u.65c.CJ1168-0941c (3M15)
CJ1176-0932 (6D11)	CJ1168-1000, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1080, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0932, 119, 60/60 (100%)	CJ1000.CJE1080.CJ1176.1018.CJ0932.CJ1168-1000 (3Q22)
CJ1176-0934 (6D12)	CJ1168-1002c, 103, 58/60 (96%)	GRM1221-1082, 103, 58/60 (96%)	CJ1176-0934, 119, 60/60 (100%)	sua.CJ1002c.CJE1082.CJ1176.1020.CJ0934.CJ1168-1002c (3Q23)
CJ1176-0936 (6D13)	CJ1168-1004, 85.7, 55/59 (93%)	GRM1221-1084, 85.7, 55/59 (93%)	CJ1176-0936, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1022.CJ0936
CJ1176-0938 (6D14)	CJ1168-1006, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1086, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-0938, 119, 60/60 (100%)	CJ1006.CJE1086.CJ1176.1024.CJ0938.CJ1168-1006 (3M23)
CJ1176-0939 (6D15)	CJ1168-1007c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1087, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-0939, 119, 60/60 (100%)	CJ1007c.CJE1087.CJ1176.1025.CJ0939.CJ1168-1007c (3N23)
CJ1176-0951 (6D16)	CJ1168-1019c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1163, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0951, 119, 60/60 (100%)	hw.CJ1019c.CJE1163.CJ1176.1039.CJ0951.CJ1168-1019c (3E1)
CJ1176-0954 (6D17)	CJ1168-1022c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1166, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0954, 119, 60/60 (100%)	CJ1022c.CJE1166.CJ1176.1041.CJ0954.CJ1168-1022c (3E1)
CJ1176-0960 (6D18)	CJ1168-1028c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1172, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-0960, 119, 60/60 (100%)	stav.CJ1028c.CJE1172.CJ1176.1047.CJ0960.CJ1168-1028c (3Q2)
CJ1176-0977 (6D19)	CJ1168-1045c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1188, 103, 58/59 (99%)	CJ1176-0977, 119, 60/60 (100%)	hw.CJ1045c.CJE1188.CJ1176.1066.CJ0977.CJ1168-1045c (4A4)
CJ1176-0983 (6D20)	CJ1168-1052c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1196, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0983, 119, 60/60 (100%)	mutS.mutS2.CJ1052c.CJE1196.CJ1176.1072.CJ0983.cj1-178u.74c.CJ1168-1052c (3C5)
CJ1176-0991 (6D21)	CJ1168-1061c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1204, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0991, 119, 60/60 (100%)	ipaS.CJ1061c.CJE1204.CJ1176.1080.CJ0991.CJ1168-1061c (3D6)
CJ1176-0996 (6D22)	CJ1168-1067, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1210, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0996, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1067.CJE1210.CJ1176.1085.CJ0996.CJ1168-1067 (3A7)
CJ1176-0999 (6D23)	CJ1168-1070, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1213, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-0999, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1070.CJE1213.CJ1176.1088.CJ0999.CJ1168-1070 (3D7)
CJ1176-1007 (6D24)	CJ1168-1078, 101, 57/59 (96%)	GRM1221-1221, 101, 57/59 (96%)	CJ1176-1007, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1096.CJ1007
CJ1176-1008 (6E1)	CJ1168-1079, 101, 57/59 (96%)	GRM1221-1222, 103, 58/60 (96%)	CJ1176-1008, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1097.CJ1008
CJ1176-1017 (6E2)	CJ1168-1081, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1226, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1017, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1098.CJ1176.1106.CJ1017.CJ1168-1081 (3F9)
CJ1176-1018 (6E3)	CJ1168-1082c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1232, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1018, 119, 60/60 (100%)	CJ1089c.CJE1232.CJ1176.1107.CJ1018.CJ1168-1082c (3G9)
CJ1176-1025 (6E4)	CJ1168-1086c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1238, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1025, 119, 60/60 (100%)	meR.CJ1086c.CJE1239.CJ1176.1114.CJ1025.CJ1168-1086c (3F10)
CJ1176-1031 (6E5)	CJ1168-1102, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1245, 103, 58/60 (96%)	CJ1176-1031, 119, 60/60 (100%)	ispE.CJ1104.CJE1245.CJ1176.1120.CJ1031.CJ1168-1102 (3D11)
CJ1176-1033 (6E6)	CJ1168-1104, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1247, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1033, 119, 60/60 (100%)	ispE.CJ1104.CJE1247.CJ1176.1122.CJ1033.CJ1168-1104 (3F11)
CJ1176-1035 (6E7)	CJ1168-1106, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1249, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1035, 119, 60/60 (100%)	CJ1106.CJE1249.CJ1176.1124.CJ1035.CJ1168-1106 (3H11)
CJ1176-1045 (6E8)	CJ1168-1125c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1252, 103, 58/60 (96%)	CJ1176-1045, 119, 60/60 (100%)	meR.CJ1125c.CJE1252.CJ1176.1134.CJ1045.CJ1168-1125c (3E13)
CJ1176-1047 (6E9)	CJ1168-1126c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1261, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1047, 119, 60/60 (100%)	cheY.CJ1126c.CJE1261.CJ1176.1136.CJ1047.CJ1168-1126c (3D13)
CJ1176-1048 (6E10)	CJ1168-1128c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1262, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1048, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1128c.CJE1262.CJ1176.1137.CJ1048.CJ1168-1128c (3E13)
CJ1176-1053 (6E11)	CJ1168-1129c, 103, 58/59 (99%)	GRM1221-1263, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1053, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1129c.CJE1263.CJ1176.1142.CJ1053.CJ1168-1129c (3E13)
CJ1176-1056 (6E12)	CJ1168-1128c, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1270, 103, 58/60 (96%)	CJ1176-1056, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1128c.CJE1270.CJ1176.1145.CJ1056.CJ1176.82c.CJ1168-1128c (3F14)
CJ1176-1057 (6E13)	CJ1168-1128c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1271, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1057, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1128c.CJE1271.CJ1176.1147.CJ1057.CJ1168-1128c (3G14)
CJ1176-1058 (6E14)	CJ1168-1129c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1272, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1058, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1129c.CJE1272.CJ1176.1147.CJ1058.CJ1168-1129c (3G14)
CJ1176-1059 (6E15)	CJ1168-1130c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1272, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1059, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1130c.CJE1272.CJ1176.1147.CJ1059.CJ1168-1130c (3H14)
CJ1176-1062 (6E16)	CJ1168-1133, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1276, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1062, 119, 60/60 (100%)	waaC.CJ1133.CJE1275.CJ1176.1150.CJ1062.cj1-178u.87c.CJ1168-1133 (3C15)
CJ1176-1065 (6E17)	CJ1168-1134, 79.8, 52/56 (92%)		CJ1176-1065, 119, 60/60 (100%)	pep.waaM.CJ1134.CJE1276.CJ1176.1151.CJ1065.CJ1168-1134 (3C15)
CJ1176-1066 (6E18)	CJ1168-1143, 79.8, 52/56 (92%)		CJ1176-1066, 119, 60/60 (100%)	cgfA.CJ1176.1154.CJ1066.cj1-178u.91
CJ1176-1067 (6E19)	CJ1168-0936c, 40.1, 20/20 (100%)	GRM1221-1013, 40.1, 20/20 (100%)	CJ1176-1067, 119, 60/60 (100%)	cgfB.CJ1176.1155.CJ1067.cj1-178u.92c
CJ1176-1068 (6E20)	CJ1168-1132, 52, 41/41 (99%)	GRM1221-1286, 101, 37/41 (90%)	CJ1176-1068, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1156.CJ1068
CJ1176-1069 (6E21)			CJ1176-1069, 119, 60/60 (100%)	cgfH.CJ1176.1157.CJ1069.cj1-178u.93CJ3456-01 (6N6)
CJ1176-1070 (6E22)	CJ1168-1141, 54, 45/51 (89%)		CJ1176-1070, 119, 60/60 (100%)	neutB.CJ1176.1158.CJ1070.cj1-178u.94
CJ1176-1071 (6E23)			CJ1176-1071, 119, 60/60 (100%)	neutC.CJ1176.1159.CJ1071.cj1-178u.95
CJ1176-1072 (6E24)			CJ1176-1072, 119, 60/60 (100%)	cgfI.H.CJ1176.1160.CJ1072.cj1-178u.96
CJ1176-1073 (6F1)			CJ1176-1073, 119, 60/60 (100%)	neutA.CJ1176.1161.CJ1073.cj1-178u.97
CJ1176-1074 (6F2)			CJ1176-1074, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1162.CJ1074
CJ1176-1075 (6F3)	CJ1168-1146c, 87.7, 56/60 (93%)	GRM1221-1282, 86.7, 51/53 (95%)	CJ1176-1075, 119, 60/60 (100%)	neutB.CJ1176.1163.CJ1075.cj1-178u.98
CJ1176-1080 (6F4)	CJ1168-1151c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1287, 89.7, 51/53 (95%)	CJ1176-1080, 119, 60/60 (100%)	hhd.waaD.CJ1151c.CJ1176.1168.CJ1080.cj1-178u.104c.CJ1168-1151c (3D17)
CJ1176-1083 (6F5)	CJ1168-1154c, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1290, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1083, 119, 60/60 (100%)	hhd.waaD.CJ1154c.CJ1176.1171.CJ1083.CJ1168-1154c (3G17)
CJ1176-1084 (6F6)	CJ1168-1155c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1291, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1084, 119, 60/60 (100%)	CJ1155c.CJE1291.CJ1176.1172.CJ1084.CJ1168-1155c (3H17)
CJ1176-1086 (6F7)	CJ1168-1157, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1293, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1086, 119, 60/60 (100%)	dhax.CJ1157.CJE1293.CJ1176.1174.CJ1086.CJ1168-1157 (3B18)
CJ1176-1087 (6F8)	CJ1168-1158c, 101, 54/55 (98%)	GRM1221-1294, 101, 54/55 (98%)	CJ1176-1087, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1176.CJ1087
CJ1176-1090 (6F9)	CJ1168-1163c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1297, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1090, 119, 60/60 (100%)	CJ1163c.CJE1297.CJ1176.1178.CJ1090.CJ1168-1163c (3H18)
CJ1176-1097 (6F10)	CJ1168-1170c, 111, 56/56 (100%)	GRM1221-1304, 111, 56/56 (100%)	CJ1176-1097, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1185.CJ1097
CJ1176-1110 (6F11)	CJ1168-1154c, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1305, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1110, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1186.CJ1176.1198.CJ1110.CJ1168-1163c (3D21)
CJ1176-1111 (6F12)	CJ1168-1184c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1318, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1111, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1184c.CJE1318.CJ1176.1199.CJ1111.CJ1168-1184c (3E21)
CJ1176-1112 (6F13)	CJ1168-1185c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1319, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1112, 119, 60/60 (100%)	meR.CJ1185c.CJE1319.CJ1176.1200.CJ1112.CJ1168-1185c (3F21)
CJ1176-1115 (6F14)	CJ1168-1189c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1319, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1115, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1189c.CJE1322.CJ1176.1203.CJ1115.CJ1168-1189c (3A22)
CJ1176-1130 (6F15)	CJ1168-1203c, 111, 59/60 (98%)	GRM1221-1337, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1130, 119, 60/60 (100%)	CJ1203c.CJE1337.CJ1176.1218.CJ1130.CJ1168-1203c (3H23)
CJ1176-1133 (6F16)	CJ1168-1206c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1340, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1133, 119, 60/60 (100%)	RAY.CJ206c.CJE1340.CJ1176.1221.CJ1133.CJ1168-1206c (3C24)
CJ1176-1137 (6F17)	CJ1168-1219c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1342, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1137, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1137.CJE1344.CJ1176.1224.CJ1137.CJ1168-1219c (3E24)
CJ1176-1146 (6F18)	CJ1168-1219c, 95.6, 57/60 (95%)	GRM1221-1354, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1146, 119, 60/60 (100%)	CJE1354.CJ1176.1225.CJ1146
CJ1176-1147 (6F19)	CJ1168-1222c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1358, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1147, 119, 60/60 (100%)	decr.CJ1222c.CJE1358.CJ1176.1226.CJ1150.CJ1168-1222c (4D2)
CJ1176-1154 (6F20)	CJ1168-1236c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1362, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1154, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1154.CJE1362.CJ1176.1227.CJ1154.CJ1168-1236c (4E2)
CJ1176-1158 (6F21)	CJ1168-1231, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1368, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1158, 119, 60/60 (100%)	kefB.CJ1231.CJE1368.CJ1176.1245.CJ1158.CJ1168-1231 (4D3)
CJ1176-1161 (6F22)	CJ1168-1234, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1369, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1161, 119, 60/60 (100%)	gysY.CJ1234.CJE1369.CJ1176.1248.CJ1161.CJ1168-1234 (4G3)
CJ1176-1165 (6F23)	CJ1168-1236c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1373, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1165, 119, 60/60 (100%)	pep.CJ1236.CJE1373.CJ1176.1252.CJ1165.CJ1168-1236c (4A4)
CJ1176-1168 (6F24)	CJ1168-1240c, 81.8, 53/57 (92%)	GRM1221-1377, 81.8, 54/57 (94%)	CJ1176-1168, 119, 60/60 (100%)	CJ1176.1255.CJ1168
CJ1176-1169 (6G1)	CJ1168-1241, 103, 58/60 (98%)	GRM1221-1377, 111, 59/60 (98%)	CJ1176-1169, 119, 60/60 (100%)	CJ1241.CJE1377.CJ1176.1256.CJ1169.CJ1168-1241 (4F4)
CJ1176-1175 (6G2)	CJ1168-1247c, 119, 60/60 (100%)	GRM1221-1383, 119, 60/60 (100%)	CJ1176-1175, 119	

