

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Variabilité antigénique et génétique d'isolats de *Mycoplasma hyopneumoniae***

par  
**Annie Boisvert**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en virologie et immunologie**

**Jury d'évaluation**

<b>Président du jury:</b>	<b>Charles Dozois, Ph.D.</b>
<b>Examinateur externe:</b>	<b>Serge Messier, DMV, Ph.D.</b>
<b>Directeur de recherche:</b>	<b>Serge Dea, DMV, Ph.D. (<i>in memoriam</i>)</b>
<b>Codirecteur de recherche:</b>	<b>François Shareck, Ph.D.</b>

## Dédicace

À ma famille et à Mathieu qui comptent tellement dans ma vie!

## Table des matières

Dédicace .....	i
Table des matières .....	ii
Liste des tableaux .....	iv
Liste des figures .....	v
Liste des abréviations .....	vi
Sommaire .....	viii
Introduction générale.....	1
Revue de littérature .....	4
1. Les mycoplasmes et leurs caractéristiques générales.....	5
1.1. Découverte .....	5
1.2 Taxonomie et phylogénie .....	6
1.2. Caractéristiques générales des mycoplasmes .....	9
1.2.1 Morphologie des colonies .....	10
1.3. Caractéristiques génétiques .....	13
1.4. Caractéristiques biochimiques.....	14
1.5. Pathogenèse.....	17
1.6. Évasion du système immunitaire.....	18
1.7. Interaction avec l'hôte .....	19
1.7.1. Activation du système immunitaire.....	19
1.7.2. Oncogénicité.....	20
2. Les mycoplasmes porcins.....	21
2.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	23
2.1.1. Caractéristiques de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	23
2.1.2. Caractéristiques de la pneumonie enzootique porcine .....	24
2.1.3. Pathogenèse et lésions .....	25
2.2. Diagnostic.....	29
2.2.1. Diagnostic immunohistochimique.....	29
2.2.2. Diagnostic sérologique.....	29
2.2.3. Diagnostic moléculaire.....	30

2.3. Traitements et prophylaxie .....	31
3. Les protéines immunodominantes chez <i>M. hyopneumoniae</i> .....	35
3.1. La protéine P36: une lactate déshydrogénase .....	35
3.2. La protéine P46: une protéine membranaire .....	36
3.3. La protéine P65: une lipoprotéine membranaire .....	38
3.4. La protéine P74 et autres chaperones .....	38
3.5. La protéine P97: une adhésine .....	39
Article .....	43
4. Article .....	44
4.1. Accusé de réception .....	44
4.2. Résumé de l'article en français .....	45
4.3. Contribution des auteurs .....	46
4.4. Article .....	48
Discussion générale .....	67
Remerciements .....	74
Annexes .....	76
Annexe I: Liste des présentations et des séances d'affiches .....	77
Annexe II: Résultats des séquençages des gènes p46 et p97 .....	79
Bibliographie .....	117

## Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie et caractéristiques des <i>Mollicutes</i> .....	8
Tableau 2 : Isolats et souches de <i>M. hyopneumoniae</i> utilisés lors du projet.....	65
Tableau 3: Résultats du séquençage du gène p97 des différents isolats et de la souche ATCC 25934 .....	66
Tableau 4 : Pourcentage d'homologie en nt du gène p97 et en aa de la protéine P97 pour les différentes souches utilisées de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	79
Tableau 5 : Mutations en acides aminés de la protéine P97 comparée au consensus .....	80
Tableau 6: Amorces utilisées lors de ce projet pour l'amplification et la séquençage de gènes de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	116

## Liste des figures

Figure 1: Photographie de deux colonies d'aspect «oeufs frits» caractérisant bien les colonies de la plupart des mycoplasmes. ....	11
Figure 2: Photographie montrant deux colonies de <i>M. hyopneumoniae</i> . Contrairement à la majorité des autres mycoplasmes, les colonies de cette espèce n'ont pas l'apparence «d'oeufs frits». ....	12
Figure 3: Changement de couleur du milieu observé lors de la croissance de mycoplasmes fermentant le glucose. Dans ce plateau, les trois premières rangées ont été inoculées avec une souche de <i>M. hyopneumoniae</i> tandis que la dernière rangée de puits ne contient que du milieu Friis. ....	16
Figure 4: Photographie de poumons sains d'un porc .....	27
Figure 5: Photographie de poumons d'un porc atteint de la pneumonie enzootique. Les lésions rougeâtres sont caractéristiques de la pneumonie enzootique.....	28
Figure 6: Immunobuvardage de type Western démontrant la réactivité des AcMo anti-P46 contre les différents isolats et la souche ATCC 25934 de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	62
Figure 7: Immunobuvardages de type Western démontrant les différents patrons de bandes obtenus lorsque les AcMo anti-P97-C-terminale et anti-P97-totale réagissent contre les différents isolats et la souche ATCC 25934 de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	63

## Liste des abréviations

<b>A</b>	adénine
<b>aa</b>	acide aminé
<b>AcMo</b>	anticorps monoclonaux
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>C</b>	cytosine
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbant assay
<b>G</b>	guanine
<b>GST</b>	glutathion sulfotransférase
<b>IIF</b>	immunofluorescence indirecte
<b>Ig</b>	immunoglobuline
<b>IL</b>	interleukine
<b>INF-γ</b>	interféron gamma
<b>kpb</b>	kilopaires de bases
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>MAb</b>	monoclonal antibody
<b>ml</b>	millilitre
<b>mM</b>	millimolaire
<b>μl</b>	microlitre
<b>nt</b>	nucléotide
<b>ORF</b>	open reading frame (cadre de lecture ouvert)
<b>pb</b>	paires de bases
<b>PBS</b>	phosphate buffered solution (tampon salin phosphaté)
<b>PCR</b>	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PPLO</b>	pleuropneumonia-like organism
<b>PPO</b>	pleuropneumonia organism
<b>rec</b>	recombinante
<b>SDS</b>	sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SPF	specific pathogen free
SRRP	syndrome reproducteur et respiratoire porcin
T	thymine
TBS	Tris buffered saline
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha

## Sommaire

*Mycoplasma hyopneumoniae* est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine. Cette maladie respiratoire chronique et très contagieuse est rarement mortelle mais retarde la croissance des animaux atteints. De plus, l'infection avec *M. hyopneumoniae* peut prédisposer à de graves infections secondaires. Cette pathologie engendre chaque année des pertes économiques considérables pour les producteurs de porcs. C'est pourquoi il serait souhaitable de contrôler la propagation de ce pathogène. Malheureusement, les vaccins existants n'induisent qu'une protection partielle contre l'infection. Différents problèmes sont aussi associés au diagnostic de cette bactérie, entre autres, la difficulté de l'isolement et les réactions antigéniques croisées entre les différentes espèces de mycoplasmes porcins.

L'utilisation de protéines immunodominantes et spécifiques à *M. hyopneumoniae*, notamment P36, P46, P65 et P97 pourra éventuellement remédier au problème de réactions croisées. De plus, les protéines P46 et P97 induisent une réponse humorale précoce. Notre laboratoire prévoit se servir de ces protéines recombinantes pour le développement de tests sérologiques et de vaccins sous-unitaires. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur leur variation entre les différentes souches de *M. hyopneumoniae*. Les objectifs du projet de maîtrise, présenté dans ce mémoire, étaient donc de vérifier les variations génétiques et antigéniques de ces deux protéines chez différents isolats nord-américains.

La première étape de ce projet était l'isolement de souches provenant d'échantillons de poumons de porcs infectés par *M. hyopneumoniae*. Les 11 isolats purs (exempts de *M. hyorhinis*) obtenus et la souche de référence ATCC25934 étaient analysés en parallèle selon deux volets, soit la variabilité antigénique des protéines P46 et P97 et la variabilité génétique des gènes p46 et p97. Dans le volet antigénique, la réactivité des différents isolats contre les anticorps monoclonaux anti-P46-recombinantes, anti-P97-c-terminale-rec et anti-P97-totale-rec était vérifiée. Les protéines recombinantes ainsi que les AcMo ont été produits dans le cadre d'un projet antérieur du laboratoire. Ces AcMo

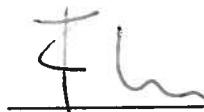
ont été sélectionnés pour leur spécificité contre les protéines recombinantes et les protéines natives de *M. hyopneumoniae*. Pour le volet génétique, les gènes p46 et p97 des isolats étaient amplifiés par PCR, les produits obtenus étaient séquencés. Finalement, les séquences des gènes de ces 11 isolats étaient comparées à celles de la souche de référence ATCC 25934.

Les résultats des deux volets démontrent que la P46 est une protéine très conservée entre les différentes souches de *M. hyopneumoniae*. En effet, on n'observe aucune différence de réactivité avec les 6 AcMo anti-p46 puisque tous les isolats donnent un profil à une seule bande correspondant à la P46 en immunobuvardage de type Western. Quant au séquençage, il indique qu'un seul acide aminé est muté pour toute la P46 chez 9 des 11 isolats. Les résultats des deux volets, concernant l'adhésine, se complètent et corroborent ceux obtenus par d'autres équipes (Zhang *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1997; Wilton *et al.*, 1998). Ainsi, les différences de taille de l'adhésine, observées en immunobuvardage, peuvent être expliquées par les résultats des séquençages qui démontrent que l'adhésine des divers isolats possèdent un nombre différent de séquences répétées RR1 et RR2 dans sa portion C-terminale. Cette partie de la P97 est donc très variable mais le reste de cette protéine semble bien conservé entre les différents isolats.

D'après notre étude, la P46 est une protéine très conservée entre les différentes souches de *M. hyopneumoniae*, ce qui suggère qu'elle aurait possiblement une fonction importante pour ce microorganisme. De plus, la conservation de la P46 apporte un argument supplémentaire à son utilisation comme outil diagnostique. Les résultats obtenus pour la P97 ont permis à tout le moins de constater que les variations étaient similaires à celles observées dans d'autres études.



Étudiante: Annie Boisvert



Codirecteur: François Shareck

## **Introduction générale**

Les mycoplasmes sont des bactéries très particulières. En effet, l'absence de parois et leur très petit génome les distinguent des autres microorganismes. Parce qu'ils ont des besoins nutritifs très élaborés, la plupart d'entre eux sont des parasites. Pour se sustenter, ils doivent donc vivre au crochet de leur hôte spécifique. Les différentes espèces de mycoplasmes sont néanmoins retrouvées chez une grande variété d'hôtes, tels que les plantes, les insectes et les animaux, incluant l'humain.

Quelques mycoplasmes infectent le porc, dont *M. hyopneumoniae* qui est l'agent causal de la pneumonie enzootique. Cette maladie respiratoire, qui peut affecter les porcs de tous âges, est chronique et très contagieuse (Goodwin *et al.*, 1965; Maré et Switzer, 1965). De plus, cette enzootie est répandue mondialement et entraîne annuellement des coûts énormes pour tous les producteurs. Les principaux symptômes notés lors de l'infection avec ce pathogène sont une toux sèche et un important retard de croissance même si les animaux conservent généralement leur appétit. Ainsi, le taux de morbidité est élevé mais la mortalité est généralement faible lors de cette infection. Par contre, ce mycoplasme prédispose à des surinfections dont les effets sur les troupeaux sont souvent plus sévères.

Le contrôle de cet agent est souvent entravé car les vaccins existants n'offrent qu'une protection partielle et le diagnostic de ce pathogène fait face à plusieurs problèmes. En effet, la croissance de *M. hyopneumoniae* est généralement très fastidieuse et les cultures sont souvent contaminées par d'autres bactéries. De plus, les tests sérologiques et immunohistochimiques présentement utilisés sont souvent biaisés par les réactions croisées qui peuvent survenir entre les différents mycoplasmes porcins puisque ceux-ci possèdent des déterminants antigéniques communs. Quant aux techniques utilisant le PCR, elles sont généralement sensibles et spécifiques lorsque des lavages trachéobronchiaux ou des échantillons de poumons sont utilisés mais cela nécessite alors le sacrifice de l'animal.

Le programme de recherche de notre laboratoire vise donc à développer de nouveaux tests diagnostiques sensibles et plus spécifiques à *M. hyopneumoniae* ainsi que des vaccins stimulant une immunité efficace contre ce pathogène. Des protéines immunodominantes et spécifiques à *M. hyopneumoniae* ont été identifiées et leur utilisation comme outil diagnostique a été suggérée. Parmi ces protéines, la P46 et la P97 sont celles qui induisent des réponses humorales les plus hâtives. Elles sont donc des protéines très intéressantes pour l'élaboration de tests sérologiques. Toutefois, peu d'études ont été réalisées pour vérifier leur variation entre les différentes souches de *M. hyopneumoniae*.

Dans le cadre du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire, les objectifs spécifiques étaient donc d'analyser les différences antigéniques et génomiques chez 11 isolats Nord-Américains de *M. hyopneumoniae*.

Cet ouvrage débute par une revue bibliographique sur les mycoplasmes en général ainsi que sur l'agent de la pneumonie enzootique, *Mycoplasma hyopneumoniae*. Les résultats et les conclusions obtenus sont ensuite exposés dans l'article: Antigenic and genomic variability of 11 North American strains/isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* in their P46 and P97 open reading frame regions. Puis, une brève discussion générale du projet est fournie. Finalement, les résultats des séquençages, c'est-à-dire les séquences des gènes p46 et p97 ainsi que les séquences déduites en acides aminés des protéines P46 et P97 de tous les 11 isolats et de la souche de référence, sont retrouvés en annexe.

## **Revue de littérature**

## 1. Les mycoplasmes et leurs caractéristiques générales

Les mycoplasmes sont des bactéries ayant pour très lointains ancêtres des microorganismes à Gram positif (Maniloff, 1996; Herrmann *et al.*, 1999). Lors de leur évolution, de considérables changements se sont produits, notamment une importante réduction de leur bagage génétique. En effet, parmi les microorganismes pouvant s'autorépliquer, les mycoplasmes sont ceux qui possèdent le plus petit génome (Maniloff, 1996). Puisqu'ils détiennent un nombre minimal de gènes, leur capacité de synthèses biochimiques s'en trouve restreinte. Ils ont toutefois développé un mode de vie parasitaire leur permettant de combler tous leurs besoins vitaux. De plus, ils ont su s'adapter à une panoplie de niches écologiques. On les retrouve notamment chez les plantes, les insectes, les animaux et les êtres humains (Razin et Jacobs, 1992). Les principales caractéristiques de ces bactéries fascinantes seront abordées dans les sections qui suivent.

### 1.1. Découverte

Lors d'études portant sur la péripleuropneumonie bovine, Nocard et Roux en 1898 ont été les premiers à isoler les mycoplasmes (Nocard et Roux, 1898). Les scientifiques de l'époque étaient confondus puisque l'agent infectieux était filtrable mais aussi capable de croître en absence de cellule. Cela semblait contradictoire puisque habituellement seul les virus sont assez petits pour être filtrés mais ont besoin des cellules pour se répliquer. Tandis que les bactéries, étant plus grosses, sont retenues par les filtres mais peuvent par contre croître par elles-mêmes dans des milieux synthétiques. Les chercheurs ne pouvant trancher sur la classification de cet agent, ils l'ont alors nommé «Pleuropneumonia Organism» (Chastel, 1995). Par la suite, d'autres microorganismes ayant des propriétés similaires ont été découverts. Ils ont été regroupés dans la classe des «Pleuro-pneumonia-like-organisms» ou PPLO. Ce n'est que plusieurs années plus tard que des chercheurs ont finalement prouvé que les PPLO sont des bactéries particulières n'ayant pas de paroi de peptidoglycans. À cause de leur singularité, on leur a donc assigné une classe distincte, celle des *Mollicutes*. Ce nom latin fait justement référence à l'absence de paroi rigide de ces microorganismes (*mollis* signifiant mou et *cutis*, peau) (Razin et Freundt, 1984).

## 1.2 Taxonomie et phylogénie

Depuis la découverte des *Mollicutes*, leur nombre est toujours grandissant. Par contre, la classe a dû être subdivisée en différents ordres puisque les membres manifestaient des caractéristiques parfois très différentes. Ainsi, plus de 190 espèces de *Mollicutes* sont maintenant répertoriées et divisées en quatre ordres, soit les *Mycoplasmatales*, les *Entomoplasmatales*, les *Acholeplasmatales* et les *Anaeroplasmatales* (Rottem, 2003). Ces ordres sont elles-mêmes fractionnées en familles et en genres comme il est présenté dans le tableau 1 (Tully *et al.*, 1993; Tully et Whitcomb, 1995). Récemment, une catégorie supplémentaire a été ajoutée, soit les *Candidatus*. Ce statut provisoire, en attendant leur classification définitive, est attribué aux espèces dont la caractérisation est incomplète. Parmi les postulants, il y a le genre *Phytoplasma* dont les organismes sont des pathogènes pour les plantes. L'impossibilité de les cultiver *in vitro* complique grandement leur étude et donc l'établissement de leurs propriétés (Razin, 1995a; Herrmann *et al.*, 1999).

Leur classification a d'abord été basée principalement sur les caractéristiques phénotypiques des différentes espèces. Ainsi, les bactéries doivent répondre à certains critères pour appartenir aux *Mollicutes*, le tout premier étant évidemment l'absence de parois. Il faut cependant être vigilant sur ce point car certaines bactéries peuvent perdre leur paroi lorsqu'elles sont exposées à des antibiotiques ou à d'autres substances inhibant la synthèse des peptidoglycans. Contrairement aux réels *Mollicutes*, ces protoplastes ou formes-L retrouvent toutefois leur paroi lorsqu'ils sont cultivés dans un milieu sans ces substances (Tully et Whitcomb, 1995). Un deuxième critère de sélection est que leur taille doit être suffisamment petite pour permettre leur filtration sur des membranes dont les pores sont de diamètre égal ou inférieur à 450 nm. D'autres propriétés permettront aussi d'assigner à un ordre, une famille et finalement un genre particulier aux différentes espèces. Parmi ces particularités, on retrouve: leur sensibilité à l'oxygène (anaérobiose stricte ou facultative), leur morphologie (forme ovoïde ou hélicoïdale), leur besoin en stérols, leur température optimale de croissance, et leur capacité d'hydrolyser l'urée

(Tully et Whitcomb, 1995; Tully, 1996). Maintenant, en plus des caractéristiques mentionnées ci-haut, l'analyse de la séquence du gène codant pour la sous-unité 16 S de l'ARN ribosomial permet d'affirmer avec certitude qu'un microorganisme fait réellement partie des *Mollicutes* (Razin, 1995b). L'analyse de ce gène s'est avérée non seulement un outil précieux pour la taxonomie mais aussi pour les études phylogéniques (Weisburg *et al.*, 1989; Maniloff, 1992; Weisburg, 1995). Quoique les autres genres soient aussi important, il ne sera discuté dans les sections suivantes que des *Mycoplasma*.

Tableau 1: Taxonomie et caractéristiques des *Mollicutes*

Classification	Nombre d'espèces <sup>a</sup>	Taille du génome (kpb)	% de G+C de l'ADN	Besoin en stérol	Habitat <sup>b</sup>	Particularités
<b>Ordre I : <i>Mycoplasmatales</i></b>						
Famille I : <i>Mycoplastaceae</i>						
Genre I : <i>Mycoplasma</i>	112	580-1350	23-40	+	H, A, I et P	
Genre II : <i>Ureaplasma</i>	7	760-1170	27-30	+	H et A	Uréase positive
<b>Ordre II : <i>Entomoplasmatales</i></b>						
Famille I : <i>Entomoplasmataceae</i>						
Genre I : <i>Entomoplasma</i>	6	790-1140	27-29	+	I et P	
Genre II : <i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	27-30	-	I et P	
Famille II : <i>Spiroplasmataceae</i>						
Genre I : <i>Spiroplasma</i>	45	940-2240	25-30	+	I et P	forme hélicoïdale, motile
<b>Ordre III : <i>Acholeplasmatales</i></b>						
Famille : <i>Acholeplasmataceae</i>						
Genre I : <i>Acholeplasma</i>	14	1500-1650	26-36	-	A, I et P	
<b>Ordre IV : <i>Anaeroplasmatales</i></b>						
Famille I : <i>Anaeroplasmataceae</i>						
Genre I : <i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	29-34	+	R	Anaérobies obligatoires
Genre II : <i>Asteroplasma</i>	1	1500	40	-	R	Anaérobies obligatoires
<i>Candidatus<sup>c</sup></i>						
Genre : <i>Mycoplasma</i>	5	580-1350	23-40	N.D.	A	non cultivés
Genre : <i>Phytoplasma</i>	8	600-1200	22-28	N.D.	P	non cultivés

Basé sur: (Tully et Whitcomb, 1995; Herrmann *et al.*, 1999).

a : Le nombre d'espèces a été trouvé dans la liste, mise à jour le 6 juin 2003, du site de «International Committee on Systematic of Prokaryotes»: <http://www.the-icsp.org/taxa/mollicuteslist.htm>.

b : H= humains, A= animaux, I= insectes, P= plantes, R= rumen des ovins et bovins

c : La catégorie, *Candidatus*, est un statut provisoire donné aux bactéries dont la caractérisation incomplète ne permet pas la classification définitive.

## 1.2. Caractéristiques générales des mycoplasmes

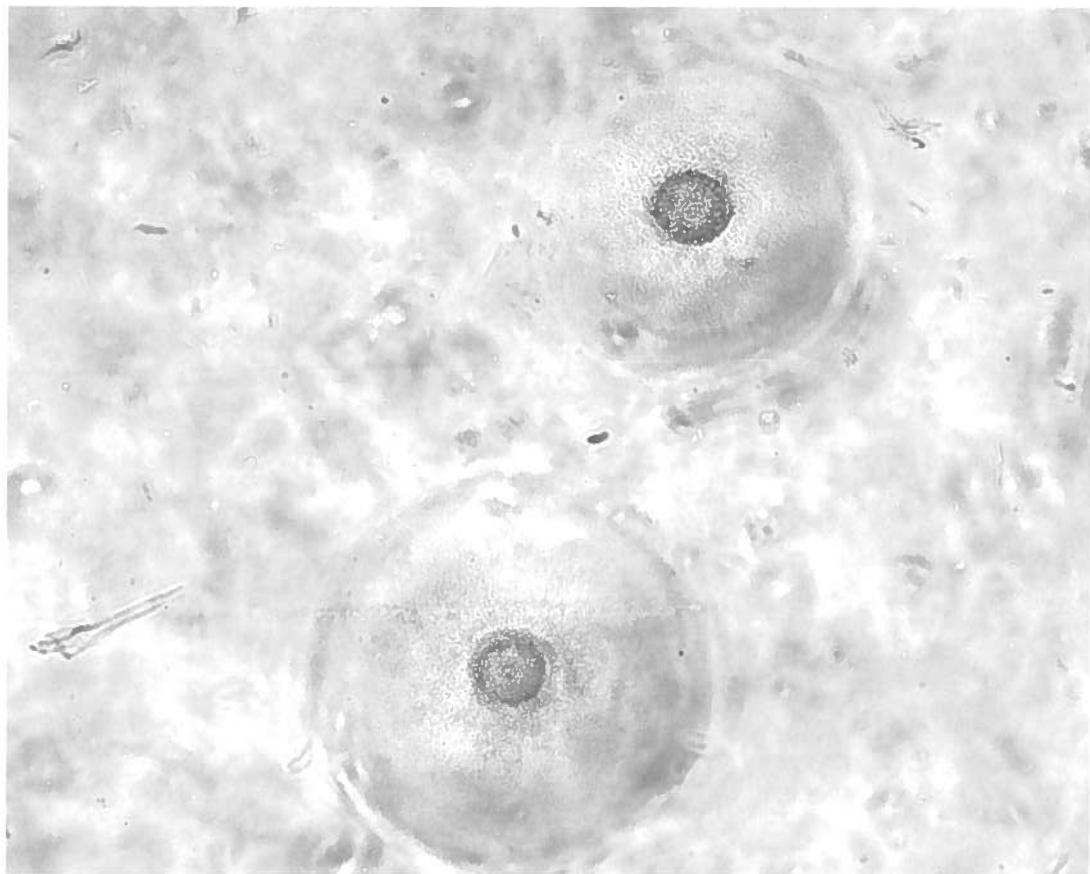
Les mycoplasmes sont de très petites cellules procaryotiques dont le diamètre varie entre 125 et 250 nm (Razin et Jacobs, 1992). Ces microorganismes sont constitués de ribosomes, de protéines, d'ARN et d'un chromosome double brin circulaire (Dybvig, 1990). Comme pour tous les autres mollicutes, les mycoplasmes ne possèdent pas de paroi rigide et ne sont donc bordés que d'une simple membrane plasmique. Celle-ci est composée de phospholipides, de stérols, de glycolipides, de protéines et plus particulièrement d'un nombre élevé de lipoprotéines (Dybvig et Voelker, 1996). Cette absence de paroi offre une grande plasticité; les mycoplasmes peuvent donc adopter différentes formes. Ainsi, la majorité des cellules sont généralement rondes ou ovoïdes mais des formes filamenteuses transitoires peuvent aussi être observées. Ces conformations sont présentes lorsque la réPLICATION semi-conservative n'est pas synchronisée avec la division cytoplasmique durant la reproduction par fission binaire (Razin et Freundt, 1984). Toutefois, ces filaments se changeront éventuellement en chaînes de coques qui se rediviseront ensuite en simples unités sphériques (Razin et Freundt, 1984). De plus, l'absence de paroi explique pourquoi ces micro-organismes sont naturellement résistants aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactames, ainsi que leur sensibilité aux chocs osmotiques et à la lyse par des détergents ou des alcools (Razin et Freundt, 1984).

Les espèces du genre *Mycoplasma* sont généralement des bactéries anaérobies facultatives mais qui poussent bien en conditions aérobiques en présence de 5 à 10 % de CO<sub>2</sub> (Razin, 1984). Leur température optimale varie selon les espèces mais les mycoplasmes infectant les animaux croissent généralement entre 36 et 37°C (Razin et Freundt, 1984). Ils sont non-mobiles à l'exception de certaines espèces qui possèdent un organite «tip», une structure allongée à l'un des pôles de la cellule, permettant un mouvement de glissement sur les milieux solides (Dybvig et Voelker, 1996). Cet organite serait aussi impliqué dans l'adhérence aux cellules hôtes (Razin et Freundt, 1984). C'est principalement l'incapacité des mycoplasmes à hydrolyser l'urée qui permet de les

distinguer des *Ureaplasma* formant l'autre genre de la famille des *Mycoplastaceae* (Razin et Freundt, 1984).

### **I.2.1 Morphologie des colonies**

Les colonies de mycoplasmes sont aussi très petites, leur diamètre variant entre 50 à 500 µm. De plus, elles ont une forme caractéristique d'«œufs frits» (figure 1). C'est-à-dire que les bactéries ayant tendance à pénétrer la gélose, le centre de la colonie apparaît donc plus foncé que la périphérie où les organismes sont plus en surface (Razin et Freundt, 1984). Toutefois, certaines espèces ne formeront jamais de centre foncé, notamment *M. hyopneumoniae* (figure 2) (Razin, 1983; Razin et Freundt, 1984).



**Figure 1: Photographie de deux colonies d'aspect «oeufs frits» caractérisant bien les colonies de la plupart des mycoplasmes.**



**Figure 2:** Photographie montrant deux colonies de *M. hyopneumoniae*. Contrairement à la majorité des autres mycoplasmes, les colonies de cette espèce n'ont pas l'apparence «d'oeufs frits».

### 1.3. Caractéristiques génétiques

Les mycoplasmes possèdent un génome de taille variant entre 0,58 Mpb et 2,20 Mpb. Cela est très petit comparativement aux autres eubactéries, par exemple *E. coli* dont la taille du génome est de 4,64 Mpb (Herrmann *et al.*, 1999; Rottem, 2003). Comme mentionné précédemment, c'est lors de leur évolution que les mycoplasmes ont subi une réduction de la taille de leur bagage génétique, leur conférant ainsi des caractéristiques tout à fait différentes de leurs prédecesseurs (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989; Herrmann *et al.*, 1999). Le plus petit génome cellulaire recensé à ce jour est celui de *Mycoplasma genitalium* qui contient seulement 580 070 pb (Fraser *et al.*, 1995). Quelques 470 régions codantes ont pu être identifiées. Il a été suggéré que ce nombre de gènes se rapproche probablement du minimum nécessaire permettant la vie cellulaire (Dybvig, 1990; Maniloff, 1996).

Outre la modicité des génomes, ceux-ci sont aussi caractérisés par leur richesse en adénine (A) et thymine (T) (Razin et Jacobs, 1992). En fait, leur ADN ne comprend qu'entre 23 et 41 % de guanine (G) et de cytosine (C) tandis que chez les autres procaryotes les pourcentages couvrent un plus vaste éventail allant de 25 % jusqu'à 75% de G et de C (Razin, 1995a). Cette prédominance en A et T des génomes de mycoplasmes a possiblement créé une pression évolutive menant à une utilisation plus fréquente de ces bases, ce qui peut expliquer leur divergence au code génétique universel (Yamao *et al.*, 1985). Ainsi, le codon TGA, représentant généralement un arrêt de traduction chez la majorité des organismes, code pour le tryptophane chez les mycoplasmes (Yamao *et al.*, 1985; Bove, 1993). Les TGG codent aussi pour cet acide aminé mais chez ces bactéries, l'utilisation du TGA est dix fois plus fréquente (Dybvig et Voelker, 1996). De plus, chez l'espèce *Mycoplasma capricolum*, le codon CGG représente une terminaison de la traduction plutôt que de coder pour une arginine (Andachi *et al.*, 1989). Ainsi, la mutagenèse dirigée des codons singuliers, par exemples les TGA en TGG des gènes, est une étape essentielle pour permettre l'expression de protéines recombinantes de mycoplasmes dans un système bactérien hétérologue tel que *E. coli* (Futo *et al.*, 1995b).

