

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
Salmonella enterica subsp. *enterica*
EN ALIMENTOS MEDIANTE CRISPR-PCR

MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Navarro Brotons, Natalia

Director: Dr. Francisco J. Martínez Mojica
Universidad de Alicante

Tutor: Dra. Ana González Pellicer
Universidad Politécnica de Valencia

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* EN ALIMENTOS MEDIANTE CRISPR-PCR

N. Navarro, F.J. Martínez Mojica¹, A. González Pellicer²

RESUMEN

La epidemiología de *Salmonella enterica* se ha estudiado utilizando diversos métodos de tipado molecular entre los que se incluyen PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) y MLST (Multiple-Locus Sequence Typing). El uso de genes de virulencia y secuencias repetidas CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) como marcadores genéticos en esquemas MLST ha permitido una mejor diferenciación e identificación de *S. enterica* subsp. *enterica* comparado con PFGE. *Salmonella* spp. posee un único sistema CRISPR/CAS el cual incluye dos agrupaciones de repeticiones, CRISPR1 y CRISPR2.

El objetivo principal de este estudio es poner a punto un método de detección e identificación de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en alimentos basado en amplificación por PCR de agrupaciones CRISPR. Para ello han sido analizadas 67 cepas de *S. enterica* subsp. *enterica*, incluyendo un mayor porcentaje de aquellos aislados pertenecientes a los dos serotipos principales (Typhimurium y Enteritidis). La agrupación CRISPR1 se confirmó como una diana adecuada para este fin.

La amplificación por PCR de la agrupación CRISPR1 (CRISPR1-PCR) permitió detectar niveles de *S. enterica* subsp. *enterica* inferiores a 10 ufc en muestras de alimento, estableciéndose un procedimiento de análisis mixto, que incluye una etapa inicial de enriquecimientos por cultivo, seguida de la amplificación de dicha agrupación y análisis electroforético del producto obtenido. Como alimento a analizar se utilizó mayonesa por su gran incidencia como vehículo de este tipo de infecciones.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella*, CRISPR/CAS, PCR, Tipado Molecular.

RESUM

L' epidemiologia de *Salmonella enterica* s' ha estudiat utilitzant diversos mètodes de tipat molecular entre els que s' inclouen PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) i MLST (Multiple-Locus Sequence Typing). L'ús de gens de virulència i seqüències repetides CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) com a marcadors genètics en esquemes MLST ha permès una millor diferenciació i identificació de *S. enterica* subsp. *enterica* comparat amb PFGE. *Salmonella* spp. posseïx un únic sistema CRISPR/CAS el qual inclou dos agrupacions de repeticions, CRISPR 1 i CRISPR 2.

¹ Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.

² Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

L'objectiu principal d'aquest estudi és posar a punt un mètode de detecció i identificació de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en aliments basat en amplificació per PCR d'agrupacions CRISPR. Per a això han sigut analitzades 67 soques de *S. enterica* subsp. *enterica*, incloent un major percentatge d'aquells aïllats pertanyents als dos serotips principals (Typhimurium i Enteritidis). L'aprupació CRISPR 1 es va confirmar com una diana adequada per a aquesta fi.

L'amplificació per PCR de l'agrupació CRISPR1 (CRISPR1-PCR) va permetre detectar nivells de *S. enterica* subsp. *enterica* inferiors a 10 ufc en mostres d'aliment, establint-se un procediment d'anàlisi mixta, que inclou una etapa inicial d'enriquiments per cultiu, seguida de l'amplificació d'aquesta agrupació i anàlisi electroforètic del producte obtingut. Com a aliment a analitzar es va utilitzar maionesa per la seua gran incidència com a vehicle d'aquest tipus d'infeccions

PARAULES CLAU: *Salmonella*, CRISPR/CAS, PCR, Tipat Molecular.

ABSTRACT

The epidemiology of *Salmonella enterica* has been studied using several molecular subtyping methods, including PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) and MLST (Multiple-Locus Sequence Typing). The use of virulence genes and CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) as genetic markers in a MLST scheme has allowed a better differentiation and identification of *S. enterica* subsp. *enterica* than PFGE approaches. *Salmonella* spp. has one CRISPR/CAS system including two clusters of repeats, CRISPR1 and CRISPR2.

The main objective of this research is to set up a new method for detection and identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in food based on PCR amplification of CRISPR clusters. A total of 67 strains of *S. enterica* subsp. *enterica* have been analyzed including a higher percentage of isolates belonging to the main serotypes (Typhimurium and Enteritidis). CRISPR1 was confirmed as a suitable target for this purpose.

PCR amplification of CRISPR1 (CRISPR1-PCR) allowed the detection of *S. enterica* subsp. *enterica* at levels under 10 cfu in food samples. Eventually, a mixed-analysis procedure was established, including an initial stage of enrichments by culture, followed by amplification and electrophoretic analysis of the PCR product. Mayonnaise was the food of choice due to its high incidence as a vehicle of this type of infection.

KEYWORDS: *Salmonella*, CRISPR/CAS, PCR, Molecular Typing.