C81176-1412 (6J1)	G1168-1518, 95.6, 48/48 (100%)	CRM221-1691, 119, 60/60 (100%)	C81176-1412, 119, 60/60 (100%)	CJE1891.CJ81176_1510.CJB1412
C81176-1414 (6J2)			C81176-1414, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_1512.CJB1414.cj32.c81176u_177c
C81176-1415 (6J3)			C81176-1415, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_1513.CJB1415.cj33.c81176u_178c
C81176-1417 (6J4)	G1168-1530, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1701, 116, 58/58 (100%)	C81176-1417, 119, 60/60 (100%)	CJ1547.CJE1716.CJ81176_1532.CJB1434.CJ1168-1547 (4L17)
C81176-1418 (6J5)	G1168-1531, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1702, 119, 60/60 (100%)	C81176-1418, 119, 60/60 (100%)	CJ1555c.CJE1722.CJ81176_1541.CJB1441.CJ1168-1555c (4K18)
C81176-1419 (6J6)	G1168-1532, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1703, 111, 59/60 (98%)	C81176-1419, 119, 60/60 (100%)	CJ1532.CJE1703.CJ81176_1517.CJB1419.CJ1168-1532 (4M15)
C81176-1422 (6J7)	G1168-1535c, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1706, 111, 59/60 (98%)	C81176-1422, 119, 60/60 (100%)	pa3p.CJ1535.CJE1706.CJ81176_1520.CJB1422.c81176_173c.cj1168-1535c (4P15)
C81176-1425 (6J8)	G1168-1538c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1709, 119, 60/60 (100%)	C81176-1425, 119, 60/60 (100%)	CJ1538c.CJE1709.CJ81176_1523.CJB1425.CJ1168-1538c (4K18)
C81176-1427 (6J9)	G1168-1540, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1711, 119, 60/60 (100%)	C81176-1427, 119, 60/60 (100%)	CJ1540.CJE1711.CJ81176_1525.CJB1427.CJ1168-1540 (4M16)
C81176-1434 (6J10)	G1168-1547, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1718, 119, 60/60 (100%)	C81176-1434, 119, 60/60 (100%)	CJ1547.CJE1716.CJ81176_1532.CJB1434.CJ1168-1547 (4L17)
C81176-1441 (6J11)	G1168-1555c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1728, 111, 59/60 (98%)	C81176-1441, 119, 60/60 (100%)	CJ1555c.CJE1722.CJ81176_1541.CJB1441.CJ1168-1555c (4K18)
C81176-1443 (6J12)	G1168-1560, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1730, 103, 55/56 (98%)	C81176-1443, 119, 60/60 (100%)	CJ1560.CJ81176_1544.CJB1443.CJ1168-1560 (4N18)
C81176-1445 (6J13)	G1168-1562, 83.0, 42/42 (100%)	CRM221-1731, 50.1, 50/50 (100%)	C81176-1445, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_1546.CJB1445
C81176-1452 (6J14)	G1168-1569c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1740, 119, 60/60 (100%)	C81176-1452, 119, 60/60 (100%)	nuoK.CJ1569c.CJE1740.CJ81176_1554.CJB1452.CJ1168-1569c (4D19)
C81176-1453 (6J15)	G1168-1570c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1741, 111, 59/60 (98%)	C81176-1453, 119, 60/60 (100%)	ruoJ.CJ1570c.CJE1741.CJ81176_1555.CJB1453.CJ1168-1570c (4P19)
C81176-1464 (6J16)	G1168-1581c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1752, 119, 60/60 (100%)	C81176-1464, 119, 60/60 (100%)	CJ1581c.CJE1752.CJ81176_1566.CJB1464.CJ1168-1581c (4K21)
C81176-1469 (6J17)			C81176-1469, 119, 60/60 (100%)	dmsA.CJ81176_1570.CJB1468.cj36.c81176u_180
C81176-1469 (6J18)			C81176-1469, 119, 60/60 (100%)	dmsB.CJ81176_1571.CJB1469.cj35.c81176u_181
C81176-1470 (6J19)			C81176-1470, 119, 60/60 (100%)	dmsC.CJ81176_1572.CJB1470.cj36.c81176u_182
C81176-1471 (6J20)			C81176-1471, 119, 60/60 (100%)	torD.CJ81176_1573.CJB1471.cj37.c81176u_183
C81176-1472 (6J21)	G1168-1586, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1757, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-1472, 119, 60/60 (100%)	cab.CJ1586.CJE1757.CJ81176_1574.CJB1472.CJ1168-1586 (4P21)
C81176-1476 (6J22)	G1168-1590, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1762, 119, 60/60 (100%)	C81176-1476, 119, 60/60 (100%)	inA.CJ1590.CJE1762.CJ81176_1576.CJB1476.CJ1168-1590 (4L22)
C81176-1477 (6J23)	G1168-1591, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1763, 119, 60/60 (100%)	C81176-1477, 119, 60/60 (100%)	repA.CJ1591.CJE1763.CJ81176_1574.CJB1477.CJ1168-1591 (4M22)
C81176-1478 (6J24)	G1168-1592, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1764, 119, 60/60 (100%)	C81176-1478, 119, 60/60 (100%)	rsbM.CJ1592.CJE1764.CJ81176_1579.CJB1478.CJ1168-1592 (4N22)
C81176-1510 (6K1)	G1168-1624, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1796, 111, 59/60 (98%)	C81176-1510, 119, 60/60 (100%)	sdaA.CJ1624.CJE1796.CJ81176_1615.CJB1510.CJ1168-1624 (5F2)
C81176-1511 (6K2)	G1168-1625c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1797, 119, 60/60 (100%)	C81176-1511, 119, 60/60 (100%)	sdgC.CJ1625c.CJE1797.CJ81176_1616.CJB1511.CJ1168-1625c (5G2)
C81176-1513 (6K3)	G1168-1627c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1799, 111, 59/60 (98%)	C81176-1513, 119, 60/60 (100%)	CJ1627c.CJE1799.CJ81176_1618.CJB1513.CJ1168-1627c (5A3)
C81176-1514 (6K4)	G1168-1628, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1800, 111, 59/60 (98%)	C81176-1514, 119, 60/60 (100%)	exbB2.exbB-2.CJ1628.CJE1800.CJ81176_1619.CJB1514.CJ1168-1628 (5B3)
C81176-1515 (6K5)	G1168-1629, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1801, 103, 59/60 (98%)	C81176-1515, 119, 60/60 (100%)	CJ1630.CJE1801.CJ81176_1620.CJB1515.CJ1168-1629 (6C3)
C81176-1520 (6K6)	G1168-1634c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1806, 119, 60/60 (100%)	C81176-1520, 119, 60/60 (100%)	arc.CJ1634c.CJE1806.CJ81176_1625.CJB1520.CJ1168-1634c (5H3)
C81176-1522 (6K7)	G1168-1636c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1808, 119, 60/60 (100%)	C81176-1522, 119, 60/60 (100%)	imaB.CJ1636c.CJE1808.CJ81176_1627.CJB1522.CJ1168-1636c (5B4)
C81176-1525 (6K8)	G1168-1639, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1811, 119, 60/60 (100%)	C81176-1525, 119, 60/60 (100%)	ispA.CJ1639.CJE1811.CJ81176_1633.CJB1533.CJ1168-1639 (5E4)
C81176-1530 (6K9)	G1168-1644, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1816, 119, 60/60 (100%)	C81176-1530, 119, 60/60 (100%)	ispA.CJ1644.CJE1816.CJ81176_1635.CJB1535.CJ1168-1644 (5B5)
C81176-1532 (6K10)	G1168-1648, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1818, 111, 59/60 (98%)	C81176-1532, 119, 60/60 (100%)	iamB.CJ1646.CJE1818.CJ81176_1637.CJB1537.CJ1168-1646 (5D5)
C81176-1534 (6K11)	G1168-1649, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1820, 111, 59/60 (98%)	C81176-1534, 119, 60/60 (100%)	murI.CJ1649.CJE1820.CJ81176_1639.CJB1539.CJ1168-1649 (5F5)
C81176-1538 (6K12)	G1168-1652c, 115, 58/58 (100%)	CRM221-1824, 119, 60/60 (100%)	C81176-1538, 119, 60/60 (100%)	murI.CJ1652c.CJE1824.CJ81176_1643.CJB1538.CJ1168-1652c (5B6)
C81176-1543 (6K13)			C81176-1543, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_1648.CJB1543
C81176-1545 (6K14)	G1168-1659, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1829, 87.7, 56/60 (93%)	C81176-1545, 119, 60/60 (100%)	p19.CJB1545.CJE1831.CJ81176_1650.CJB1545.CJ1168-1659 (5H6)
C81176-1554 (6K15)	G1168-1688c, 87.7, 56/60 (93%)	CRM221-1840, 95.6, 57/60 (95%)	C81176-1554, 119, 60/60 (100%)	CJB1554
C81176-1562 (6K16)	G1168-1675, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1847, 119, 60/60 (100%)	C81176-1562, 119, 60/60 (100%)	IBC.CJE1847.CJ81176_1671.CJB1562
C81176-1568 (6K17)	G1168-1693c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1853, 119, 60/60 (100%)	C81176-1568, 119, 60/60 (100%)	CJ1630.CJE1853.CJ81176_1677.CJB1568.CJ1168-1693c (5A10)
C81176-1569 (6K18)	G1168-1686c, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1854, 111, 59/60 (98%)	C81176-1569, 119, 60/60 (100%)	topA.CJ81176_1678.CJB1569.c81176u_184c
C81176-1572 (6K19)	G1168-1345c, 36.2, 18/18 (100%)	CRM221-1534, 36.2, 18/18 (100%)	C81176-1572, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_1680.CJB1572.cj38.c81176u_185c
C81176-1573 (6K20)			C81176-1573, 119, 60/60 (100%)	topA.CJ81176_1683.CJB1573.cj39.c81176u_186c
C81176-1574 (6K21)	G1168-1688c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1856, 119, 60/60 (100%)	C81176-1574, 119, 60/60 (100%)	sec.Y.CJ1688c.CJE1856.CJ81176_1685.CJB1574.CJ1168-1688c (5D10)
C81176-1576 (6K22)	G1168-1690c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1858, 119, 60/60 (100%)	C81176-1576, 119, 60/60 (100%)	rsbE.CJ1690c.CJE1858.CJ81176_1687.CJB1576.CJ1168-1690c (5F10)
C81176-1579 (6K23)	G1168-1693c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1861, 119, 60/60 (100%)	C81176-1579, 119, 60/60 (100%)	repA.CJ1693.CJE1861.CJ81176_1690.CJB1579.CJ1168-1693c (5A11)
C81176-1591 (6L1)	G1168-1700c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1868, 119, 60/60 (100%)	C81176-1591, 119, 60/60 (100%)	rjP.CJ1700c.CJE1868.CJ81176_1697.CJB1596.CJ1168-1700c (5H11)
C81176-1596 (6L2)	G1168-1705c, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1873, 111, 59/60 (98%)	C81176-1596, 119, 60/60 (100%)	rjW.CJ1705c.CJE1873.CJ81176_1702.CJB1591.CJ1168-1705c (5E12)
C81176-1596 (6L3)	G1168-1709c, 111, 59/60 (98%)	CRM221-1878, 111, 59/60 (98%)	C81176-1596, 119, 60/60 (100%)	CJ1709.CJE1878.CJ81176_1693.CJB1593.CJ1168-1709c (5H1)
C81176-1599 (6L4)	G1168-1713c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1882, 87.7, 53/56 (94%)	C81176-1599, 119, 60/60 (100%)	CJ1713.CJ81176_0007.CJB1599.CJ1168-1713 (5M1)
C81176-1600 (6L5)			C81176-1600, 119, 60/60 (100%)	CJ81176_0010.CJB1600
C81176-1605 (6L6)	G1168-1719c, 119, 60/60 (100%)	CRM221-1889, 111, 59/60 (98%)	C81176-1605, 119, 60/60 (100%)	hesA.CJ1719c.CJE1889.CJ81176_0017.CJB1605.CJ1168-1719c (5K2)
C81-02 (7D17)			C81176-1340, 56, 46/52 (88%)	HS1.08
C81-03 (7D18)				HS1.09
C81-04 (7D19)				HS1.10.CJX06 (5O12)
C81-05 (7D20)				hsdR.HS1.11
CUJ087-01 (7D21)				orf4
CUJ087-02 (7D22)				orf3
CpTet-001 (6L7)				tetD.CJ81176_pTet0048.CpTet-0001
CpTet-002 (6L8)				cp2.CpTet-0002
CpTet-003 (6L9)				cp3.CJ81176_pTet0051.CpTet-0003
CpTet-004 (6L10)				cp4.CJ81176_pTet0052.CpTet-0004
CpTet-005 (6L11)				repA.CJ81176_pTet0001.CpTet-0005
CpTet-006 (6L12)				cp6.CJ81176_pTet0002.CpTet-0006
CpTet-007 (6L13)				cp7.CJ81176_pTet0003.CpTet-0007
CpTet-008 (6L14)				cp8.CJ81176_pTet0004.CpTet-0008
CpTet-009 (6L15)				cp9.CJ81176_pTet0005.CpTet-0009
CpTet-010 (6L16)				cp10.CJ81176_pTet0006.CpTet-0010
CpTet-011 (6L17)				cp11.CJ81176_pTet0007.CpTet-0011
CpTet-012 (6L18)		CRM221-1127, 71.9, 54/60 (90%)		cp12.CJ81176_pTet0008.CpTet-0012
CpTet-013 (6L19)		CRM221-1126, 87.7, 56/60 (93%)		cp13.CJ81176_pTet0009.CpTet-0013
CpTet-014 (6L20)				cp14.CJ81176_pTet0010.CpTet-0014
CpTet-015c (6L21)				cp16.CJ81176_pTet0011.CpTet-0015c
CpTet-016c (6L22)				cp17.CJ81176_pTet0012.CpTet-0016c
CpTet-017c (6L23)				cp18.CJ81176_pTet0013.CpTet-0017c
CpTet-018 (6L24)				cp19.CJ81176_pTet0014.CpTet-0018
CpTet-019 (6M1)				cp20.CJ81176_pTet0015.CpTet-0019
CpTet-020 (6M2)				cp21.CJ81176_pTet0016.CpTet-0020
CpTet-021 (6M3)		CRM221-1123, 56, 28/28 (100%)		cp22.CJ81176_pTet0017.CpTet-0021
CpTet-022 (6M4)		CRM221-1120, 46.1, 23/23 (100%)		cp23.CJ81176_pTet0018.CpTet-0022
CpTet-023 (6M5)				cp24.CJ81176_pTet0019.CpTet-0023
CpTet-024 (6M6)				cp25.CJ81176_pTet0022.CpTet-0024
CpTet-025 (6M7)				cp26.CJ81176_pTet0023.CpTet-0025
CpTet-026c (6M8)				cp27.CJ81176_pTet0024.CpTet-0026c
CpTet-027c (6M9)				vapD.CJ81176_pTet0025.CpTet-0027c
CpTet-028c (6M10)				cp29.CJ81176_pTet0026.CpTet-0028c
CpTet-029 (6M11)				emgB2.CJ81176_pTet0027.CpTet-0029
CpTet-030 (6M12)				emgB3v4.CJ81176_pTet0028.CpTet-0030
CpTet-031 (6M13)				cp32.CJ81176_pTet0029.CpTet-0031
CpTet-032 (6M14)				cp33.CJ81176_pTet0030.CpTet-0032
CpTet-033 (6M15)				ssb1.CJ81176_pTet0031.CpTet-0033
CpTet-034 (6M16)				cp35.CJ81176_pTet0032.CpTet-0034
CpTet-035 (6M17)				emgB5.CJ81176_pTet0033.CpTet-0035
CpTet-036 (6M18)				emgB6.CJ81176_pTet0034.CpTet-0036
CpTet-037 (6M19)				emgB7.CJ81176_pTet0035.CpTet-0037
CpTet-038 (6M20)				emgB8.CJ81176_pTet0036.CpTet-0038
CpTet-039 (6M21)				emgB9.CJ81176_pTet0037.CpTet-0039
CpTet-040 (6M22)				emgB10.CJ81176_pTet0038.CpTet-0040
CpTet-041 (6M23)				emgB11.CJ81176_pTet0039.CpTet-0041
CpTet-042 (6M24)				emgD4.CJ81176_pTet0040.CpTet-0042
CpTet-043 (6N1)				cp44.CJ81176_pTet0041.CpTet-0043
CpTet-044 (6N2)				cp45.CJ81176_pTet0042.CpTet-0044
CpTet-045 (6N3)				