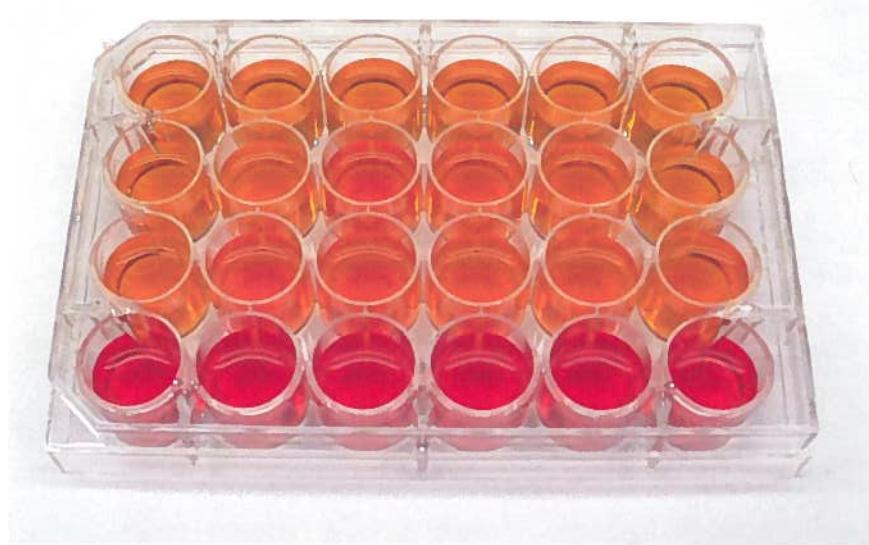
#### 1.4. Caractéristiques biochimiques

La perte d'une partie du génome a inévitablement entraîné une limitation de la capacité de biosynthèse des mycoplasmes. Cela est dû à l'absence de certaines enzymes ainsi qu'aux voies métaboliques tronquées, notamment celles menant généralement à la synthèse de la paroi de peptidoglycans. Ces microorganismes dépendent donc de leurs cellules hôtes pour leur fournir les différents nutriments essentiels à leur croissance, tels les purines, les pyrimidines et les stérols (Ruuth et Praz, 1989). Puisque leur mode de vie repose sur une relation intime avec leurs cellules hôtes, les mycoplasmes ont développé des mécanismes d'adhésion et des systèmes de transport pour permettre l'entrée des nutriments (Ruuth et Praz, 1989; Bove, 1993; Chastel, 1995). Leur culture *in vitro* est possible mais souvent fastidieuse et requiert des milieux hautement enrichis pour compléter leurs nombreux besoins nutritifs.

Les mycoplasmes tirent leur source d'énergie soit en fermentant le glucose ou de la dégradation de l'arginine (Razin et Freundt, 1984). Pour les souches qui utilisent le glucose, le sous produit majoritaire sera l'acide lactique ce qui entraînera une acidification du milieu de culture (Razin, 1984). L'ajout d'un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, facilite donc la visualisation de la croissance bactérienne qui ne produit habituellement qu'une très faible turbidité du milieu (figure 3) (Razin et Freundt, 1984).

Paradoxalement, ces microorganismes, qui sont si fastidieux à croître dans des milieux synthétiques, sont souvent des contaminants de lignées cellulaires. Parmi, les espèces les plus isolées, on retrouve: *M. arginini*, *M. hyorhinis*, *Acholeplasma laidlawii* et *M. orale*. Les trois premières proviennent de produits biologiques contaminés, tandis que la dernière est de source humaine et transmise par aérosol lors des manipulations des cultures de cellules (Ruuth et Praz, 1989; Chastel, 1995). De telles contaminations mènent à certains changements des fonctions cellulaires ce qui peut entraîner l'obtention de résultats expérimentaux biaisés (Ruuth et Praz, 1989). Par contre, des effets cytopathiques ne sont pas toujours présents, ce qui complique grandement la détection d'une éventuelle contamination par ces microorganismes. Toutefois, les mycoplasmes

peuvent être détectés dans les cultures cellulaires via différentes techniques, notamment par certaines colorations de l'ADN ou encore par des PCR amplifiant les gènes de l'ARNr 16S (Masover et Becker, 1996; Veilleux *et al.*, 1996).



**Figure 3:** Changement de couleur du milieu observé lors de la croissance de mycoplasmes fermentant le glucose. Dans ce plateau, les trois premières rangées ont été inoculées avec une souche de *M. hyopneumoniae* tandis que la dernière rangée de puits ne contient que du milieu Friis.

### 1.5. Pathogenèse

Une des principales caractéristiques des infections des mycoplasmes est leur spécificité d'hôte. En effet, même si les différents mycoplasmes infectent des multitudes d'hôtes différents, une espèce particulière aura un tropisme restreint à un seul hôte voire même un type cellulaire particulier (Rosengarten *et al.*, 2000). Il existe néanmoins certaines exceptions à cette règle, par exemple, *M. arginini* et *M. canis* peuvent infecter un large spectre d'animaux (Tully, 1996). De plus, d'autres études semblent suggérer que la barrière inter-espèces puisse être franchie plus souvent que ne le laissaient croire les travaux antérieurs (Tully, 1996).

Le mécanisme de pathogenèse est encore très peu connu. Par contre, l'étape initiatrice de l'infection serait l'adhérence des bactéries à la surface de leur cellule hôte. En effet, des études ont démontré que des mutants ayant perdu leur capacité d'adhérer sont habituellement non infectieux (Baseman et Tully, 1997). Ainsi, ce processus requiert que les adhésines, aidées par d'autres protéines accessoires, se lient aux récepteurs qui sont des sialoglycoconjugués et des glycolipides sulfatés situés à la surface de leur cellule hôte (Razin et Jacobs, 1992; Baseman et Tully, 1997). Habituellement, ces protéines sont éparses sur toute la membrane du mycoplasme. Par contre, chez les espèces telles que, *M. pneumoniae* et *M. genitalium*, ces protéines sont principalement concentrées à l'organite «tip» (Dybvig et Voelker, 1996). Ainsi, l'adhérence permet aux mycoplasmes d'être à proximité de leur source de nutriments offerts par leur cellule hôte. En contre partie, cette liaison sera l'élément initiateur qui permettra le déclenchement des différents mécanismes impliqués dans la pathogenèse.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les dommages cellulaires observés (Baseman et Tully, 1997; Rottem, 2003). Comme il a été mentionné plus tôt, les mycoplasmes ayant une capacité limitée pour la biosynthèse de nutriments, ils doivent vivre au crochet de cellules hôtes. Si cette compétition pour les précurseurs mène à une déplétion d'éléments essentiels, cela peut entraîner une altération de l'intégrité de la

cellule ainsi que de ses fonctions. De plus, les déchets métaboliques du parasite (peroxyde d'hydrogène, radicaux superoxydes) peuvent causer des dommages oxydatifs à la membrane plasmique de la cellule. Les mycoplasmes sécrètent aussi des enzymes, telles que des phospholipases, ATPases, protéases et nucléases, dans l'environnement immédiat de la cellule, ce qui entraîne inévitablement des bris cellulaires. Finalement, des réactions immunitaires non-spécifiques pourraient aussi induire des dommages cellulaires observés (Kahane, 1995; Baseman et Tully, 1997; Rosengarten *et al.*, 2000). En plus des différents mécanismes qui sont impliqués lors des dommages cellulaires, les mycoplasmes ont aussi développé d'autres moyens leur permettant d'échapper à la vigilance du système immunitaire de l'hôte.

### 1.6. Évasion du système immunitaire

La majorité des infections avec mycoplasmes sont chroniques, suggérant que ces microorganismes ont la capacité d'échapper aux assauts du système immunitaire de l'hôte. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène.

L'un des principaux mécanismes repose sur la propriété des mycoplasmes à engendrer des taux élevés de variation de leurs protéines de surface, plus particulièrement de leurs lipoprotéines (Razin, 1995a; Dybvig et Voelker, 1996; Rottem, 2003). Deux types de variations existent, la variation de phase qui correspond à l'arrêt complet de l'expression de la protéine ou encore la variation de la taille des protéines comportant des régions répétées (Rosengarten et Wise, 1990; Yogeve *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1993; Wise, 1993). L'effet global obtenu est donc de changer les déterminants de surface pour éviter d'être reconnu comme un envahisseur. Les mécanismes sous-jacents permettant ces modifications sont nombreux et peuvent différer selon l'espèce mais ils découlent généralement du réarrangement de l'ADN soit par la recombinaison homologue entre de multiples copies d'un gène, le changement de cadre de lecture ou encore par l'insertion ou la délétion de répétitions dans le gène (Rosengarten *et al.*, 2000). Ainsi, cela permet à ces organismes ayant un tout petit génome de maximiser leur diversité génétique (Baseman et Tully, 1997).

Il a aussi été suggéré que le mimétisme de certains épitopes antigéniques des mycoplasmes et ceux des cellules hôtes puisse être un autre moyen utilisé par ces parasites pour leur permettre d'éviter d'être détruits par les sentinelles de l'hôte (Rottem, 2003). Cette ressemblance a été rapportée pour aussi causer l'activation de cellules T auto-réactives et la production d'auto-anticorps provoquant ainsi des réactions auto-immunes chez l'hôte (Baseman et Tully, 1997; Rottem, 2003).

Récemment, la capacité de certaines espèces de mycoplasmes, dont *M. penetrans*, à s'introduire dans les cellules hôtes non-phagocytaires a été démontrée (Lo *et al.*, 1993; Rottem, 2003). Cela a donc remis en perspective le concept voulant que les mycoplasmes soient strictement des parasites extracellulaires. Cette localisation intracellulaire serait donc un autre moyen efficace pour résister au système immunitaire et à l'effet de plusieurs antibiotiques (Rosengarten *et al.*, 2000).

## 1.7. Interaction avec l'hôte

### 1.7.1. Activation du système immunitaire

Les mycoplasmes semblent, dans une certaine mesure, être capables de circonvenir à leur élimination par divers mécanismes et ainsi provoquer des maladies chroniques. Néanmoins, le système immunitaire de l'hôte tente de limiter l'invasion par ces microorganismes. Ainsi les macrophages et les neutrophiles représentent la première ligne de défense naturelle contre les différentes bactéries. La phagocytose est toutefois plus efficace à la suite de l'opsonisation de ces parasites par les molécules du complément ou par les anticorps (Marshall *et al.*, 1995). L'ingestion des mycoplasmes induit ensuite les phagocytes à sécréter des cytokines pro-inflammatoires tels le TNF- $\alpha$  et des interleukines telles IL-1, IL-6, IL-8 et IL-12 (Gallily *et al.*, 1995; Razin, 1995a; Rottem, 2003). Suite aux stimuli inflammatoires, un grand nombre de monocytes, qui patrouillent l'hôte, sont recrutés aux sites d'infection (Janeway et Travers, 1997).

Plus tard, la réponse immune adaptative s'ajoute à l'action des phagocytes dans la lutte contre ce pathogène. Ainsi, la présentation d'antigènes spécifiques aux lymphocytes B et T non-activés induit alors leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices (Ruuth et Praz, 1989; Naot, 1995; Razin, 1995a). Notamment, les plasmocytes produiront et sécrèteront alors des anticorps de type IgG et IgA qui permettront l'opsonisation des mycoplasmes, ce qui facilitera l'élimination de ces pathogènes par les phagocytes (Messier *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1995). Les cellules Natural Killer sont aussi impliquées dans la destruction des mycoplasmes, soit de façon directe ou encore via la sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui active les macrophages qui peuvent alors engouffrer les mycoplasmes non-opsonisés (Lai et Bennett, 1995).

Les mycoplasmes peuvent avoir une activité mitogénique non-spécifique sur les lymphocytes B et T (Ruuth et Praz, 1989; Messier *et al.*, 1990; Messier et Ross, 1991). De telles stimulations des cellules immunitaires causent le développement de lésions au site d'infection et contribuent donc à la pathogenèse de ces bactéries (Messier et Ross, 1991; Baseman et Tully, 1997; Rosengarten *et al.*, 2000).

### 1.7.2. Oncogénicité

L'interaction sur de longues périodes entre les cellules hôtes et les mycoplasmes mènerait à l'instabilité chromosomique (Tsai *et al.*, 1995; Rottem, 2003). L'oncogénie des mycoplasmes humains serait un processus à plusieurs étapes passant par une phase réversible mais conduisant éventuellement à la transformation irréversible (Tsai *et al.*, 1995).

## 2. Les mycoplasmes porcins

Nous avons vu que les différents mycoplasmes ont réussi à trouver des niches écologiques dans un très vaste spectre d'hôtes. Ainsi, le porc n'étant pas épargné, quelques mycoplasmes ont trouvé refuge chez cet animal. Parmi les mycoplasmes ayant été isolés chez le porc, certains sont des pathogènes tels que *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*, *M. hyopneumoniae*. Par contre, on retrouve aussi d'autres espèces, qui jusqu'à présent, n'ont pas été associées à aucune maladie comme, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis*, *M. sualvi*. De plus, quelques acholeplasmes, faisant partie d'une autre famille des mollicutes, sont connus pour infecter une grande panoplie d'hôtes et peuvent parfois être présents chez le porc (Ross, 1992). Parmi tous ces différents micro-organismes mentionnés ci-haut, ce sont néanmoins *M. flocculare*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* ainsi que *M. hyopneumoniae* qui sont le plus couramment retracés chez cet animal. De plus, ils ont un tropisme très spécifique pour ce dernier. Une brève description de ces espèces sera donc faite dans cette section.

*M. hyosynoviae* possède un tropisme pour les membranes synoviales des articulations mais peut aussi être isolé des voies respiratoires et dans les amygdales qui servent de réservoir pour ce microorganisme (Kobisch et Friis, 1996). C'est cependant au niveau des articulations que les pathologies surviennent car cette bactérie cause la polyarthrite sérofibrinuse. La transmission se fait habituellement de la truie aux porcelets âgés de quatre à six semaines. Les signes cliniques n'apparaissent généralement que lorsque les animaux ont atteint des poids variant entre 30 et 100 kg. Le taux de morbidité est élevé, il se situe entre 10 et 50%. Par contre, le taux de mortalité est très bas (Ross, 1992). Le principal symptôme observable est que les animaux affectés éprouvent de la difficulté à se mouvoir ou même à se lever dû aux lésions des articulations. Lors d'examens macroscopiques, on note la présence de liquide visqueux sérofibrineux et sérohémorragique au niveau des articulations. La phase aiguë de la maladie dure entre 3 et 10 jours. Après quoi les signes cliniques régressent et la majorité des animaux récupèrent sans avoir de séquelles apparentes. Toutefois, certains animaux vont plutôt

souffrir de façon chronique (Ross, 1992). Certains antibiotiques sont utilisés comme moyen prophylactique mais peuvent aussi être administrés aux animaux déjà atteints pour réduire les symptômes (Kobisch et Ross, 1996). Aucun vaccin n'est présentement disponible sur le marché (Ross, 1992; Kobisch et Ross, 1996).

Les trois autres mycoplasmes porcins, soit *M. flocculare*, *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* sont des espèces ayant de grandes similarités, tout particulièrement entre *M. flocculare* et *M. hyopneumoniae*, ce qui a été démontré lors d'études phylogéniques (Stemke *et al.*, 1992; Stemke *et al.*, 1994a). Cela explique pourquoi ces espèces possèdent des déterminants antigéniques communs provoquant des réactions croisées observées lors de tests immunologiques (Freeman *et al.*, 1984; Armstrong *et al.*, 1987). Même si au niveau moléculaire une certaine homologie est retrouvée, les conséquences d'une infection avec ces espèces sont quant à elles bien différentes. En effet, comme il a été mentionné un peu plus tôt, *M. flocculare* est considéré comme un organisme commensal des voies respiratoires tandis que les deux autres espèces sont des pathogènes entraînant toutefois des maladies très distinctes.

*M. flocculare* possède un tropisme tissulaire restreint généralement aux voies respiratoires et aux poumons quoique les conjonctives aient aussi été démontrées comme étant un lieu possible de colonisation pour cet organisme (Kobisch et Friis, 1996). Ces bactéries sont considérées jusqu'à présent comme non-pathogéniques, puisque même si elles sont parfois isolées chez des porcs démontrant des lésions pulmonaires spécifiques de la pneumonie, aucune pathologie n'a été révélée lors d'infections expérimentales (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Le principal intérêt poussant l'étude de ce microorganisme est donc relié à sa grande similitude tant génomique (Stemke *et al.*, 1994b) qu'antigénique (Freeman *et al.*, 1984) avec *M. hyopneumoniae*.

*M. hyorhinis* colonise fréquemment les voies respiratoires de porcs sans causer aucun dommage apparent. Toutefois, il a été rapporté que des porcelets gnotobiotiques avaient développé une pneumonie suite à une infection avec cette espèce (Ross, 1992). Par contre, les pathologies généralement associées avec *M. hyorhinis* sont une polysérite

sérofibrineuse ou des arthrites (Kobisch et Friis, 1996). Les traitements aux antibiotiques ont été rapportés comme peu efficaces contre ce pathogène (Ross, 1992). Ce mycoplasme pousse très rapidement en culture, ce qui complique souvent l'isolement primaire des autres mycoplasmes porcins qui ont une croissance beaucoup plus lente en milieu de culture (Ross, 1992). Il est aussi l'un des principaux contaminants des cultures cellulaires (Chastel, 1995).

Quant à *M. hyopneumoniae*, il est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine (Goodwin *et al.*, 1965; Maré et Switzer, 1965). Ce mycoplasme ayant fait plus spécifiquement l'objet d'études présentées dans ce mémoire, il sera donc caractérisé plus exhaustivement dans la section qui suit.

## **2.1. *Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* causant la pneumonie enzootique porcine a été isolé en 1965 par deux équipes différentes; l'une du Royaume-Uni (Goodwin *et al.*, 1965) et l'autre des États-Unis (Maré et Switzer, 1965). Cette mycoplasmose porcine, retrouvée sur tous les continents, entraîne chaque année des pertes économiques importantes pour les producteurs de porcs.

### **2.1.1. Caractéristiques de *M. hyopneumoniae***

Les *M. hyopneumoniae* sont de petites cellules sphériques ou ovales d'un diamètre variant entre d'environ 0,8 µm et 2,5 µm de diamètre mais peuvent aussi former de courts filaments (Razin et Freundt, 1984; Hovind-Hougen et Friis, 1991). Évidemment aucune paroi n'est retrouvée à leur surface. Par contre, une capsule ou encore une structure nommée «fuzzy layer» composée de protéines de surface peuvent parfois être observées (Tajima et Yagihashi, 1982; Zielinski et Ross, 1992). Cette dernière structure a été rapportée pour jouer un rôle dans l'adhérence aux cellules ciliées épithéliales bordant les voies respiratoires des porcs (Mebus et Underdahl, 1977; Tajima et Yagihashi, 1982; Hovind-Hougen et Friis, 1991; Zhang *et al.*, 1995). Les colonies, elles aussi minuscules,

mesurent à peine 0,5 mm. Elles n'arborent cependant pas l'aspect d'œufs frits comme les colonies formées par la majorité des autres mycoplasmes (figure 2) (Razin et Freundt, 1984).

Ces microorganismes anaérobies facultatifs poussent généralement «bien» dans une atmosphère contenant de 5 à 10% de CO<sub>2</sub> (Razin et Freundt, 1984). Ils puisent leur énergie en fermentant le glucose (Kobisch et Friis, 1996). Le milieu, le plus fréquemment utilisé pour ce mycoplasme, a été mis au point par Friis (Friis, 1975). Leur culture *in vitro* est particulièrement fastidieuse (Ross et Whittlestone, 1983).

*M. hyopneumoniae* possède un chromosome constitué d'un ADN circulaire double brin. La taille du génome est pour l'instant estimée à 1100 kb (Frey *et al.*, 1992; Blank et Stemke, 2001). Le pourcentage de G + C a été évalué à 30% (Stemke *et al.*, 1985; Dybvig et Voelker, 1996). Comme pour la plupart des mycoplasmes, l'usage du TGA diverge du code universel (Futo *et al.*, 1995b; Bouh *et al.*, 2003). Présentement, l'équipe du professeur F. Chris Minion (Iowa State University) s'affaire à séquencer la totalité du génome de *M. hyopneumoniae*, comme mentionné sur le site de l'IOM (International Organization for Mycoplasmology: <http://mycoplasmas.vm.iastate.edu/seq/home.html>). Outre, la taille du génome et le pourcentage de G + C, les résultats de ce travail permettront d'obtenir maintes informations précieuses sur ce mycoplasme.

### 2.1.2. Caractéristiques de la pneumonie enzootique porcine

La pneumonie enzootique porcine, causée par *M. hyopneumoniae*, est une maladie chronique, contagieuse et retrouvée à travers le monde entier. De plus, elle entraîne chaque année des pertes économiques considérables pour les producteurs de porcs. En effet, seulement aux États-Unis, les coûts annuels associés à cette maladie sont estimés à 300 millions de dollars (King *et al.*, 1996). Les dépenses supplémentaires sont liées aux retards de croissance et au faible indice de conversion alimentaire caractérisant la maladie, sans oublier les coûts des traitements. La mortalité reliée directement à cette maladie est plutôt faible mais le taux de morbidité est élevé (Maes *et al.*, 1996). Outre, le

retard de croissance, le principal symptôme qui peut être observé, est une toux sèche non-productive (Kobisch et Friis, 1996). La transmission peut se faire soit par contacts directs entre les animaux ou encore par aérosols (Goodwin, 1985; Stark *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 2001). Des infections expérimentales ont démontré que des porcs de tous âges peuvent être affectés (Kobisch *et al.*, 1993). Par contre, dans les élevages, ce sont généralement les jeunes animaux qui sont les plus susceptibles de développer la maladie car les plus âgés ont généralement acquis une immunité protectrice suite à une infection passée avec *M. hyopneumoniae* (Goodwin *et al.*, 1969; Kobisch *et al.*, 1993).

### 2.1.3. Pathogénèse et lésions

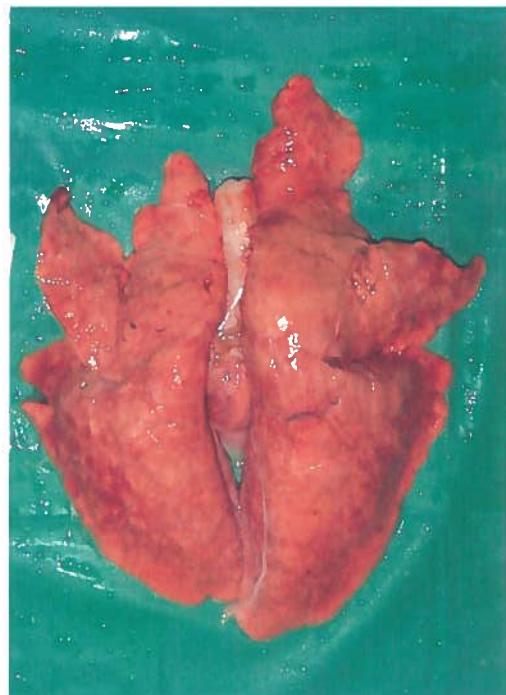
Le mécanisme de pathogénèse de *M. hyopneumoniae* est encore très peu connu. Par contre, comme pour tous les autres mycoplasmes, la virulence repose sur leur capacité de se lier aux cellules cibles. Cette espèce adhère spécifiquement aux cils des cellules de la trachée, des bronches et bronchioles (Tajima et Yagihashi, 1982; Zielinski et Ross, 1990; DeBey et Ross, 1994; Zhang *et al.*, 1994b). Cette adhérence est possible lorsque l'adhésine de *M. hyopneumoniae*, une protéine de 97 kDa, lie les récepteurs cellulaires qui sont des glycolipides sulfatés (Zielinski et Ross, 1993; Zhang *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1994b; Zhang *et al.*, 1995). Des études avec *M. pneumoniae* ont toutefois démontré que l'adhérence est un mécanisme complexe qui demande non seulement des adhésines mais aussi des protéines accessoires (Razin et Jacobs, 1992). Par contre, jusqu'à présent, de telles protéines chez *M. hyopneumoniae* n'ont pas été identifiées.

Il a aussi été établi que l'adhérence de ce mycoplasme cause la perte graduelle des cils des cellules hôtes (Tajima et Yagihashi, 1982; Zielinski et Ross, 1990; DeBey et Ross, 1994; Zhang *et al.*, 1994b). La perte des cils des cellules épithéliales ainsi qu'une infiltration de neutrophiles dans le lumen des voies respiratoires caractérisent la phase hâtive de l'infection (Ross, 1992). Lors de stades plus avancés, une infiltration massive de lymphocytes en régions péribronchiolaires, péribroncholaires et périvasculaires sera alors observée (Mebus et Underdahl, 1977; Tajima et Yagihashi, 1982). Cette hyperplasie lymphocytaire est vraisemblablement engendrée par les cytokines et interleukines pro-

inflammatoires sécrétées par les macrophages alvéolaires activés lors de la colonisation par *M. hyopneumoniae* (Asai *et al.*, 1993; Asai *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 2000). *M. hyopneumoniae* possède une certaine activité mitogénique non-spécifique sur les lymphocytes (Messier *et al.*, 1990; Messier et Ross, 1991). Il n'est donc pas exclut que certains lymphocytes induisent des dommages cellulaires au site d'infection (Tajima *et al.*, 1984; Suter *et al.*, 1985; Messier et Ross, 1991; Okada *et al.*, 2000). Toutefois, le mécanisme de pathogenèse repose vraisemblablement sur de multiples facteurs comme c'est le cas pour les autres mycoplasmes.

Si aucune infection secondaire ne survient, la pneumonie enzootique est rarement mortelle. Les animaux atteints vont alors guérir et les lésions macroscopiques localisées dans les parties déclives des différents lobes du poumon ainsi que dans les parties antérieures des lobes caudaux (figure 4) vont disparaître à l'intérieur de quelques semaines ou mois (Ross, 1992; Kobisch *et al.*, 1993). Par contre, le taux de mortalité est grandement augmenté suite à des surinfections, notamment par *Pasteurella multocida* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi *et al.*, 1984; Ciprian *et al.*, 1988).

En plus de causer la pneumonie enzootique, *M. hyopneumoniae* a aussi été associé au complexe des maladies respiratoires porcines . Ce syndrome respiratoire est caractérisé par un retard de croissance, une conversion alimentaire déficiente, de la léthargie, de l'anorexie, de la fièvre, une toux et de la dyspnée. Outre ce mycoplasme, d'autres pathogènes bactériens et vitaux sont impliqués dans le développement de ce syndrome, parmi ceux-ci on retrouve: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP), le virus de l'influenza porcin (SIV) et le virus de la pseudo-rage (PRV). *M. hyopneumoniae* est reconnu pour amplifier et faire perdurer les pneumonies causées par le virus du SRRP (Thacker *et al.*, 1999).



**Figure 4: Photographie de poumons sains d'un porc**



**Figure 5: Photographie de poumons d'un porc atteint de la pneumonie enzootique.  
Les lésions rougeâtres sont caractéristiques de la pneumonie enzootique.**

## 2.2. Diagnostic

Les signes cliniques et l'observation de lésions macroscopiques décrites précédemment permettent de soupçonner l'infection mais sont par contre insuffisants pour en établir le diagnostic (Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al.*, 1996). La culture de l'agent infectieux peut être utilisée pour confirmer la maladie mais la croissance de *M. hyopneumoniae* est très fastidieuse et demande parfois jusqu'à un mois d'incubation (Ross et Whittlestone, 1983). De plus, les cultures primaires sont souvent contaminées par différentes bactéries, tout particulièrement par *M. hyorhinis* (Ross et Whittlestone, 1983). D'autres méthodes ont donc dû être développées afin de raccourcir les délais du diagnostic.

### 2.2.1. Diagnostic immunohistochimique

Les techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase permettent de révéler *in situ* la présence de *M. hyopneumoniae* sur des coupes de poumons. Leur sensibilité dépend directement de la quantité présente de cet agent pathogène dans les échantillons. Ainsi, ces tests sont beaucoup moins sensibles lors des stades précoce ou très avancés de la maladie où un nombre moins important de bactéries est retrouvé (Amanfu *et al.*, 1984). De plus, des problèmes de spécificité, reliés aux réactions croisées avec *M. flocculare* et *M. hyorhinis*, peuvent être observés lorsque des anticorps polyclonaux sont utilisés (Maes *et al.*, 1996; Ross et Stemke, 1996). Toutefois, l'utilisation d'AcMo améliore la spécificité de ces tests (Caron *et al.*, 2000b; Bouh *et al.*, 2003).