INTRODUCCIÓN

Características generales del género *Salmonella*

El género *Salmonella* está formado por bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos, oxidasa negativas, la mayoría son móviles y fermentan glucosa con producción de ácido y gas (Ellermeier y Slauch, 2006). El tratamiento taxonómico actual de *Salmonella* spp. agrupa todas las cepas (patógenas o no) en tres especies *S. enterica*, *S. subterranea* (Shelobolina *et al.*, 2004) y *S. bongori* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). La especie *S. enterica* consta de seis subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*).

Salmonella enterica subsp. *enterica* se divide en cinco serogrupos, que a su vez comprenden múltiples serotipos. Su hábitat principal es el tracto intestinal de animales de sangre caliente. Las cepas de *Salmonella* que afectan con más frecuencia al hombre, produciendo un tipo de gastroenteritis conocida como salmonelosis no tifoidea, pertenecen a esta subespecie, siendo Thyphimurium y Enteritidis los serotipos prevalentes.

Identificación molecular de *Salmonella*

La epidemiología de *Salmonella enterica* se ha estudiado utilizando diversos métodos de tipado molecular, entre los que se incluyen MLVA (Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis), MLST (Multiple-Locus Sequence Typing) y PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). PFGE es actualmente el método más utilizado por los laboratorios de salud pública para el rastreo de patógenos alimentarios del género *Salmonella*. Sin embargo, su poder de discriminación es muy limitado en el caso de serotipos altamente clonales como *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. En este caso particular, MLVA muestra un mayor poder discriminatorio que PFGE, aunque excepcionalmente algunas cepas que tienen el mismo tipado por MLVA se resuelven por PFGE. Por su parte, el método MLST, basado en diferencias en las secuencias de nucleótidos en varios lugares del DNA, genera una gran cantidad de información altamente reproducible. Durante la redacción de esta memoria, una vez finalizado el trabajo experimental, se ha publicado un artículo (Liu *et al.*, 2011) en el que se evalúa el uso de genes de virulencia y secuencias CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) como marcadores genéticos en esquemas MLST, demostrando una mejor diferenciación e identificación de *S. enterica* subsp. *enterica* comparado con PFGE.

Los sistemas CRISPR/CAS

Las secuencias repetidas CRISPR fueron originalmente identificadas en el dominio Bacteria (Ishino *et al.*, 1987) y posteriormente en Archaea (Mojica *et al.*, 1993). Tras la detección de secuencias con una organización similar en una veintena de genomas procarióticos pertenecientes a diversos grupos

taxonómicos, se reconocieron en el año 2000 (Mojica *et al.*, 2000) como miembros de una nueva familia de repeticiones de DNA cortas y regularmente espaciadas que se denominó SRSR (Short Regularly Spaced Repeats). Posteriormente, estas secuencias se renombraron con el actual acrónimo de CRISPR (Jansen *et al.*, 2002).

Las repeticiones CRISPR tienen un tamaño comprendido entre 21 y 47 pb (Godde y Bickerton, 2006; Grissa *et al.*, 2007) estando intercaladas por secuencias de tamaño más o menos constante, denominadas espaciadores, que según el sistema oscilan entre 20 y 72 pb (Grissa *et al.*, 2007; Mojica *et al.*, 2000).

La diversidad de secuencia de las repeticiones CRISPR es muy elevada, pudiéndose distinguir más de 12 subtipos en base a la misma (Kunin *et al.*, 2007). La mayor parte de las agrupaciones CRISPR poseen en un extremo una región rica en adeninas y timinas denominada *leader* (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2000).

Tras la descripción de esta familia de repeticiones se identificaron los genes *cas* (CRISPR associated) asociados a estas repeticiones (Jansen *et al.*, 2002). Hasta la fecha se han descrito entre 25 y 45 familias de proteínas Cas diferentes (Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006). Atendiendo a la composición y organización de las agrupaciones de los genes *cas*, los sistemas CRISPR/CAS se clasifican en 3 tipos (I, II y III) con varios subtipos cada uno (Makarova *et al.*, 2011).

Un sistema CRISPR/CAS típico está constituido por una o varias agrupaciones de unidades CRISPR-espaciador, con una secuencia *leader* adyacente a cada una de dichas agrupaciones y una única dotación de genes *cas* asociados.

La función biológica de los sistemas CRISPR/CAS fue desvelada en el año 2007 mediante experimentos llevados a cabo con la bacteria *Streptococcus thermophilus*, donde se constató la inserción de nuevos espaciadores durante la infección por un fago, procedentes del genoma del virus, y la adquisición de inmunidad específica frente a dicho virus como consecuencia de la presencia de los nuevos espaciadores (Barrangou *et al.*, 2007). Estos resultados indican que los sistemas CRISPR/CAS constituyen un sistema que interfiere en la transmisión de elementos genéticos extracromosómicos. Para ello el sistema debe incorporar algún espaciador idéntico (o similar) a una secuencia del elemento invasor (denominada proto-espaciador), que le serviría en una posterior entrada para su reconocimiento. Esta función se ha confirmado en multitud de trabajos posteriores (ver revisión reciente en Makarova *et al.*, 2011).