CpvVr-41 (6024)					Cpv41.CJ81176_pVr0041.CpvVr-41
CpvVr-42 (6P1)					Cpv42.CJ81176_pVr0042.CpvVr-42
CpvVr-43 (6P2)					Cpv43.CJ81176_pVr0043.CpvVr-43
CpvVr-44 (6P3)					Cpv44.CJ81176_pVr0044.CpvVr-44
CpvVr-45 (6P4)					Cpv45.CJ81176_pVr0045.CpvVr-45
CpvVr-46 (6P5)					Cpv46.CJ81176_pVr0046.CpvVr-46
CpvVr-47 (6P6)					Cpv47.CJ81176_pVr0047.CpvVr-47
CpvVr-48 (6P7)	C11168-1456c, 79.8, 55/60 (91%)	CJRM1221-1629, 79.8, 55/60 (91%)		C81176-1354, 79.8, 55/60 (91%)	Cpv48.CJ81176_pVr0048.CpvVr-48
CpvVr-49 (6P8)					Cpv49.CJ81176_pVr0049.CpvVr-49
CpvVr-50 (6P9)					Cpv50.CpvVr-50
CpvVr-51 (6P10)					Cpv51.CJ81176_pVr0051.CpvVr-51
CpvVr-52 (6P11)					Cpv52.CJ81176_pVr0052.CpvVr-52
CpvVr-53 (6P12)					wB4.CJ81176_pVr0053.CpvVr-53
CpvVr-54 (6P13)					Cpv54.CpvVr-54
CRM1221-0012 (4821)	C11168-0013, 95.6, 57/60 (95%)	CRM1221-0012, 119, 60/60 (100%)		C81176-0013, 119, 60/60 (100%)	IMO.CJE0012.CJ81176_0039.CJB0013
CRM1221-0018 (4822)	C11168-0018c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0018, 119, 60/60 (100%)		C81176-0018, 119, 60/60 (100%)	dbac.CJ016c.CJE0018.CJ81176_0045.CJB0018.C11168-0018c (1B3)
CRM1221-0022 (4823)	C11168-0022c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0022, 119, 60/60 (100%)		C81176-0022, 119, 60/60 (100%)	CJ022c.CJE0022.CJ81176_0049.CJB0022.C11168-0022c (1F3)
CRM1221-0032 (4824)		CRM1221-0032, 119, 60/60 (100%)			CJE0032
CRM1221-0045 (4C11)		CRM1221-0045, 119, 60/60 (100%)			CJE0045
CRM1221-0050 (4C2)		CRM1221-0050, 119, 60/60 (100%)			CJE0050
CRM1221-0051 (4C3)	C11168-0122, 46.1, 41/47 (87%)	CRM1221-0051, 119, 60/60 (100%)			CJE0051
CRM1221-0052 (4C4)		CRM1221-0052, 119, 60/60 (100%)			CJE0052
CRM1221-0053 (4C5)		CRM1221-0053, 119, 60/60 (100%)			CJE0053
CRM1221-0068 (4C6)	C11168-0072c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0068, 119, 60/60 (100%)		C81176-0070, 119, 60/60 (100%)	CJ0072c.CJE0068.CJ81176_0109.CJB0070.C11168-0072c (1A9)
CRM1221-0079 (4C7)		CRM1221-0079, 119, 60/60 (100%)			CJE0079
CRM1221-0085 (4C8)	C11168-0090, 103, 58/60 (96%)	CRM1221-0085, 119, 60/60 (100%)		C81176-0086, 111, 59/60 (98%)	CJ0090.CJE0085.CJ81176_0125.CJB0086.C11168-0090 (1A11)
CRM1221-0092 (4C9)	C11168-0097, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0092, 119, 60/60 (100%)		C81176-0093, 119, 60/60 (100%)	preB.CJ0097.CJE0092.CJ81176_0132.CJB0093.C11168-0097 (1H11)
CRM1221-0105 (4C10)	C11168-0110, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0105, 119, 60/60 (100%)		C81176-0106, 119, 60/60 (100%)	sea33.CJ0110.CJE0105.CJ81176_0145.CJB0106.C11168-0110 (1M1)
CRM1221-0110 (4C11)	C11168-0115, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0110, 119, 60/60 (100%)		C81176-0111, 119, 60/60 (100%)	C1168-0115 (LJ2)
CRM1221-0112 (4C12)	C11168-0117, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0112, 119, 60/60 (100%)		C81176-0113, 119, 60/60 (100%)	plb.mnA.CJ0117.CJE0112.CJ81176_0152.CJB0113.C11168-0117 (L2)
CRM1221-0113 (4C13)	C11168-0118, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0113, 119, 60/60 (100%)		C81176-0114, 119, 60/60 (100%)	CJ0118.CJE0113.CJ81176_0153.CJB0114.C11168-0118 (1M2)
CRM1221-0115 (4C14)	C11168-0120, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0115, 119, 60/60 (100%)		C81176-0116, 111, 59/60 (98%)	CJ0115.CJE0115.CJ81176_0156.CJB0115.C11168-0120 (L2)
CRM1221-0126 (4C15)	C11168-0131, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0126, 119, 60/60 (100%)		C81176-0127, 111, 59/60 (98%)	CJ0131.CJE0126.CJ81176_0166.CJB0127.C11168-0131 (1U4)
CRM1221-0132 (4C16)	C11168-0137, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0132, 119, 60/60 (100%)		C81176-0133, 119, 60/60 (100%)	nBA.CJ0137.CJE0132.CJ81176_0172.CJB0133.C11168-0137 (1P4)
CRM1221-0134 (4C17)		CRM1221-0134, 119, 60/60 (100%)			CJE0134
CRM1221-0137 (4C18)	C11168-0142c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0137, 119, 60/60 (100%)		C81176-0138, 119, 60/60 (100%)	CJ0142c.CJE0137.CJ81176_0178.CJB0138.C11168-0142c (1M5)
CRM1221-0139 (4C19)		CRM1221-0139, 119, 60/60 (100%)			CJE0139
CRM1221-0140 (4C20)	C11168-0164, 38.2, 19/19 (100%)	CRM1221-0140, 119, 60/60 (100%)		C81176-0147, 38.2, 19/19 (100%)	CJE0140
CRM1221-0160 (4C21)	C11168-0164c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0160, 119, 60/60 (100%)		C81176-0160, 111, 59/60 (98%)	uBA.CJ0164c.CJE0160.CJ81176_0200.CJB0160.C11168-0164c (1K8)
CRM1221-0162 (4C22)	C11168-0198c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0162, 119, 60/60 (100%)		C81176-0190, 119, 60/60 (100%)	CJ0199c.CJE0192.CJ81176_0230.CJB0190.C11168-0198c (1M2)
CRM1221-0201 (4C23)	C11168-0208, 61.9, 52/59 (86%)	CRM1221-0201, 119, 60/60 (100%)		C81176-0198, 61.9, 52/59 (86%)	CJE0201
CRM1221-0202 (4C24)		CRM1221-0202, 119, 60/60 (100%)			CJE0202
CRM1221-0203 (4B1)		CRM1221-0203, 119, 60/60 (100%)			CJE0203
CRM1221-0204 (4B2)		CRM1221-0204, 119, 60/60 (100%)			CJE0204.CJ81176_0241
CRM1221-0205 (4B3)		CRM1221-0205, 119, 60/60 (100%)		C81176-0200, 111, 59/60 (98%)	CJE0205.CJ81176_0242.CJB0200
CRM1221-0206 (4B4)	C11168-0223, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0206, 119, 60/60 (100%)		C81176-0201, 119, 60/60 (100%)	CJE0206
CRM1221-0207 (4B5)	C11168-0223, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0207, 119, 60/60 (100%)		C81176-0202, 119, 60/60 (100%)	CJ0207.CJ81176_0244.CJB0207
CRM1221-0208 (4B6)	C11168-0223, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0208, 119, 60/60 (100%)		C81176-0202, 119, 60/60 (100%)	CJE0208
CRM1221-0209 (4B7)	C11168-0223, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0209, 119, 60/60 (100%)			CJE0209
CRM1221-0210 (4B8)	C11168-0223, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-0210, 119, 60/60 (100%)		C81176-0203, 111, 59/60 (98%)	CJ0210.CJ81176_0245.CJB0203
CRM1221-0211 (4B9)	C11168-0223, 107, 57/58 (98%)	CRM1221-0211, 119, 60/60 (100%)		C81176-0204, 119, 60/60 (100%)	CJE0211.CJ81176_0246.CJB0204
CRM1221-0213 (4D10)		CRM1221-0213, 119, 60/60 (100%)			CJE0213
CRM1221-0214 (4D11)		CRM1221-0214, 119, 60/60 (100%)			CJE0214
CRM1221-0215 (4D12)		CRM1221-0215, 119, 60/60 (100%)			CJE0215
CRM1221-0216 (4D13)		CRM1221-0216, 119, 60/60 (100%)			CJE0216
CRM1221-0217 (4D14)		CRM1221-0217, 119, 60/60 (100%)			CJE0217
CRM1221-0218 (4D15)		CRM1221-0218, 119, 60/60 (100%)			CJE0218
CRM1221-0219 (4D16)		CRM1221-0219, 119, 60/60 (100%)			CJE0219
CRM1221-0220 (4D17)		CRM1221-0220, 119, 60/60 (100%)			ban.CJE0220
CRM1221-0221 (4D18)		CRM1221-0221, 119, 60/60 (100%)			CJE0221
CRM1221-0222 (4D19)		CRM1221-0222, 119, 60/60 (100%)			CJE0222
CRM1221-0223 (4D20)		CRM1221-0223, 119, 60/60 (100%)			CJE0223
CRM1221-0224 (4D21)	C11168-0055c, 36.2, 21/22 (95%)	CRM1221-0224, 119, 60/60 (100%)		C81176-0054, 36.2, 21/22 (95%)	CJE0224
CRM1221-0225 (4D22)		CRM1221-0225, 119, 60/60 (100%)			CJE0225
CRM1221-0226 (4D23)		CRM1221-0226, 119, 60/60 (100%)			CJE0226
CRM1221-0227 (4D24)		CRM1221-0227, 119, 60/60 (100%)			CJE0227
CRM1221-0228 (4E1)	C11168-1055c, 36.2, 18/18 (100%)	CRM1221-0228, 119, 60/60 (100%)		C81176-0986, 36.2, 18/18 (100%)	CJE0228
CRM1221-0229 (4E2)		CRM1221-0229, 119, 60/60 (100%)			CJE0229
CRM1221-0230 (4E3)		CRM1221-0230, 119, 60/60 (100%)			CJE0230
CRM1221-0231 (4E4)		CRM1221-0231, 119, 60/60 (100%)			CJE0231
CRM1221-0232 (4E5)		CRM1221-0232, 119, 60/60 (100%)			CJE0232
CRM1221-0233 (4E6)		CRM1221-0233, 119, 60/60 (100%)			CJE0233
CRM1221-0234 (4E7)		CRM1221-0234, 119, 60/60 (100%)			CJE0234
CRM1221-0235 (4E8)	C11168-1108, 36.2, 21/22 (95%)	CRM1221-0235, 119, 60/60 (100%)		C81176-1248, 36.2, 24/26 (92%)	CJE0235
CRM1221-0236 (4E9)		CRM1221-0236, 119, 60/60 (100%)			CJE0236
CRM1221-0237 (4E10)		CRM1221-0237, 119, 60/60 (100%)			CJE0237
CRM1221-0238 (4E11)		CRM1221-0238, 119, 60/60 (100%)			CJE0238
CRM1221-0239 (4E12)		CRM1221-0239, 119, 60/60 (100%)			CJE0239
CRM1221-0240 (4E13)	C11168-1481c, 38.2, 19/19 (100%)	CRM1221-0240, 119, 60/60 (100%)		C81176-1378, 38.2, 19/19 (100%)	CJE0240
CRM1221-0241 (4E14)		CRM1221-0241, 119, 60/60 (100%)			CJE0241
CRM1221-0242 (4E15)		CRM1221-0242, 119, 60/60 (100%)			CJE0242
CRM1221-0243 (4E16)		CRM1221-0243, 119, 60/60 (100%)			CJE0243
CRM1221-0244 (4E17)		CRM1221-0244, 119, 60/60 (100%)			CJE0244
CRM1221-0245 (4E18)		CRM1221-0245, 119, 60/60 (100%)			CJE0245
CRM1221-0246 (4E19)		CRM1221-0246, 119, 60/60 (100%)			CJE0246
CRM1221-0247 (4E20)		CRM1221-0247, 119, 60/60 (100%)			CJE0247
CRM1221-0248 (4E21)		CRM1221-0248, 119, 60/60 (100%)			CJE0248
CRM1221-0249 (4E22)		CRM1221-0249, 119, 60/60 (100%)			CJE0249
CRM1221-0250 (4E23)		CRM1221-0250, 119, 60/60 (100%)			CJE0250
CRM1221-0251 (4E24)		CRM1221-0251, 119, 60/60 (100%)			CJE0251
CRM1221-0252 (4F1)		CRM1221-0252, 119, 60/60 (100%)			CJE0252
CRM1221-0253 (4F2)		CRM1221-0253, 119, 60/60 (100%)			CJE0253
CRM1221-0254 (4F3)		CRM1221-0254, 119, 60/60 (100%)			CJE0254
CRM1221-0255 (4F4)		CRM1221-0255, 119, 60/60 (100%)			CJE0255
CRM1221-0256 (4F5)		CRM1221-0256, 119, 60/60 (100%)			hBx.CJE0256
CRM1221-0257 (4F6)		CRM1221-0257, 119, 60/60 (100%)			CJE0257
CRM1221-0258 (4F7)		CRM1221-0258, 119, 60/60 (100%)			CJE0258
CRM1221-0259 (4F8)		CRM1221-0259, 119, 60/60 (100%)			CJE0259
CRM1221-0260 (4F9)		CRM1221-0260, 119, 60/60 (100%)			CJE0260
CRM1221-0261 (4F10)		CRM1221-0261, 119, 60/60 (100%)			CJE0261
CRM1221-0262 (4F11)		CRM1221-0262, 119, 60/60 (100%)			CJE0262
CRM1221-0263 (4F12)		CRM1221-0263, 119, 60/60 (100%)			CJE0263
CRM1221-0264 (4F13)		CRM1221-0264, 119, 60/60 (100%)			CJE0264
CRM1221-0265 (4F14)		CRM1221-0265, 119, 60/60 (100%)			CJE0265
CRM1221-0266 (4F15)		CRM1221-0266, 119, 60/60 (100%)			CJE0266
CRM1221-0267 (4F16)		CRM1221-0267, 119, 60/60 (100%)			CJE0267
CRM1221-0268 (4F17)		CRM1221-0268, 119, 60/60 (100%)			CJE0268
CRM1221-0269 (4F18)		CRM1221-0269, 119, 60/60 (100%)			CJE0269
CRM1221-0270 (4F19)		CRM1221-0270, 119, 60/60 (100%)			CJE0270
CRM1221-0271 (4F20)		CRM1221-0271, 119, 60/60 (100%)			CJE0271
CRM1221-0272 (4F21)		CRM1221-0272, 119, 60/60 (100%)			CJE0272
CRM1221-0273 (4F22)		CRM1221-0273, 119, 60/60 (100%)			CJE0273
CRM1221-0274 (4F23)	C11168-0223, 89.7, 58/61 (95%)	CRM1221-0274, 119, 60/60 (100%)			CJE0274
CRM1221-0281 (4F24)	C11168-0206c, 103, 52/52 (100%)	CRM1221-0281, 119, 60/60 (100%)		C81176-0212, 103, 52/52 (100%)	CJE0281
CRM1221-0283 (4G1)	C11168-0232c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-0283, 119, 60/60 (100%)		C81176-0214, 119, 60/60 (100%)	CJ02