### 2.2.2. Diagnostic sérologique

Au cours des années, divers tests sérologiques ont été développés tels que l'hémagglutination indirecte, la fixation du complément ainsi que l'ELISA (Ross et Stemke, 1996). Le test ELISA s'est avéré être une technique plus spécifique et plus

sensible que ces deux autres (Sorensen *et al.*, 1993). Par contre, il n'est pas exclut que des réactions croisées puissent avoir lieu entre les différents mycoplasmes porcins. Des améliorations ont donc été apportées à cette technique pour augmenter sa spécificité. Ainsi, Nicolet *et al.* (1980) ont constaté un net progrès lorsque des antigènes de *M. hyopneumoniae* étaient extraits à l'aide du Tween 20 (Nicolet *et al.*, 1980; Bereiter *et al.*, 1990). Puis, l'ELISA de compétition développé par Felds *et al.* (1992) utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope d'une protéine de 74 kDa de *M. hyopneumoniae* a aussi démontré une spécificité accrue (Feld *et al.*, 1992). De plus, son évaluation dans une étude sur des troupeaux danois s'est avérée très concluante. Cet ELISA de compétition a donc été commercialisé (Sorensen *et al.*, 1992). Toutefois, ces deux méthodes utilisent des antigènes provenant de cultures de *M. hyopneumoniae*. Puisque la culture de ce mycoplasme est très fastidieuse, cela augmente les délais de production des antigènes et l'utilisation de ces derniers génère un risque d'entraîner des réactions croisées. L'équipe de Futo *et al.* (1995) ont mis au point un ELISA double-sandwich utilisant la P46 rec fusionnée avec une étiquette His permettant la purification sur colonne d'affinité (Futo *et al.*, 1995b). Celui-ci s'est démontré hautement spécifique et permettait la détection d'anticorps sériques anti-P46 dès la deuxième semaine post-infection. Ainsi, l'utilisation de protéines recombinantes semble prometteuse puisque cela simplifie la production et la purification des antigènes.

### 2.2.3. Diagnostic moléculaire

Au début des années 1990, des techniques diagnostiques basées sur la biologie moléculaire ont été développées, notamment, l'hybridation à l'aide de sondes à ADN (Stemke, 1989; Ahrens et Friis, 1991; Abiven *et al.*, 1992; Futo *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 1992; Boye *et al.*, 2001) et l'amplification de gènes ou fragments de gènes de *M. hyopneumoniae* (Harasawa *et al.*, 1991; Artiushin *et al.*, 1993). Certaines réactions croisées peuvent aussi survenir dans ces techniques mais lorsque des sondes ou des amorces adéquates sont utilisées, la spécificité de ces tests est habituellement élevée. Par contre, leur sensibilité est variable (Ross et Stemke, 1996). Ainsi, les sondes radiomarquées sont plus sensibles que celles utilisant une autre méthode de marquage

mais les PCR demeurent généralement plus sensibles que ces deux types d'hybridation (Harasawa *et al.*, 1991; Futo *et al.*, 1992). Deux PCR nichés ou «nested PCR», récemment développés, permettent de détecter aussi peu que 50 à 80 microorganismes, c'est-à-dire dès le début de l'infection et donc bien avant qu'une séroconversion ne surviennent (Calsamiglia *et al.*, 1999; Verdin *et al.*, 2000). Toutefois, une telle sensibilité demande des règles strictes de manipulations ainsi que l'utilisation de témoins négatifs pour s'assurer qu'aucune contamination n'a été perpétrée lors des manutentions des échantillons (Calsamiglia *et al.*, 2000). De plus, les PCR donnant les meilleurs résultats utilisent des lavages bronchoalvéolaires (Blanchard *et al.*, 1996; Baumeister *et al.*, 1998; Verdin *et al.*, 2000) ou des tissus pulmonaires (Caron *et al.*, 2000a). Ces échantillons demandent généralement le sacrifice de l'animal. Certaines équipes ont aussi tenté l'emploi des écouvillons nasaux prélevés chez des animaux vivants comme échantillons pour les PCR. Par contre, elles ont obtenu des résultats mitigés avec ce type de spécimens (Mattsson *et al.*, 1995; Calsamiglia *et al.*, 1999; Caron *et al.*, 2000a). Caron *et al.*, (2000) ont proposé que ce pathogène ne soit présent dans les cavités nasales que pour un court laps de temps, ce qui expliquerait les résultats négatifs obtenus lors de l'utilisation des écouvillons nasaux (Caron *et al.*, 2000a).

### **2.3. Traitements et prophylaxie**

Idéalement, la pneumonie enzootique pourrait être combattue à l'aide d'un vaccin induisant une protection complète et de longue durée contre l'infection par *M. hyopneumoniae*. Malheureusement, un tel vaccin n'a pas encore été découvert. Ainsi, la prévention de cette maladie repose sur une stratégie combinant différents moyens pour obtenir une protection maximale, c'est-à-dire en fournissant un environnement optimal aux animaux, en limitant la présence de l'agent pathogène et en utilisant la vaccination présentement disponible.

La gestion des conditions environnementales et des troupeaux influence grandement la susceptibilité des animaux aux agents infectieux (Curtis et Backstrom, 1992). Parmi les principaux facteurs à surveiller pour obtenir un milieu optimal on inclut:

une bonne qualité de l'air et de la ventilation, une température contrôlée, une humidité relative entre 60-80%, une minimisation des stress pouvant être causés aux animaux, le maintien d'une propreté et d'une hygiène stricte des installations et éviter la surpopulation dans les enclos (Maes *et al.*, 1996). De plus, une des méthodes permettant un bon contrôle de la maladie dans la porcherie repose sur un système de production stricte de tout plein/tout vide ou «all-in/all-out» (Clark *et al.*, 1991). C'est-à-dire que les porcs sont amenés et sortis par groupes de la porcherie permettant ainsi la désinfection des infrastructures entre chacun des pelotons (Curtis et Backstrom, 1992). De plus, il est fortement conseillé de regrouper des porcs dont l'âge ne varie pas de plus de trois semaines (Clark *et al.*, 1989). Cela permet ainsi de réduire la possibilité de contamination des porcs plus jeunes par des porteurs sains plus âgés, phénomène qui est très répandu dans les élevages utilisant la production en continu.

L'élimination de l'agent infectieux peut aussi être fait par l'utilisation d'antibiotiques ou par l'assainissement des troupeaux. Comme il a été mentionné précédemment, les mycoplasmes, ne possédant pas de paroi, sont en général naturellement résistants aux antibiotiques  $\beta$ -lactames tel que la pénicilline et ses analogues (Razin et Freundt, 1984). De plus, *M. hyopneumoniae* serait aussi insensible aux polymixines, à la rifampine et aux sulfonamides (Maes *et al.*, 1996). Par contre, d'autres drogues ont été rapportées pour inhiber la croissance de *M. hyopneumoniae*, notamment, les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones (Kobisch et Friis, 1996). Les antibiotiques peuvent aussi servir lors de différents systèmes visant à assainir les cheptels (Maes *et al.*, 1996). Par exemple, la méthode de sevrage précoce avec médication ou «medicated early weaning» consiste à administrer des antibiotiques aux truies, durant et après la gestation. Suite à la parturition, les porcelets sont rapidement sevrés et sont eux aussi soumis à un traitement aux antibiotiques (Alexander *et al.*, 1980). Une autre technique consiste à sevrer rapidement les porcelets et à les élever dans des unités séparées des truies et autres porcs pour éviter leur contamination par ces derniers (Harris, 1990). Dans un autre programme de lutte similaire, on sépare les jeunes porcs des plus âgés en leur fournissant une nourriture médicamenteuse (Ross, 1992). La repopulation des élevages avec des porcs exempts de pathogène spécifique communément appelé SPF

(specific pathogen free) est l'une des méthodes les plus efficaces pour l'assainissement des troupeaux mais elle est aussi la plus onéreuse, c'est pourquoi elle est peu utilisée (Kobisch et Friis, 1996).

Bien que le diagnostic et la prévention soient des atouts essentiels à la lutte contre les infections, ils ne peuvent toutefois garantir l'exclusion d'une possible réapparition de la maladie. C'est pourquoi, la vaccination demeure le moyen idéal pour l'éradication de l'agent et de la maladie, tout en réduisant les coûts associés à la maladie et à sa prévention (Maes *et al.*, 1999). Les vaccins, présentement sur le marché, sont des bactérines faites soit de micro-organismes inactivés ou encore d'extraits de membranes et sont administrés avec un adjuvant (Kobisch et Friis, 1996). Par contre, des études ont démontré que de tels vaccins peuvent induire une immunité protectrice lors d'infections expérimentales mais ils n'offrent en pratique qu'une protection partielle et très variable contre la pneumonie enzootique (Kristensen *et al.*, 1981; Ross *et al.*, 1984; Thacker *et al.*, 1998). Cette variation d'efficacité des vaccins en milieux naturels peut être attribuée, entre autres, aux différents pathogènes présents dans les porcheries, leur présence pouvant moduler la réaction immunitaire chez l'animal (Maes *et al.*, 1999). Par exemple, il a été suggéré que l'infection due au virus du SRRP décroisse l'efficacité des vaccins contre *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2000b).

Puisque l'effet de ces bactérines n'est pas entièrement satisfaisant, différentes formes de vaccins sont en développement. Ainsi, Weng *et al.* (1992) sont à la mise au point de microcapsules de polymères contenant des antigènes de *M. hyopneumoniae*. Ces microcapsules, suite à leur injection à l'animal, libèrent progressivement ces antigènes (Weng *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003). D'autres équipes développent des vaccins sous-unitaires de protéines recombinantes (Cheik Saad Bouh *et al.*, en préparation) ou chimériques (Chen *et al.*, 2001). Des bactéries atténées, soit *Salmonella typhimurium* (Fagan *et al.*, 1997; Fagan *et al.*, 2001) et *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Shimoji *et al.*, 2002; Shimoji *et al.*, 2003), ont aussi été proposées comme vecteurs pour délivrer des antigènes de *M. hyopneumoniae*. Finalement, des vaccins à ADN ont aussi été tentés (Moore *et al.*, 2001). Toutefois, comme avec les bactérines ces nouveaux

vaccins n'offrent souvent qu'une protection partielle suite aux immunisations. De plus, ils n'ont été pour l'instant testés qu'expérimentalement, donc leur efficacité en milieu naturel n'est pas encore connue.

Pour éventuellement développer des vaccins plus efficaces, il est important de déterminer quels paramètres permettront d'induire une immunité protectrice spécifique et de longue durée. Différents travaux ont donc étudié les réponses immunitaires lors d'infections et suite à la vaccination (Kristensen *et al.*, 1981; Ross *et al.*, 1984; Messier *et al.*, 1990; Messier et Ross, 1991; Sitjar *et al.*, 1996; Thacker *et al.*, 2000a). Les résultats de ces travaux semblent indiquer que les réponses locales, mucosales, humorales et cellulaires sont induites lors d'infections mais l'immunité mucosale locale et l'immunité cellulaire seraient plus particulièrement impliquées dans la protection des porcs contre les infections avec *M. hyopneumoniae* (Kristensen *et al.*, 1981; Sheldrake *et al.*, 1993; Thacker *et al.*, 1998; Thacker *et al.*, 2000a). Ces conclusions devront être prises en considération lors du développement de futurs vaccins.

### **3. Les protéines immunodominantes chez *M. hyopneumoniae***

Au cours des nombreuses études sur *M. hyopneumoniae*, plusieurs protéines immunodominantes et spécifiques à cette espèce ont été découvertes. Parmi ces protéines on retrouve: la P36, une lactate déshydrogénase (Strasser *et al.*, 1991), des lipoprotéines membranaires, la P46 (Futo *et al.*, 1995a) et la P65 (Wise et Kim, 1987a), des protéines chaperones (heat shock protein), la P42 (Chou *et al.*, 1997), la HSP 60 (Scherm *et al.*, 2002) et la P74 (Brooks et Faulds, 1989) et finalement l'adhésine de *M. hyopneumoniae*, la P97 (Zhang *et al.*, 1995). Les caractéristiques principales de chacune d'elles seront mentionnées, ainsi que leur usage en diagnostic ou dans le développement de vaccins.

#### **3.1. La protéine P36: une lactate déshydrogénase**

La P36 est une protéine cytosolique entraînant une réponse humorale hâtive contre *M. hyopneumoniae* (Young et Ross, 1987; Strasser *et al.*, 1991). C'est cette caractéristique qui a stimulé l'intérêt de l'étude de cette protéine. À la suite du séquençage du gène p36 (Numéro d'accès sur GenBank : X67286) il a été suggéré que cette protéine soit une lactate déshydrogénase. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par des tests biochimiques (Haldimann *et al.*, 1993). La P36 recombinante totale a pu être directement exprimée chez *E. coli*, sans aucune mutagenèse, puisqu'il s'est avéré que son gène ne possède aucun codon TGA (Strasser *et al.*, 1991; Haldimann *et al.*, 1993). La P36 dispose de deux caractéristiques très importantes pour l'élaboration de tests diagnostiques qui sont, sa conservation entre les différentes souches et sa grande spécificité pour *M. hyopneumoniae*. En effet, aucune réaction croisée n'a été observée avec d'autres espèces, pas même avec *M. flocculare* et *M. hyorhinis* qui sont pourtant reconnues pour partager des déterminants communs à *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1991).

Différentes équipes ont donc tenté d'élaborer des tests diagnostiques avec la P36. Ainsi, deux ELISA indirectes avec la P36 recombinante ont été conçues.

Malheureusement, il ne semblait pas y avoir de corrélation entre la présence des anticorps dans les sérums et les signes cliniques et pathologiques observés. D'autres tests se sont néanmoins révélés plus satisfaisants. Par exemple, une immunofluorescence indirecte (IIF) sur coupes congelées de poumons, utilisant des anticorps monoclonaux contre la P36 rec, s'est avérée une méthode rapide et très spécifique permettant de surcroît les observations histopathologiques (Caron *et al.*, 2000b). Un autre test diagnostic a été mis au point mais cette fois utilisant des amorces spécifiques au gène p36. Le PCR obtenu s'est montré sensible et spécifique (Caron *et al.*, 2000a). Par contre, comme l'avaient suggéré Haldimann *et al.* (1993), il ne semble pas que la lactate déshydrogénase, étant une protéine cytosolique, puisse induire une immunité protectrice. Cette hypothèse a été confirmée lors d'un essai d'immunisation avec la P36 recombinante. En effet, malgré des titres sériques élevés en anticorps anti-P36, les porcs immunisés ne semblaient pas avoir été protégés contre l'infection expérimentale (Frey *et al.*, 1994).

### **3.2. La protéine P46: une protéine membranaire**

La P46 a été identifiée comme étant un antigène spécifique à *M. hyopneumoniae* qui induit une réponse humorale hâtive suite à une infection (Mori *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 1988). En effet, les anticorps dirigés contre la P46 sont décelés très tôt dans le sérum de porcs infectés (Mori *et al.*, 1988). Ainsi, que ce soit par ELISA ou par immunobuvardage de type Western, la présence de ces anticorps est détectée dès la deuxième semaine post-infection (Futo *et al.*, 1995b). Ces caractéristiques suggèrent donc que la P46 puisse être utile pour le développement d'outils diagnostics.

La séquence complète du gène (numéro d'accès sur GenBank: D16682) a été obtenue par Futo *et al.* (1995). Cela a permis de déterminer la taille de l'ORF de la P46, soit 1257 pb et de confirmer la présence de trois codons TGA codant pour le tryptophane. L'analyse de la séquence déduite en acides aminés a révélé l'existence d'un site de clivage, en N-terminal, caractéristique des lipoprotéines. La P46 est donc vraisemblablement d'abord exprimée sous la forme d'une pro-protéine de 46 kDa, puis le peptide signal de trente acides aminés serait clivé ce qui permet sa maturation en

lipoprotéine membranaire. Les masses de la pro-protéine et de la protéine mature ont été établies à 45 788 Da et à 43 344 Da respectivement (Futo *et al.*, 1995a). Par contre, aucune homologie n'avait été trouvée entre le gène p46 et ceux déjà répertoriés dans les banques de données (Futo *et al.*, 1995a). La fonction de la P46 de *M. hyopneumoniae* demeurait donc inconnue. Récemment, la consultation de ces banques de données nous indique maintenant que la protéine P46 possède des domaines conservés similaires à ceux de certaines protéines qui lient les sucres ou bien d'autres impliquées dans le transport des sucres (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrvcgi>).

La P46 s'exprime très bien chez *E. coli*, suite à la mutagenèse des codons TGA en TGG (Futo *et al.*, 1995b; Bouh *et al.*, 2003). La protéine P46 recombinante obtenue demeure toujours reconnue par des anticorps anti-P46 native lors de test ELISA double sandwich (Futo *et al.*, 1995b) ou en immunobuvardage de type Western (Bouh *et al.*, 2003). Par contre, les anticorps des sérum de porcs infectés par d'autres mycoplasmes ne réagissent pas avec la protéine recombinante, démontrant une fois de plus la spécificité de P46 pour *Mycoplasma hyopneumoniae* (Futo *et al.*, 1995b).

Parmi les autres tests diagnostics possibles avec la P46, on retrouve des essais d'immunofluorescence indirecte et d'immunoperoxydase sur des coupes de tissus permettant la localisation *in situ* des bactéries utilisant des anticorps monoclonaux produits contre la P46 (Bouh *et al.*, 2003). Au niveau diagnostic moléculaire, un PCR permet l'amplification d'un fragment du gène p46. Le PCR était spécifique mais s'est avéré moins sensible que celui amplifiant le gène p36 mentionné un peu plus tôt (Caron, J *et al.*, 2000).

Un essai d'immunisation a vérifié la protection conférée par différentes protéines recombinantes, dont la P46, ainsi que la P65, la P97 et le mélange de ces trois protéines rec (Cheikh Saad Bouh 2003, soumis). Bien que la protection accordée par ces protéines ne soit que partielle, suite à l'infection défi, une réduction significative des lésions pulmonaires a été observée en comparaison avec les témoins non-vaccinés. Ainsi les vaccins sous-unitaires seront peut-être une alternative aux bactérines.

### **3.3. La protéine P65: une lipoprotéine membranaire**

La P65 est une lipoprotéine membranaire ayant une capacité immunogène, puisqu'on dénote, en immunobuvardage, la présence d'anticorps dirigés contre celle-ci dans des sérum de porcs convalescents (Wise et Kim, 1987b; Kim *et al.*, 1990). Le domaine immunogénique, comportant certains épitopes spécifiques à *M. hyopneumoniae*, se situe dans la partie C-terminale de la protéine (Wise et Kim, 1987a; Kim *et al.*, 1990). Le séquençage de l'ORF de la P65, réalisé par Chou et Shiuan, n'a révélé la présence que d'un seul TGA (soumission directe à GenBank en 1996; le numéro d'accès: U50209).

Contrairement à la P46, l'utilisation de la P65 pour le développement d'un test sérologique est beaucoup moins attrayante puisque les anticorps anti-p65 apparaissent seulement après trois à quatre semaines (Cheikh Saad Bouh, *et al.* 2003, manuscrit.). Cela représente un délai relativement long sachant que les anticorps contre la P46 sont généralement observés dès la deuxième semaine post-infection (Cheikh Saad Bouh *et al.* 2003, manuscrit). Toutefois, des AcMo dirigés contre la partie C-terminale de la protéine P65 rec ont permis une détection *in situ* spécifique de *M. hyopneumoniae* lors d'essais immunohistochimiques tel l'IIF et l'immunoperoxydase sur coupe de poumons de porcs (Bouh *et al.*, 2003).

### **3.4. La protéine P74 et autres chaperones**

Quelques protéines de *M. hyopneumoniae* faisant partie de la famille de chaperones ou «heat shock proteins» (HSP) ont aussi été reconnues pour induire une réponse humorale lors de l'infection avec cet agent. La P74 a été la première à être découverte (Brooks et Faulds, 1989). Plus récemment, deux autres protéines, l'une de 42 kDa (Chou *et al.*, 1997) et l'autre de 60 kDa (Scherm *et al.*, 2002) ont été identifiées comme des chaperones de *M. hyopneumoniae* ayant possiblement des propriétés immunogéniques. Par contre, la P74 est la seule de ces protéines à avoir servi à l'élaboration d'un test diagnostique (Feld *et al.*, 1992). Les HSP sont parmi les protéines

les plus conservées ce qui implique qu'elles partagent des déterminants antigéniques. Cela explique les réactions croisées observées en immunobuvardages entre des HSP de différentes espèces (Dascher *et al.*, 1990; Feld *et al.*, 1992). Toutefois, la découverte d'un AcMo anti-P74 spécifique à *M. hyopneumoniae* a suggéré que la protéine P74 possède au moins un déterminant antigénique propre à cette espèce. Ainsi, un ELISA de compétition utilisant cet anticorps a été mis au point (Feld *et al.*, 1992). Un essai à grande échelle a été réalisé pour valider la sensibilité et spécificité de ce test diagnostic (Sorensen *et al.*, 1992). Cet ELISA de blocage s'est révélé être un meilleur outil diagnostique que ceux existant auparavant, c'est pourquoi il a été commercialisé et est couramment utilisé pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae*.

### **3.5. La protéine P97: une adhésine**

Avant même de savoir la fonction de la P97, cette protéine avait été identifiée comme l'une des protéines les plus immunogènes de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Young *et al.*, 1992). De plus, la réponse immunitaire humorale induite par cette dernière est très rapide puisque les anticorps contre cette protéine apparaissent généralement après deux à trois semaines suite à une infection par *Mycoplasma hyopneumoniae* (Cheikh Saad Bouh *et al.* 2003, manuscrit en préparation). Par contre, le principal intérêt pour cette protéine est lié à la découverte de sa fonction d'adhésine qui a été réalisée lors de tests d'inhibition d'adhérence in vitro. En effet, cette protéine a la capacité de bloquer l'adhérence de *Mycoplasma hyopneumoniae* aux cellules ciliées de la trachée de porcs (Zhang *et al.*, 1995). L'adhésine P97 est donc impliquée dans la toute première étape du mécanisme de la pathogenèse, soit l'attachement aux cils des cellules de l'épithélium respiratoire (Mebus et Underdahl, 1977). Une meilleure connaissance de la P97 permettrait d'éclaircir le mécanisme d'adhérence et peut-être même de développer de nouveaux vaccins.

Suite à sa découverte, cette protéine a été localisée aléatoirement sur toute la surface de la bactérie, contrairement à *M. pneumoniae* qui possède un organite d'adhérence ou «tip organelle» où sont polarisées ces deux adhésines P1 et P30 (Zhang *et*

*al.*, 1995; Rottem, 2003). Ensuite, les travaux sur le clonage et le séquençage du gène (Numéro d'accès sur GenBank: U50901) ont démontré la présence de TGA codant pour le tryptophane. Leur nombre varie cependant de quatre à cinq selon les souches (Hsu *et al.*, 1997; Wilton *et al.*, 1998). Ces mêmes travaux ont aussi établi la taille de l'ORF à 3327 pb codant pour une pro-protéine de 124,9 kDa. L'adhésine correspondrait quant à elle au plus long fragment résultant du clivage des 195 premiers acides aminés situés à l'extrémité N-terminale de cette pro-protéine. Même si la masse théorique de l'adhésine est de 102,9 kDa, elle tient son appellation de P97 du fait que lorsqu'elle est migrée sur gel SDS-PAGE sa masse observée est de 97 kDa (Hsu *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus par une autre équipe ayant séquencé le gène Mhp1 (Numéro d'accès sur GenBank :U27294) qui code pour une protéine très similaire à la P97 (King *et al.*, 1996). Finalement, la comparaison des séquences des gènes p97 et mph1, venant de deux souches différentes, a démontré que ces deux gènes codent pour la même protéine, soit l'adhésine P97.

Ces études ont aussi révélé le caractère spécial de la partie C-terminale de la P97 où deux régions répétées, nommées RR1 et RR2, sont présentes. Les motifs répétés se composent de cinq acides aminés; AAKPV/E pour la région RR1 et de dix résidus pour les RR2, dont la séquence est G(A/S/E)P(N/S)QGKKAЕ (Hsu *et al.*, 1997; Wilton *et al.*, 1998). Toutefois, le nombre de ces motifs répétés fluctue selon la souche, passant de 8 à 15 pour les RR1 et de 3 à 4 pour les RR2 (Wilton *et al.*, 1998). C'est pourquoi, la taille des adhésines varie aussi selon les souches, ce qui a été observé lors d'immunobuvardages de type Western avec des AcMo dirigés contre la P97 (Zhang *et al.*, 1995). Ainsi, ces variations antigéniques des régions RR1 et RR2 entre les différentes souches entraînent une certaine hétérogénéité pouvant être impliquée dans le mécanisme d'évasion au système immunitaire de l'hôte (Zhang *et al.*, 1995; Rottem, 2003). C'est aussi dans la partie C-terminale de la P97 que le domaine d'adhérence a été identifié, c'est-à-dire dans la région répétée RR1 (Hsu *et al.*, 1997; Hsu et Minion, 1998). Minion *et al.* (2000) ont établi qu'un minimum de 8 répétitions AAKPV/E semble nécessaire pour que la P97 puisse jouer son rôle dans l'attachement aux cils des cellules (Minion *et al.*, 2000). De plus, leurs résultats ont aussi démontré que la région RR1 est immunogène

et qu'un épitope de cette région doit être composé d'un minimum de trois répétitions pour être reconnu par un anticorps. Cheikh Saad Bouh *et al.* ont produit des AcMo contre la protéine totale ainsi que contre la partie C-terminale, cela dans le but de mieux caractériser l'emplacement des parties antigéniques de la protéine P97 (Cheikh Saad Bouh *et al.*, en préparation). Leur résultats suggèrent que la région RR1 n'est pas la seule portion immunogène de la P97 puisqu'en immunobuvardage de type Western des anticorps dirigés contre la P97 totale n'ont pas réagi avec la partie C-terminale contenant les régions RR1 et RR2.

La P97 ne serait vraisemblablement pas la seule protéine engagée dans le mécanisme d'adhérence (Zhang *et al.*, 1995; Hsu et Minion, 1998). En effet, il a été suggéré que d'autres protéines soient nécessaires à ce processus, par exemple une protéine de 110 kDa qui serait possiblement une autre adhésine de *M. hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 1998). Cette hypothèse est plausible puisque des études sur l'adhérence avec *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycoplasma genitalium* ont démontré que ces deux espèces possèdent deux adhésines ainsi que plusieurs protéines accessoires qui sont essentielles pour le déroulement de l'adhérence (Hu *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1995; Dallo *et al.*, 1996; Rottem, 2003).

Puisque la P97 joue un rôle prépondérant dans l'infection en tant qu'adhésine, différentes études ont voulu évaluer le potentiel vaccinal de cette protéine. Le premier essai d'immunisation de porcs avec une P97 recombinante (Mhp1-GST) n'avait pas démontré l'effet protecteur escompté, c'est-à-dire que les porcs vaccinés avec la P97 ne présentaient pas de réduction significative des lésions des poumons (King *et al.*, 1996). Par contre, King *et al* ont suggéré que l'échec de protection serait peut-être dû à des facteurs reliés au mode de vaccination et la méthode d'inoculation lors de l'infection défi. Depuis lors, différents types de vaccins en développement sont produits à partir de la P97. Ainsi, des vaccins sous-unitaires avec la P97 recombinante (Cheikh Sad Bouh *et al.*, en préparation) ou chimérique (Chen *et al.*, 2001; Cheikh Saad Bouh, 2003), des bactéries atténuees *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Shimoji *et al.*, 2002; Shimoji *et al.*, 2003) peuvent aussi être utilisées comme vecteurs pour livrer la P97 de *M. hyopneumoniae*. Ces

nouveaux vaccins n'ont toutefois été testés que lors d'infections expérimentales et n'offrent souvent qu'une protection partielle. Il n'est cependant pas exclut que parmi ceux-ci, certains puissent être optimisés pour donner en définitive une protection complète contre *M. hyopneumoniae*.

Finalement, l'étude de ces différentes protéines immunodominantes est importante puisque certaines se sont déjà montrées utiles en diagnostic et d'autres sont prometteuses pour l'élaboration de nouveaux tests de dépistage et même de vaccins. Un meilleur contrôle de *M. hyopneumoniae* est évidemment souhaitable puisque cela permettra non seulement de mieux lutter contre la pneumonie enzootique mais aussi de réduire les infections secondaires souvent favorisées par cette maladie.

## **Article**

**Antigenic and genomic variability of 11 North American isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* in their P46 and P97 open reading frame regions**

## 4. Article

### 4.1. Accusé de réception

**Shareck, Francois (IAF)(LAVAL)**

---

De: AGRICULTURE EDIT. OFFICE (ELS) [agri-eo-f@elsevier.nl]  
Envoyé: Wednesday, August 20, 2003 10:55 AM  
À: 'francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca'  
Objet: VETMIC 1890

Dear Mr. Shareck,

I acknowledge with thanks the safe receipt of the manuscript Antigenic and genomic variability of 11 North American strains/isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* in their P46 and P97 open reading frame regions by Boisvert, A., Bouh, K.C.S., Kheyar, A., Shareck, F. and Dea,  
S

A decision on publication will be communicated to you as soon as possible.

Our aim is to inform our authors of the decision on publication of their manuscripts within three months and we will do everything we can to achieve this target.

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Thank you for submitting your manuscript to our journal.