El sistema CRISPR/CAS de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. posee un único sistema CRISPR/CAS (Touchon y Rocha, 2010), perteneciente al subtipo I-E (Makarova *et al.*, 2011). El sistema incluye dos agrupaciones de repeticiones que denominamos CRISPR1, localizada a 20 pb del extremo 3' del gen *iap* y CRISPR2, localizada a unas 16 kb de la primera, corriente abajo del gen *ygcF*. Las unidades repetidas tienen normalmente un tamaño de 29 pb y los

espaciadores de 32 pb. En el caso de CRISPR1 se ha identificado una secuencia *leader* en el extremo opuesto al gen *iap*, y en el caso de CRISPR2 en el extremo próximo a *ygcF*. Junto a la *leader* de la agrupación CRISPR1 se encuentran 8 genes *cas* (denominados en conjunto CAS-E) en la disposición *cas2-cas1-cse3-cas5e-cse4-cse2-cse1-cas3* (figura1).

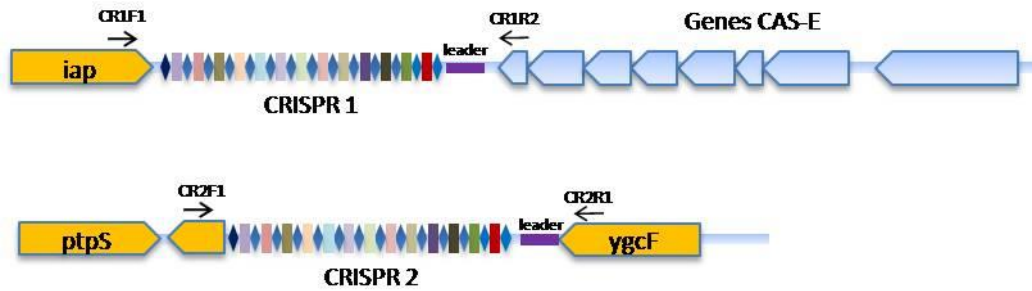


FIGURA 1. Representación esquemática del sistema CRISPR/CAS de *Salmonella* spp. Se muestran las dos agrupaciones CRISPR (CRISPR1 y CRISPR2), constituidas por repeticiones (rombos) separadas por espaciadores (rectángulos), las regiones *leader* y los genes *cas* (rectángulos azules, apuntando en la dirección de transcripción). La localización de los cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR (Polimerase Chain Reaction) de las regiones CRISPR se señala mediante flechas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

En este trabajo han sido analizadas 67 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, suministradas por laboratorios LABAQUA S.A (cepa S43) y el Hospital General Universitario de Elche (resto de cepas). En la tabla 1 se relacionan los serotipos correspondientes a cada una de ellas, y el código asignado para su identificación.

Las cepas se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 30 %.

TABLA 1. Serotipos correspondientes a cada una de las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* analizadas

Thyphimurium	Enteritidis
T01	E01
T02	E02
T03	E03
T04	E04
T05	E05
T06	E06
T07	E07
T08	E08
T09	E09
T10	E10
T11	E11
T12	E12
T13	E13
T14	E14
T15	E15
T16	Paratyphi A
T17	Z01
T18	Rissen
T19	Z02
T20	Ndolo
T21	Z03
T22	Manhattan
T23	Z04
T24	Spartel
T25	Z05
T26	41:z10;1,2
T27	Z06
T28	Paratyphi B
T29	Z07
T30	Mikawasima
T31	Z08
T32	Bredeney
T33	Z09
T34	Legon
T35	Z10
T36	Choleraesuis
T37	SCH
T38	Thyphi
T39	S43
T40	

Soluciones y medios de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo se prepararon a partir de sus componentes deshidratados, suministrados por Laboratorios Conda, S.A., siguiendo las instrucciones del fabricante.

La composición de los distintos medios de cultivo utilizados se detalla a continuación.

LB (g/l)

Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

AGAR ENTÉRICO HEKTOEN (g/l)

Proteosa peptona	12
Extracto de levadura	3
Sales biliares	9
Lactosa	12
Sacarosa	12
Salicina	2
Cloruro de sodio	5
Tiosulfato de sodio	5
Citrato de sodio y amonio	1,5
Agar	14
Azul de bromotimol	0,065
Fucsina ácida	0,1

RAPPAPORT VASSILIADIS (g/l)

Peptona de soja	5
Cloruro sódico	8
Potasio di-hidrógeno fosfato	1,6
Cloruro magnésico	40
Verde de malaquita	0,04

AGAR NUTRITIVO (g/l)

Extracto de carne	1
Extracto de levaduras	2
Peptonas	5
Cloruro sódico	5
Agar	15

CALDO NUTRITIVO (g/l)

Extracto de carne	1
Extracto de levaduras	2
Peptonas	5
Cloruro sódico	5

AGUA PEPTONA TAMPONADA (g/l)

Peptona de caseína	10
Cloruro sódico	5
Potasio di-hidrógeno fosfato	1,5
di-Sodio hidrógeno fosfato	3,5