CRM121-0445 (4H13)	C11168-0396, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0445, 119, 60/60 (100%)	C81176-0372, 119, 60/60 (100%)	CJ0396;CJE0445;CJ81176_0419;CJB0372;C11168-0396 (1/23)
CRM121-0447 (4H14)	C11168-0398, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0447, 119, 60/60 (100%)	C81176-0374, 119, 60/60 (100%)	gacC;CJ0398;CJE0447;CJ81176_0421;CJB0374;C11168-0398 (1/23)
CRM121-0463 (4H15)	C11168-0414, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0463, 119, 60/60 (100%)	C81176-0390, 119, 60/60 (100%)	CJ0414;CJE0463;CJ81176_0438;CJB0390;C11168-0414 (2/21)
CRM121-0465 (4H16)	C11168-0415, 56, 29/29 (90%)	CRM121-0465, 119, 60/60 (100%)	C81176-0391, 56, 29/29 (90%)	CJE0465
CRM121-0466 (4H17)		CRM121-0466, 119, 60/60 (100%)		CJE0466
CRM121-0469 (4H18)	C11168-0420, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0469, 119, 60/60 (100%)	C81176-0395, 119, 60/60 (100%)	CJ0420;CJE0469;CJ81176_0443;CJB0395;C11168-0420 (2/22)
CRM121-0472 (4H19)		CRM121-0472, 119, 60/60 (100%)		CJE0472
CRM121-0473 (4H20)		CRM121-0473, 119, 60/60 (100%)		CJE0473
CRM121-0474 (4H21)		CRM121-0474, 119, 60/60 (100%)		CJE0474
CRM121-0477 (4H22)	C11168-0428, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0477, 119, 60/60 (100%)	C81176-0400, 119, 60/60 (100%)	CJ0428;CJE0477;CJ81176_0448;CJB0400;C11168-0428 (2/23)
CRM121-0479 (4H23)		CRM121-0479, 119, 60/60 (100%)		CJE0479
CRM121-0481 (4H24)	C11168-0431, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0481, 119, 60/60 (100%)	C81176-0403, 119, 60/60 (100%)	CJ0431;CJE0481;C11168-0431 (2/23)
CRM121-0484 (4H1)	C11168-0434, 97, 55/57 (98%)	CRM121-0484, 119, 60/60 (100%)	C81176-0406, 111, 59/60 (98%)	patC;CJE0484;CJ81176_0460;CJB0406
CRM121-0485 (4H2)	C11168-0435, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0485, 119, 60/60 (100%)	C81176-0407, 119, 60/60 (100%)	fabG;CJ0435;CJE0485;CJ81176_0461;CJB0407;C11168-0435 (2/13)
CRM121-0487 (4H3)		CRM121-0487, 119, 60/60 (100%)		CJE0487
CRM121-0488 (4H4)	C11168-0437, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0488, 119, 60/60 (100%)	C81176-0409, 119, 60/60 (100%)	sdhA;CJ0437;CJE0488;CJ81176_0463;CJB0409;C11168-0437 (2/14)
CRM121-0492 (4H5)		CRM121-0492, 119, 60/60 (100%)		CJE0492;CJ81176_0467
CRM121-0493 (4H6)	C11168-0441, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0493, 119, 60/60 (100%)	C81176-0413, 119, 60/60 (100%)	acpP;CJ0441;CJE0493;CJ81176_0468;CJB0413;C11168-0441 (2/14)
CRM121-0495 (4H7)	C11168-0443, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0495, 119, 60/60 (100%)	C81176-0415, 117, 59/59 (100%)	aca;CJ0443;CJE0495;CJ81176_0470;CJB0415;C11168-0443 (2/14)
CRM121-0496 (4H8)	C11168-0444, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0496, 119, 60/60 (100%)	C81176-0416, 111, 59/60 (98%)	efaA;CJ0444;CJE0496;CJ81176_0471;CJB0416;C11168-0444 (2/15)
CRM121-0497 (4H9)		CRM121-0497, 119, 60/60 (100%)		CJ0496;CJE0506;CJ81176_0481;CJB0426;C11168-0496 (2/26)
CRM121-0506 (4H9)	C11168-0456, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0506, 119, 60/60 (100%)	C81176-0426, 111, 59/60 (98%)	recG;CJ0464;CJE0514;CJ81176_0489;CJB0434;C11168-0464 (2/27)
CRM121-0514 (4H10)	C11168-0464, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0514, 119, 60/60 (100%)	C81176-0434, 111, 59/60 (98%)	CJE0511
CRM121-0521 (4H11)		CRM121-0521, 119, 60/60 (100%)		rsfL;CJ0491;CJE0540;CJ81176_0511;CJB0450;C11168-0491 (2/10)
CRM121-0544 (4H13)		CRM121-0544, 119, 60/60 (100%)		CJE0544
CRM121-0545 (4H14)		CRM121-0545, 119, 60/60 (100%)		CJE0545
CRM121-0546 (4H15)		CRM121-0546, 119, 60/60 (100%)		CJE0546
CRM121-0547 (4H16)	C11168-0945c, 36.2, 18/18 (100%)	CRM121-0547, 119, 60/60 (100%)	C81176-0887, 36.2, 18/18 (100%)	CJE0547
CRM121-0548 (4H17)		CRM121-0548, 119, 60/60 (100%)		CJE0548
CRM121-0549 (4H18)		CRM121-0549, 119, 60/60 (100%)		CJE0549
CRM121-0551 (4H19)		CRM121-0551, 119, 60/60 (100%)		CJE0551
CRM121-0552 (4H20)		CRM121-0552, 119, 60/60 (100%)		CJE0552
CRM121-0553 (4H21)		CRM121-0553, 119, 60/60 (100%)		CJE0553
CRM121-0554 (4H22)		CRM121-0554, 119, 60/60 (100%)		CJE0554
CRM121-0555 (4H23)		CRM121-0555, 119, 60/60 (100%)		CJE0555
CRM121-0556 (4H24)		CRM121-0556, 119, 60/60 (100%)		CJE0556
CRM121-0557 (4H1)		CRM121-0557, 119, 60/60 (100%)		CJE0557
CRM121-0558 (4H2)		CRM121-0558, 119, 60/60 (100%)		CJE0558
CRM121-0559 (4H3)		CRM121-0559, 119, 60/60 (100%)		CJE0559
CRM121-0560 (4H4)		CRM121-0560, 119, 60/60 (100%)		CJE0560
CRM121-0561 (4H5)		CRM121-0561, 119, 60/60 (100%)		CJE0561
CRM121-0562 (4H6)		CRM121-0562, 119, 60/60 (100%)		CJE0562
CRM121-0563 (4H7)		CRM121-0563, 119, 60/60 (100%)		CJE0563
CRM121-0564 (4H8)		CRM121-0564, 119, 60/60 (100%)		CJE0564
CRM121-0565 (4H9)		CRM121-0565, 119, 60/60 (100%)		CJE0565
CRM121-0566 (4H10)		CRM121-0566, 119, 60/60 (100%)		CJE0566
CRM121-0567 (4H11)		CRM121-0567, 119, 60/60 (100%)		CJE0567
CRM121-0568 (4H12)		CRM121-0568, 119, 60/60 (100%)		CJE0568
CRM121-0569 (4H13)		CRM121-0569, 119, 60/60 (100%)		CJE0569
CRM121-0570 (4H14)		CRM121-0570, 119, 60/60 (100%)		CJE0570
CRM121-0571 (4H15)		CRM121-0571, 119, 60/60 (100%)		CJE0571
CRM121-0572 (4H16)		CRM121-0572, 119, 60/60 (100%)		CJE0572
CRM121-0573 (4H17)		CRM121-0573, 119, 60/60 (100%)		CJE0573
CRM121-0574 (4H18)		CRM121-0574, 119, 60/60 (100%)		CJE0574
CRM121-0575 (4H19)		CRM121-0575, 119, 60/60 (100%)		CJE0575
CRM121-0576 (4H20)		CRM121-0576, 119, 60/60 (100%)		CJE0576
CRM121-0577 (4H21)		CRM121-0577, 119, 60/60 (100%)		CJE0577
CRM121-0578 (4H22)		CRM121-0578, 119, 60/60 (100%)		CJE0578
CRM121-0580 (4H24)		CRM121-0580, 119, 60/60 (100%)		CJE0580
CRM121-0581 (4H1)		CRM121-0581, 119, 60/60 (100%)		CJE0581
CRM121-0582 (4H2)		CRM121-0582, 119, 60/60 (100%)		CJE0582
CRM121-0583 (4H3)		CRM121-0583, 119, 60/60 (100%)		CJE0583
CRM121-0584 (4H4)		CRM121-0584, 119, 60/60 (100%)		CJE0584
CRM121-0585 (4H5)		CRM121-0585, 119, 60/60 (100%)		CJE0585
CRM121-0586 (4H6)		CRM121-0586, 119, 60/60 (100%)		CJE0586
CRM121-0587 (4H7)		CRM121-0587, 119, 60/60 (100%)		CJE0587
CRM121-0588 (4H8)		CRM121-0588, 119, 60/60 (100%)		CJE0588
CRM121-0589 (4H9)		CRM121-0589, 119, 60/60 (100%)		CJE0589
CRM121-0590 (4H10)		CRM121-0590, 119, 60/60 (100%)		CJE0590
CRM121-0591 (4H11)		CRM121-1451, 119, 60/60 (100%)		CJE0591
CRM121-0592 (4H12)		CRM121-1450, 119, 60/60 (100%)		CJE0592
CRM121-0593 (4H13)		CRM121-1449, 119, 60/60 (100%)		CJE0593
CRM121-0594 (4H14)		CRM121-0594, 119, 60/60 (100%)		CJE0594
CRM121-0595 (4H15)		CRM121-0595, 119, 60/60 (100%)		CJE0595
CRM121-0596 (4H16)	C11168-0112, 36.2, 22/23 (95%)	CRM121-0596, 119, 60/60 (100%)	C81176-0108, 36.2, 22/23 (95%)	CJE0596
CRM121-0597 (4H17)		CRM121-0597, 119, 60/60 (100%)		CJE0597
CRM121-0598 (4H18)		CRM121-0598, 119, 60/60 (100%)		CJE0598
CRM121-0599 (4H19)	C11168-0607, 36.2, 24/26 (92%)	CRM121-0599, 119, 60/60 (100%)	C81176-0671, 36.2, 18/18 (100%)	CJE0599
CRM121-0600 (4H20)		CRM121-0600, 119, 60/60 (100%)	C81176-1220, 36.2, 19/19 (100%)	CJE0600
CRM121-0601 (4H21)		CRM121-0601, 119, 60/60 (100%)		CJE0601
CRM121-0622 (4H23)	C11168-0515, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0622, 119, 60/60 (100%)	C81176-0482, 119, 60/60 (100%)	C11168-0515;CJE0622;CJ81176_0543;CJB0482;C11168-0515 (2/11)
CRM121-0624 (4H25)	C11168-0517, 105, 53/53 (100%)	CRM121-0624, 119, 60/60 (100%)	C81176-0484, 105, 53/53 (100%)	CJE0624
CRM121-0632 (4H24)	C11168-0528c, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0632, 119, 60/60 (100%)	C81176-0492, 119, 60/60 (100%)	ifgB;CJ0528c;CJE0632;CJ81176_0553;CJB0492;C11168-0528c (2/13)
CRM121-0637 (4H1)	C11168-0533, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0637, 119, 60/60 (100%)	C81176-0497, 103, 58/60 (98%)	svuA;CJ0633;CJE0637;CJ81176_0558;CJB0497;C11168-0533 (2/13)
CRM121-0648 (4H2)	C11168-0544, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0648, 119, 60/60 (100%)	C81176-0508, 111, 59/60 (98%)	CJ0544;CJE0648;CJ81176_0569;CJB0508;C11168-0544 (2/15)
CRM121-0653 (4H3)	C11168-0549, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0653, 119, 60/60 (100%)	C81176-0513, 119, 60/60 (100%)	rls;CJ0549;CJE0653;CJ81176_0574;CJB0513;C11168-0549 (2/15)
CRM121-0668 (4H4)	C11168-0563, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0668, 119, 60/60 (100%)	C81176-0527, 119, 60/60 (100%)	OS0563;CJE0668;CJ81176_0568;CJB0527;C11168-0563 (2/17)
CRM121-0669 (4H5)	C11168-0564, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0669, 119, 60/60 (100%)	C81176-0528, 91.7, 55/58 (94%)	CJ0564;CJE0669;C11168-0564 (2/17)
CRM121-0670 (4H6)		CRM121-0670, 119, 60/60 (100%)		CJE0670
CRM121-0671 (4H7)		CRM121-0671, 119, 60/60 (100%)		CJE0671
CRM121-0681 (4H9)	C11168-0578c, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0681, 119, 60/60 (100%)	C81176-0533, 119, 60/60 (100%)	CJE0672;CJ81176_0594;CJB0533;C11168-0578c (2/19)
CRM121-0688 (4H1)	C11168-0588, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0688, 119, 60/60 (100%)	C81176-0542, 119, 60/60 (100%)	tafC;mtb;CJ0578c;CJE0681;CJ81176_0606;CJB0542;C11168-0578c (2/19)
CRM121-0691 (4H11)	C11168-0588, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0691, 119, 60/60 (100%)	C81176-0549, 113, 57/57 (100%)	acpA;CJE0688;CJE0688;CJ81176_0613;CJB0549;C11168-0588 (2/10)
CRM121-0697 (4H12)	C11168-0594c, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0697, 119, 60/60 (100%)	C81176-0552, 87.7, 56/60 (93%)	hYA;CJE0691
CRM121-0698 (4H13)	C11168-0594c, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0698, 119, 60/60 (100%)	C81176-0558, 103, 58/60 (96%)	CJ0594c;CJE0697;CJ81176_0622;CJB0558;C11168-0594c (2/11)
CRM121-0709 (4H14)	C11168-0595c, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0709, 119, 60/60 (100%)	C81176-0559, 119, 60/60 (100%)	npf;CJ0595c;CJE0698;CJ81176_0623;CJB0559;C11168-0595c (2/11)
CRM121-0716 (4H15)	C11168-0613, 71.9, 54/60 (90%)	CRM121-0716, 119, 60/60 (100%)	C81176-0570, 111, 59/60 (98%)	CJ0698;CJE0709;CJ81176_0635;CJB0570;C11168-0613 (2/12)
CRM121-0719 (4H16)	C11168-0618, 77.8, 54/59 (91%)	CRM121-0719, 119, 60/60 (100%)	C81176-0580, 85.7, 55/59 (93%)	pasB;CJE0719
CRM121-0721 (4H17)	C11168-0561, 38.2, 19/19 (100%)	CRM121-0721, 119, 60/60 (100%)	C81176-0538, 36.2, 19/19 (100%)	CJE0720
CRM121-0723 (4H18)	C11168-0620, 75.8, 53/58 (91%)	CRM121-0723, 119, 60/60 (100%)	C81176-0584, 83.8, 54/58 (93%)	CJE0723
CRM121-0731 (4H19)		CRM121-0731, 119, 60/60 (100%)		CJE0731
CRM121-0732 (4H20)		CRM121-0732, 119, 60/60 (100%)		CJE0732
CRM121-0733 (4H21)	C11168-0630c, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0733, 119, 60/60 (100%)	C81176-0593, 103, 58/60 (96%)	hoia;CJ0630c;CJE0733;CJ81176_0658;CJB0593;C11168-0630c (2/15)
CRM121-0739 (4H22)	C11168-0636, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0739, 119, 60/60 (100%)	C81176-0599, 103, 58/60 (96%)	CJ0636;CJE0739;CJ81176_0664;CJB0599;C11168-0636 (2/16)
CRM121-0743 (4H23)	C11168-0640c, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0743, 119, 60/60 (100%)	C81176-0603, 119, 60/60 (100%)	ansB;CJ0640c;CJE0743;CJ81176_0668;CJB0603;C11168-0640c (2/17)
CRM121-0745 (4H24)	C11168-0642, 119, 60/60 (100%)	CRM121-0745, 119, 60/60 (100%)	C81176-0605, 111, 59/60 (98%)	recN;CJ0642;CJE0745;CJ81176_0670;CJB0605;C11168-0642 (2/17)
CRM121-0756 (4H1)	C11168-0653c, 111, 59/60 (98%)	CRM121-0756, 119, 60/60 (100%)	C81176-0616, 111, 59/60 (9	