Yours sincerely,

Editorial Office Veterinary Microbiology

Mrs. N. de Jong

Phone: 20-485-3395

Fax: 20-485-3754

E-mail: agri-eo-f@elsevier.nl

#### 4.2. Résumé de l'article en français

Les protéines membranaire P46 et l'adhésine P97 ont précédemment été décrites parmi les protéines les plus immunogéniques de *M. hyopneumoniae*, l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine. Le but de l'étude présentée dans cet article était de découvrir et d'analyser les variations génétiques et antigéniques pour ces protéines chez différents isolats Nord-Américains.

Les gènes p46 et p97 de tous les isolats, obtenus à partir de cas cliniques, ont été amplifiés par PCR et ont été séquencés pour déceler les variations génétiques. Les variations antigéniques ont quant à elles été détectées en immunobuvardages de type Western avec les anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre les protéines P46 et P97 recombinantes ayant été exprimées chez *E. coli*.

L'analyse des séquences en acides aminés a révélé d'importantes variations dans la région C-terminale correspondant à des délétions ou des insertions dans les deux régions répétées RR1 et RR2 faisant varier la taille de l'adhésine. Ces différences de taille ont aussi été remarquées lors de l'analyse des patrons électrophorétiques obtenus avec les AcMo anti-P97. Contrairement à la P97, la P46 semble être une protéine très conservée entre les différentes souches étudiées. En effet, les séquences déduites en acides aminés ont révélé un taux de conservation très élevé. De plus, l'analyse des immunobuvardages avec les AcMo anti-P46 n'ont révélé aucune variation dans les patrons électrophorétiques observés. Des études antérieures ont déjà établi que la P46 est une protéine spécifique à l'espèce qui induit une réponse humorale hâtive. Nos résultats suggèrent qu'elle est de plus une protéine très conservée. Donc, la protéine P46 semble être un excellent outil pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae*.

### 4.3. Contribution des auteurs

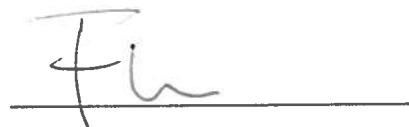
J'aimerais tout d'abord mentionner que cette étude a été possible grâce aux outils développés antérieurement par un autre étudiant, M. Kane Cheikh Saad Bouh. En effet, les anticorps monoclonaux anti-P46 et anti-P97, utilisés pour vérifier la variation antigénique entre les souches, sont les fruits de son labeur. Ces AcMo sont dirigés contre des protéines recombinantes et pour les obtenir, il a d'abord dû procéder à la mutagenèse dirigée pour changer les TGA en TGG des gènes p46 et p97. Ensuite, ces protéines ont pu être exprimées pour servir à l'immunisation de souris BALB/c pour la production des AcMo. La spécificité des anticorps envers les protéines d'intérêt de *Mycoplasma hyopneumoniae* a aussi été vérifiée par cet étudiant. J'ai été impliquée lors de la production des AcMo anti-P97, en maintenant les clones et en les criblant par ELISA. Les anticorps ayant été produits et caractérisés, j'ai donc pu les utiliser dans le cadre de mon projet de maîtrise.

Donc, pour ce qui concerne les travaux présentés dans cet article, c'est-à-dire les manipulations portant sur les variations antigéniques et génomiques, c'est moi qui ai réalisé la majorité des expériences. J'ai isolé les souches de champs de *Mycoplasma hyopneumoniae* à partir d'homogénats de poumons de porcs ayant été diagnostiqués avec la pneumonie enzootique. J'ai vérifié par PCR qu'il n'y avait pas de contamination de mes cultures par *Mycoplasma hyorhinis*. Les souches ont été purifiées par dilutions limites. J'ai ensuite produit des antigènes et extrait l'ADN génomique pour chacune des souches. Les antigènes m'ont servi à vérifier les différences antigéniques entre les souches en les faisant réagir en Western blot contre les différents AcMo. Quant à l'ADN génomique, elle m'a servi de matrice pour amplifier les gènes p46 et p97 des différentes souches. Plusieurs produits PCR ont été nécessaires pour obtenir la séquence complète de chaque gène. Finalement, j'ai compilé et analysé les différents résultats des volets antigéniques et génomiques et fait la revue de littérature nécessaire afin de rédiger l'article qui suit.

Je tiens à mentionner que mesdames Louise Wilson, Lise Cousineau et Martine Boutin m'ont aidée pour certaines manipulations, tout particulièrement Martine qui m'a initiée et aidée à l'analyse des séquences. Mes travaux ont été supervisés par messieurs Ali Kheyar, François Shareck et Serge Dea.

A handwritten signature in black ink that reads "Annie Boisvert". The signature is fluid and cursive, with "Annie" on the top line and "Boisvert" on the bottom line, both underlined.

Étudiante: Annie Boisvert

A handwritten signature in black ink that reads "Fin". The signature is written in a simple, bold hand, with a horizontal line underneath it.

Codirecteur: François Shareck

#### 4.4. Article

Antigenic and genomic variability of 11 North American isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* in their P46 and P97 open reading frame regions

Annie Boisvert, Kane Cheikh Saad Bouh, Ali Kheyar,

François Shareck\* and Serge Dea<sup>(1)</sup>

INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval,

P.Q., Canada, H7V 1B7

(1) : deceased January 2003

\*Corresponding author mailing address:

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531, boul. des Prairies

Laval, Qc, Canada

H7V 1B7

E. Mail: [francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:francois.shareck@inrs-iaf.quebec.ca)

**Abstract:**

The P46 membrane anchored and the P97 adhesin proteins have been described as amongst the most immunogenic proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiologic agent of swine enzootic pneumonia. The aim of the present study was to analyze the genetic and antigenic variations of these important proteins from different North-American isolates.

The p46 and p97 genes of each strain isolated from clinical cases were amplified by PCR and sequenced using standard protocols. Furthermore, monoclonal antibodies (MAbs) directed against *E. coli*-expressed recombinant fusion P46 and P97 proteins of a reference strain have been used to establish the antigenic variations of these proteins among the different isolates by Western blot analysis.

Deduced amino acid sequence analysis revealed variations in the P97 C-terminal region consisting of important sequence deletions or insertions either in the repeated regions RR1 and RR2. Western blot analysis using the P97-specific MAbs revealed different electrophoretic patterns of the P97 protein that correlated with the above genetic variations. However, comparison of p46 gene sequence of all isolates revealed a high degree of amino acids conservation and Western blot analysis using the P46-specific MAbs did not reveal any variation in electrophoretic patterns. The P46 protein is species-specific, induces an early production of antibodies and seems to be well conserved as we demonstrate. Thus, our results support the earlier suggestion that P46 could be used for specific diagnosis of swine enzootic pneumonia due to mycoplasma infection.

**Keywords:** P46 protein, P97 protein, *Mycoplasma hyopneumoniae*, antigenic variation, genetic variation.

## 1. Introduction

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of porcine enzootic pneumonia. It is a very contagious chronic respiratory disease characterized by low mortality rates but high morbidity rates with poor feed conversion. This agent predisposes pigs to retarded growth and to secondary pulmonary infections. Consequently, this disease is responsible for important economic losses to the swine industry (Kobisch et Friis, 1996). The growth of *M. hyopneumoniae* in pure culture is very difficult. Antibody cross-reactions with other porcine mycoplasma cause problems for the diagnosis of this agent (Armstrong *et al.*, 1987; Kobisch et Friis, 1996). However, some immunodominant proteins have been identified, such as P36 (Strasser *et al.*, 1991), P46 (Strasser *et al.*, 1991; Futo *et al.*, 1995a; Futo *et al.*, 1995b), P65 (Kim *et al.*, 1990) and P97 (Zhang *et al.*, 1995). P36 and P97 have been identified respectively as a lactate dehydrogenase (Haldimann *et al.*, 1993) and an adhesin (Zhang *et al.*, 1995), whereas the roles of the other antigens are currently unknown.

The membranous P46 and the P97 proteins have been chosen in this study because they were described as the most immunogenic proteins inducing the earliest immune response in infected pigs (Bouh *et al.*, submitted for publication). Thus, it has been suggested that the P46 protein may be a reliable diagnostic tool for *M. hyopneumoniae* (Futo *et al.*, 1995a; Bouh *et al.*, 2003). P97 has been described as an adhesin protein implicated in the adhesion of *M. hyopneumoniae* to ciliary cells. Its C-terminal region displays two repeat regions called RR1 and RR2 regions which correspond in deduced amino acids to AAKPV/E and GTPNQGKK(S/A)E respectively (Zhang *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1997). The number of RR1 and RR2 may vary in different strains usually from 9 to 15 times for the former and from 4 to 5 times for the latter (Wilton *et al.*, 1998).

The amino acid sequence necessary for the binding of the P97 protein has been identified as RR1 (Hsu et Minion, 1998). Recently, it has been reported that 8 RR1 repeats are the minimum number required for a strain to adhere to the ciliary cells of the

air way in swine. However, 3 RR1 repeats represent the minimal unit composing an antigenic epitope (Minion *et al.*, 2000).

In this study, we have analyzed genetic and antigenic variations of the p46 and p97 genes and their encoded proteins respectively in 11 field strains isolated from different North-American geographical regions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Source of *M. hyopneumoniae* isolates

Lung homogenates from pigs diagnosed with typical clinical signs of enzootic pneumonia were used to obtain 11 isolates of *M. hyopneumoniae* from North America; 8 strains from Canada and 3 strains from the USA (Table 2). The ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae* from the American Type Culture Collection, (Rockville, MD, U.S.A.), was used as the reference strain.

### 2.2. Growth conditions

The field strains and the ATCC 25934 reference strain were grown in a modified Friis medium (Friis, 1975), containing 20% horse serum, 5% yeast extract (Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.15 mg/ml bacitracin and 0.08 mg/ml thallium acetate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) for about 7 days at 37°C. The cells were harvested by centrifugation at 12,000 x g for 30 min at 4°C, washed three times, and suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. These whole-cell bacterial pellets were used as antigen stocks in the antigenic study and for DNA extraction in the genetic study.

### 2.3. PCR confirmation

The strain identity was confirmed by a diagnostic PCR assay previously developed in our laboratory using species specific primers (Caron *et al.*, 2000a). Briefly, aliquots of 3 ml of each culture were pelleted and suspended in 20  $\mu$ l of 0.1 M PBS, pH 7.4. The suspensions were boiled 5 min, then 5  $\mu$ l were directly used as template in the diagnostic PCR. Species-specific primers were used in order to discriminate *M. hyorhinis* contaminated culture. FSp36 and RSp36 *M. hyopneumoniae* specific primers yielded an amplification product of 948 bp. Sp37 and Asp37 *M. hyorhinis* specific primers gave an amplification product of 346 bp (Data not shown).

### 2.4. Monoclonal antibodies

MAbs directed against *E. coli*-expressed recombinant-*M. hyopneumoniae* P46 fusion protein (glutathione-S-transferase-P46; GST-P46) (Bouh *et al.*, 2003) and GST-P97 and GST-P97 C-terminal region (Amino acids 535 to 1108) (GST-P97C) proteins (manuscript in preparation) of the ATCC 25934 reference strain have been previously produced. Briefly, TGA codons present in the p46 ORF (3 codons) and p97 ORF (4 codons) have been mutated to TGG to allow their synthesis in the *E. coli* expression system. The mutated genes have been cloned into the pGEX-4T1 vector (Amersham-Pharmacia Biotech). The recombinant proteins have been produced, purified, cleaved with thrombin and served to immunize BALB/c mice. Hybridomas were produced by fusing spleen cells of immunized mice with Sp2/0-Ag14 myeloma cells. MAb specificities have been confirmed by Western blot against the recombinant proteins and the whole-cell bacterial antigen. Characteristics of the anti-P46 MAbs have been described in Bouh *et al.* (2003) and anti-P97 MAbs in Cheikh Saad Bouh *et al.* (submitted).

## 2.5. Antigenic study

The protein content of the whole-cell bacterial pellet of each field strain and the reference ATCC 25934 strain have been estimated with the DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 10 µg have been migrated under reducing conditions on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and were electrotransferred onto Hybond ECL-nitrocellulose membranes (Pharmacia). The membranes were blocked overnight in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.1% Tween 80, 3% goat serum and 5% skim milk. The membranes were then incubated for 90 min at room temperature in the presence of a 1: 1000 dilution of either mouse anti-P46 or anti-P97 hyperimmune serum, or mouse ascitic fluid in the blocking buffer or undiluted anti-P97 hybridoma cell culture supernatants. The immune reactions were revealed following incubation with a 1: 2000 dilution of the peroxidase-labeled mouse anti-immunoglobulin G conjugate and incubation in the enzyme substrate solutions consisting of 0.06% 4-chloro-1-naphthol (Sigma, St-Louis, Mo, USA) in TBS (Tris buffered saline) containing 20% (v/v) methanol.

## 2.6. Genetic study

### 2.6.1. DNA extraction

Bacterial pellets from each field strain and the ATCC 25934 reference strain were used for DNA extraction. Total DNA from the different strains was obtained after an incubation of 45 min at 37°C in lysis buffer containing 20 µg/ml of RNase (Roche, Laval, Quebec, Canada) and 10% sodium dodecyl sulfate, followed by another incubation of 30 min at 37°C in the presence of 20 µg/ml of Proteinase K (Boehringer Mannheim) and 0.5 M EDTA (Sigma-Aldrich, Canada) (Dallo *et al.*, 1989). DNA purification was completed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation standard methods (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.6.2. P46 and P97 ORFs amplifications

Three fragments of the p46 ORF and 5 fragments of the p97 ORF from each strain/isolate were amplified by PCR, at least twice, to obtain their complete sequence. The PCR was performed by using 1 µg of mycoplasma genomic DNA. The amplification was realized in a 100 µl reaction mixture containing each deoxynucleoside triphosphophate at a concentration of 0.2 mM, plus 50 pmol of each forward and reverse primer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1X of 10X PCR Rxn Buffer and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The samples were subjected to 35 amplification cycles consisting of a denaturation at 94°C for 60 seconds (s), a primer annealing at 50°C for 60 s and an elongation at 72°C for 90 s. There was a final extension step at 72°C for 10 minutes. The PCR amplifications were carried out using a DNA Engine Thermocycler (MJ Research model PTC-100, with hot bonnet). The PCR products were purified by using the QIAquick PCR Purification Kit or the QIAquick Gel Extraction kit from QIAGEN (Mississauga, Ontario, Canada). The purified PCR products were sequenced using standard protocols. Sequences were analyzed with the GCG software of the Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA and compared to those of the ATCC 25934 strain (Genbank accession no. D16682).

## 3. Results

### 3.1. Antigenic study

MAbs produced against P46 and P97 have served to establish by Western blot analysis whether any antigenic variations existed between the different strains. In this study, 6 anti-recombinant (rec)-P46 MAbs, 5 anti-rec-P97, and 4 anti-rec-P97C- MAbs have been used in Western blotting analysis. Typical results are shown in Figures 6 and 7.

All 6 anti-rec-P46 MAbs and the anti-rec-P46 monospecific mouse serum reacted strongly and similarly against all strains and revealed a single protein band of 43 kDa

which corresponds to the P46 protein without its signal peptide at the N-terminal end (Futo *et al.*, 1995a) (Fig. 6).

In contrast to the results obtained with the anti-rec-P46 MAbs in the Western blotting analysis, the results with the anti-rec-P97 MAbs were less obvious. Indeed, the anti-rec-P97 MAbs, anti-rec-P97C MAbs and mouse hyperimmune sera yielded variable multiple band patterns. Two major patterns were observed depending on the different types of MAbs used (Fig. 7). This result suggested that the MAbs reacted with different epitopes of the P97 protein. Thus all 5 anti-rec-P97 MAbs (Fig. 7 A) and the anti-rec-P97C MAbs 8H2-H8 (Fig. 7 B) gave a profile pattern with strong 65 and 97 kDa bands and a faint 124 kDa band. However, the anti-rec-P97C MAbs 2D1-A5, 2D1-G1 and 8H4-G6 (Fig. 7 C) reacted slightly with 28 kDa and 124 kDa proteins and strongly with a 97 kDa protein. Furthermore, each band varied in mass by a few kDa depending on the strain. This is especially the case for strains IAF 464-01 (lane 4) and 20735-2 (lane 9), which suggested that these strains have more variations.

### 3.2. Genetic study

The sequencing of the complete p46 and p97 ORFs has served to verify the genetic variability between the different strains and to confirm the results of the antigenic study using MAbs in Western blotting.

The p46 gene sequence analysis of the 11 field strains compared to the ATCC 25934 reference strain revealed that the 3 TGA codons are conserved in all these strains. The nucleotide homology is higher than 99,1 % and the deduced amino acid homology ranges from 99,8% to 100%. In fact, only Gln235 (CAA) was mutated to a glycine (GGA) in the p46 gene of 9 field strains (IAF 464-01, IAF 669-00, IAF 2186-01, IAF 2355-B-01, IAF DM9827, 20868-B, 40689-2, 01-17577 and 01-18285). Thus, the p46 gene seems to be very conserved amongst the 12 strains used in this study.

Sequence analysis of p97 from the 11 field strains and the ATCC 25934 reference strain revealed much more variability than that observed for p46 gene analysis. The variations are concentrated mainly at the 3' end, in particular in the repeat regions RR1 and RR2. Therefore, the deduced amino acid homology ranged between 97.8% to 99.3% when the entire protein amino acid sequence was considered and it lowered between 94.8% to 98.7% when we narrowed the analysis at the C-terminal end. This is mostly caused by the number of repeat regions. In fact, the RR1region varied from 4 to 17 repeats of 15 nucleotides each encoding 5 amino acids (AAKPE/V) and the RR2 region ranged between 2 to 4 repeats of 30 nucleotides each encoding 10 amino acids (GTPNQGKK(S/A)E) for the different strains (Table 3). The protein molecular mass observed on Western for P97 blot analysis (Fig. 7) correlated with the number of repeats identified in the different isolates (Table 3).

Although, the 3' end of the p97 ORF displayed more variations, the 5'end sequence seemed to be well conserved and only demonstrated a few scattered punctual mutations. Moreover, all the 4 TGA codons are conserved among all the isolates except for strain ATCC 25934 which has only 3 TGA codons as revealed by sequencing (Data not shown).

#### 4. Discussion

The comparison of the p46 ORF sequence of 12 field strains of *M. hyopneumoniae* revealed a high degree of deduced amino acid conservation. Further, Western blot analysis using anti-P46-specific MAbs did not reveal any variation in electrophoretic patterns and always gave a 43 kDa band corresponding to the P46 protein without its signal peptide at the N-terminal end (Futo *et al.*, 1995a). These results suggest that P46 is a well conserved protein among all *M. hyopneumoniae* isolates and also supports the possible use of anti-rec-P46 protein MAbs as a diagnostic tool (Bouh *et al.*, 2003). These MAbs allow a much better specificity in serological and immunohistochemical tests and

eliminate cross-reaction with other swine mycoplasmas such as *M. hyorhinis* and *M. flocculare* that could be observed when polyclonal antibodies are used. The high degree of conservation of P46 is an important characteristic for the use of this protein as a diagnostic tool because it is well known that mycoplasma proteins are subjected to high rates of antigenic variations to escape the host immune system (Rottem, 2003).

Previous studies have reported that the P46 protein induced an early immune response. In fact, infected pigs develop anti-P46 antibodies as soon as 2 weeks post-infection (Futo *et al.*, 1995b). Recently, we have investigated and established that the rec-P46 protein induced the earliest immune response compared to those obtained with other immunodominant proteins of *M. hyopneumoniae* such as rec-P65 and rec-P97 (Cheikh Saad Bouh *et al.*, submitted). This suggests that the rec-P46 membranous protein might be a valuable tool for the design of an ELISA assay to be used for the diagnosis of *M. hyopneumoniae* infected pigs.

The results obtained for the P97 amino-acid sequence analysis revealed that variations are mostly concentrated in the C-terminal region. They consisted of sequence deletions or insertions of either RR1 or RR2 segments which affect the size of the entire P97 protein. The IAF464-01 and 20735-2 strains have the smallest number of repeats and the shortest P97 protein size. This P97 size variation was reflected in the Western blot analysis using the P97-specific MAbs (Figure 7 and Table 3).

However, those size variations cannot explain the multiple band patterns. Similar results have been previously observed by other workers in Western blots of whole-cell lysates of mycoplasma using infected pig sera (Wilton *et al.*, 1998) or specific MAbs (Zhang *et al.*, 1995). The presence of a similar epitope on different antigens (Zhang *et al.*, 1995) or successive post-translational cleavages (Hsu *et al.*, 1997) have been suggested as an explanation. In fact, it has been established that the p97 transcript is translated as a pro-P97 protein of 124 kDa. Then, the first 195 amino acids, at the N-terminal end, are post-translationally cleaved to give approximately a 102 kDa protein which migrates as a 97 kDa product on a polyacrylamide gel (Hsu *et al.*, 1997). Thus, other cleavages may

occur in this large protein and this would explain the observed multiple band pattern (Fig. 7). Moreover, Wilton et al., (1998) have suggested that a 28 kDa protein might be produced from an internal ORF of the p97 gene. They first demonstrated that the 28 kDa protein originated from P97, since in Western blot, an anti-P28 serum reacted against P97 and an anti-P97 serum reacted with P28. They associated this P28 to a putative internal ORF in the p97 gene at the 3' terminal end since they found an ATG start codon located 10 nucleotides downstream of a Shine-Dalgarno sequence, an important element for the internal translation initiation. In our sequence results, we identified the same putative ORF and a possible Shine-Dalgarno sequence in all strains. The sequence motif of the SD was AAGAAG instead of AAGAGA as reported in the J strain used by Wilton et al. (1998). However, it is known that this translation initiation motif is not restricted to a unique sequence (Schurr *et al.*, 1993) but the expression level is affected by the strength of the interaction of the Shine-Dalgarno sequence and the anti-sense binding sequence on the 16 S rRNA (Schurr *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2002). This P28 ORF begins between the RR1 and RR2 repeats. Consequently, if a monoclonal antibody reacts against P28, it is obviously against a non-RR1 epitope. This could be the case for anti-rec-P97C MAbs 2D1-G1, since they reacted with a 28 kDa fragment on Western blot (fig. 7C). This is particularly interesting because it has been reported that the major P97 epitope in mice is located in the RR1 region and many attempts to produce MAbs against non-RR1 region have failed (Minion *et al.*, 2000).

Finally, this study has demonstrated that the P46 protein is well conserved among different isolates of *M. hyopneumoniae*. This result supports the suggestion that the rec-P46 and specific MAbs may be used as diagnostic tools. Our results for the P97 protein confirmed the findings of a previous report by Wilton et al. (1998) which showed that the heterogeneous size of the P97 depends on the number of RR1 and RR2 repeats.

### Acknowledgements

The authors thank Biovet USA, MAPAQ, INRS-IAF- Diagnostic laboratory and Dr. G. Maxie from Guelph University (Ontario, Canada) for providing respectively the *M. hyopneumoniae* infected pork lungs and some *M. hyopneumoniae* strains. We are grateful to Louise Wilson, Lise Cousineau and Martine Boutin for technical support and to Dr. Carl A. Gagnon for helpful discussions. This project has been partly sponsored by the Conseil de Recherches en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (Grant # 4600), La Fédération des Producteurs de Porcs du Québec and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada. (This report was taken in part from a dissertation to be submitted by A. Boisvert to the INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, in partial fulfillment of the requirements for the M. Sc. degree.)

## References

- Armstrong, C.H., Freeman, M.J., Sands-Freeman, L., 1987, Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Isr J Med Sci* 23, 654-656.
- Bouh, K.C., Shareck, F., Dea, S., 2003, Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 459-468.
- Caron, J., Ouardani, M., Dea, S., 2000, Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* 38, 1390-1396.
- Dallo, S.F., Chavoya, A., Su, C.J., Baseman, J.B., 1989, DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 57, 1059-1065.
- Friis, N.F., 1975, Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suisneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27, 337-339.
- Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T., Kawai, K., 1995a, Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J Bacteriol* 177, 1915-1917.
- Futo, S., Seto, Y., Okada, M., Sato, S., Suzuki, T., Kawai, K., Imada, Y., Mori, Y., 1995b, Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 33, 680-683.
- Haldimann, A., Nicolet, J., Frey, J., 1993, DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Gen Microbiol* 139 (Pt 2), 317-323.
- Hsu, T., Artiushin, S., Minion, F.C., 1997, Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol* 179, 1317-1323.
- Hsu, T., Minion, F.C., 1998, Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 66, 4762-4766.

- Kim, M.F., Heidari, M.B., Stull, S.J., McIntosh, M.A., Wise, K.S., 1990, Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect Immun* 58, 2637-2643.
- Kobisch, M., Friis, N.F., 1996, Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15, 1569-1605.
- Ma, J., Campbell, A., Karlin, S., 2002, Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* 184, 5733-5745.
- Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T., 2000, R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68, 3056-3060.
- Rottem, S., 2003, Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 83, 417-432.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, Second Edition, Cold Spring Harbor laboratory, Plainview, NY, USA.
- Schurr, T., Nadir, E., Margalit, H., 1993, Identification and characterization of *E.coli* ribosomal binding sites by free energy computation. *Nucleic Acids Res* 21, 4019-4023.
- Strasser, M., Frey, J., Bestetti, G., Kobisch, M., Nicolet, J., 1991, Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 59, 1217-1222.
- Wilton, J.L., Scarman, A.L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 1998, Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* 144 ( Pt 7), 1931-1943.
- Young, T.F., Thacker, E.L., Erickson, B.Z., Ross, R.F., 2000, A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol* 71, 269-279.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1994, Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 62, 1616-1622.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1995, Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63, 1013-1019.

**Figure 6: Immunobuvardage de type Western démontrant la réactivité des AcMo anti-P46 contre les différents isolats et la souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae***

Figure 6.

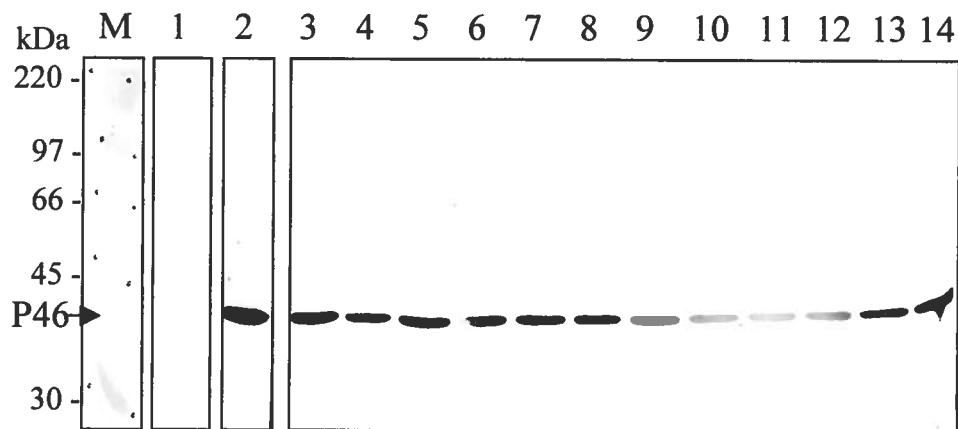


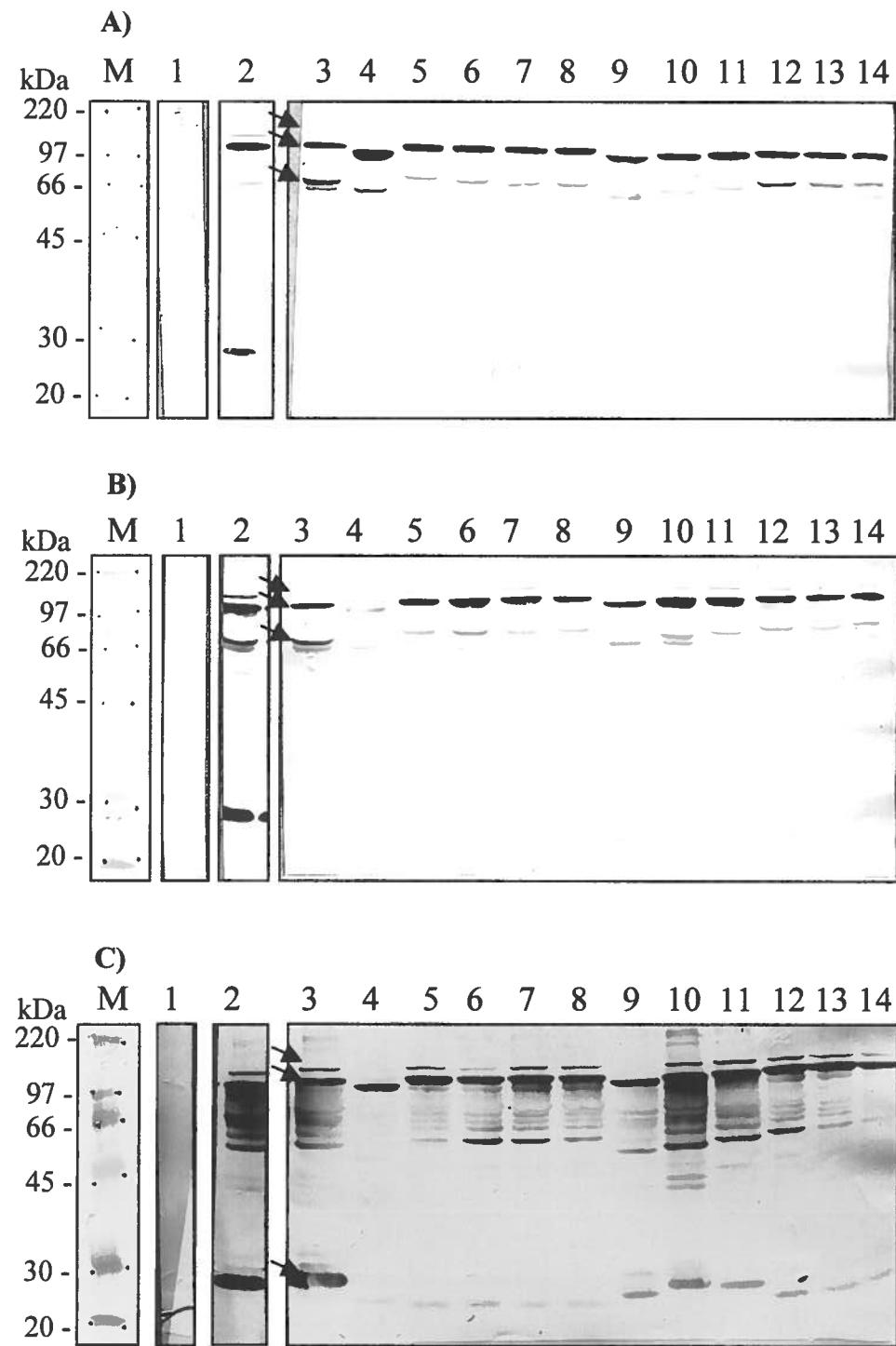
Fig. 6. Reactivity of native antigens of 12 *M. hyopneumoniae* strains with anti-rec-P46 MAbs.