Extracción de ADN

Las extracciones de DNA para su posterior amplificación por PCR se llevaron a cabo a partir de 5 ml de cultivos crecidos en medio LB e incubados en agitación a 37°C durante 12-18 horas. Las células se recuperaron por centrifugación durante 10 minutos a 4.000 rpm y tras eliminar el sobrenadante por decantación se resuspendieron en 1 ml de agua de calidad Milli-Q (MQ) estéril, transfiriendo la suspensión de células a tubos estériles de 1,5 ml. Posteriormente se realizó un lavado con 1 ml de agua MQ estéril consistente en un paso de centrifugación durante 1 minuto a 6.000 rpm y resuspensión final en 0,1 ml de agua MQ estéril. Las células se lisaron mediante incubación en un termociclador a 96°C durante 10 minutos. Finalmente se eliminaron las células no lisadas mediante centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un tubo estéril de 1,5 ml. La suspensión de DNA se conservó a -20°C.

Amplificación de regiones CRISPR mediante PCR

Las reacciones de amplificación por PCR de las regiones CRISPR de *Salmonella* spp. se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf, utilizando el kit Expand High Fidelity PCR system suministrado por la casa comercial ROCHE. Los cebadores empleados fueron diseñados a partir del alineamiento mediante la aplicación informática ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), de las regiones adyacentes a las agrupaciones de repeticiones en genomas disponibles en bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Las agrupaciones CRISPR1 se amplificaron utilizando los oligonucleótidos CR1F1, (5'-GATGTAGTGCGGATAATGC-3') y CR1R2 (5'-CCTGTTGAAAATCAATAAGTT-3'). Las agrupaciones CRISPR2 se amplificaron con los oligonucleótidos CR2F1 (5'-GCCATGGCCTTCTCCTG-3') y CR2R1 (5'-CATAGCGATGCACGGATC-3'). La localización aproximada de los 4 cebadores se muestra en la figura 1.

Los componentes de las reacciones de PCR se mezclaron en proporciones estándar de acuerdo con las recomendaciones del suministrador del sistema de amplificación, en un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación utilizado en todos casos incluyó los siguientes pasos:

1. Desnaturalización a 94°C durante 2 minutos.
2. 15 ciclos de desnaturalización-hibridación-extensión, compuestos por una etapa de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, un paso de hibridación durante 30 segundos, disminuyendo la temperatura 1°C por ciclo desde 58°C hasta 43°C y finalmente de una fase de extensión a 72°C durante 1,5 minutos.
3. 35 ciclos de desnaturalización-hibridación-extensión, incluyendo cada uno de ellos una etapa de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, una de hibridación durante 1 minuto a 48°C, y una extensión a 72°C durante 1,5 minutos.
4. Extensión a 72°C durante 10 minutos.

Análisis de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis a voltaje constante (80 mV) en gel de agarosa Seakem LE (Biowhittaker Molecular Applications) al 1% (p/v) en tampón TAE (Sambrook *et al.*, 2000), incluyendo el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para la estimación del tamaño de los fragmentos. La visualización del DNA tras las electroforesis se realizó mediante tinción de los geles sumergiéndolos en una solución de Bromuro de Etidio (Sigma), y posterior lavado con agua destilada.

Secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron secuenciados por los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, utilizando un secuenciador ABI PRISM 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Las muestras de DNA fueron purificadas previamente a su secuenciación con el kit GFX PCR DNA (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis bioinformático de las secuencias CRISPR

Las agrupaciones CRISPR fueron identificadas en secuencias de DNA mediante la herramienta informática CRISPRFinder, disponible en la dirección web <http://crispr.u-psud.fr/crispr/CRISPRdatabase.php>. Los espaciadores CRISPR identificados de esta manera se compararon mediante la aplicación CRISPRtionary, accesible en <http://crispr.u-psud.fr/CRISPRcompar/Dict/Dict.php>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad de regiones CRISPR en *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Con la finalidad de valorar el potencial de la amplificación por PCR de loci CRISPR para la detección e identificación de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, se realizó en primer lugar un análisis de la variabilidad de las dos agrupaciones descritas para la especie en una colección de 67 cepas representativa de la diversidad de aislados relacionados con casos de salmonelosis no tifoidea humana en la zona de Elche. Este estudio permitiría al mismo tiempo optimizar las condiciones de amplificación, establecer la dimensión de su aplicación (a nivel de serotipos concretos o a nivel de la subespecie) y determinar qué locus es el más apropiado como diana de la PCR.

Una vez diseñada una pareja de oligonucleótidos específicos para cada una de las agrupaciones CRISPR1 y CRISPR2 de *S. enterica* subsp. *enterica* se procedió a la amplificación por PCR de ambas regiones (ver Materiales y Métodos). En primer lugar se amplificó la agrupación CRISPR1,

obteniendo productos de amplificación para las 67 cepas analizadas (figura 2), aunque en una de ellas (Z06) el pequeño tamaño del amplicón (0,2 kb) sugiere la ausencia de repeticiones en esta región.