CRM1221-1048 (4N19)		CRM1221-1048, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0468, 95.6, 57/80 (95%)	CJE 1048
CRM1221-1050 (4N20)	Q11168-0966, 95.6, 51/52 (98%)	CRM1221-1050, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0908, 63.9, 42/44 (95%)	CJE 1050
CRM1221-1051 (4N21)	Q11168-0970, 99.6, 56/58 (96%)	CRM1221-1051, 119, 60/60 (100%)		CJE 1051
CRM1221-1052 (4N22)	Q11168-0971, 99.6, 56/58 (96%)	CRM1221-1052, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0908, 103, 58/60 (96%)	CJ0971.CJE 1052;CJ1168-0971 (3J19)
CRM1221-1055 (4N23)		CRM1221-1055, 119, 60/60 (100%)		CJE 1055
CRM1221-1059 (4N24)	Q11168-0977, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1059, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0911, 119, 60/60 (100%)	CJ0977.CJE 1059;CJ81176_0996.CJ80911.CJ1168-0977 (3P19)
CRM1221-1062 (4C01)	Q11168-0988, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1062, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0914, 117, 59/59 (100%)	psd.CJ8090.CJE 1062;CJ81176_0999.CJ80914.CJ1168-0980 (3K20)
CRM1221-1065 (4C02)	Q11168-0983, 101, 57/59 (95%)	CRM1221-1065, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0917, 101, 57/59 (95%)	jpa.CJE 1065
CRM1221-1071 (4C03)	Q11168-0991c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1071, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0923, 119, 60/60 (100%)	CJ0991.CJE 1071;CJ81176_1009.CJ80923.CJ1168_0991c (3N21)
CRM1221-1089 (4C04)	Q11168-1036c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1089, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0941, 111, 59/60 (98%)	CJ1039c.CJE 1089;CJ81176_1027.CJ80941.CJ1168-1036c (3P23)
CRM1221-1091 (4C05)	Q11168-1011, 95.6, 57/60 (95%)	CRM1221-1091, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0943, 103, 58/60 (96%)	CJ1011.CJE 1091;CJ81176_1029.CJ80943.CJ1168-1011 (3J24)
CRM1221-1092 (4C06)		CRM1221-1092, 119, 60/60 (100%)		CJE 1092
CRM1221-1093 (4C07)		CRM1221-1093, 119, 60/60 (100%)		CJE 1093
CRM1221-1094 (4C08)		CRM1221-1094, 119, 60/60 (100%)		CJE 1094
CRM1221-1095 (4C09)		CRM1221-1095, 119, 60/60 (100%)		CJE 1095
CRM1221-1096 (4C10)		CRM1221-1096, 119, 60/60 (100%)		CJE 1096
CRM1221-1097 (4C11)		CRM1221-1097, 119, 60/60 (100%)		CJE 1097
CRM1221-1098 (4C12)	Q11168-1309c, 36.2, 21/22 (95%)	CRM1221-1098, 119, 60/60 (100%)		CJE 1098
CRM1221-1099 (4C13)		CRM1221-1099, 119, 60/60 (100%)		CJE 1099
CRM1221-1100 (4C14)		CRM1221-1100, 119, 60/60 (100%)		CJE 1100
CRM1221-1101 (4C15)		CRM1221-1101, 119, 60/60 (100%)		CJE 1101
CRM1221-1102 (4C16)		CRM1221-1102, 119, 60/60 (100%)		CJE 1102
CRM1221-1103 (4C17)		CRM1221-1103, 119, 60/60 (100%)		CJE 1103
CRM1221-1104 (4C18)		CRM1221-1104, 119, 60/60 (100%)		CJE 1104
CRM1221-1105 (4C19)		CRM1221-1105, 119, 60/60 (100%)		CJE 1105
CRM1221-1106 (4C20)		CRM1221-1106, 119, 60/60 (100%)		CJE 1106
CRM1221-1107 (4C21)		CRM1221-1107, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0876, 119, 60/60 (100%)	CJE 1107
CRM1221-1108 (4C22)		CRM1221-1108, 119, 60/60 (100%)		CJE 1108
CRM1221-1109 (4C23)		CRM1221-1109, 119, 60/60 (100%)		CJE 1109
CRM1221-1110 (4C24)		CRM1221-1110, 119, 60/60 (100%)		CJE 1110
CRM1221-1111 (4P1)	Q11168-1206c, 38.2, 19/19 (100%)	CRM1221-1111, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1133, 38.2, 19/19 (100%)	CJE 1111
CRM1221-1112 (4P2)		CRM1221-1112, 119, 60/60 (100%)		CJE 1112
CRM1221-1113 (4P3)		CRM1221-1113, 119, 60/60 (100%)		CJE 1113
CRM1221-1114 (4P4)		CRM1221-1114, 119, 60/60 (100%)		CJE 1114
CRM1221-1115 (4P5)		CRM1221-1115, 119, 60/60 (100%)		CJE 1115
CRM1221-1116 (4P6)		CRM1221-1116, 119, 60/60 (100%)		CJE 1116
CRM1221-1117 (4P7)		CRM1221-1117, 119, 60/60 (100%)		CJE 1117
CRM1221-1118 (4P8)		CRM1221-1118, 119, 60/60 (100%)		CJE 1118
CRM1221-1119 (4P9)		CRM1221-1119, 119, 60/60 (100%)		CJE 1119
CRM1221-1120 (4P10)		CRM1221-1120, 119, 60/60 (100%)		CJE 1120
CRM1221-1121 (4P11)		CRM1221-1121, 119, 60/60 (100%)		CJE 1121
CRM1221-1122 (4P12)		CRM1221-1122, 119, 60/60 (100%)		CJE 1122
CRM1221-1123 (4P13)		CRM1221-1123, 119, 60/60 (100%)		CJE 1123
CRM1221-1124 (4P14)		CRM1221-1124, 119, 60/60 (100%)		CJE 1124
CRM1221-1125 (4P15)		CRM1221-1125, 119, 60/60 (100%)		CJE 1125
CRM1221-1126 (4P16)		CRM1221-1126, 119, 60/60 (100%)		CJE 1126
CRM1221-1127 (4P17)		CRM1221-1127, 119, 60/60 (100%)		CJE 1127
CRM1221-1128 (4P18)		CRM1221-1128, 119, 60/60 (100%)		CJE 1128
CRM1221-1129 (4P19)		CRM1221-1129, 119, 60/60 (100%)		CJE 1129
CRM1221-1130 (4P20)		CRM1221-1130, 119, 60/60 (100%)		CJE 1130
CRM1221-1131 (4P21)		CRM1221-1131, 119, 60/60 (100%)		CJE 1131
CRM1221-1132 (4P22)		CRM1221-1132, 119, 60/60 (100%)		CJE 1132
CRM1221-1133 (4P23)		CRM1221-1133, 119, 60/60 (100%)		CJE 1133
CRM1221-1134 (4P24)		CRM1221-1134, 119, 60/60 (100%)		CJE 1134
CRM1221-1135 (5A1)		CRM1221-1135, 119, 60/60 (100%)		CJE 1135
CRM1221-1136 (5A2)		CRM1221-1136, 119, 60/60 (100%)		CJE 1136
CRM1221-1137 (5A3)		CRM1221-1137, 119, 60/60 (100%)		CJE 1137
CRM1221-1138 (5A4)		CRM1221-1138, 119, 60/60 (100%)		CJE 1138
CRM1221-1139 (5A5)		CRM1221-1139, 119, 60/60 (100%)		CJE 1139
CRM1221-1140 (5A6)		CRM1221-1140, 119, 60/60 (100%)		CJE 1140
CRM1221-1141 (5A7)		CRM1221-1141, 119, 60/60 (100%)		CJE 1141
CRM1221-1142 (5A8)		CRM1221-1142, 119, 60/60 (100%)		CJE 1142
CRM1221-1143 (5A9)		CRM1221-1143, 119, 60/60 (100%)		CJE 1143
CRM1221-1144 (5A10)		CRM1221-1144, 119, 60/60 (100%)		CJE 1144
CRM1221-1145 (5A11)		CRM1221-1145, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0939, 36.2, 18/18 (100%)	CJE 1145
CRM1221-1146 (5A12)	Q11168-1565c, 36.2, 18/18 (100%)	CRM1221-1146, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1448, 36.2, 18/18 (100%)	CJE 1146
CRM1221-1147 (5A13)		CRM1221-1147, 119, 60/60 (100%)		CJE 1147
CRM1221-1148 (5A14)		CRM1221-1148, 119, 60/60 (100%)		CJE 1148
CRM1221-1149 (5A15)		CRM1221-1149, 119, 60/60 (100%)		CJE 1149
CRM1221-1150 (5A16)		CRM1221-1150, 119, 60/60 (100%)		CJE 1150
CRM1221-1151 (5A17)		CRM1221-1151, 119, 60/60 (100%)		CJE 1151
CRM1221-1152 (5A18)		CRM1221-1152, 119, 60/60 (100%)		CJE 1152
CRM1221-1153 (5A19)		CRM1221-1153, 119, 60/60 (100%)		CJE 1153
CRM1221-1154 (5A20)		CRM1221-1154, 119, 60/60 (100%)		CJE 1154
CRM1221-1155 (5A21)	Q11168-1012c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1155, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0944, 111, 59/60 (98%)	CJ1012c.CJE 1155;CJ81176_1031.CJ80944.CJ1168-1012c (3K24)
CRM1221-1157 (5A22)	Q11168-1013c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1157, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0945, 119, 60/60 (100%)	CJ1013c.CJE 1157;CJ81176_1032.CJ80945.CJ1168-1013c (3L24)
CRM1221-1164 (5A23)	Q11168-1020c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1164, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0952, 111, 59/60 (98%)	CJ11020c.CJE 1164;CJ81176_1039.CJ80952.CJ1168-1020c (3C1)
CRM1221-1168 (5A24)	Q11168-1024c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1168, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0956, 119, 60/60 (100%)	figr.CJ1024c.CJE 1168.CJ81176_1043.CJ80956.CJ1168-1024c (3G1)
CRM1221-1174 (5B1)	Q11168-1030c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1174, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0962, 119, 60/60 (100%)	lepA.CJ1030c.CJE 1174;CJ81176_1049.CJ80962.CJ1168-1030c (3E2)
CRM1221-1185 (5B2)	Q11168-1041c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1185, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0973, 119, 60/60 (100%)	yncC.CJ1041c.CJE 1185;CJ81176_1062.CJ80973.CJ1168-1041c (3H4)
CRM1221-1187 (5B3)	Q11168-1043c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1187, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0975, 119, 60/60 (100%)	CJ1043c.CJE 1187;CJ81176_1064.CJ80975.CJ1168-1043c (3B4)
CRM1221-1191 (5B4)	Q11168-1047c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1191, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0979, 103, 58/60 (96%)	hns.CJ1047c.CJE 1191;CJ81176_1068.CJ80979.CJ1168-1047c (3F4)
CRM1221-1192 (5B5)	Q11168-1048c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1192, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0980, 119, 60/60 (100%)	hns.CJ1048c.CJE 1192;CJ81176_1069.CJ80980.CJ1168-1048c (3C4)
CRM1221-1195 (5B6)	Q11168-1051c, 87.7, 56/60 (93%)	CRM1221-1195, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0985, 111, 59/60 (98%)	CJE 1195
CRM1221-1198 (5B7)	Q11168-1054c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1198, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0986, 111, 59/60 (98%)	murC.CJ1054c.CJE 1198;CJ81176_1074.CJ80986.CJ1168-1054c (3E5)
CRM1221-1202 (5B8)	Q11168-1058c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1202, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0990, 111, 59/60 (98%)	CJ1058c.CJE 1202;CJ81176_1079.CJ80990.CJ1168-1058c (3B6)
CRM1221-1206 (5B9)	Q11168-1063c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1206, 119, 60/60 (100%)	CB1176-0993, 119, 60/60 (100%)	CJ1063.CJE 1206;CJ81176_1082.CJ80993.CJ1168-1063c (3F6)
CRM1221-1216 (5B10)	Q11168-1073c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1216, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1002, 119, 60/60 (100%)	lon.CJ1073c.CJE 1216;CJ81176_1091.CJ80993.CJ1168-1073c (3G7)
CRM1221-1223 (5B11)	Q11168-1080c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221-1223, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1009, 103, 58/60 (96%)	hemM.CJ1080c.CJE 1223;CJ81176_1098.CJ80993.CJ1168-1080c (3F8)
CRM1221-1227 (5B12)	Q11168-1084c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1227, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1019, 119, 60/60 (100%)	CJ1084c.CJE 1227;CJ81176_1102.CJ81019.CJ1168-1084c (3B9)
CRM1221-1229 (5B13)	Q11168-1086c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1229, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1015, 111, 59/60 (98%)	CJ1086c.CJE 1229;CJ81176_1104.CJ81015.CJ1168-1086c (3D5)
CRM1221-1237 (5B14)	Q11168-1094c, 95.6, 57/60 (95%)	CRM1221-1237, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1023, 95.6, 57/60 (95%)	yncC.CJ1094c.CJE 1237;CJ81176_1112.CJ81023.CJ1168-1094c (3D10)
CRM1221-1248 (5B15)	Q11168-1105, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1248, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1034, 119, 60/60 (100%)	smfB.CJ1105.CJE 1248;CJ81176_1123.CJ81034.CJ1168-1105 (3G11)
CRM1221-1252 (5B16)	Q11168-1109, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1252, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1038, 119, 60/60 (100%)	aac.CJ1109.CJE 1252;CJ81176_1127.CJ81038.CJ1168-1109 (3C12)
CRM1221-1260 (5B17)	Q11168-1117c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1260, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1046, 119, 60/60 (100%)	smfB.CJ1117c.CJE 1260;CJ81176_1135.CJ81046.CJ1168-1117c (3C13)
CRM1221-1268 (5B18)	Q11168-1126c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1268, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1054, 119, 60/60 (100%)	psfB.wafC.CJ1126c.CJE 1268;CJ81176_1143.CJ81054.CJ1168-1126c (3D14)
CRM1221-1269 (5B19)	Q11168-1127c, 119, 60/60 (100%)	CRM1221-1269, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1055, 119, 60/60 (100%)	psfB.wafC.CJ1127c.CJE 1269;CJ81176_1144.CJ81055.CJ1168-1127c (3E14)
CRM1221-1276 (5B20)	Q11168-1134, 117, 59/59 (100%)	CRM1221-1276, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1063, 111, 59/60 (98%)	hnb.waaM.CJ1134.CJE 1276;CJ81176_1151.CJ81063.CJ1168-1134 (3D15)
CRM1221-1278 (5B21)		CRM1221-1278, 119, 60/60 (100%)		CJE 1278
CRM1221-1279 (5B22)		CRM1221-1279, 119, 60/60 (100%)		CJE 1279
CRM1221-1280 (5B23)	Q11168-1138c, 42.1, 36/41 (87%)	CRM1221-1280, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1066, 61.9, 40/43 (93%)	CJE 1280
CRM1221-1281 (5B24)	Q11168-1148, 48.1, 29/30 (93%)	CRM1221-1281, 119, 60/60 (100%)		CJE 1281
CRM1221-1283 (5C1)	Q11168-1148, 87.7, 56/60 (93%)	CRM1221-1283, 119, 60/60 (100%)		waaf.CJE 1283
CRM1221-1284 (5C2)	Q11168-1150c, 103, 58/60 (96%)	CRM1221-1284, 119, 60/60 (100%)	CB1176-1076, 79.8, 55/60 (91%)	hnb.zB.CJE 1284;CJ81176_1165.CJ81077.CJ1168-1150c (5C11)
CRM1221-1286 (5C3)	Q11168-1151c, 111, 59/60 (98%)	CRM1221		