Lane 1: ATCC 25934 strain probed with normal mouse serum, Lane 2: ATCC 25934 strain probed with anti-rec-P46 mouse hyperimmune serum. Lanes 3 to 14: strains ATCC 25934, IAF 464-01, IAF669-00, IAF2186-01, IAF 2355-B-01, IAF-DM9827, 01-17577, 01-17704, 01-18285, 20735-2, 20868-B and 40689-2 probed with anti-rec-P46 4H9-E9 MAb. The band corresponds to the P46 protein. Lane M represents the rainbow colored protein molecular weight markers (Amersham-Pharmacia Biotech).

**Figure 7: Immunobuvardages de type Western démontrant les différents patrons de bandes obtenus lorsque les AcMo anti-P97-C-terminale et anti-P97-totale réagissent contre les différents isolats et la souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*.**

Fig. 7. Reactivity of native antigens of 12 *M. hyopneumoniae* strains with anti-rec-P97 (panel A) or anti-rec-P97C (panels B and C) MAbs.

Lane 1; ATCC 25934 strain probed with normal mouse serum, Lane 2 A; ATCC 25934 strain probed with anti-rec-P97 mouse hyperimmune serum. Lanes 2 B and 2 C: ATCC 25934 strain probed with anti-rec-P97C hyperimmune mouse serum. Lanes 3 to 14; strains ATCC25934, IAF 464-01, IAF669-00, IAF2186-01, IAF 2355-B-01, IAF-DM9827, 20735-2, 20868-B, 40689-2, 01-17577, 01-17704 and 01-18285 probed respectively with anti-rec-P97 40B3 MAb (A), anti-rec-P97C 8H2-H8 MAb (B) or anti-rec-P97C 2D1-G1 MAb (C). The arrows show the major bands of 65, 97 and 124 kDa (A and B) or 28, 97 and 124 kDa (C). Lane M represents the rainbow colored protein molecular weight markers.

**Figure 7.**

**Tableau 2 : Isolats et souches de *M. hyopneumoniae* utilisés lors du projet**

**Table 2**  
*Mycoplasma hyopneumoniae* strains/isolates used

Strains/isolates	Sample year	collection Sources
ATCC 25934	NA	ATCC, USA <sup>b</sup>
IAF 464-01 <sup>a</sup>	2001	Quebec, Canada <sup>c</sup>
IAF 669-00 <sup>a</sup>	2000	Quebec, Canada <sup>c</sup>
IAF 2186-01 <sup>a</sup>	2001	Quebec, Canada <sup>c</sup>
IAF 2355-B-01 <sup>a</sup>	2001	Quebec, Canada <sup>c</sup>
DM9827 <sup>a</sup>	1998	Quebec, Canada <sup>c</sup>
01-17577 <sup>a</sup>	2001	Minnesota, USA <sup>d</sup>
01-17704 <sup>a</sup>	2001	Nebraska, USA <sup>d</sup>
01-18285 <sup>a</sup>	2001	Kansas, USA <sup>d</sup>
20735-2	1996	Ontario, Canada <sup>e</sup>
20868-B	1996	Ontario, Canada <sup>e</sup>
40689-2	1996	Ontario, Canada <sup>e</sup>

a: The described field isolates were obtained from lung homogenates of pigs diagnosed with enzootic pneumonia.

b: from American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA.

c: from Diagnostic Service of INRS-Institut Armand-Frappier, Quebec, Ca.

d: from Biovet USA Inc., USA.

e: from Dr. G. Maxie, Guelph University, Ontario, Ca.

**Tableau 3: Résultats du séquençage du gène p97 des différents isolats et de la souche ATCC 25934**

Table 3

Results of the sequencing of the p97 gene

Strains	No. of repeat regions		Size (bp)	Theoretical MW <sup>a</sup> (kDa)	Observed MW (kDa)
	RR1	RR2			
ATCC 25934	10	5	3279	101	97
IAF 464-01	4	2	3114	96	94
IAF 669-00	17	2	3297	101	97
IAF 2186-01	17	2	3297	101	97
IAF 2355-B-01	17	2	3297	101	97
IAF DM9827	8	4	3234	99	96
20735-2	8	3	3192	98	94
20868-B	8	4	3237	100	96
40689-2	12	4	3282	100	96
01-17577	17	2	3297	101	97
01-17704	17	2	3297	101	97
01-18285	17	2	3297	101	97

a: The theoretical weights were calculated with the program peptidemass on the website: <http://us.expasy.org/tools/peptides-mass.html>.

## **Discussion générale**

La pneumonie enzootique est une maladie respiratoire chronique engendrant un taux faible de mortalité mais un taux élevé de morbidité. De plus, elle est très contagieuse et peut donc se répandre rapidement à tout l'élevage se transmettant par aérosols (Ross, 1992). Les porcs de tous âges peuvent être affectés (Kobisch *et al.*, 1993). Par contre, dans les élevages ce sont principalement les porcs plus jeunes chez qui la maladie est observée puisque les plus âgés auront développé une immunité protectrice suite à un premier contact avec l'agent pathogène (Goodwin *et al.*, 1969). Les principaux signes cliniques sont une toux sèche et non-productive, un retard de croissance malgré le fait que les animaux conservent leur appétit. De plus, cette maladie prédispose à des infections secondaires qui aggravent considérablement l'état des bêtes atteintes et peut même causer leur mort (Ross, 1992). Cette pathologie est répandue mondialement et entraîne d'énormes pertes économiques pour les producteurs. En effet, les coûts engendrés par les retards de croissance, les traitements, les méthodes de prophylaxie ainsi que les mortalités dues aux surinfections sont de l'ordre de 200 millions de dollars annuellement, seulement aux États-Unis (Kobisch et Friis, 1996). Malheureusement, différents problèmes sont associés à la détection et au contrôle de cette maladie dont l'agent étiologique est *Mycoplasma hyopneumoniae* (Goodwin *et al.*, 1965; Maré et Switzer, 1965).

Les buts du programme de recherche du laboratoire consistent donc à développer de nouvelles méthodes de dépistage sensibles et spécifiques à *M. hyopneumoniae* ainsi que des vaccins stimulant une immunité protectrice contre ce pathogène. Pour ce faire, nous comptions utiliser des protéines immunodominantes spécifiques à *M. hyopneumoniae*. En effet, ces protéines ont été suggérées pour être des outils utiles pour le diagnostic ainsi que pour le développement de vaccins sous-unitaires. Dans le laboratoire, les protéines P46 et P97 nous intéressent tout particulièrement, puisqu'elles se sont révélées être parmi les protéines immunodominantes induisant les réponses humorales les plus hâties (Cheikh Saad Bouh *et al.*, 2003 soumis). Par contre, il y a très peu d'études sur les variations antigéniques et génomiques des souches de *M. hyopneumoniae*. Nous voulions donc vérifier les variations possibles pour les protéines P46 et P97 chez divers isolats provenant de régions géographiques différentes.

Lors du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire, les objectifs spécifiques étaient d'analyser les différences antigéniques et génomiques chez différents isolats Nord-Américains de *M. hyopneumoniae*. Onze isolats ont été analysés par immunobuvardages de type Western pour vérifier leur réactivité contre les AcMo anti-P46 et anti-P97, permettant de signaler des différences antigéniques des protéines P46 et P97. Pour ce faire, nous avons utilisés six AcMo anti-P46, quatre AcMo anti-P97-C-terminal et cinq AcMo anti-P97-total ainsi que les sérum polyclonaux de souris anti-P46 et anti-P97. Parallèlement, le séquençage des gènes p46 et p97 de ces mêmes isolats a été réalisé pour rechercher la présence de différences génétiques et aussi confirmer les résultats obtenus lors du volet antigénique.

Lors des immunobuvardages avec le serum de souris anti-P46 et les six AcMo anti-P46, ces anticorps ont tous réagi de façon similaire que ce soit contre la souche de référence ATCC 25934 ou bien contre les différents isolats. C'est-à-dire qu'ils ont tous révélé une seule bande intense de 43 kDa. Cette bande correspond au poids moléculaire de la P46 une fois que son peptide signal en N-terminal est clivé (Futo *et al.*, 1995a). Ce résultat nous a donc amené à penser que la protéine P46 possédait à tout le moins des déterminants antigéniques très conservés entre les différentes souches et isolats. L'analyse des résultats du séquençage s'est avérée encore plus révélatrice du niveau de conservation de la P46. Ainsi, les taux d'homologie en nucléotides et en acides aminés déduits étaient tous deux supérieurs à 99%. En fait, lors de la comparaison de la P46 des isolats à la souche de référence, une seule mutation a été détectée au niveau protéique. Le 235<sup>e</sup> acide aminé, une glutamine, était changé pour une glycine chez la majorité des isolats (IAF 464-01, IAF 669-00, IAF 2186-01, IAF 2355-B-01, IAF DM9827, 20868-B, 40689-2, 01-17577 et 01-18285). Ainsi, la glycine semble être l'acide aminé consensus et c'est plutôt la souche ATCC 25934 et les isolats 20735-2 et 01-17704 qui auraient subi une mutation de cette glycine pour une glutamine. Cette mutation ne semble pas être reliée à une région géographique particulière. Exception faite de cette seule mutation ponctuelle, tout le reste de la protéine était identique pour les différents isolats ainsi que pour la souche de référence ATCC 25934. Ces résultats confirment donc que la P46 est

très conservée chez les isolats étudiés et possiblement chez toutes les souches de *M. hyopneumoniae*.

Nos résultats pour la P97 nous ont permis principalement de constater, comme des études antérieures le démontrent, que des variations sont principalement retrouvées dans la partie C-terminale de la P97 (King *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997). En effet, les taux d'homologie se situent entre 98 et 99% pour la protéine en entier et ils chutent à 94 à 98% lorsque seule la partie C-terminale était comparée entre les différents isolats (Annexe II, Tableau 4). En effet, les régions répétées RR1 varient de 4 à 17 répétitions et de 2 à 5 pour le RR2. Des résultats similaires avaient été obtenus par Wilton *et al.*, (1998). Outre la variation du nombre de répétitions des régions RR1 et RR2, la majorité de la protéine des différents isolats et de la souche ATCC 25934 est bien conservée puisque seulement quelques mutations éparses ont été retrouvées (Annexe II, Tableau 5). Des mutations similaires de la P97 sont parfois retrouvées pour des souches d'une région donnée. Par exemple, la protéine P97 est identique chez les souches québécoises IAF 669-00, IAF 2186-01 et IAF 2355-B-01. Par contre, à l'intérieur d'une même localisation géographique on distingue aussi des souches qui possèdent des mutations de la P97 qui sont très différentes. Ainsi, les souches québécoises, IAF 464-01 et IAF DM9827 ne montrent pas les mêmes mutations que les souches mentionnées précédemment. De plus, les souches 01-17577 et 01-18285 provenant des États-Unis (Minnesota et Kansas) possèdent une P97 identique à celles des souches québécoises du groupe de IAF 669-00. Ainsi, les mutations de la P97 ne sont donc pas nécessairement représentatives d'une localisation particulière. Cela indique aussi que les souches de champs sont hétérogènes comme les travaux de Frey *et al.* (1992) et Artushin et Minion (1996) l'avaient démontré auparavant.

Les adhésines varient donc en taille dépendamment du nombre de répétitions de RR1 et RR2 qu'elles comportent. Les tailles se situaient donc entre 94 et 97 kDa lors de leur migration sur des gels SDS-PAGE, ce qui a été observé lors de l'analyse des différents immunobuvardages de type Western utilisant les AcMo anti-P97-C-terminal et anti-P97-totale. Ce genre de variations a été suggéré pour faire partie d'un mécanisme

d'évasion au système immunitaire des mycoplasmes. En effet, ces microorganismes engendrent des réarrangements de leurs protéines de surface en variant l'expression ou la taille de ces dernières pour ainsi échapper à la surveillance des nombreuses cellules immunitaires. (Rosengarten et Wise, 1990; Yogeve *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1993; Wise, 1993).

Outre la variation de taille de l'adhésine, différents patrons de bandes ont aussi été observés lors des immunobuvardages. Cela n'était pas étonnant puisque d'autres d'études avaient obtenu des résultats semblables (Zhang *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1997). Ainsi, parmi les bandes les plus communes, on retrouve celles de 28, 65, 97 et 124 kDa qui ont été révélées avec les AcMo anti-P97-C-terminal, anti-P97-totale et les anticorps de souris anti-P97 polyclonaux. La bande de 124 kDa correspond à la pro-protéine dont les 195 premiers acides aminés sont clivés pour donner la P97 (Hsu *et al.*, 1997). Il n'est donc pas impossible que d'autres clivages post-traductionnels aient lieu dans la protéine donnant ainsi le profil à bandes multiples observé en immunobuvardage. Toutefois, il a été suggéré que la P28 soit produite à partir d'un ORF interne dans le gène p97 (Wilton *et al.*, 1998). En effet, la présence d'un ATG situé aval d'une séquence Shine Dalgarno, qui est une séquence nucléotidique permettant l'initiation de la traduction, semble indiquer que la P28 peut être exprimée à partir de cet ORF (Schurr *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2002). Ce même motif a été observé chez tous nos isolats, de même que pour la souche de référence (Annexe II: les séquences du gène p97). De plus, une bande de 28 kDa était présente dans les immunobuvardages. Si la bande de 28 kDa correspond bien à la P28 décrit par Wilton *et al.* (1998) cela signifierait que nous aurions des anticorps réagissant contre des parties de la P97 autres que la RR1. Donc, contrairement à ce qui a déjà été rapporté (Minion *et al.*, 2000), d'autres parties de la P97 seraient immunogènes chez la souris. Ceci demeure toutefois à être confirmé en caractérisant ces AcMo anti-P97 et en vérifiant s'ils réagissent contre la P28 recombinante.

Nos résultats semblent démontrer que la P46 est une protéine très bien conservée entre les différents isolats de *M. hyopneumoniae*. Donc, elle aurait probablement un rôle biologique essentiel. Toutefois, lors de sa découverte, aucune fonction n'avait été

associée à cette protéine. Une recherche récente dans les banques de données a montré que la protéine P46 possède des domaines conservés qui sont retrouvés principalement dans des protéines qui lient les sucres ou bien d'autres impliquées dans le transport des sucres (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrvcgi>). Cette fonction permettrait donc l'apport en sucres à ce mycoplasme, ce qui est très plausible puisque *M. hyopneumoniae* tire son énergie en fermentant le glucose (Kobisch et Friis, 1996). D'un autre côté, il est connu que les récepteurs cellulaires des mycoplasmes sont des sucres, il n'est donc pas exclut que la P46 puisse jouer un rôle dans le mécanisme d'adhésion de ce microorganisme (Zielinski et Ross, 1993; Zhang *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1994b; Zhang *et al.*, 1995).

La P46 est une protéine immunodominante qui induit une réponse humorale hâtive, c'est-à-dire environ deux semaines post-infection (Futo *et al.*, 1995b; Cheikh Saad Bouh *et al.*, en préparation). Elle est de surcroît une protéine hautement conservée chez tous les isolats provenant de différentes régions géographiques. Cette nouvelle caractéristique ajoute un argument supplémentaire pour l'utilisation de cette protéine comme outil diagnostique pour détecter *M. hyopneumoniae*, de même que comme vaccin sous-unitaire. En effet, un essai d'immunisation avec différentes protéines recombinantes, dont la P46, a permis de vérifier la protection obtenue avec ces vaccins sous-unitaires (Cheikh Saad Bouh 2003, soumis). Bien que la protection accordée par cette protéine ne soit que partielle, une réduction significative des lésions pulmonaires a été observée en comparaison avec les témoins non-vaccinés. Ainsi les vaccins sous-unitaires avec cette protéine seront peut-être une alternative aux vaccins (bactérines) présentement sur le marché.

Les résultats obtenus pour la P97 ont permis de constater que les variations des répétitions observées chez les isolats nord-américains étaient similaires aux résultats de l'équipe australienne (Wilton *et al.*, 1998). De plus, les AcMo réagissent avec un antigène d'une taille de 28 kDa qui correspond possiblement à la P28 décrite par Wilton *et al.* (1998). Cela signifierait alors que, contrairement à ce qui a été suggéré par Minion *et al.*,

(2000), d'autres parties de la P97 sont immunogènes chez la souris. Une caractérisation plus approfondie des AcMo P97 permettra de vérifier cette hypothèse.

Finalement, ce projet de maîtrise a permis d'acquérir des informations supplémentaires sur les caractéristiques des protéines immunodominantes P46 et P97. L'accumulation de notions sur les différentes protéines immunodominantes importantes permet de mieux comprendre la biologie et les mécanismes de pathogenèse de *M. hyopneumoniae*. Éventuellement, ces protéines pourront servir à la mise au point de nouvelles techniques de diagnostic et à la production de vaccins sous-unitaires contre ce pathogène. Cela permettra de mieux contrôler la pneumonie enzootique dans les élevages et de réduire les pertes économiques qui y sont associées.

## **Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier Serge Dea, mon directeur de maîtrise, qui m'a accueillie non seulement dans son laboratoire mais aussi dans sa grande famille formée de ses nombreux étudiants. Malheureusement, Serge nous a quitté mais je garderai toujours le souvenir de lui comme un homme excessivement généreux et qui aura consacré sa vie à l'avancement de la science, à ses étudiants ainsi qu'à sa famille.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à mon codirecteur, François Shareck, qui m'a encadré suite au départ précipité de Serge. Merci François!

Je remercie toutes les personnes de l'édifice 27, tant les étudiants que les techniciens et techniciennes que j'ai côtoyés durant mon séjour parmi eux. J'ai vraiment passé de bons moments avec vous tous!

Finalement, les derniers mais non les moindres, je souhaite remercier mes amis, ma famille et Mathieu, qui m'ont encouragée et me donnait l'énergie pour continuer par leur sempiternelle question: «Quand est-ce que tu finis, Annie?».

Je vous remercie tous et toutes du plus profond de mon coeur! Je peux enfin vous répondre, que j'ai terminé ma maîtrise et que je suis prête à débuter une nouvelle étape de ma vie!

## **Annexes**

## Annexe I: Liste des présentations et des séances d'affiches

### Publication en préparation:

Cheikh Saad Bouh, K., Boisvert, A., Wilson, L., Shareck, F. and Dea, S., 2003. Kinetics of the humoral immune response in pigs to individual *E. coli*-expressed and authentic p46, p65 and p97 membrane-anchored proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the potential use of recombinant proteins for early specific diagnosis (article en préparation).

### Ma contribution pour cet article:

Les travaux qui seront présentés dans cet article étaient principalement ceux de Kane Cheikh Saad Bouh. Ils n'étaient donc pas relier directement à mon projet de maîtrise. J'y ai quand même participé, en faisant la production d'antigènes complets de la souche de référence ATCC 25934. J'ai aussi utilisé ces antigènes pour faire les immunobuvardages de type Western pour suivre la cinétique d'apparition des anticorps anti-P46, anti-P65 et anti-P97, ainsi que pour les immunobuvardages de l'hyper immunisation des porcs avec les protéines recombinantes.

**Liste des séances d'affiche:**

1. K.Cheikh Saad Bouh\*, L.Wilson, A. Boisvert , N. Sawyer, F. Shareck et S. Dea (2000) : Prokaryotic expression and antigenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* P46 and P65 membranous proteins. 81<sup>th</sup> Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) Chicago, Illinois, U.S.A. Abstract No 152, du 11 au 14 novembre 2000.
2. K.Cheikh Saad Bouh\*, A. Boisvert, L.Wilson, F. Shareck et S. Dea (2000) : Expression prokaryotique des protéines membranaires P46 et P65 de *Mycoplasma hyopneumoniae* et production d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'espèces. 2<sup>e</sup> Congrès INRS-Institut Armand-Frappier, Mont Gabriel, Québec, Canada, du 1<sup>er</sup> au 3 novembre 2001.
3. K.Cheikh Saad Bouh, A. Boisvert\*, L.Wilson, F. Shareck et S. Dea (2000) : Cinétique de la production d'anticorps chez les porcs contre les protéines membranaires de *Mycoplasma hyopneumoniae*: application pour le diagnostic sérologique. 2<sup>e</sup> Congrès INRS-Institut Armand-Frappier, Mont Gabriel, Québec, Canada, du 1<sup>er</sup> au 3 novembre 2001.
4. K.Cheikh Saad Bouh\*, L.Wilson, A. Boisvert , N. Sawyer, F. Shareck et S. Dea(2001) : *E.coli*-expression of membranous P46 and P65 proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and production of species-specific monoclonal antibodies. X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnostician and OIE Seminar on Biotechnology, Sasomaggiore, Parm, Italie, du 4 au 7 juillet 2001.
5. K.Cheikh Saad Bouh\*, A. Boisvert, F. Shareck et S. Dea (2002) : Directed mutagenesis and *E. coli* expression of P46 and P65 membranous proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* and use of MAbs for indirect immunofluorescence (IIF) and immunoperoxidase (IIP). 83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the CRWAD, St-Louis, Missouri, U.S.A, du 10 au 12 novembre, 2002.
6. K.Cheikh Saad Bouh\*, A. Boisvert, L. Wilson, F. Shareck et S. Dea (2003) : Monoclonal antibodies against P46 and P65 rec. proteins for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection by indirect immunofluorescence (IIF) and immunoperoxidase (IP). 53<sup>e</sup> Congrès annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, Laval, Québec, Canada, du 25 au 28 mai 2003.
7. A. Boisvert\*, K. Cheikh Saad Bouh, L. Wilson, M. Boutin, A. Kheyar, F. Shareck and S. Dea. Antigenic and genomic variability of P46 and P97 of 11 North American strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 53<sup>e</sup> Congrès annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, Laval, Québec, Canada, du 25 au 28 mai 2003.

## Annexe II: Résultats des séquençages des gènes p46 et p97

**Tableau 4 : Pourcentage d'homologie en nt du gène p97 et en aa de la protéine P97 pour les différentes souches utilisées de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Souches	% Homologie en nt		% Homologie en aa	
	p97 total	3'term de p97	P97 totale	C-term de P97
ATCC 25934	100%	100%	100%	100%
IAF 464-01	98.9%	98.7%	99.3%	98.7%
IAF 669-00	98.1%	94.4%	98.4%	94.8%
IAF 2186-01	98.1%	94.4%	98.4%	94.8%
IAF 2355-B-01	98.1%	94.4%	98.4%	94.8%
IAF DM9827	97.6%	94.3%	98.5%	97.0%
20735-2	98.1%	94.7%	98.7%	96.0%
20868-B	97.9%	94.3%	98.5%	96.9%
40689-2	97.7%	93.7%	97.8%	95.1%
01-17577	98.1%	94.4%	98.4%	94.8%
01-17704	98.2%	94.4%	98.4%	94.8%
01-18285	98.1%	94.4%	98.4%	94.8%
232	97.6%	94.0%	98.1%	95.1%

La comparaison est faite par rapport à la souche de référence ATCC 25934.

Note :

1. Les portions 3'terminales du gène p97 et les parties C-terminales de la protéine P97 ont été prises à partir de la première répétition RR1.

Tableau 5 : Mutations en acides aminés de la protéine P97 comparée au consensus

Position	aa	Souches <sup>a</sup>											Codons	
		Québec						É.-U.		Ontario				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
223	A/P						x			x		x		GCT/CCT
261	E/K						x			x		x		GAA/AAA
373	A/S			x	x	x		x		x		x		GCA/TCA
444	T/K						x			x		x		TAC/TAA
464	P/S											x		TCA/CCA
503	Y/N						x							TAT/AAT
502-503	S de plus													TCA de plus
583	T/A		x					x		x	x		x	ACA/GCA
635	Q/R	x								x	x	x		CAG/AGG
635	Q/W						x							CAG/TGA
641	E/G		x				x				x	x		GAG/GGG
642	A/V	x								x	x			GCT/GTT
645	Y/D									x				TAT/GAT
661	W/G/L/S	x					x				x	x		TGG/GGG/TTG/TGG
663	K/E									x				GAA/AAA
671	K/N										x			AAC/AAA
830	A/T											x		GCA/ACA
831	A/T											x		GCA/ACA
890	A/G									x				GCA/GGA
891	A/T	x	x				x			x				GCT/ACT
892	K/N	x	x				x			x				AAA/AAT
893	P/T	x	x				x			x				CCA/ACT
894	E/N	x	x				x			x				GAA/AAC
953	E/D									x	x			GAA/GAC
955	K/E										x	x		AAA/GAA
977	A/T	x	x						x		x	x		ACT/GCT
979	D/E	x	x											GAC/GAA
993	S/T								x		x			TCT/ACT
994	S/P/Q	x							x		x			TCA/CCT/CAA
1000	A/G/S								x		x	x		GCA/GGT/AGT
1003	A/T								x		x	x		GCT/ACT
1015	S/N										x			AGT/AAC
1033	A/T													GCT/ACT
1035	S/N													AGT/AAC
1043	T/A	x										x		ACT/GCT
1044	S/P									x		x		TCT/CCT
1045	N/S											x		AAC/AGT
1048	N/S	x	x					x		x	x	x		AAC/AGC
1049	T/P							x		x	x	x		ACA/CCA
1051	T/S							x		x		x		ACC/AGC
1059	D/E	x	x	x	x	x	x		x					GAC/GAA
1126	L/P		x	x	x		x		x			x		TTA/CCA
1127	K/E											x		AAA/GAA

Note : .

a: Les numéros correspondent aux souches suivantes : 1 = ATCC 25934, 2 = IAF464-01, 3 = IAF669-00, 4 = IAF2186-01, 5 = IAF 2355-B-01, 6 = IAF DM9827, 7 = 01-17577, 8 = 01-17704, 9 = 01-18285, 10 = 20735-2, 11 = 20868-B, 12 = 40689-2, 13 = 232 (séquence sur genbank : U50901)

Alignement des séquences du gène p46 de la souche de référence ATCC 25934 et des 11 isolats de champs de *M. hyopneumoniae*.