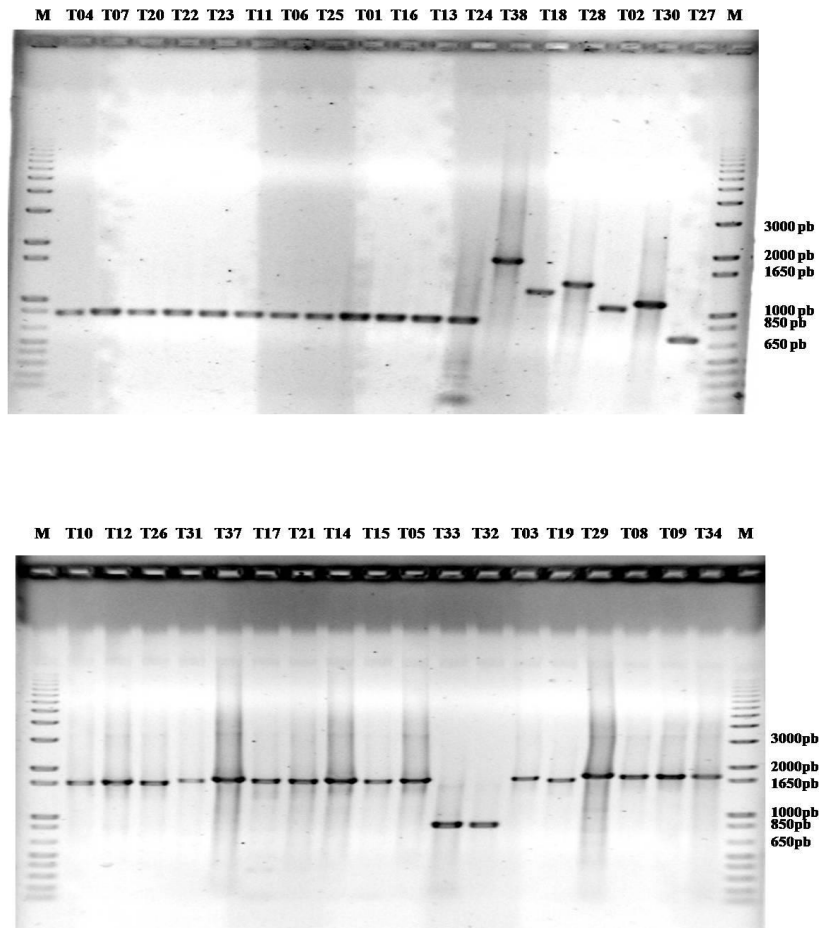
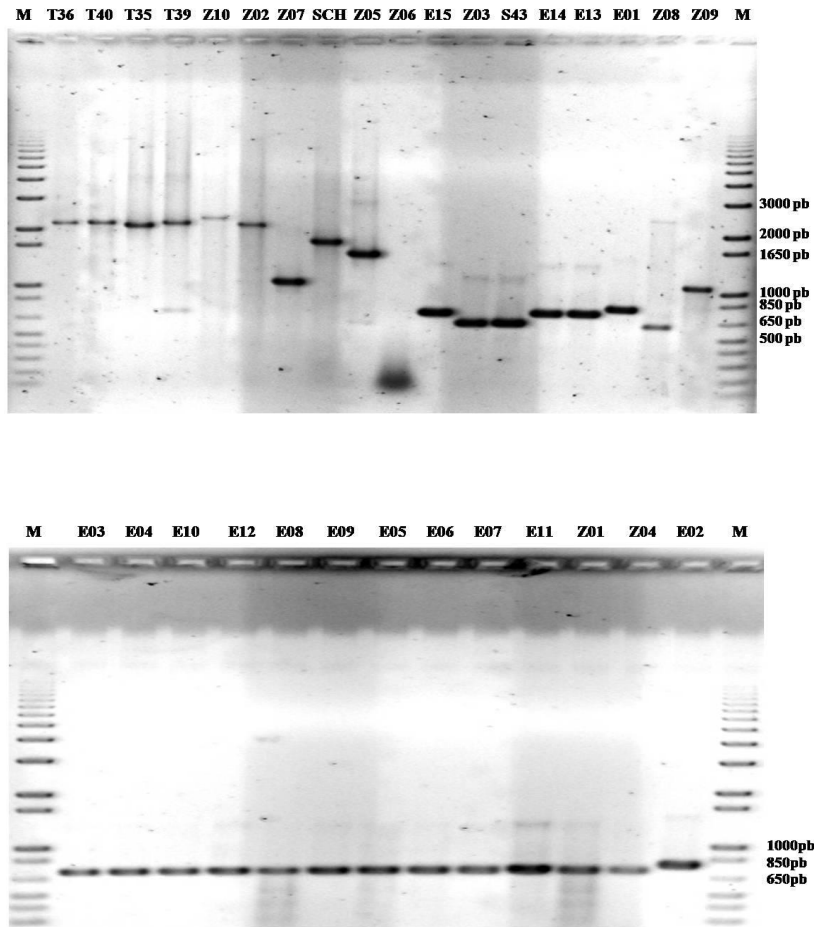


FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de la agrupación CRISPR1. Se incluye el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (M), indicando el tamaño de fragmentos que flanquean las bandas de amplificación más intensas (supuestamente específicas).