CR1176-1442 (E1)		CR1176-1442, 119, 60/60 (100%)	CJE1442
CR1176-1443 (E2)		CR1176-1443, 119, 60/60 (100%)	CJE1443
CR1176-1444 (E3)		CR1176-1444, 119, 60/60 (100%)	CJE1444
CR1176-1445 (E4)		CR1176-1445, 119, 60/60 (100%)	CJE1445
CR1176-1446 (E5)	G1168-0112, 38.2, 22/23 (95%)	CR1176-1446, 119, 60/60 (100%)	CJE1446
CR1176-1447 (E6)		CR1176-1447, 119, 60/60 (100%)	CJE1447
CR1176-1448 (E7)	G1168-1117c, 36.2, 18/18 (100%)	CR1176-1448, 119, 60/60 (100%)	CJE1448
CR1176-1449 (E8)		CR1176-1449, 119, 60/60 (100%)	CJE1449
CR1176-1450 (E9)		CR1176-1450, 119, 60/60 (100%)	CJE1450
CR1176-1451 (E10)		CR1176-1451, 119, 60/60 (100%)	CJE1451
CR1176-1452 (E11)		CR1176-1452, 119, 60/60 (100%)	CJE1452
CR1176-1453 (E12)		CR1176-1453, 119, 60/60 (100%)	CJE1453
CR1176-1454 (E13)		CR1176-1454, 119, 60/60 (100%)	CJE1454
CR1176-1455 (E14)		CR1176-1455, 119, 60/60 (100%)	CJE1455
CR1176-1456 (E15)		CR1176-1456, 119, 60/60 (100%)	CJE1456
CR1176-1457 (E16)		CR1176-1457, 119, 60/60 (100%)	CJE1457
CR1176-1458 (E17)		CR1176-1458, 119, 60/60 (100%)	CJE1458
CR1176-1459 (E18)		CR1176-1459, 119, 60/60 (100%)	CJE1459
CR1176-1460 (E19)		CR1176-1460, 119, 60/60 (100%)	CJE1460
CR1176-1461 (E20)		CR1176-1461, 119, 60/60 (100%)	CJE1461
CR1176-1462 (E21)	G1168-0722c, 38.2, 19/19 (100%)	CR1176-1462, 119, 60/60 (100%)	CJE1462
CR1176-1463 (E22)		CR1176-1463, 119, 60/60 (100%)	CJE1463
CR1176-1464 (E23)		CR1176-1464, 119, 60/60 (100%)	CJE1464
CR1176-1465 (E24)	G1168-1584c, 38.2, 19/19 (100%)	CR1176-1465, 119, 60/60 (100%)	CJE1465
CR1176-1466 (E25)		CR1176-1466, 119, 60/60 (100%)	CJE1466
CR1176-1467 (E26)		CR1176-1467, 119, 60/60 (100%)	CJE1467
CR1176-1468 (E27)		CR1176-1468, 119, 60/60 (100%)	CJE1468
CR1176-1469 (E28)		CR1176-1469, 119, 60/60 (100%)	CJE1469
CR1176-1470 (E29)		CR1176-1470, 119, 60/60 (100%)	CJE1470
CR1176-1471 (E30)		CR1176-1471, 119, 60/60 (100%)	CJE1471
CR1176-1472 (E31)		CR1176-1472, 119, 60/60 (100%)	CJE1472
CR1176-1473 (E32)		CR1176-1473, 119, 60/60 (100%)	CJE1473
CR1176-1474 (E33)		CR1176-1474, 119, 60/60 (100%)	CJE1474
CR1176-1475 (E34)	G1168-1285c, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1475, 119, 60/60 (100%)	CJ1285c;CJE1477;CJ81176_1302;CJB1213;CJ1168-1285c (4A10)
CR1176-1476 (E35)	G1168-1287c, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1476, 119, 60/60 (100%)	CJ1287c;CJE1479;CJ81176_1304;CJB1215;CJ1168-1287c (4C10)
CR1176-1477 (E36)	G1168-1284, 111, 59/60 (98%)	CR1176-1477, 119, 60/60 (100%)	pseC;CJ294;CJE1486;CJ81176_1311;CJB1222;c81176_110;CJ1168-1284 (4B11)
CR1176-1478 (E37)	G1168-1299, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1478, 119, 60/60 (100%)	mal-1;CJE1488
CR1176-1479 (E38)	G1168-1300, 99.6, 56/58 (96%)	CR1176-1479, 119, 60/60 (100%)	acpP;CJ1299;CJE1489;CJ1168-1299 (4G11)
CR1176-1480 (E39)	G1168-1304, 111, 59/60 (98%)	CR1176-1480, 119, 60/60 (100%)	CJE1490
CR1176-1481 (E40)	G1168-1306c, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1481, 119, 60/60 (100%)	acpP;CJ304;CJE1493;CJ81176_1320;CJB1230;c81176_118;CJ1168-1304 (4D12)
CR1176-1482 (E41)		CR1176-1482, 119, 60/60 (100%)	CJE1491
CR1176-1483 (E42)		CR1176-1483, 119, 60/60 (100%)	CJE1492
CR1176-1484 (E43)		CR1176-1484, 119, 60/60 (100%)	CJE1493
CR1176-1485 (E44)		CR1176-1485, 119, 60/60 (100%)	CJE1494
CR1176-1486 (E45)		CR1176-1486, 119, 60/60 (100%)	CJE1495
CR1176-1487 (E46)		CR1176-1487, 119, 60/60 (100%)	CJE1496
CR1176-1488 (E47)		CR1176-1488, 119, 60/60 (100%)	CJE1497
CR1176-1489 (E48)		CR1176-1489, 119, 60/60 (100%)	CJE1498
CR1176-1490 (E49)		CR1176-1490, 119, 60/60 (100%)	CJE1499
CR1176-1491 (E50)		CR1176-1491, 119, 60/60 (100%)	CJE1500
CR1176-1492 (E51)		CR1176-1492, 119, 60/60 (100%)	CJE1501
CR1176-1493 (E52)		CR1176-1493, 119, 60/60 (100%)	CJE1502
CR1176-1494 (E53)		CR1176-1494, 119, 60/60 (100%)	CJE1503
CR1176-1495 (E54)	G1168-1310c, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1495, 119, 60/60 (100%)	CJ1310c;CJE1504;CJ1168-1310c (4J1)
CR1176-1496 (E55)	G1168-1313, 111, 59/60 (98%)	CR1176-1496, 119, 60/60 (100%)	pseH;CJ313;CJE1508;CJ81176_1330;CJB1241;c81176_127;CJ1168-1313 (4M1)
CR1176-1497 (E56)	G1168-1317, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1497, 119, 60/60 (100%)	neB;CJE1512
CR1176-1498 (E57)	G1168-1330, 119, 60/60 (100%)	CR1176-1498, 119, 60/60 (100%)	CJ1330;CJE1519;CJ1168-1330 (4N3)