		1		50
ATCC25934	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
IAF 464-01	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
IAF 669-00	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
IAF 2186-01	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
IAF 2355-B-01	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
IAF DM9827	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
20735-2	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
20868-B	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
40689-2	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
01-17577	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
01-17704	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
01-18285	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
Consensus	ATGAAAAAAA	TGCTTAGAAA	AAAATTCTTG	TATTCATCAG CTATTTATGC
		51		100
ATCC25934	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
IAF 464-01	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
IAF 669-00	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
IAF 2186-01	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
IAF 2355-B-01	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
IAF DM9827	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
20735-2	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
20868-B	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
40689-2	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
01-17577	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
01-17704	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
01-18285	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
Consensus	AACCTCGCTT	GCATCAATT	TTGCATTTGT	TGCAGCAGGT TGTGGACAGA
		101		150
ATCC25934	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCA	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACTCTAAAA
IAF 464-01	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
IAF 669-00	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACTCTAAAA
IAF 2186-01	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACTCTAAAA
IAF 2355-B-01	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
IAF DM9827	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
20735-2	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
20868-B	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
40689-2	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
01-17577	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACTCTAAAA
01-17704	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA
01-18285	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACTCTAAAA
Consensus	CAGAACTCAGG	TTCGACTTCT	GATTCTAAC	CACAAGCCGA GACGCTAAAA

						200
ATCC25934	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
IAF 464-01	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
IAF 669-00	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
IAF 2186-01	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
IAF 2355-B-01	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
IAF DM9827	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
20735-2	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
20868-B	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
40689-2	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
01-17577	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
01-17704	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
01-18285	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
Consensus	CATAAAAGTAA	GTAATGATT	TATTCGAATA	GCACTAACCG	ATCCGGATAA	
						250
ATCC25934	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
IAF 464-01	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
IAF 669-00	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
IAF 2186-01	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
IAF 2355-B-01	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
IAF DM9827	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
20735-2	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
20868-B	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
40689-2	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
01-17577	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
01-17704	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
01-18285	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
Consensus	TCCTCGATGA	ATTAGTGCCC	AAAAAGATAT	TATTTCTTAT	GTTGATGAAA	
						300
ATCC25934	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
IAF 464-01	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAGAATAAAC	
IAF 669-00	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAGAATAAAC	
IAF 2186-01	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAGAATAAAC	
IAF 2355-B-01	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAGAATAAAC	
IAF DM9827	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
20735-2	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
20868-B	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
40689-2	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
01-17577	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
01-17704	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAAATAAAC	
01-18285	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACAGAATAAAC	
Consensus	CAGAGGCAGC	AACTTCAACA	ATTACAAAAAA	ACCAGGATGC	ACA-AATAAAC	
						350
ATCC25934	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
IAF 464-01	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
IAF 669-00	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
IAF 2186-01	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
IAF 2355-B-01	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
IAF DM9827	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGC CCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
20735-2	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGC CCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
20868-B	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGC CCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
40689-2	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
01-17577	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
01-17704	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGC CCA	GCgC AAAAG	GATTTATTAT	
01-18285	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCAC AAAAG	GATTTATTAT	
Consensus	TGACTCACTC	AGCAAGCTAA	TTTAAGTCCA	GCCCCAAAAG	GATTTATTAT	

		351		400
ATCC25934	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
IAF 464-01	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
IAF 669-00	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
IAF 2186-01	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
IAF 2355-B-01	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
IAF DM9827	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
20735-2	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
20868-B	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
40689-2	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
01-17577	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
01-17704	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
01-18285	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
Consensus	TGCCCCCTGAA	AATGGAAGTG	GAGTTGGAAC	TGCTGTTAAT
		401		450
ATCC25934	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
IAF 464-01	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
IAF 669-00	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
IAF 2186-01	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
IAF 2355-B-01	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
IAF DM9827	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
20735-2	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
20868-B	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
40689-2	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
01-17577	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
01-17704	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
01-18285	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
Consensus	ATAAAAGGAAT	TCCGATTGTT	GCCTATGATC	GACTAATTAC
		451		500
ATCC25934	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
IAF 464-01	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
IAF 669-00	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
IAF 2186-01	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
IAF 2355-B-01	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
IAF DM9827	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
20735-2	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
20868-B	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
40689-2	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
01-17577	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
01-17704	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
01-18285	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
Consensus	AAATATGATT	GGTATGTTTC	TTTGATAAT	GAAAAAGTTG
		501		550
ATCC25934	AGGTCTTCA	CTTGCgCGGG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
IAF 464-01	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
IAF 669-00	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
IAF 2186-01	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
IAF 2355-B-01	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
IAF DM9827	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
20735-2	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
20868-B	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
40689-2	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
01-17577	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
01-17704	AGGTCTTCA	CTTGCGcGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
01-18285	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT
Consensus	AGGTCTTCA	CTTGCTGC GG	GTCTATTAGG	AAAAGAAGAT

					551		600
ATCC25934	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
IAF 464-01	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
IAF 669-00	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
IAF 2186-01	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
IAF 2355-B-01	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
IAF DM9827	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
20735-2	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
20868-B	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
40689-2	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
01-17577	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
01-17704	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
01-18285	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
Consensus	ATTCAATTGA	TCAAATGAAT	GAATATCTAA	AATCACATAT	GCCCCAAGAG		
					601		650
ATCC25934	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
IAF 464-01	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAACtCCCA		
IAF 669-00	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
IAF 2186-01	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
IAF 2355-B-01	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
IAF DM9827	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
20735-2	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
20868-B	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
40689-2	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAACtCCCA		
01-17577	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
01-17704	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
01-18285	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
Consensus	ACAATTCTT	TTTATACAAT	CGCGGGTTCC	CAAGATGATA	ATAATTCCCA		
					651		700
ATCC25934	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
IAF 464-01	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
IAF 669-00	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
IAF 2186-01	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
IAF 2355-B-01	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
IAF DM9827	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
20735-2	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
20868-B	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
40689-2	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
01-17577	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
01-17704	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
01-18285	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
Consensus	ATATTTTAT	AATGGTGCAA	TGAAAGTACT	TAAAGAATT	ATGAAAAATT		
					701		750
ATCC25934	CGcaAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
IAF 464-01	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
IAF 669-00	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
IAF 2186-01	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
IAF 2355-B-01	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
IAF DM9827	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
20735-2	CGcaAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
20868-B	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
40689-2	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
01-17577	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
01-17704	CGcaAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
01-18285	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		
Consensus	CGGGAAATAA	AATAATTGAT	TTATCTCCTG	AAGGCAGAAA	TGCTGTTTAT		

		751		800
ATCC25934	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
IAF 464-01	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
IAF 669-00	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
IAF 2186-01	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
IAF 2355-B-01	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
IAF DM9827	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
20735-2	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
20868-B	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
40689-2	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
01-17577	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
01-17704	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
01-18285	GTCCCAGGAT	GAAATTATGG	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
Consensus	GTCCCAGGAT	<u>GAAATTATGG</u>	AACTGCCGT	CAAAGAATCC
		801		850
ATCC25934	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
IAF 464-01	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
IAF 669-00	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
IAF 2186-01	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
IAF 2355-B-01	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
IAF DM9827	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
20735-2	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
20868-B	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
40689-2	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
01-17577	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
01-17704	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
01-18285	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
Consensus	AACAATTAAC	AAAGATCCAG	CAGGTGGTAA	TAAAATCAAA
		851		900
ATCC25934	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
IAF 464-01	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
IAF 669-00	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
IAF 2186-01	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
IAF 2355-B-01	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
IAF DM9827	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
20735-2	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
20868-B	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
40689-2	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
01-17577	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
01-17704	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
01-18285	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
Consensus	CAAAACCAGC	TTCTATTTTC	AAAGGATTTC	TTGCCCAAA
		901		950
ATCC25934	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
IAF 464-01	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
IAF 669-00	GCCGAACAAG	CgATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
IAF 2186-01	GCCGAACAAG	CgATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
IAF 2355-B-01	GCCGAACAAG	CgATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
IAF DM9827	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
20735-2	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
20868-B	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
40689-2	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
01-17577	GCCGAACAAG	CgATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
01-17704	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
01-18285	GCCGAACAAG	CgATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG
Consensus	GCCGAACAAG	CAATCACCAA	ATTAAAACCTT	GAAGGATTTG

		951		1000
ATCC25934	AATCTTTGTA	ACTGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
IAF 464-01	AATCTTTGTA	ACTGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
IAF 669-00	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
IAF 2186-01	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
IAF 2355-B-01	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
IAF DM9827	AATCTTTGTA	ACTGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
20735-2	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
20868-B	AATCTTTGTA	ACTGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
40689-2	AATCTTTGTA	ACTGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
01-17577	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
01-17704	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
01-18285	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
Consensus	AATCTTTGTA	ACCGGTCAAG	ATTATAATGA	TAAAGCCAAA
		1001		1050
ATCC25934	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
IAF 464-01	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
IAF 669-00	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
IAF 2186-01	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
IAF 2355-B-01	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
IAF DM9827	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
20735-2	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
20868-B	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
40689-2	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
01-17577	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
01-17704	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
01-18285	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
Consensus	AAGACGGCGA	TCAAAATATG	ACAATTATA	AACCTGATAA
		1051		1100
ATCC25934	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
IAF 464-01	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
IAF 669-00	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
IAF 2186-01	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
IAF 2355-B-01	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
IAF DM9827	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
20735-2	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
20868-B	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
40689-2	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
01-17577	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
01-17704	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
01-18285	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
Consensus	AAAGTTGCTG	TTGAAGTTCT	TCGGGTTTTA	ATTGCAAAGA
		1101		1150
ATCC25934	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	AGCAAAaCTA
IAF 464-01	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	AGCAAAGCTA
IAF 669-00	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
IAF 2186-01	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
IAF 2355-B-01	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
IAF DM9827	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
20735-2	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
20868-B	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
40689-2	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
01-17577	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
01-17704	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
01-18285	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA
Consensus	ATCTAGATCA	GAAGTCGAAA	ACGAACCTAA	gGCAAAGCTA

		1151		1200
ATCC25934	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
IAF 464-01	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
IAF 669-00	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
IAF 2186-01	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
IAF 2355-B-01	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
IAF DM9827	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
20735-2	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
20868-B	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
40689-2	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
01-17577	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
01-17704	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
01-18285	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
Consensus	CATTTAAATA	TGATAATCAA	ACATATAAAG	TGCAAGGTAA AAATATTAAT
		1201		1250
ATCC25934	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
IAF 464-01	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
IAF 669-00	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
IAF 2186-01	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
IAF 2355-B-01	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
IAF DM9827	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
20735-2	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
20868-B	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
40689-2	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
01-17577	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
01-17704	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
01-18285	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
Consensus	ACAATTTCAGT	TAAGTCCAGT	AATTGTTACA	AAAGCTAATG TTGATAATCC
	1251	1260		
ATCC25934	TGATGCCTAA			
IAF 464-01	TGATGCCTAA			
IAF 669-00	TGATGCCTAA			
IAF 2186-01	TGATGCCTAA			
IAF 2355-B-01	TGATGCCTAA			
IAF DM9827	TGATGCCTAA			
20735-2	TGATGCCTAA			
20868-B	TGATGCCTAA			
40689-2	TGATGCCTAA			
01-17577	TGATGCCTAA			
01-17704	TGATGCCTAA			
01-18285	TGATGCCTAA			
Consensus	TGATGCCTAA			

Notes :

- 1-Les **TGA** codent pour le tryptophane.
- 2-Le codon **GGA** représente une mutation pour une glycine.
- 3-Les lettres minuscules représentent des mutations de bases.

Alignement des séquences du gène p97 de la souche de référence ATCC 25934 et des isolats de champs de *M. hyopneumoniae* ainsi que de la séquence de la souche 232A : numéro de Genbank U50901

		1		50
ATCC25934	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGaATTGT		
IAF 464-01	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
IAF 669-00	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
IAF 2186-01	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
IAF 2355-B-01	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
IAF-DM9827	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
01-17577	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
01-17704	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGaATTGT		
01-18285	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
20735-2	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGaATTGT		
20868-B	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
40689-2	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
232A	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGaATTGT		
Consensus	ATGAGTAAAA AATCAAAAAC	ATTTAAAATT GGTTTGACTG CCGGGATTGT		
		51		100
ATCC25934	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGcC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
IAF 464-01	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
IAF 669-00	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
IAF 2186-01	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
IAF 2355-B-01	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
IAF-DM9827	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
01-17577	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
01-17704	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
01-18285	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
20735-2	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
20868-B	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
40689-2	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
232A	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
Consensus	TGGTCTTGGGA GTTTTTGGTC	TAAC TGT CGG ACT TAG CAGC TTGGCAAAT		
		101		150
ATCC25934	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
IAF 464-01	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
IAF 669-00	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
IAF 2186-01	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
IAF 2355-B-01	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
IAF-DM9827	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
01-17577	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
01-17704	ACAGATCAGA AAGtCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
01-18285	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
20735-2	ACAGATCAGA AAGtCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
20868-B	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
40689-2	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
232A	ACAGATCAGA AAGtCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		
Consensus	ACAGATCAGA AAGCCCACGA	AAGATTGCAA ATGATTTTGC CGCAAAAGTT		

					151		200
ATCC25934	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
IAF 464-01	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
IAF 669-00	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
IAF 2186-01	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
IAF 2355-B-01	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
IAF-DM9827	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
01-17577	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
01-17704	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
01-18285	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
20735-2	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
20868-B	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
40689-2	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
232A	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
Consensus	TCAACATTAG	CTTTTAGTCC	TTATGCTTT	GAGACTGATT	CTGATTATAA		
					201		250
ATCC25934	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
IAF 464-01	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
IAF 669-00	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
IAF 2186-01	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
IAF 2355-B-01	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
IAF-DM9827	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
01-17577	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
01-17704	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
01-18285	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
20735-2	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
20868-B	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
40689-2	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
232A	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
Consensus	AATAGTCAAA	AGGTGACTAG	TTGATTCTAA	TAACAATATT	AGAAATAAAAG		
					251		300
ATCC25934	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
IAF 464-01	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
IAF 669-00	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
IAF 2186-01	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
IAF 2355-B-01	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
IAF-DM9827	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
01-17577	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
01-17704	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
01-18285	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
20735-2	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
20868-B	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TaATCAGTTA		
40689-2	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
232A	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
Consensus	AAAAAGTTAT	TGATTCCTT	TCCTTTTTA	CTAAAAACGG	TGATCAGTTA		
					301		350
ATCC25934	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAaGCGA	AaATAACTTT		
IAF 464-01	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAaGCGA	AaATAACTTT		
IAF 669-00	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAGGCGA	AGATAACTTT		
IAF 2186-01	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAGGCGA	AGATAACTTT		
IAF 2355-B-01	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAGGCGA	AGATAACTTT		
IAF-DM9827	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAaGCGA	AaATAACTTT		
01-17577	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAAGGCGA	AGATAACTTT		
01-17704	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAAGGCGA	AGATAACTTT		
01-18285	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAAGGCGA	AGATAACTTT		
20735-2	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAAGGCGA	AGATAACTTT		
20868-B	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAaGCGA	AaATAACTTT		
40689-2	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAaGCGA	AaATAACTTT		
232A	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAGGCGA	AGATAACTTT		
Consensus	GAAAAAATTAA	ATTTTCAAGA	TCCTGAATAT	ACCAAGGCGA	AGATAACTTT		

		351		400
ATCC25934	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
IAF 464-01	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
IAF 669-00	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
IAF 2186-01	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
IAF 2355-B-01	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
IAF-DM9827	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
01-17577	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
01-17704	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
01-18285	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
20735-2	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
20868-B	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
40689-2	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
232A	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
Consensus	TGAGATTCTT	GAAATTATCC	CTGATGATGT	CAATCAAAAT
		401		450
ATCC25934	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
IAF 464-01	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
IAF 669-00	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
IAF 2186-01	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
IAF 2355-B-01	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
IAF-DM9827	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
01-17577	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
01-17704	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
01-18285	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
20735-2	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
20868-B	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
40689-2	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
232A	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
Consensus	AATTCAGGC	ATTACAAAAA	CTTCATAATG	GTGATATTGC
		451		500
ATCC25934	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
IAF 464-01	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
IAF 669-00	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
IAF 2186-01	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
IAF 2355-B-01	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
IAF-DM9827	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
01-17577	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
01-17704	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
01-18285	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
20735-2	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
20868-B	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
40689-2	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
232A	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
Consensus	ATTTATGAGC	AAACAGTTGC	TTTGCCAAA	CAGTCAAATC
		501		550
ATCC25934	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
IAF 464-01	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
IAF 669-00	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
IAF 2186-01	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
IAF 2355-B-01	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
IAF-DM9827	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
01-17577	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
01-17704	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
01-18285	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
20735-2	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
20868-B	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
40689-2	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
232A	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA
Consensus	CGAATTAAAT	TTTCGCTTA	AAAAAATTAC	CGAAAAAATTA

		551		600
ATCC25934	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
IAF 464-01	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
IAF 669-00	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
IAF 2186-01	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
IAF 2355-B-01	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
IAF-DM9827	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
01-17577	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
01-17704	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
01-18285	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
20735-2	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
20868-B	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
40689-2	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
232A	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
Consensus	TTGAAAATTT	ATCAACAAAAA	ATTACAAATT	TTGCTGATGA AAAAACAAAGC
		601		650
ATCC25934	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
IAF 464-01	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
IAF 669-00	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
IAF 2186-01	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
IAF 2355-B-01	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
IAF-DM9827	AGCCAAAAAAG	ATCCCaTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
01-17577	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
01-17704	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
01-18285	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
20735-2	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
20868-B	AGCCAAAAAAG	ATCCCaTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
40689-2	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
232A	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGACTTCC AATACGATT
Consensus	AGCCAAAAAAG	ATCCCCTCAAC	TCTAAGAGCT	ATTGATTTCC AATACGATT
		651		700
ATCC25934	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
IAF 464-01	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
IAF 669-00	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
IAF 2186-01	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
IAF 2355-B-01	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
IAF-DM9827	AAATACAGCG	CGAAATcCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
01-17577	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
01-17704	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
01-18285	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
20735-2	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
20868-B	AAATACAGCG	CGAAATcCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
40689-2	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
232A	AAATACAGCG	CGAAATcCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
Consensus	AAATACAGCG	CGAAATGCTG	AGGATTTAGA	TATAAAGCTT GCTAATT
		701		750
ATCC25934	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
IAF 464-01	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
IAF 669-00	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
IAF 2186-01	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
IAF 2355-B-01	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
IAF-DM9827	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
01-17577	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
01-17704	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
01-18285	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
20735-2	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
20868-B	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
40689-2	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
232A	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT
Consensus	TTCCAGTACT	TAAAAAATTTA	ATAAACAGAC	TAAATAATGC TCCTGAGAAT

		751		800
ATCC25934	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
IAF 464-01	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
IAF 669-00	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
IAF 2186-01	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
IAF 2355-B-01	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
IAF-DM9827	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
01-17577	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
01-17704	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
01-18285	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
20735-2	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
20868-B	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
40689-2	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
232A	AAATTACCTA ATAATTTgGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
Consensus	AAATTACCTA ATAATTTAGG	TAATATTTTT	GAATTAGCT TTGCAAAAGA	
		801		850
ATCC25934	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
IAF 464-01	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
IAF 669-00	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
IAF 2186-01	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
IAF 2355-B-01	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
IAF-DM9827	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
01-17577	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
01-17704	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
01-18285	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
20735-2	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
20868-B	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
40689-2	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
232A	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
Consensus	TAGTTCAACT AATCAATATG	TAAGTATCCA	GAACCAAATT CCTTCGCTGT	
		851		900
ATCC25934	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
IAF 464-01	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
IAF 669-00	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
IAF 2186-01	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
IAF 2355-B-01	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
IAF-DM9827	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
01-17577	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
01-17704	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
01-18285	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
20735-2	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
20868-B	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
40689-2	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
232A	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
Consensus	TTTTAAAAGC AGATCTTAGT	CAAAGTGCC	GTGAAATTTT AGCTAGGCCA	
		901		950
ATCC25934	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
IAF 464-01	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
IAF 669-00	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
IAF 2186-01	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
IAF 2355-B-01	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
IAF-DM9827	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
01-17577	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
01-17704	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
01-18285	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
20735-2	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
20868-B	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
40689-2	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
232A	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	
Consensus	GATGAAGTTC AGCCAGTTAT	TAACATTTTA	AGATTAATGA AAAAAGATAA	

		951		1000
ATCC25934	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
IAF 464-01	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
IAF 669-00	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
IAF 2186-01	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
IAF 2355-B-01	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
IAF-DM9827	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
01-17577	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
01-17704	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
01-18285	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
20735-2	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
20868-B	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
40689-2	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
232A	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
Consensus	TTCTTCTTAT	TTTCTAAATT	TTGAGGAGTT	TGTTAATAAT TTAACACTGA
		1001		1050
ATCC25934	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
IAF 464-01	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
IAF 669-00	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
IAF 2186-01	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
IAF 2355-B-01	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
IAF-DM9827	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
01-17577	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
01-17704	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
01-18285	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
20735-2	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
20868-B	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AaGGTCAAAA TCTTTCTGCC
40689-2	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
232A	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
Consensus	AAAATATGCA	AAAAGAAGAT	TTAAATGCAA	AGGGTCAAAA TCTTTCTGCC
		1051		1100
ATCC25934	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	AAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
IAF 464-01	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	AAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
IAF 669-00	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	AAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
IAF 2186-01	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	AAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
IAF 2355-B-01	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	AAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
IAF-DM9827	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCcGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
01-17577	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
01-17704	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
01-18285	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
20735-2	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
20868-B	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCcGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
40689-2	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
232A	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
Consensus	TATGAATTTC	TAGCAGATAT	TAAATCTGGA	TTTTTCCCTG GAGACAAGAG
		1101		1150
ATCC25934	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
IAF 464-01	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
IAF 669-00	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
IAF 2186-01	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
IAF 2355-B-01	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
IAF-DM9827	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
01-17577	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
01-17704	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
01-18285	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
20735-2	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
20868-B	ATCCAGTCAT	ACCAAGtCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
40689-2	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
232A	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA
Consensus	ATCCAGTCAT	ACCAAGGCAG	AAATTAGTAA	TCTTTTAAAT AAAAAAGAAA

		1151		1200
ATCC25934	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAAcGA CCGTCTTAAC
IAF 464-01	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
IAF 669-00	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
IAF 2186-01	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
IAF 2355-B-01	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
IAF-DM9827	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAAcGA CCGTCTTAAC
01-17577	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
01-17704	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAAcGA CCGTCTTAAC
01-18285	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
20735-2	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAACGA CCGTCTTAAC
20868-B	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
40689-2	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
232A	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAAcGA CCGTCTTAAC
Consensus	ATATTATGA	CTTGGTAAA	TACAATGGAA	AATTCAATGA CCGTCTTAAC
		1201		1250
ATCC25934	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
IAF 464-01	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTtGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
IAF 669-00	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GcCTTGATAA
IAF 2186-01	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GcCTTGATAA
IAF 2355-B-01	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GcCTTGATAA
IAF-DM9827	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
01-17577	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GcCTTGATAA
01-17704	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
01-18285	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GcCTTGATAA
20735-2	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
20868-B	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTtGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
40689-2	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTtGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
232A	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
Consensus	TCGCCAAATT	TAGAATATAG	CCTAGATGCA	GCAAGCGCAA GTCTTGATAA
		1251		1300
ATCC25934	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
IAF 464-01	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
IAF 669-00	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
IAF 2186-01	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
IAF 2355-B-01	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
IAF-DM9827	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
01-17577	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
01-17704	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
01-18285	AAAAGATAAA	TCAATAaTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
20735-2	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
20868-B	AAAAGATAAA	TCAATAGTTc	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
40689-2	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
232A	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
Consensus	AAAAGATAAA	TCAATAGTTT	TAATTCCCTA	CCGCCTTGAA ATTAAAGATA
		1301		1350
ATCC25934	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
IAF 464-01	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
IAF 669-00	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
IAF 2186-01	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
IAF 2355-B-01	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
IAF-DM9827	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	aAAAAGATAA TATTCTTGTA
01-17577	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
01-17704	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
01-18285	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
20735-2	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
20868-B	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	aAAAAGATAA TATTCTTGTA
40689-2	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA
232A	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTcGTA
Consensus	AATTTTTGCG	CGATGATTTA	TATCCAGATA	CAAAAGATAA TATTCTTGTA

		1351		1400
ATCC25934	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	aACTGGATT	AAAAAAGGtC CAAAAATTGA
IAF 464-01	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
IAF 669-00	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
IAF 2186-01	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
IAF 2355-B-01	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
IAF-DM9827	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
01-17577	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
01-17704	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	aACTGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
01-18285	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
20735-2	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	aACTGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
20868-B	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
40689-2	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
232A	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	aACTGGATT	AAAAAAGGct CAAAAATTGA
Consensus	AAAGAAGGGA	TTCTTAAATT	GACAGGATT	AAAAAAGGAC CAAAAATTGA
		1401		1450
ATCC25934	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
IAF 464-01	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
IAF 669-00	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
IAF 2186-01	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
IAF 2355-B-01	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
IAF-DM9827	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
01-17577	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
01-17704	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
01-18285	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
20735-2	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
20868-B	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
40689-2	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
232A	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
Consensus	TCTCCCTAAT	ATCAATCAGC	AAATTTTAA AACCGAATAT	TTACCATT
		1451		1500
ATCC25934	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
IAF 464-01	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
IAF 669-00	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
IAF 2186-01	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
IAF 2355-B-01	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
IAF-DM9827	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
01-17577	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
01-17704	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
01-18285	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
20735-2	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
20868-B	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
40689-2	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
232A	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
Consensus	TTGAAAAAGG	TAAAGAAGAA CAAGCAAAT	TAGACTATGG	TAATATCTTA
		1501		1550
ATCC25934	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
IAF 464-01	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
IAF 669-00	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
IAF 2186-01	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
IAF 2355-B-01	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
IAF-DM9827	AATC...CAa	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
01-17577	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
01-17704	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
01-18285	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
20735-2	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
*20868-B	AATCCat	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AgGCTCTTT
40689-2	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
232A	AATC...CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT
Consensus	AATC---CAT	ATAATACTCA ACTTGCCAAA	GTTGAAGTTG	AAGCTCTTT

	1551	1600
ATCC25934	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
IAF 464-01	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
IAF 669-00	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
IAF 2186-01	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
IAF 2355-B-01	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
IAF-DM9827	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
01-17577	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
01-17704	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
01-18285	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
20735-2	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
20868-B	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
40689-2	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
232A	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
Consensus	TAAAGGAAT AAAAACCAAG	AAATCTATCA AGCACTTGAT GGAAATTATG
	1601	1650
ATCC25934	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
IAF 464-01	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
IAF 669-00	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
IAF 2186-01	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
IAF 2355-B-01	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
IAF-DM9827	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
01-17577	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
01-17704	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
01-18285	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
20735-2	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
20868-B	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
40689-2	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
232A	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
Consensus	CCTATGAATT CGGGGCCTTT	AAATCCGTGC TTAATTCTG <u>AACAGGAAAA</u>
	1651	1700
ATCC25934	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
IAF 464-01	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
IAF 669-00	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
IAF 2186-01	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
IAF 2355-B-01	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
IAF-DM9827	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
01-17577	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
01-17704	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
01-18285	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
20735-2	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
20868-B	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
40689-2	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
232A	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
Consensus	ATTCAGCATC CTGAAAAGC	TGATATCAA AGATTTACAA GACATTTAGA
	1701	1750
ATCC25934	ACAAGTTAAA tTgggttcta	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
IAF 464-01	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAgCAA
IAF 669-00	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
IAF 2186-01	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
IAF 2355-B-01	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
IAF-DM9827	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
01-17577	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
01-17704	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAgCAA
01-18285	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
20735-2	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAgCAA
20868-B	ACAAGTTAAA tTgggttcta	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
40689-2	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAgCAA
232A	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA
Consensus	ACAAGTTAAA ATTGGTTCTA	ATTCAGTTTT AAATCAACCA CAAACAACAA

		1751		1800
ATCC25934	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
IAF 464-01	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
IAF 669-00	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
IAF 2186-01	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
IAF 2355-B-01	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
IAF-DM9827	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
01-17577	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
01-17704	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
01-18285	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
20735-2	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
20868-B	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
40689-2	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
232A	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
Consensus	AAGAACAAAGT	ATTTCAGT	CTTAAAAGTA	ATAACTTTT
		1801		1850
ATCC25934	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
IAF 464-01	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
IAF 669-00	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
IAF 2186-01	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
IAF 2355-B-01	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
IAF-DM9827	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
01-17577	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
01-17704	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
01-18285	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
20735-2	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
20868-B	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
40689-2	CATCAAGTTG	CtAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
232A	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
Consensus	CATCAAGTTG	CAAGTTATTT	CCAGGATTTA	CTCACCAAGG
		1851		1900
ATCC25934	AGTTcTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
IAF 464-01	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAgTGGGGA
IAF 669-00	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
IAF 2186-01	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
IAF 2355-B-01	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
IAF-DM9827	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
01-17577	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
01-17704	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAgTGGGGA
01-18285	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
20735-2	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAgTGGGGA
20868-B	AGTTcTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
40689-2	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAgTGGGGA
232A	AatTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
Consensus	AGTTTTAGAG	ACTCTTTATG	ATCTAGCAAA	AAAATGGGGA
		1901		1950
ATCC25934	ACagGGCgCA	ATTCCCGAAA	GAGGtTTTCC	AATATACAAA
IAF 464-01	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GgGGCTTTC	AATATACAAA
IAF 669-00	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
IAF 2186-01	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
IAF 2355-B-01	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
IAF-DM9827	ACtgaGCACA	ATTCCCGAAA	GgGGCTTTC	AATATACAAA
01-17577	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
01-17704	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
01-18285	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
20735-2	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA
20868-B	ACagGGCgCA	ATTCCCGAAA	GAGGtTTTCC	AAgATACAAA
40689-2	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GgGGCTTTC	AATATACAAA
232A	ACagaGCACA	ATTCCCGAAA	GgGGtTTTCC	AATATACAAA
Consensus	ACCAGGCACA	ATTCCCGAAA	GAGGCTTTC	AATATACAAA