Fig.2 cont.



Las reacciones de PCR de la agrupación CRISPR2 (figura 3), dieron lugar a productos de amplificación para 60 de las 67 cepas analizadas (89,5%). La ausencia de amplificado en el caso de T20, T17, Z10, Z06, Z08, Z09 y Z01 podría deberse a varias razones, incluyendo la degeneración de las secuencias de apareamiento de los cebadores utilizados y/o a la inserción de algún elemento de gran tamaño que estaría impidiendo completar los amplificadores a partir de dichos cebadores tal y como se ha documentado en *Escherichia coli* (Díez-Villaseñor *et al.*, 2010). En cualquier caso, estos resultados descartarían a la agrupación CRISPR2 como diana para la identificación mediante CRISPR-PCR de *S. enterica* subsp. *enterica*, al menos bajo las condiciones (cebadores y parámetros de reacción) utilizadas. Por el contrario, el locus CRISPR1 se confirma como una diana adecuada para este fin (amplificación del 100% de las cepas), si bien su utilidad debería corroborarse en un futuro mediante la amplificación de un mayor número y diversidad de aislados.

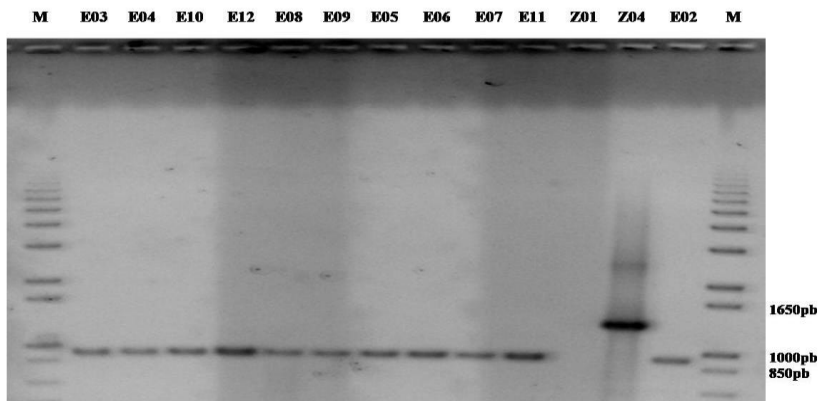
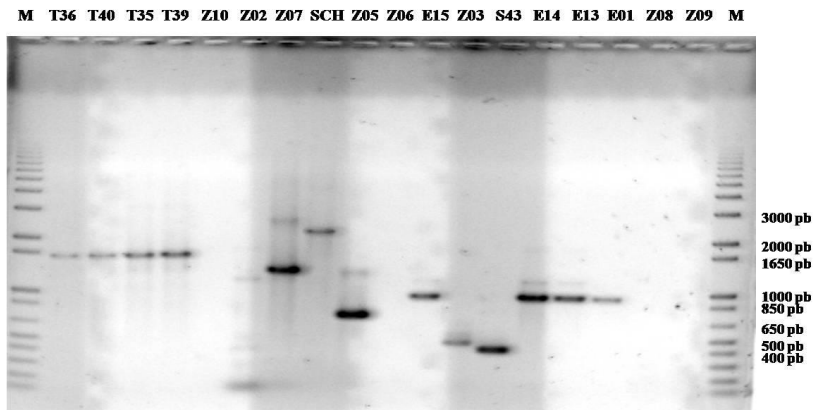
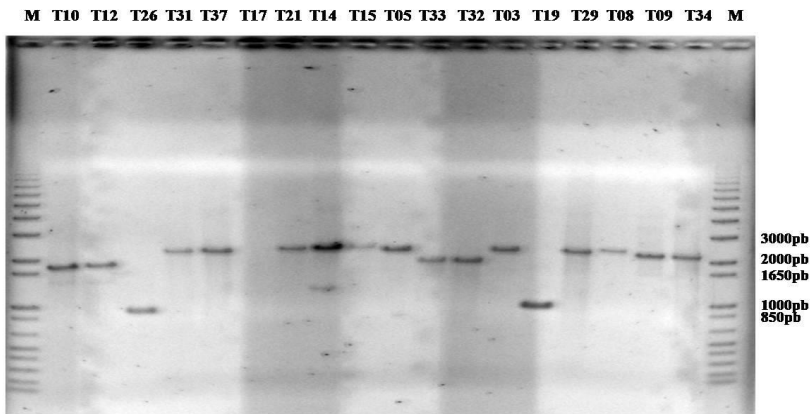
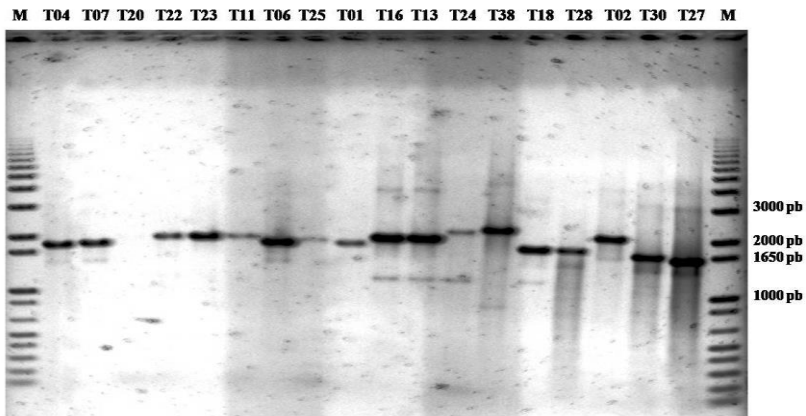


FIGURA 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de las agrupaciones CRISPR2. Se incluye el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (M), indicando el tamaño de fragmentos que flanquean las bandas de amplificación más intensas, supuestamente específica.