CSSH-02 (7D24)	Cj11168-1138, 40.1, 23/24 (95%)			961-D5
CSSH-03 (7E1)				961-E7
CSSH-04 (7E2)			Cj81176-0908, 109, 55/55 (100%)	629-E2
CSSH-05 (7E3)				629-D8
CSSH-06 (7E4)				670-B10
CSSH-07 (7E5)				1967-C2
CSSH-08 (7E6)				961-A4
CSSH-09 (7E7)				961-A6
CSSH-10 (7E8)		CjRM1221-0032, 113, 57/57 (100%)		1967-C5
CSSH-11 (7E9)	Cj11168-0764c, 40.1, 23/24 (95%)	CjRM1221-0855, 40.1, 23/24 (95%)	Cj81176-0712, 40.1, 23/24 (95%)	504-DB
CSSH-12 (7E10)				961-B5
CSSH-14 (7E12)			Cj81176-1469, 119, 60/60 (100%)	1967-H9
CSSH-15 (7E13)	Cj11168-1052c, 54, 27/27 (100%)	CjRM1221-1196, 54, 27/27 (100%)	Cj81176-1279, 65.9, 33/33 (100%)	1967-G6
CSSH-16 (7E14)	Cj11168-1395, 71.9, 54/60 (90%)	CjRM1221-1583, 119, 60/60 (100%)	Cj81176-1302, 119, 60/60 (100%)	629-E8
CSSH-17 (7E15)			Cj81176-0707, 119, 60/60 (100%)	1967-B4
CjX-01 (7E16)				cjX-1;CjX-01 (5J12)
CjX-02 (7E17)			Cj81176-1333, 95.6, 57/60 (95%)	cjX-2;CjX-02 (5K12)
CjX-03 (7E18)				cjX-3;CjX-03 (5L12)
CjX-04 (7E19)				cjX-4;CjX-04 (5M12)
CjX-05 (7E20)				cjX-5;CjX-05 (5N12)