	1951	2000
ATCC25934	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA gGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
IAF 464-01	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
IAF 669-00	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
IAF 2186-01	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
IAF 2355-B-01	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
IAF-DM9827	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TcGAAAAAgA AGGATCCTTA	
01-17577	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
01-17704	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
01-18285	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
20735-2	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
20868-B	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAGAAA AGGATCCTTA	
40689-2	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
232A	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TtGAAGAAAA AGGATCCTTA	
Consensus	GCAGAAGCAG ATAAATTAAA ATTTTTGGAA TGGAAAAAAA AGGATCCTTA	
	2001	2050
ATCC25934	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
IAF 464-01	CAACCGAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
IAF 669-00	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
IAF 2186-01	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
IAF 2355-B-01	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
IAF-DM9827	CAAcCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
01-17577	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
01-17704	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
01-18285	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
20735-2	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
20868-B	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
40689-2	CAAcCAGATA AACGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCtCGTA	
232A	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
Consensus	CAATCAGATA AAAGAAATTTC ACCAACCTTTC CTTTAATATT TTAGCCCGTA	
	2051	2100
ATCC25934	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
IAF 464-01	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
IAF 669-00	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
IAF 2186-01	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
IAF 2355-B-01	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
IAF-DM9827	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
01-17577	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
01-17704	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
01-18285	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
20735-2	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
20868-B	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
40689-2	AtGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
232A	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
Consensus	ACGATGTAAT AAAATCTGAT GGATTTTACG GAGTTTATT ATTGCCCAA	
	2101	2150
ATCC25934	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
IAF 464-01	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
IAF 669-00	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
IAF 2186-01	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
IAF 2355-B-01	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
IAF-DM9827	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
01-17577	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
01-17704	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
01-18285	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
20735-2	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
20868-B	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
40689-2	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
232A	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	
Consensus	AGTGTAAAAA CTGAATTAGA AGGCAAAAAT GAGGCGAAA TTTTTGAAGC	

		2151		2200
ATCC25934	tCTTAAAAAAa	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
IAF 464-01	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
IAF 669-00	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
IAF 2186-01	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
IAF 2355-B-01	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
IAF-DM9827	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
01-17577	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
01-17704	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
01-18285	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
20735-2	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
20868-B	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
40689-2	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
232A	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
Consensus	GCTTAAAAAG	TATTCTTTAA	TTGAGAACTC	GGCTTTAAA ACTACTATT
		2201		2250
ATCC25934	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
IAF 464-01	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
IAF 669-00	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
IAF 2186-01	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
IAF 2355-B-01	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
IAF-DM9827	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTC
01-17577	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
01-17704	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTC
01-18285	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
20735-2	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTC
20868-B	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
40689-2	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
232A	TAGATAAAA	TtTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
Consensus	TAGATAAAA	TCTACTTGAA	GGGACTGATT	TTAAACCTT CGGTGATTT
		2251		2300
ATCC25934	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
IAF 464-01	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
IAF 669-00	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
IAF 2186-01	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
IAF 2355-B-01	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
IAF-DM9827	TTAAAGCAT	TTTCCT <u>TaAA</u>	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
01-17577	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
01-17704	TTAAAGCAT	TTTCCT <u>TaAA</u>	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
01-18285	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
20735-2	TTAAAGCAT	TTTCCT <u>TaAA</u>	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
20868-B	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAG <u>CaCAA</u>	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
40689-2	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
232A	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
Consensus	TTAAAGCAT	TTTCCTTAA	AGCAGCCAA	TTTAATAATT TTGCTCCT <u>TG</u>
		2301		2350
ATCC25934	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
IAF 464-01	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
IAF 669-00	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
IAF 2186-01	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
IAF 2355-B-01	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
IAF-DM9827	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
01-17577	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
01-17704	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
01-18285	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
20735-2	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
20868-B	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
40689-2	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
232A	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG
Consensus	<u>AGCAAAATTA</u>	GACGATAATC	TTCAGTATT	CTGAAGCT ATCAAAAAG

	2351	2400
ATCC25934	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
IAF 464-01	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
IAF 669-00	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
IAF 2186-01	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
IAF 2355-B-01	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
IAF-DM9827	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
01-17577	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
01-17704	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
01-18285	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAA	
20735-2	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
20868-B	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
40689-2	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
232A	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
Consensus	GGGAAACTAC AAAAGAAGGT AAAAGAGAAG AAGTAGATAA AAAAGTTAAC	
	2401	Début des RR1 2450
ATCC25934	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
IAF 464-01	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
IAF 669-00	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
IAF 2186-01	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
IAF 2355-B-01	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
IAF-DM9827	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTg CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
01-17577	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
01-17704	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
01-18285	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
20735-2	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
20868-B	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
40689-2	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
232A	GAATTggATA ATAAAAATAAA AGGTATATTg CCTCAGCCCC CAGCAGCaAA	
Consensus	GAATTAGATA ATAAAAATAAA AGGTATATTAA CCTCAGCCCC CAGCAGCTAA	
	2451	2500
ATCC25934	ACCTGAAGCg GCtAAACCAG TAGCaGCa.....	
IAF 464-01	.....	
IAF 669-00	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF 2186-01	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF 2355-B-01	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF-DM9827	ACCaGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCT.....	
01-17577	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
01-17704	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
01-18285	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
20735-2	ACCaGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCT.....	
20868-B	ACCaGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCT.....	
40689-2	ACCaGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCA.....	
232A	ACCaGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAaCA aCAAAACCAG	
Consensus	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
	2501	2550
ATCC25934	.....	
IAF 464-01	.....	
IAF 669-00	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
IAF 2186-01	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
IAF 2355-B-01	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
IAF-DM9827	.....	
01-17577	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
01-17704	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
01-18285	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	
20735-2	.....	
20868-B	.....	
40689-2	.....	GAAGCA
232A	TAGCaGCTAA ACtGAAGCA ..... GCTAA ACtGAAGCA	
Consensus	TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA	

	2551	2600
ATCC25934	...AAACCTG aAGCaGCTAA ACCtGAAaCA aCAAAACCAG TAGCaGCTAA	
IAF 464-01	.....	GCTAA
IAF 669-00	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
IAF 2186-01	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
IAF 2355-B-01	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
IAF-DM9827	...AAACCAG aAGCaG.....	CAAACCAG TAGCGGCTAA
01-17577	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
01-17704	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
01-18285	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
20735-2	...AAACCAG aAGCaG.....	CAAACCAG TtGCaGCTAA
20868-B	...AAACCAG aAGCaG.....	CAAACCAG TAGCGGCTAA
40689-2	GCAAAACCAG TtGCaGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TtGCaGCTAA	
232A	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
Consensus	GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA	
	2601	2650
ATCC25934	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCaGCaAA ACCAGtAGCA GCA.....	
IAF 464-01	ACCTGAAGCA GCAAAACCAG TAGCaGCTAA ACCtGAAGCA GCA.....	
IAF 669-00	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF 2186-01	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF 2355-B-01	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
IAF-DM9827	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCTGAaCA aCA.....	
01-17577	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
01-17704	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
01-18285	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
20735-2	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGggGGCTAA ACCTGAAGCA GCA.....	
20868-B	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCTGAaCA aCA.....	
40689-2	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TtGCaGCTAA ACCAGAAGCA GCA.....	
232A	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCA.....	
Consensus	ACCAGAAGCA GCAAAACCAG TAGCGGCTAA ACCAGAAGCA GCAAAACCAG	
	2651	Fin des RR1 2700
ATCC25934	.....AA ACCAGTtGCt aCTAAtaC.....	Taat
IAF 464-01	.....AA ACCAGTtGCt aCTAAtaC.....	Taat
IAF 669-00	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
IAF 2186-01	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
IAF 2355-B-01	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
IAF-DM9827	.....AA ACCAGTtGCt aCTAAtaC.....	Taat
01-17577	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
01-17704	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
01-18285	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
20735-2	.....AA ACCAGTtGC.....	T
20868-B	.....AA ACCAGTtGCt aCTAAtaC.....	Taat
40689-2	.....AA ACCAGTtGCa GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
232A	.....AA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
Consensus	TAGCGGCTAA ACCAGTAGCG GCTAAACCAG AAGCAGAAA ACCAGTTGCT	
	2701	Séquence Shine Dalgarno 2750
ATCC25934	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
IAF 464-01	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
IAF 669-00	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
IAF 2186-01	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
IAF 2355-B-01	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
IAF-DM9827	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
01-17577	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
01-17704	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
01-18285	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
20735-2	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
20868-B	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
40689-2	ACTAATACTG GCTTTCTCT TgCAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
232A	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	
Consensus	ACTAATACTG GCTTTCACT TACAAATAAA CCAAAAGAAG ACTATTTCCC	

	2751	ORF 28 selon Wilton et al. (1998)	2800
ATCC25934	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
IAF 464-01	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
IAF 669-00	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
IAF 2186-01	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
IAF 2355-B-01	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
IAF-DM9827	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
01-17577	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
01-17704	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
01-18285	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
20735-2	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
20868-B	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
40689-2	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
232A	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
Consensus	AATGGCTTTT	AGTTATAAAT	TAGAATATAC
	2801		2850
ATCC25934	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
IAF 464-01	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
IAF 669-00	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
IAF 2186-01	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
IAF 2355-B-01	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
IAF-DM9827	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
01-17577	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
01-17704	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
01-18285	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
20735-2	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
20868-B	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
40689-2	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
232A	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
Consensus	TAAAAAACACC	GGAAATTAAAT	GTATTTTTAG
	2851		2900
ATCC25934	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
IAF 464-01	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
IAF 669-00	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
IAF 2186-01	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
IAF 2355-B-01	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
IAF-DM9827	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
01-17577	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
01-17704	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
01-18285	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
20735-2	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
20868-B	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
40689-2	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
232A	TATGAAGAAC	AAAGAACATAAT	AAAGGAACCA
Consensus	TATGAAGAAC	AAAAAAATAAT	AAAGGAACCA
	2901		2950
ATCC25934	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
IAF 464-01	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
IAF 669-00	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
IAF 2186-01	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
IAF 2355-B-01	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
IAF-DM9827	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
01-17577	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
01-17704	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
01-18285	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
20735-2	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
20868-B	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
40689-2	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
232A	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC
Consensus	TCAATATCAA	TTCCAGGAAG	TCAAGGTaaC

	2951	Début des RR2	3000
ATCC25934	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTc CAAATCAAGG tAAAAAAAGCC
IAF 464-01	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCC
IAF 669-00	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
IAF 2186-01	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
IAF 2355-B-01	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
IAF-DM9827	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
01-17577	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
01-17704	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
01-18285	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
20735-2	TTAGCCACCC	AATGATGACC	.....
20868-B	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
40689-2	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGatCTc aAAACCAAGG tAAAAAAAGgt
232A	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG tAAAAAAAGgc
Consensus	TTAGCCACCC	AATGATGACC	GAGGGATCTT CAAATCAAGG CAAAAAAAGCA
	3001		3050
ATCC25934	GAaGGcGCTC	CTAACCAAGG	cAAAAAAAGCC GAAGGcGCaC CTAGTCAAGG
IAF 464-01	GAaGGcGCTC	CTAACCAAGG	cAAAAAAAGCa GAgGGTGCT. .....
IAF 669-00	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
IAF 2186-01	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
IAF 2355-B-01	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
IAF-DM9827	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	gAAAAAAAGCC GAgGGTGCTC CTAGTCAAGG
01-17577	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
01-17704	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
01-18285	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGG. ....
20735-2	GAGGGGAaCTC	aaAACCAAGG	TAAAAAAAGgt GAAGGaaCTC CTAatTCAAGG
20868-B	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	gAAAAAAAGCC GAgGGTGCTC CTAGTCAAGG
40689-2	GAaGGaaCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCa GAgGGTGCTC CTAGTCAAGG
232A	GAaGGaaCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCa GAAGGcGCgC CTAacCAAGG
Consensus	GAGGGGGCTC	CTAACCAAGG	TAAAAAAAGCC GAAGGTGCTC CTAGTCAAGG
	3051		3100
ATCC25934	gAAAAAAAGCc	GAAGGcGCTc	ctaaccaagg caaaaaaagcc gaaggcgcac
IAF 464-01	.....	.....	.....
IAF 669-00	.....	.....	.....
IAF 2186-01	.....	.....	.....
IAF 2355-B-01	.....	.....	.....
IAF-DM9827	.....	.....	.....
01-17577	.....	.....	.....
01-17704	.....	.....	.....
01-18285	.....	.....	.....
20735-2	.....	.....	.....
20868-B	.....	.....	.....
40689-2	.....	.....	.....
232A	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....
	3101	Fin des RR2	3150
ATCC25934	CTAGTCAAGG	gAAAAAAAGCa	GAGGGtgCTT CTAAtCAACA AAgCACAACT
IAF 464-01	.....	.....	.....
IAF 669-00	.....	.....	.....
IAF 2186-01	.....	.....	.....
IAF 2355-B-01	.....	.....	.....
IAF-DM9827	CTAGTCAAGG	tAAAAAAAGCC	GAAGGAACTT CTAACCAACA AAACACAAC
01-17577	.....	.....	.....
01-17704	.....	.....	.....
01-18285	.....	.....	.....
20735-2	CTAGTCAAGG	tAAAAAAAGCC	GAAGGAAACac CTAAtCAACA AAgCcCAACT
20868-B	CTAGTCAAGG	tAAAAAAAGCC	GAAGGAACTT CTAACCAACA AAACACAAC
40689-2	CTAacCAAGG	gAAAAAAAGCC	GAAGGAAACac CTAAtCAACA AAgCcCAACT
232A	CTAacCAAGG	gAAAAAAAGCa	GAGGGAgCac CTAGtCAACA AAgCcCAACT
Consensus	CTAGTCAAGG	-AAAAAAAGCC	GAAGGAACTT CTAACCAACA AAACACAAC

		3151	3200
ATCC25934	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
IAF 464-01	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
IAF 669-00	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
IAF 2186-01	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
IAF 2355-B-01	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
IAF-DM9827	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
01-17577	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
01-17704	AgCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
01-18285	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGAaTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
20735-2	AgCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
20868-B	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
40689-2	AgCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
232A	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
Consensus	ACCGAATTAA	CTAATTACCT	TCCTGACTTA GGTAAAAAAA TTGACGAAAT
		3201	3250
ATCC25934	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGgAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
IAF 464-01	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
IAF 669-00	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
IAF 2186-01	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
IAF 2355-B-01	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
IAF-DM9827	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
01-17577	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
01-17704	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
01-18285	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
20735-2	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
20868-B	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
40689-2	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
232A	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
Consensus	CATTAAAAAA	CAAGGTAAAA	ATTGAAAAAC AGAGGTTGAA CTAATCGAGG
		3251	3300
ATCC25934	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
IAF 464-01	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
IAF 669-00	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
IAF 2186-01	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
IAF 2355-B-01	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
IAF-DM9827	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
01-17577	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
01-17704	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
01-18285	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTgTCCT AAGGGATGAT
20735-2	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
20868-B	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
40689-2	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
232A	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
Consensus	ATAATATCGC	TGGAGATGCT	AAATTGCTAT ACTTTATCCT AAGGGATGAT
		3301	3350
ATCC25934	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
IAF 464-01	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
IAF 669-00	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
IAF 2186-01	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
IAF 2355-B-01	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
IAF-DM9827	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
01-17577	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
01-17704	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
01-18285	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
20735-2	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
20868-B	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
40689-2	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
232A	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT
Consensus	TCAAAATCCG	GTGATCCTAA	AAAATCAAGT CTAAAAGTTA AAATAACAGT

	3351		3390
ATCC25934	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
IAF 464-01	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
IAF 669-00	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAAccAAA	ATCTAAATAA
IAF 2186-01	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAAccAAA	ATCTAAATAA
IAF 2355-B-01	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAAccAAA	ATCTAAATAA
IAF-DM9827	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
01-17577	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAAccAAA	ATCTAAATAA
01-17704	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
01-18285	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAAccAAA	ATCTAAATAA
20735-2	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
20868-B	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
40689-2	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA
232A	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAACC <sub>A</sub> g <sub>A</sub>	ATCTAAATAA
Consensus	AAAACAAAGT AATAATAATC	AGGAATTAAA	ATCTAAATAA

Note :

- 1-Les codons TGA seront traduits en tryptophane.
- 2-L'isolat 20868-B possède un codon TCA de plus, donc une sérine en plus.
- 3-L'isolat IAF DM9827 a une mutation d'un codon AGA/TGA.
- 4-La souche ATCC 25934 a une mutation d'un codon TGA/TGG.
- 5-Le début et la fin des régions répétées RR1 et RR2 sont indiquées par des lignes verticales.
- 5-Les lettres minuscules indiquent une mutation de la base.

**Alignement des séquences en acides aminés de la protéine P46 de la souche de référence ATCC 25934 et des 11 isolats de champs de *M. hyopneumoniae* .**

1	50
ATCC25934	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
IAF 464-01	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
IAF 669-00	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
IAF 2186-01	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
IAF 2355-B-01	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
IAF DM9827	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
20735-2	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
20868-B	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
40689-2	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
01-17577	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
01-17704	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
01-18285	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
Consensus	MKKMLRKKFL YSSAIYATSL ASIIAFVAAG CGQTESGSTS DSKPQAETLK
51	100
ATCC25934	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
IAF 464-01	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
IAF 669-00	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
IAF 2186-01	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
IAF 2355-B-01	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
IAF DM9827	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
20735-2	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
20868-B	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
40689-2	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
01-17577	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
01-17704	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
01-18285	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
Consensus	HKVSNDSIRI ALTDPDNPRW ISAQKDIISY VDETEAATST ITKNQDAQNN
101	150
ATCC25934	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
IAF 464-01	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
IAF 669-00	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
IAF 2186-01	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
IAF 2355-B-01	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
IAF DM9827	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
20735-2	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
20868-B	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
40689-2	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
01-17577	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
01-17704	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
01-18285	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD
Consensus	WLQQQANLSP APKGFIIAPE NGSGVGTAVN TIADKGIPIV AYDRLITGSD

						200
ATCC25934	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
IAF 464-01	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
IAF 669-00	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
IAF 2186-01	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
IAF 2355-B-01	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
IAF DM9827	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
20735-2	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
20868-B	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
40689-2	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
01-17577	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
01-17704	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
01-18285	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
Consensus	KYDWYVSDN	EKGELQGLS	LAAGLLGKED	GAFDSIDQMN	EYLKSHMPQE	
			201			250
ATCC25934	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNNSQNKIID	LSPEGENAVY	
IAF 464-01	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
IAF 669-00	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
IAF 2186-01	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
IAF 2355-B-01	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
IAF DM9827	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
20735-2	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNNSQNKIID	LSPEGENAVY	
20868-B	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
40689-2	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
01-17577	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
01-17704	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNNSQNKIID	LSPEGENAVY	
01-18285	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
Consensus	TISFYTIAGS	QDDNNSQYFY	NGAMKVLKEL	MKNSGNQNKIID	LSPEGENAVY	
			251			300
ATCC25934	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
IAF 464-01	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
IAF 669-00	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
IAF 2186-01	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
IAF 2355-B-01	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
IAF DM9827	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
20735-2	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
20868-B	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
40689-2	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
01-17577	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
01-17704	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
01-18285	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
Consensus	VPGWNYGTAG	QRIQSFLTIN	KDPAGGNKIK	AVGSKPASIF	KGFLAPNDGM	
			301			350
ATCC25934	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
IAF 464-01	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
IAF 669-00	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
IAF 2186-01	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
IAF 2355-B-01	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
IAF DM9827	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
20735-2	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
20868-B	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
40689-2	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
01-17577	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
01-17704	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
01-18285	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	
Consensus	AEOAITKLKL	EGFDTQKIFV	TGQDYNDKAK	TFIKDGDQNM	TIYKPDVKLG	

	351	400
ATCC25934	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
IAF 464-01	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
IAF 669-00	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
IAF 2186-01	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
IAF 2355-B-01	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
IAF DM9827	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
20735-2	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
20868-B	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
40689-2	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
01-17577	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
01-17704	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
01-18285	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
Consensus	KVAVEVLRVL IAKKNKASRS	EVENELKAKL PNISFKYDNQ TYKVQGKNIN
	401	419
ATCC25934	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
IAF 464-01	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
IAF 669-00	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
IAF 2186-01	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
IAF 2355-B-01	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
IAF DM9827	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
20735-2	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
20868-B	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
40689-2	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
01-17577	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
01-17704	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
01-18285	TILVSPVIVT KANVDNPDA	
Consensus	TILVSPVIVT KANVDNPDA	

Notes:

- 1-Les W indiquent les tryptophanes provenant d'un codon TGA.
- 2-La glutamine à la position 235 est mutée en glycine pour certains isolats.
- 3-La flèche représente le site de clivage du peptide signal selon Futo *et al.*, J.Bacteriol., 1995.

Alignement de séquences de la protéine P97 des souches ATCC 25934 et 232A ainsi que des 11 isolats de champs de *M. hyopneumoniae*.

		1		50
ATCC25934	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
IAF 464-01	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
IAF 669-00	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
IAF 2186-01	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
IAF 2355-B-01	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
IAF DM9827	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
01-17577	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
01-17704	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
01-18285	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
20735-2	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
20868-b	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
40689-2	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
232A	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
Consensus	MSKKSKTFKI	GLTAGIVGLG	VFGLTVG <b>LSS</b>	LAKYRSESPR KIANDFAAKV
		51		100
ATCC25934	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
IAF 464-01	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
IAF 669-00	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
IAF 2186-01	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
IAF 2355-B-01	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
IAF DM9827	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
01-17577	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
01-17704	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
01-18285	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
20735-2	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
20868-b	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGnQL
40689-2	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
232A	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
Consensus	STLAFSPYAF	ETDSDYKIVK	RWL <b>VDSNNNNI</b>	RNKEKV <b>IDSF</b> SFFTKNGDQL
		101		150
ATCC25934	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
IAF 464-01	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
IAF 669-00	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
IAF 2186-01	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
IAF 2355-B-01	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
IAF DM9827	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
01-17577	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
01-17704	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
01-18285	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
20735-2	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
20868-b	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
40689-2	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
232A	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD
Consensus	EKINFQDPEY	TKAKITFEIL	EII <b>PDDVNQN</b>	FKVKF <b>QALQK</b> LHNGDIAKSD



		151		200
ATCC25934	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
IAF 464-01	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
IAF 669-00	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
IAF 2186-01	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
IAF 2355-B-01	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
IAF DM9827	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
01-17577	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
01-17704	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
01-18285	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
20735-2	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
20868-b	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
40689-2	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
232A	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
Consensus	IYEQTVAFAK	QSNLLVAE FN	FSLKKITEKL	NQQIENLSTK ITNFADEKTS
		201		250
ATCC25934	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
IAF 464-01	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
IAF 669-00	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
IAF 2186-01	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
IAF 2355-B-01	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
IAF DM9827	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNpEDLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
01-17577	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
01-17704	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
01-18285	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
20735-2	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
20868-b	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNpEDLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
40689-2	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
232A	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNpEDLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
Consensus	SQKD PSLRA	IDFQYDLNTA	RNAE DLDI KL	ANYFPVLKNL INRLNNAPEN
		251		300
ATCC25934	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
IAF 464-01	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
IAF 669-00	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
IAF 2186-01	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
IAF 2355-B-01	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
IAF DM9827	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
01-17577	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
01-17704	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
01-18285	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
20735-2	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
20868-b	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
40689-2	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
232A	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
Consensus	KLPNNLGNIF	EFSFAKDSST	NQYVSIQNQI	PSLFLKADLS QSAREILASP
		301		350
ATCC25934	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
IAF 464-01	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
IAF 669-00	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
IAF 2186-01	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
IAF 2355-B-01	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
IAF DM9827	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
01-17577	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
01-17704	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
01-18285	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
20735-2	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
20868-b	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
40689-2	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
232A	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA
Consensus	DEVQPVINIL	RLMKKD NSSY	FLNFEDFVN N	LTLK NMQ KED LNAKGQNL SA

		351	400
ATCC25934	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
IAF 464-01	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
IAF 669-00	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
IAF 2186-01	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
IAF 2355-B-01	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
IAF DM9827	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
01-17577	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
01-17704	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
01-18285	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
20735-2	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
20868-b	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKsEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
40689-2	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
232A	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
Consensus	YEFLADIKSG	FFPGDKRSSH	TKAEISNLLN KKNIYDFGK YNGKFNDRLN
		401	450
ATCC25934	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
IAF 464-01	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
IAF 669-00	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
IAF 2186-01	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
IAF 2355-B-01	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
IAF DM9827	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
01-17577	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
01-17704	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
01-18285	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIILIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
20735-2	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
20868-b	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
40689-2	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
232A	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
Consensus	SPNLEYSLDA	ASASLDKKDK	SIVLIPYRLE IKDKFFADDL YPDTKDNILV
		451	500
ATCC25934	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
IAF 464-01	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
IAF 669-00	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
IAF 2186-01	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
IAF 2355-B-01	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
IAF DM9827	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
01-17577	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
01-17704	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
01-18285	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
20735-2	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
20868-b	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
40689-2	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
232A	KEGILKLTGF	KKGsKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
Consensus	KEGILKLTGF	KKGPKIDLPN	INQQIFKTEY LPFFEKGKEE QAKLDYGNIL
		501	550
ATCC25934	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
IAF 464-01	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
IAF 669-00	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
IAF 2186-01	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
IAF 2355-B-01	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
IAF DM9827	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
01-17577	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
01-17704	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
01-18285	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
20735-2	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
20868-b	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
40689-2	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
232A	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK
Consensus	NP.YNTQLAK	VEVEALFKGN	KNQEIYQALD GNYAYEFGAF KSVLNSWTGK

		551	600
ATCC25934	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
IAF 464-01	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
IAF 669-00	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
IAF 2186-01	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
IAF 2355-B-01	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
IAF DM9827	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
01-17577	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
01-17704	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
01-18285	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
20735-2	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
20868-b	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
40689-2	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
232A	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
Consensus	IQHPEKADIQ	RFRTRHLEQVK	IGSNSVLNQP
		601	650
ATCC25934	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	TLYDLAKKWG
IAF 464-01	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	LETNrAQFPK
IAF 669-00	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EvFQYTKDIF
IAF 2186-01	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	gAFQYTKDIF
IAF 2355-B-01	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
IAF DM9827	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
01-17577	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	LETNQAQFPK
01-17704	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
01-18285	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
20735-2	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
20868-b	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
40689-2	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
232A	HQVASYFQDL	LTKDKLTILE	EAFQYTKDIF
Consensus	HQVASYFQDL	LTKDKLTVLE	EAFQYTKDIF
		651	700
ATCC25934	AEADKLKFLE	gKKKDPYNQI	KEIHQLSFNI
IAF 464-01	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	LARNDVIKSD
IAF 669-00	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	GFYGVLLLPO
IAF 2186-01	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	KEIHQLSFNI
IAF 2355-B-01	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	LARNDVIKSD
IAF DM9827	AEADKLKFLE	SKKKDPFNQI	KEIHQLSFNI
01-17577	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	LARNDVIKSD
01-17704	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	GFYGVLLLPO
01-18285	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	KEIHQLSFNI
20735-2	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	LARNDVIKSD
20868-b	AEADKLKFLE	WKeKDPYNQI	GFYGVLLLPO
40689-2	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	KEIHQLSFNI
232A	AEADKLKFLE	1KKKDPYNQI	LARNDVIKSD
Consensus	AEADKLKFLE	WKKKDPYNQI	GFYGVLLLPO
		701	750
ATCC25934	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	YSLIENSAFK
IAF 464-01	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	TTILDKNLLE
IAF 669-00	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	GTDFKTFGDF
IAF 2186-01	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	YSLIENSAFK
IAF 2355-B-01	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	TTILDKNLLE
IAF DM9827	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	GTDFKTFGDF
01-17577	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	YSLIENSAFK
01-17704	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	TTILDKNLLE
01-18285	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	GTDFKTFGDF
20735-2	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	YSLIENSAFK
20868-b	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	TTILDKNLLE
40689-2	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	GTDFKTFGDF
232A	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	YSLIENSAFK
Consensus	SVKTELEGKN	EAQIFEALKK	TTILDKNLLE
			GTDFKTFGDF

	751		800
ATCC25934	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
IAF 464-01	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
IAF 669-00	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
IAF 2186-01	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
IAF 2355-B-01	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
IAF DM9827	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
01-17577	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
01-17704	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
01-18285	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
20735-2	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
20868-b	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
40689-2	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
232A	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
Consensus	LKAFFLKAAQ FNNFAPWAKL	DDNLQYSFEA IKKGETTKEG KREEVDKKVK	
	801	Début des RR1	850
ATCC25934	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPV.....	.....AAKPE.	
IAF 464-01	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPV.....	.....AAKPE.	
IAF 669-00	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
IAF 2186-01	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
IAF 2355-B-01	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
IAF DM9827	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPV.....	.....AAKPE.	
01-17577	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
01-17704	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
01-18285	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA	AKPVAAKPEA	
20735-2	ELDNKIKGIL PQFP.....	.....	
20868-b	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPV.....	.....AAKPE.	
40689-2	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPV.....	.....A AKPeAAKPv.	
232A	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPET tKPVAAKPEA AKPeAAKPv.		
Consensus	ELDNKIKGIL PQFPAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA		
	851	Fin des RR1	900
ATCC25934	....AAKPet tKPVAAKPEA AKPVAAKPv. ....AAKPVA tntn.....		
IAF 464-01	....AA.....	KPVA tntn.....	
IAF 669-00	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPVA	AKPEAAKPVA	
IAF 2186-01	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPVA	AKPEAAKPVA	
IAF 2355-B-01	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPVA	AKPEAAKPVA	
IAF DM9827	....AA.... .KPVAAKPEA AKPVAAKPE. ....tKPVA tntn.....		
01-17577	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPEAAKPVA	AKPEAAKPVA	
01-17704	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPEAAKPVA	AKPEAAKPVA	
01-18285	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPVA	AKPEAAKPVA	
20735-2	....AAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPE. ....AAKPVg AKPEAAKPVA		
20868-b	....AA.... .KPVAAKPEA AKPVAAKPE. ....tKPVA tntn.....		
40689-2	....AAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPE. ....AAKPVA AKPEAAKPVA		
232A	....AAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPE. ....AAKPVA AKPEAAKPVA		
Consensus	AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPEA AKPVAAKPVA		
	901	P28	950
ATCC25934	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
IAF 464-01	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
IAF 669-00	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
IAF 2186-01	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
IAF 2355-B-01	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
IAF DM9827	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
01-17577	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
01-17704	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
01-18285	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
20735-2	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
20868-b	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
40689-2	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
232A	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		
Consensus	TNTGFSLTNK PKEDYFPMAF SYKLEYTDEN KLSLKTPEIN VFLELVHQSE		

		951	Début des RR2	1000
ATCC25934		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVtSeQ YQKLSHPMMT	EGSpNQGKKA
IAF 464-01		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVtSeQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
IAF 669-00		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
IAF 2186-01		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
IAF 2355-B-01		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
IAF DM9827		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
01-17577		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
01-17704		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
01-18285		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
20735-2		YedQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVtSDQ YQKLSHPMMT	EGtqNQGKKg
20868-b		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
40689-2		YedQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVtSDQ YQKLSHPMMT	EGtqNQGKKg
232A		YEEQeIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVtSDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKS
Consensus		YEEQKIIKEL DKTVLNLQYQ	FQEVKVASDQ YQKLSHPMMT	EGSSNQGKKA
		1001	Fin des RR2	1050
ATCC25934		EGAPNQGKKA EGAPSqgkka	egapnQGKKA EGAPSQGKKA	EGaSNQQsTT
IAF 464-01		EGAPNQGKKA EGA.....	.....	...SNQQsTT
IAF 669-00		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQNTT
IAF 2186-01		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQNTT
IAF 2355-B-01		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQNTT
IAF DM9827		EGAPNQGKKA EGAPS.....	..... QGKKA EGAPSQGKKA	EGTSNQQNTT
01-17577		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQNTT
01-17704		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQsPT
01-18285		EGAPNQGKKA EG.....	.....	..TSNQQNTT
20735-2		EGtPNQGKKA EGAPS.....	..... QGKKA	EGTpNQQsPT
20868-b		EGAPNQGKKA EGAPS.....	..... QGKKA EGAPSQGKKA	EGTSNQQNTT
40689-2		EGtPNQGKKA EGAPS.....	..... QGKKA EGtPnQGKKA	EGTpNQQsPT
232A		EGtPNQGKKA EGAPn.....	..... QGKKA EGtPnQGKKA	EGapsQQsPT
Consensus		EGAPNQGKKA EGAPS-----	----- QGKKA EGAPSQGKKA	EGTSNQQNTT
		1051		1100
ATCC25934		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
IAF 464-01		TELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
IAF 669-00		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
IAF 2186-01		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
IAF 2355-B-01		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
IAF DM9827		TELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
01-17577		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
01-17704		sELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
01-18285		TELTNYLPeL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFVLRDD	
20735-2		SELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
20868-b		TELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
40689-2		SELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
232A		TELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
Consensus		TELTNYLPDL GKKIDEIIKK	QGKNwKTEVE LIEDNIAGDA KLLYFILRDD	
		1101		1129
ATCC25934		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
IAF 464-01		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
IAF 669-00		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> KSK	
IAF 2186-01		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> KSK	
IAF 2355-B-01		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> KSK	
IAF DM9827		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
01-17577		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> KSK	
01-17704		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
01-18285		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> KSK	
20735-2		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
20868-b		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
40689-2		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	
232A		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQE <sub>p</sub> E <sub>S</sub> K	
Consensus		SKSGDPKKSS LKVKITVKQS	NNNQELKSK	

**Notes:**

- 1-Les W provenaient de codons TGA.
- 2-Le début et la fin des régions répétées RR1 et RR2 sont indiquées par des lignes verticales, ainsi que l'ATG de la protéine P28 selon Wilton *et al.*, Microbiol., 1998.
- 3-Les lettres minuscules représentent des mutations en acides aminés en comparaison avec le consensus.
- 4-L'isolat 20868-B possède une sérine de plus à la position 503.
- 5-La flèche représente le site de clivage en N-terminal décrit par Hsu *et al.*, J.Bacteriol., 1997.