Con el objeto de definir de forma más específica la variabilidad de los loci CRISPR, y con ello valorar la aplicabilidad de la CRISPR-PCR para la identificación a nivel de serotipo, se realizó una estimación del tamaño de los productos de amplificación a partir de varias electroforesis en gel de agarosa utilizando los marcadores de peso molecular como referencia (tabla 2). Aunque el tamaño de los amplicones no permite la asignación a un serotipo particular, si sería posible descartar pertenencia a serotipos concretos. Por ejemplo, la obtención de un amplicón para la agrupación CRISPR1 con un tamaño superior a 800 pb, o de uno superior a 1 kb para la CRISPR2, descartarían en principio pertenencia al serotipo Enteritidis (amplicones de 700-800 y 900-1000 pb respectivamente). En este sentido, cabe destacar el mayor rango de tamaños observado en Typhimurium para ambas agrupaciones (entre 700 y 2.300 pb para CRISPR1 y entre 900 y 2.600 pb para CRISPR2), indicativo de una mayor diversidad de los loci CRISPR, lo cual podría permitir una identificación a nivel cepa para este serotipo en estudios epidemiológicos.

TABLA 2. Estimación del tamaño de los amplicones CRISPR

CEPA	CLUSTER 1 (pb)	CLUSTER 2 (pb)	CEPA	CLUSTER 1 (pb)	CLUSTER 2 (pb)	CEPA	CLUSTER 1 (pb)	CLUSTER 2 (pb)
T01	785	1891	T24	836	2381	E07	698	986
T02	1005	2111	T25	785	1989	E08	739	911
T03	1773	2392	T26	1654	979	E09	739	911
T04	823	1844	T27	680	1544	E10	720	929
T05	1620	2392	T28	1355	1827	E11	716	968
T06	804	1891	T29	1883	2256	E12	739	929
T07	823	1844	T30	1052	1660	E13	741	916
T08	1827	2323	T31	1754	2448	E14	759	916
T09	1827	2127	T32	861	1948	E15	759	916
T10	1703	1803	T33	836	2006	Z01	735	No detectado
T11	804	2091	T34	1827	2066	Z02	2309	1177
T12	1703	1960	T35	2200	1590	Z03	672	470
T13	856	2111	T36	2309	1590	Z04	716	1359
T14	1754	2517	T37	1860	2381	Z05	1566	718
T15	1754	2517	T38	1826	2381	Z06	254	No detectado
T16	856	2111	T39	2309	1680	Z07	1036	1349
T17	1806	No detectado	T40	2309	1590	Z08	641	No detectado
T18	1236	1827	E01	797	891	Z09	1041	No detectado
T19	1721	936	E02	755	932	Z10	2484	No detectado
T20	823	No detectado	E03	720	929	SCII	1768	2334
T21	1754	2517	E04	720	911	S43	672	432
T22	823	2091	E05	758	911			
T23	804	2039	E06	698	1005			

Para profundizar en este aspecto, se secuenciaron fragmentos de distinto tamaño obtenidos para las dos agrupaciones de siete de las cepas de Typhimurium analizadas (T02, T03, T06, T10, T18, T27, T36), seleccionadas aleatoriamente. Las secuencias de parte (CRISPR2) o la totalidad de los fragmentos (CRISPR1) se adjuntan en el Anexo I. En todos los casos se observó la presencia de repeticiones CRISPR, confirmando la especificidad

de las reacciones de PCR. La comparación de la dotación de espaciadores CRISPR1 en estas cepas junto con la información disponible en las bases de datos de secuencias (figura 4) muestra que no hay ningún espaciador que esté presente en todas las cepas de Typhimurium, descartando una posible utilización de cebadores internos para la identificación del serotipo, y por extensión de la subespecie, confirmando la estrategia utilizada en este trabajo como la única alternativa para este fin. Por otro lado, solo una cepa de las secuenciadas en este trabajo (T36) presenta espaciadores específicos, que podrían utilizarse en estudios epidemiológicos (por ejemplo, para la identificación del alimento origen de la infección), por lo que para la realización de este tipo de estudios basado en secuencias CRISPR se debería recurrir a alternativas más elaboradas que la simple amplificación por PCR, que permitieran la detección de combinaciones de espaciadores tales como hibridación o secuenciación.