Figura 64. Composición del *microarray*.

Medios de cultivo

Agar Sangre

Composición

Caldo nutritivo N° 2
Agar bacteriológico (Agar N° 1)
Sangre lacada de caballo (5 %)

Suspender 12,5 g de Caldo nutritivo N° 2 y 6 g de Agar bacteriológico en 475 ml de agua destilada y llevar a ebullición hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Atemperar a 50 °C y añadir asepticamente 25 ml de sangre de caballo lacada. Dispensar en placas de Petri estériles.

Fórmula Caldo nutritivo N° 2	(g/l de agua destilada)
Polvo "Lab Lemco"	10
Peptona	10
Cloruro de sodio	5

Tampón TE

Composición	(Concentración final)
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
	pH 8,0

Abreviaturas

µg: microgramos
µl: microlitros
µM: micromolar
µm: micrometro
Aa: aminoácido
ADN: ácido desoxirribonucleico
AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*
AP-PCR: *Arbitrary Primed PCR*
ARN: ácido ribonucleico
Asn: asparragina
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATP: adenosina-5'-trifosfato
BHI: *Brain Heart Infusion*
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BOX: *BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR*
BSA: *Bovine serum albumin*
CAP: biosíntesis de los polisacáridos capsulares
CAV: Comunidad Autónoma del País Vasco
CDT: *Citolethal Distending Toxin*
CGH: *Comparative Genome Hybridization*
cm: centímetros
CNET: *Campynet*
CPS: polisacáridos capsulares
CVI: Central Veterinary Institute Lelystad
Cy3dUTP: *indocarbocyanine*, 5-amino-propargil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato, Cy3 fluorescente
Cy5dUTP: *indocarbocyanine*, 5-amino-propargil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato, Cy5 fluorescente
dATP: desoxiadenosin trifosfato
dCTP: desoxicitosin trifosfato
dGTP: desoxiguanidin trifosfato
DMIB: Division of Molecular Infection Biology
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
dTTP: desoxitimidin trifosfato
DW: agua
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
ERIC: *enterobacterial repetitive intergenic consensus*
ESR: Institute of Environmental Science and Research
FOI: *Frequency Of Incorporation*
g: gramo
G+C: guanina + citosina
GBS: Síndrome de Guillain-Barre
HACCP: *Hazard Analysis Critical Control Points*
IS: *insertional sequences*, secuencia de inserción
Kb: kilobases
l: litro
ln: logaritmo neperiano
LOS: biosíntesis de lipooligosacáridos
LPS: lipopolisacárido
Mb: megabases
MCMC: Markov Chain Montecarlo

min: minutos
ml: mililitro
MLST: *Multilocus Sequence Typing*
mm: milímetros
mM: milimolar
MP: Máxima parsimonia
mRNA: RNA mensajero
MS: *mass spectrometry*, espectrometría de masas
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NCTC: *National Collection of Type Cultures*
ng: nanogramos
NJ: Neighbor joining
nm: nanómetros
°C: grados centígrados
ORF: *open reading frames*
pb: pares de bases
PBS: tampón salino fosfato
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
PFGE: *Pulse Field Gel Electroforesis*
pmol: picomoles
PMT: tubo fotomultiplicador
RAPD: *Random Amplified Polimorphic DNA*
RBS: zonas de unión a ribosomas
REP: *repetitive extragenic palindromic*
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA: ácido ribonucleico
rpm: revoluciones por minuto
rRNA: RNA ribosómico
SDS: *Sodium Dodecylsulphate*
Ser: serina
SIM: Sistema de Información Microbiológica
SIM: Sistema de Información Microbiológica del País Vasco
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
SVR: *Short Variable Region*
SVS: School of Veterinary Science
TBE: tampón Tris-Borato-EDTA
TE: tampón Tris-EDTA
Thr: treonina
T_m: *Melting Temperature*
U: unidades
UDP: uracil difosfato
UFC: unidades formadoras de colonias
UPV/EHU: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
UPV/EHU: Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea
USDA: Produce Safety and Microbiology Research Unit
UV: ultravioleta
V: voltios
Vh: voltios-hora
VNC: viable no cultivable
W: watios

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



Directores

Aurora Fernández Astorga

Rodrigo Alonso Monsalve

Andrea Guridi Cortaberria

Tesis Doctoral

Vitoria-Gasteiz, 2011