**Tableau 6: Amorces utilisées lors de ce projet pour l'amplification et la séquençage de gènes de *M. hypneumoniae*.**

Amorce	Sens <sup>a</sup>	Séquence	Gène	Position dans le gène	Taille du produit (pb)
*Sp37	+	5'-GTAGTCAAAGCAAGAGGATG-3'	p37	position 842	348
*Asp37	-	5'-GCTGGAGTTATTATACAGGA-3'	p37	position 1168	
Fsp36	+	5'-GGGCCGATGAAACCTTATAAATAGCT-3'	p36	contient l'ATG	948
Rsp36	-	5'-GCCGGAAATTAAATAATTAAATTGCATCCTG-3'	p36	contient le TAA (stop)	
Kmut46-RIA <sup>2</sup>	-	5'-TTGGGCACTAATTCAATCGAGGATTATC-3'	p46	195 en aval de l'ATG	
FSp46 <sup>2</sup>	+	5'-TACACGGAAATTCTTACATTTTTATAACAATTCAA-3'	p46	220 en amont de l'ATG	
Kmut46R2C <sup>2</sup>	-	5'-AGTTCCATAATTCCATCCTGGAC-3'	p46	773 en aval de l'ATG	
P46-1-S	+	5'-GCATTGTTGGCAGGAGGTG-3'	p46	69 en aval de l'ATG	
P46-1-AS	-	5'-GGCATCAGGATTATCAACATAGGC-3'	p46	1 en amont du Stop	
Kmut46FIC <sup>2</sup>	+	5'-TATGTCACCAGGATGGAATTATGGAACCT-3'	p46	747 en aval de l'ATG	
Kmut46RIC <sup>2</sup>	-	5'-TTCACCAACTAGGCTAGTTA-3'	p46	1505 en aval de l'ATG	
P65-S1	+	5'-GCCGCACITGCTTTGGCCTTGA-3'	p65	451 en aval de l'ATG	682
P65-As1	-	5'-CCACCTAAAGTTCAATCCC-3'	p65	1114 en aval de l'ATG	
P65-S2	+	5'-GAGGTAGTCGCAATTGGTGCTG-3'	p65	1021 en aval de l'ATG	
P65-As2	-	5'-CCTGCTTGATTTCAGGCATC-3'	p65	1790 en aval de l'ATG	
-185P97S	+	5'-CCAAACTTITGGTGCA-3'	p97	185 en amont de l'ATG	527
342P97AS	-	5'-CTTCGCCCTGGCAAAATACAGATCAG-3'	p97	342 en aval de l'ATG	
P97-1-S	+	5'-GCAGCTTGGCAATCTAGGC-3'	p97	84 en aval de l'ATG	
P97-1-AS	-	5'-CTTGCGCTTGCGCATCTAGGC-3'	p97	1218 en aval de l'ATG	1135
P97-2-S	+	5'-GGGAGACAAGAGATCCAGTC-3'	p97	1089 en aval de l'ATG	
P97-2-AS	-	5'-CGTCTAAATTGCTCAAGGAGC-3'	p97	2289 en aval de l'ATG	1221
P97-3-S	+	5'-GAAGGCAAAAATGAGGGCG-3'	p97	2115 en aval de l'ATG	
P97-3-AS	-	5'-GCAATTAGCATCTCCAGCG-3'	p97	3194 en aval de l'ATG	1098
291P97-S	+	5'-CTTAGCCACCCAATGATGAC-3'	p97	2917 en aval de l'ATG	
3441P97-AS	-	5'-CAACTGTACCAACAGCGGCTG-3'	p97	3441 en aval de l'ATG	524

a: + : sens ; - : antisens ;

\* : amorces amplifiant un fragment du gène p37 de *M. hyorhinis*

2 : Amorces conçus par Kane Cheikh Saad Bouh

## Bibliographie

- Abiven P., B. Blanchard, C. Saillard, M. Kobisch et J. M. Bove (1992). A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. Mol Cell Probes 6: 423-429.
- Ahrens P. et N. F. Friis (1991). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe. Lett Appl Microbiol 12: 249-253.
- Alexander T. J. L., K. Thorton, G. Boon, J. R. Lyons et A. F. Gush (1980). Medicamented early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. Vet Rec 106: 114-119.
- Amanfu W., C. N. Weng, R. F. Ross et H. J. Barnes (1984). Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: Sequential study by direct immunofluorescence. Am J Vet Res 45: 1349-1352.
- Andachi Y., F. Yamao, A. Muto et S. Osawa (1989). Codon recognition patterns as deduced from sequences of the complete set of transfer RNA species in *Mycoplasma capricolum*. Resemblance to mitochondria. J Mol Biol 209: 37-54.
- Armstrong C. H., M. J. Freeman et L. Sands-Freeman (1987). Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Isr J Med Sci 23: 654-656.
- Artiushin S., L. Stipkovits et F. C. Minion (1993). Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol Cell Probes 7: 381-385.
- Asai T., M. Okada, M. Ono, T. Irisawa, Y. Mori, Y. Yokomizo et S. Sato (1993). Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol 38: 253-260.
- Asai T., M. Okada, M. Ono, Y. Mori, Y. Yokomizo et S. Sato (1994). Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol 44: 97-102.
- Baseman J. B. et J. G. Tully (1997). Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis 3: 21-32.
- Baumeister A. K., M. Runge, M. Ganter, A. A. Feenstra, F. Delbeck et H. Kirchhoff (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. J Clin Microbiol 36: 1984-1988.

Bereiter M., T. F. Young, H. S. Joo et R. F. Ross (1990). Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet Microbiol 25: 177-192.

Blanchard B., M. Kobisch, J. M. Bove et C. Saillard (1996). Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. Mol Cell Probes 10: 15-22.

Blank W. A. et G. W. Stemke (2001). A physical and genetic map of the *Mycoplasma flocculare* ATCC 27716 chromosome reveals large genomic inversions when compared with that of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain J(T). Int J Syst Evol Microbiol 51: 1395-1399.

Bouh K. C., F. Shareck et S. Dea (2003). Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. Clin Diagn Lab Immunol 10: 459-468.

Bove J. M. (1993). Molecular features of mollicutes. Clin Infect Dis 17 Suppl 1: S10-31.

Boye M., T. K. Jensen, P. Ahrens, T. Hagedorn-Olsen et N. F. Friis (2001). In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. Apmis 109: 656-664.

Brooks E. et D. H. Faulds (1989). The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74,5 kDa antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. Dans Vaccines 89: Moderns approaches to new vaccines including prevention of AIDS, pp. 265-269. Édité par C. S. H. L. Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.

Calsamiglia M., C. Pijoan et A. Trigo (1999). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J Vet Diagn Invest 11: 246-251.

Calsamiglia M., J. E. Collins et C. Pijoan (2000). Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. Vet Microbiol 76: 299-303.

Caron J., M. Ouardani et S. Dea (2000a). Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. J Clin Microbiol 38: 1390-1396.

- Caron J., N. Sawyer, B. Ben Abdel Moumen, K. Cheikh Saad Bouh et S. Dea (2000b). Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Clin Diagn Lab Immunol 7: 528-535.
- Chastel C. (1995). Links and interactions between mycoplasmas and viruses: past confusions and present realities. Arch Virol 140: 811-826.
- Cheikh Saad Bouh K. (2003). Immunisation of pigs with P46, P65 and P97 recombinant proteins and study of their potential as sub-unit vaccine. (en préparation).
- Chen J. R., J. H. Lin, C. N. Weng et S. S. Lai (1998). Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 62: 97-110.
- Chen J. R., C. W. Liao, S. J. Mao et C. N. Weng (2001). A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. Vet Microbiol 80: 347-357.
- Chou S. Y., T. L. Chung, R. J. Chen, L. H. Ro, P. I. Tsui et D. Shiuan (1997). Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Biochem Mol Biol Int 41: 821-831.
- Ciprian A., C. Pijoan, T. Cruz, J. Camacho, J. Tortora, G. Colmenares, R. Lopez-Revilla et M. de la Garza (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can J Vet Res 52: 434-438.
- Clark L., C. H. Armstrong, K. Knox et V. Mayrose (1991). The effect of all-in/all-out management on pigs from a herd with a enzootic pneumonia. Vet. Med.
- Clark L. K., A. B. Scheidt, V. B. Mayrose, C. H. Armstrong, R. T. Cline et K. Knox (1989). Methodology to reduce days to market in swine herds with enzootic pneumonia. Proc Iowa Vet Med Assoc 107: 129-135.
- Curtis S. E. et L. Backstrom (1992). Housing and environmental influences on production. Dans Diseases of swine, 7<sup>e</sup> édition, pp. 884-900. Édité par A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire et D. J. Taylor. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Dallo S. F., A. Chavoya, C. J. Su et J. B. Baseman (1989). DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 57: 1059-1065.
- Dallo S. F., A. L. Lazzell, A. Chavoya, S. P. Reddy et J. B. Baseman (1996). Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. Infect Immun 64: 2595-2601.

- Dascher C. C., S. K. Poddar et J. Maniloff (1990). Heat shock response in mycoplasmas, genome-limited organisms. *J Bacteriol* 172: 1823-1827.
- DeBey M. C. et R. F. Ross (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62: 5312-5318.
- Dybvig K. (1990). Mycoplasmal genetics. *Annu Rev Microbiol* 44: 81-104.
- Dybvig K. et L. L. Voelker (1996). Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 50: 25-57.
- Fagan P. K., S. P. Djordjevic, J. Chin, G. J. Eamens et M. J. Walker (1997). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infect Immun* 65: 2502-2507.
- Fagan P. K., M. J. Walker, J. Chin, G. J. Eamens et S. P. Djordjevic (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog* 30: 101-110.
- Feld N. C., P. Qvist, P. Ahrens, N. F. Friis et A. Meyling (1992). A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30: 35-46.
- Fraser C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403.
- Freeman M. J., C. H. Armstrong, L. L. Sands-Freeman et M. Lopez-Osuna (1984). Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can J Comp Med* 48: 202-207.
- Frey J., A. Haldimann et J. Nicolet (1992). Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *Int J Syst Bacteriol* 42: 275-280.
- Frey J., A. Haldimann, M. Kobisch et J. Nicolet (1994). Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb Pathog* 17: 313-322.
- Friis N. F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suisneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27: 337-339.
- Futo S., Y. Seto, S. Mitsuse et Y. Mori (1992). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by using rRNA-oligodeoxynucleotide hybridization. *J Clin Microbiol* 30: 1509-1513.

- Futo S., Y. Seto, S. Mitsuse, Y. Mori, T. Suzuki et K. Kawai (1995a). Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J Bacteriol* 177: 1915-1917.
- Futo S., Y. Seto, M. Okada, S. Sato, T. Suzuki, K. Kawai, Y. Imada et Y. Mori (1995b). Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 33: 680-683.
- Gallily R., A. Avron, G. Jahsn-Streubel et P. F. Mühlradt (1995). Activation of macrophages and monocytes by mycoplasmas. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 421-438. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Goodwin R. F., R. G. Hodgson, P. Whittlestone et R. H. Woodhams (1969). Immunity in experimentally-induced'enzootic pneumonia of pigs. *J. Hyg.* 67: 193-208.
- Goodwin R. F. (1985). Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet Rec* 116: 690-694.
- Goodwin R. F. W., A. P. Pomeroy et P. Whittlestone (1965). Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *The Vet. Rec.* 77: 1247-1249.
- Haldimann A., J. Nicolet et J. Frey (1993). DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Gen Microbiol* 139 (Pt 2): 317-323.
- Harasawa R., K. Koshimizu, O. Takeda, T. Uemori, K. Asada et I. Kato (1991). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 5: 103-109.
- Harris D. L. (1990). Isolated weaning. *Large Anim Vet* 45: 10-13.
- Herrmann R., H. Göhlmann, J. Regula, J. I. Weiner, E. Pirkl, B. Ueberle et R. Frank (1999). Mycoplasmas, the smallest known bacteria. Dans *Microbial evolution and infection*, pp. 71-79. Édité par U. Göbel et B. Ruf. Reinbeck, Germany: Einhorn-Presse Verlag.
- Hovind-Hougen K. et N. F. Friis (1991). Morphological and ultrastructural studies of *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. *Res Vet Sci* 51: 155-163.
- Hsu T., S. Artiushin et F. C. Minion (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol* 179: 1317-1323.

- Hsu T. et F. C. Minion (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect Immun 66: 4762-4766.
- Hu P. C., R. M. Cole, Y. S. Huang, J. A. Graham, D. E. Gardner, A. M. Collier et W. A. Clyde, Jr. (1982). *Mycoplasma pneumoniae* infection: role of a surface protein in the attachment organelle. Science 216: 313-315.
- Janeway C. A. et P. Travers (1997). Immunobiologie, 2e édition, pp. 582. DeBoeck Université, Bruxelles, Belgique.
- Johansson K. E., J. G. Mattsson, K. Jacobsson, C. Fernandez, K. Bergstrom, G. Bolske, P. Wallgren et U. B. Gobel (1992). Specificity of oligonucleotide probes complementary to evolutionarily variable regions of 16S rRNA from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. Res Vet Sci 52: 195-204.
- Kahane I. (1995). Oxidative damage induced by mycoplasmas. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 415-419. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Kim M. F., M. B. Heidari, S. J. Stull, M. A. McIntosh et K. S. Wise (1990). Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. Infect Immun 58: 2637-2643.
- King K. W., D. H. Faulds, E. L. Rosey et R. J. Yancey, Jr. (1996). Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. Vaccine 15: 25-35.
- Kobisch M., B. Blanchard et M. F. Le Potier (1993). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. Vet Res 24: 67-77.
- Kobisch M. et N. F. Friis (1996). Swine mycoplasmoses. Rev Sci Tech 15: 1569-1605.
- Kobisch M. et R. F. Ross (1996). Experimental infections of swine. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 371-376. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Kristensen B., P. Paroz, J. Nicolet, M. Wanner et A. L. de Weck (1981). Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 42: 784-788.
- Lai W. C. et M. Bennett (1995). Interaction of mycoplasmas with natural killer cells. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 469-479. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc, New York.

Leon E. A., F. Madec, N. M. Taylor et M. Kobisch (2001). Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. Vet Microbiol 78: 331-341.

Lin J. H., M. J. Pan, C. W. Liao et C. N. Weng (2002). In vivo and in vitro comparisons of spray-drying and solvent- evaporation preparation of microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* for use as an orally administered vaccine for pigs. Am J Vet Res 63: 1118-1123.

Lin J. H., C. N. Weng, C. W. Liao, K. S. Yeh et M. J. Pan (2003). Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. J Vet Med Sci 65: 69-74.

Lo S. C., M. M. Hayes, H. Kotani, P. F. Pierce, D. J. Wear, P. B. Newton, 3rd, J. G. Tully et J. W. Shih (1993). Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. Mod Pathol 6: 276-280.

Ma J., A. Campbell et S. Karlin (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. J Bacteriol 184: 5733-5745.

Maes D., M. Verdonck, H. Deluyker et A. de Kruif (1996). Enzootic pneumonia in pigs. Vet Q 18: 104-109.

Maes D., H. Deluyker, M. Verdonck, F. Castryck, C. Miry, B. Vrijens, W. Verbeke, J. Viaene et A. de Kruif (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. Vaccine 17: 1024-1034.

Maniloff J. (1992). Phylogeny of mycoplasmas. Dans Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis, pp. 549-559. Édité par A. S. Microbiol. Washington, DC.

Maniloff J. (1996). The minimal cell genome: "on being the right size". Proc Natl Acad Sci U S A 93: 10004-10006.

Maré C. J. et W. P. Switzer (1965). *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med. 60: 84-845.

Marshall A. J., R. J. Miles et L. Richards (1995). The phagocytosis of mycoplasmas. J Med Microbiol 43: 239-250.

Masover G. K. et F. A. Becker (1996). Detection of mycoplasmas by DNA staining and fluorescent antibody methodology. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmatology, pp. 419-429. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.

- Mattsson J. G., K. Bergstrom, P. Wallgren et K. E. Johansson (1995). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 33: 893-897.
- Mebus C. A. et N. R. Underdahl (1977). Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 38: 1249-1254.
- Messier S., R. F. Ross et P. S. Paul (1990). Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 51: 52-58.
- Messier S. et R. F. Ross (1991). Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res* 52: 1497-1502.
- Minion F. C., C. Adams et T. Hsu (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68: 3056-3060.
- Moore R. J., C. Lenghaus, S. A. Sheedy et T. J. Doran (2001). Improved vectors for expression library immunization:application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine* 20: 115-120.
- Mori Y., T. Hamaoka et S. Sato (1987). Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr J Med Sci* 23: 657-662.
- Mori Y., T. Hamaoka, S. Sato et S. Takeuchi (1988). Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 19: 239-250.
- Naot Y. (1995). Mycoplasmal B-cell mitogens. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 451-460. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc, New York.
- Nicolet J., P. Paroz et S. Bruggmann (1980). Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 29: 305-309.
- Nocard E. et E. R. Roux (1898). Le microbe de la péripneumonie. *Ann Inst Pasteur* 12: 240-262.
- Okada M., T. Asai, M. Ono, T. Sakano et S. Sato (2000). Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 18: 2825-2831.

- Razin S. (1983). Identification of mycoplasma colonies. Dans Methods in mycoplasmology, pp. 83-88. Édité par S. Razin et J. Tully. New York, USA: Academic Press.
- Razin S. (1984). The Mycoplasmatales. Dans CRC Handbook of microbiology, pp. 105-129. Édité par C. P. inc. Cleveland.
- Razin S. et E. A. Freundt (1984). The mycoplasmas. Dans Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 740-775. Édité par N. R. Krieg et J. G. Holt. Willians and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Razin S. et E. Jacobs (1992). Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol 138 ( Pt 3): 407-422.
- Razin S. (1995a). Molecular properties of *Mollicutes*: a synopsis. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 1-19. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Razin S. (1995b). Introductory remarks. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 335-337. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Reddy S. P., W. G. Rasmussen et J. B. Baseman (1995). Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. J Bacteriol 177: 5943-5951.
- Rosengarten R. et K. S. Wise (1990). Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. Science 247: 315-318.
- Rosengarten R., C. Citti, M. Glew, A. Lischewski, M. Drosesse, P. Much, F. Winner, M. Brank et J. Spergser (2000). Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. Int J Med Microbiol 290: 15-25.
- Ross R. F. et P. Whittlestone (1983). Recovery of, identification of and serological response to porcine mycoplasmas. Dans Methods in mycoplasmology, pp. 115-127. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press., Inc., New York.
- Ross R. F., B. J. Zimmermann-Erickson et T. F. Young (1984). Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. Am J Vet Res 45: 1899-1905.
- Ross R. F. (1992). Mycoplasmal diseases. Dans Diseases of swine, 7e édition, pp. 537-551. Édité par A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire et D. J. Taylor. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Ross R. F. et G. W. Stemke (1996). Mycoplasma infections of swine. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 275-281. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.

Rottem S. (2003). Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 83: 417-432.

Ruuth E. et F. Praz (1989). Interactions between mycoplasmas and the immune system. *Immunol Rev* 112: 133-160.

Sambrook J., E. F. Fritsch et T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup>., Cold Spring Harbor laboratory, Plainview, NY, USA.

Scherm B., G. F. Gerlach et M. Runge (2002). Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Vet Microbiol* 89: 141-150.

Schurr T., E. Nadir et H. Margalit (1993). Identification and characterization of *E.coli* ribosomal binding sites by free energy computation. *Nucleic Acids Res* 21: 4019-4023.

Sheldrake R. F., L. F. Romalis et M. M. Saunders (1993). Serum and mucosal antibody responses against *Mycoplasma hyopneumoniae* following intraperitoneal vaccination and challenge of pigs with *M. hyopneumoniae*. *Res Vet Sci* 55: 371-376.

Shimoji Y., E. Oishi, T. Kitajima, Y. Muneta, S. Shimizu et Y. Mori (2002). *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. *Infect Immun* 70: 226-232.

Shimoji Y., E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka et Y. Mori (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* 21: 532-537.

Sitjar M., E. P. Noyes, X. Simon et C. Pijoan (1996). Relationship among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lungs lesions and production parameters in pigs. *Swine Health and Production* 4: 273-277.

Sorensen V., K. Barfod et N. C. Feld (1992). Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. *Vet Rec* 130: 488-490.

Sorensen V., K. Barfod, N. C. Feld et L. Vraa-Andersen (1993). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Rev Sci Tech* 12: 593-604.

Stark K. D., J. Nicolet et J. Frey (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 64: 543-548.

- Stemke G. W., D. J. McIntyre, K. L. Roy, M. E. Stembler et J. A. Robertson (1985). Guanine-plus-cytosine compositions of and deoxyribonucleic acid hybridization comparisons between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 527-529.
- Stemke G. W. (1989). A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic porcine pneumonia. Mol Cell Probes 3: 225-232.
- Stemke G. W., F. Laigret, O. Grau et J. M. Bove (1992). Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. Int J Syst Bacteriol 42: 220-225.
- Stemke G. W., Y. Huang, F. Laigret et J. M. Bove (1994a). Cloning the ribosomal RNA operons of *Mycoplasma flocculare* and comparison with those of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology 140 ( Pt 4): 857-860.
- Stemke G. W., R. Phan, T. F. Young et R. F. Ross (1994b). Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. Am J Vet Res 55: 81-84.
- Stipkovits L., J. Nicolet, A. Haldimann et J. Frey (1991). Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. Mol Cell Probes 5: 451-457.
- Strasser M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch et J. Nicolet (1991). Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. Infect Immun 59: 1217-1222.
- Suter M., M. Kobisch et J. Nicolet (1985). Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. Infect Immun 49: 615-620.
- Tajima M. et T. Yagihashi (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infect Immun 37: 1162-1169.
- Tajima M., T. Yagihashi, T. Nunoya, A. Takeuchi et F. Ohashi (1984). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. Am J Vet Res 45: 1928-1932.
- Thacker E. L., B. Thacker, T. B. Boettcher et H. Jayappa (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Swine Health and Production 6: 107-112.

- Thacker E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech et B. J. Thacker (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37: 620-627.
- Thacker E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins et W. R. Waters (2000a). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am J Vet Res* 61: 1384-1389.
- Thacker E. L., B. J. Thacker, T. F. Young et P. G. Halbur (2000b). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18: 1244-1252.
- Tsai S., D. J. Wear, J. W. Shih et S. C. Lo (1995). Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10197-10201.
- Tully J., J. M. Bové, F. Laigret et R. F. Whitcomb (1993). Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 378-385.
- Tully J. G. et R. F. Whitcomb (1995). Minimal standard for description of new species of the class *Mollicutes*. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 339-347. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Tully J. G. (1996). Mollicute-host interrelationships: current concepts and diagnostic implications. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 1-17. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Veilleux C., S. Razin et L. H. May (1996). Detection of mycoplasma infection by PCR. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 431-438. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.
- Verdin E., C. Saillard, A. Labbe, J. M. Bove et M. Kobisch (2000). A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet Microbiol* 76: 31-40.
- Watson H. L., X. Zheng et G. H. Cassell (1993). Structural variations and phenotypic switching of mycoplasmal antigens. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1: S183-186.
- Weisburg W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten et al. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* 171: 6455-6467.

Weisburg W. G. (1995). Ribosomal RNA sequencing and construction of mycoplasmal phylogenies. Dans Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology, pp. 349-354. Édité par J. G. Tully et S. Razin. Academic Press, Inc., New York.

Weng C. N., Y. L. Tzan, S. D. Liu, S. Y. Lin et C. J. Lee (1992). Protective effects of an oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine against experimental infection in pigs. Res Vet Sci 53: 42-46.

Wilton J. L., A. L. Scarman, M. J. Walker et S. P. Djordjevic (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology 144 (Pt 7): 1931-1943.

Wise K. S. et M. F. Kim (1987a). Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. J Bacteriol 169: 5546-5555.

Wise K. S. et M. F. Kim (1987b). Identification of intrinsic and extrinsic membrane proteins bearing surface epitopes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Isr J Med Sci 23: 469-473.

Wise K. S. (1993). Adaptive surface variation in mycoplasmas. Trends Microbiol 1: 59-63.

Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271.

Yagihashi T., T. Nunoya, T. Mitui et M. Tajima (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. Nippon Juigaku Zasshi 46: 705-713.

Yamao F., A. Muto, Y. Kawauchi, M. Iwami, S. Iwagami, Y. Azumi et S. Osawa (1985). UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 2306-2309.

Yogev D., R. Rosengarten, R. Watson-McKown et K. S. Wise (1991). Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. Embo J 10: 4069-4079.

Young T., Y.-W. Chiang et R. F. Ross (1992). Analysis of virulence-associated antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*. IOM Letter 2: 321.

Young T. F. et R. F. Ross (1987). Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am J Vet Res 48: 651-656.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1994a). Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. Infect Immun 62: 4367-4373.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1994b). Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect Immun 62: 1616-1622.

Zhang Q., T. F. Young et R. F. Ross (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect Immun 63: 1013-1019.

Zielinski G. C. et R. F. Ross (1990). Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. Am J Vet Res 51: 344-348.

Zielinski G. C. et R. F. Ross (1992). Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 53: 1119-1124.

Zielinski G. C. et R. F. Ross (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am J Vet Res 54: 1262-1269.