CEPAS	ESPACIADORES																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
T02	■	■	■																														
T03	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T06	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T18	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T36	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D23580	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
DT104	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
DT12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LT12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SL1344	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
T000240.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
UK-1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

FIGURA 4. Contenido en espaciadores CRISPR1 de cepas secuenciadas en este trabajo y de genomas disponibles de *Salmonella* Typhimurium

Detección de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en muestras de mayonesa

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió utilizar la agrupación CRISPR1 como diana para la detección de *Salmonella* por PCR.

La detección de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en muestras de alimento se realizó tras inocular muestras de mayonesa casera con la cepa S43. En la figura 5 se representa esquemáticamente el procedimiento seguido. El inóculo se preparó a partir de un comprimido BACuanti, suministrado por laboratorios LABAQUA S.A, conteniendo $2,9 \times 10^5$ ufc (incertidumbre $\pm 1.64\%$) de la cepa liofilizada. Para ello se reconstituyó la pastilla con 20 ml de agua estéril, dando lugar a una concentración teórica de $1,4 \times 10^4$ ufc/ml. Con la finalidad de confirmar dicha concentración, se sembraron por filtración (filtrado sobre membrana de celulosa de 0,45 μ m)

placas de Agar Salmonella-Shigella (SS) a partir de varias diluciones por triplicado del reconstituido, incubando a 37°C durante 24 horas. El recuento de ufc/ml a partir de estas placas dio lugar a una estimación de $6,0 \pm 1,0 \times 10^3$ ufc/ml. La diferencia con respecto al valor teórico podría atribuirse a una pérdida de viabilidad de las células liofilizadas durante el almacenamiento.

Una vez estimada la concentración de ufc en la suspensión, se realizaron pre-enriquecimientos en Agua Peptona Tamponada (APT) a partir de muestras de mayonesa (25 gramos de mayonesa homogeneizada en 225 ml de APT) inoculadas con 1 ml de diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} o 10^{-4} de la citada suspensión de células. Estos experimentos se realizaron por duplicado. Los pre-enriquecimientos se incubaron en agitación (120 rpm) a 37°C durante 24 horas. A continuación se realizaron enriquecimientos en Rappaport-Vassiliadis (RV) transfiriendo 0,1 y 1 ml a tubos con 10 ml de medio y se incubaron a 42°C durante 24 horas.

Para confirmar crecimiento de *Salmonella* tras el periodo de incubación de los enriquecimientos se sembraron 0,2 ml de cada uno de ellos en placas de Agar Entérico Hektoen (HK) y Agar Salmonella-Shigella (SS), y se incubaron a 37°C durante 24h. Se obtuvieron colonias típicas de *Salmonella* en todas las placas sembradas a partir de los enriquecimientos procedentes de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , pero no partir de la 10^{-4} .

Finalmente, se extrajo el DNA a partir de los enriquecimientos tras centrifugar 1 ml (enriquecimientos procedentes de diluciones 10^{-1} y 10^{-2}), o 9 ml (diluciones 10^{-3} y 10^{-4}) y se amplificó por PCR utilizando cebadores de la agrupación CRISPR1, tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Se obtuvieron bandas de amplificación para los enriquecimientos inoculados con 0,1 ml a partir de pre-enriquecimientos de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Por el contrario, no se pudo detectar amplificado para los enriquecimientos inoculados con 0,1 ml o 1 ml procedentes de pre-enriquecimientos de la dilución 10^{-4} (figura 6).

Según nuestra estimación por recuento en placa de ufc de la muestra de *Salmonella* inoculada, los pre-enriquecimientos realizados a partir de la dilución 10^{-4} contendrían 0,6 ufc. Tanto la ausencia de crecimiento en las placas sembradas a partir de los enriquecimientos como la no obtención de amplificados por PCR correspondientes a esta dilución son acordes con esta estimación. Por otro lado, la amplificación de las muestras procedentes de la dilución 10^{-3} confirma que mediante el procedimiento empleado, es posible detectar e identificar *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a un nivel de contaminación inferior a 10 ufc en 25 gramos de muestra. Al mismo tiempo, la obtención de amplificado a partir de 9 ml de cultivo en RV descarta una inhibición de la reacción de PCR por componentes del medio y de la propia mayonesa en las condiciones del ensayo.

Se propone un protocolo CRISPR-PCR para la detección e identificación de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* consistente en las siguientes etapas y condiciones:

1. Pre-enriquecimiento de una dilución 1/10 del alimento en APT (incubación a 37°C/24h)

2. Enriquecimiento tras inoculación de 0,1 mL de pre-enriquecimiento en 10 mL de medio RV (incubación a 42°C/24h)
3. Extracción de DNA total a partir de 9 mL de enriquecimiento
4. PCR con los cebadores CR1F1 y CR1R2, utilizando las condiciones generales de amplificación descritas en este trabajo

Con este procedimiento es posible detectar e identificar *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en un alimento en un plazo de 2 días, considerablemente inferior al de los métodos convencionales de cultivo, con un nivel de sensibilidad igual o superior a estos, suponiendo una alternativa rápida, económica y sencilla a otros métodos comerciales de detección rápida. A falta de una validación mediante el análisis de un mayor espectro de aislados de distinto origen geográfico, el protocolo descrito se podría emplear como complemento a otros procedimientos bien establecidos.

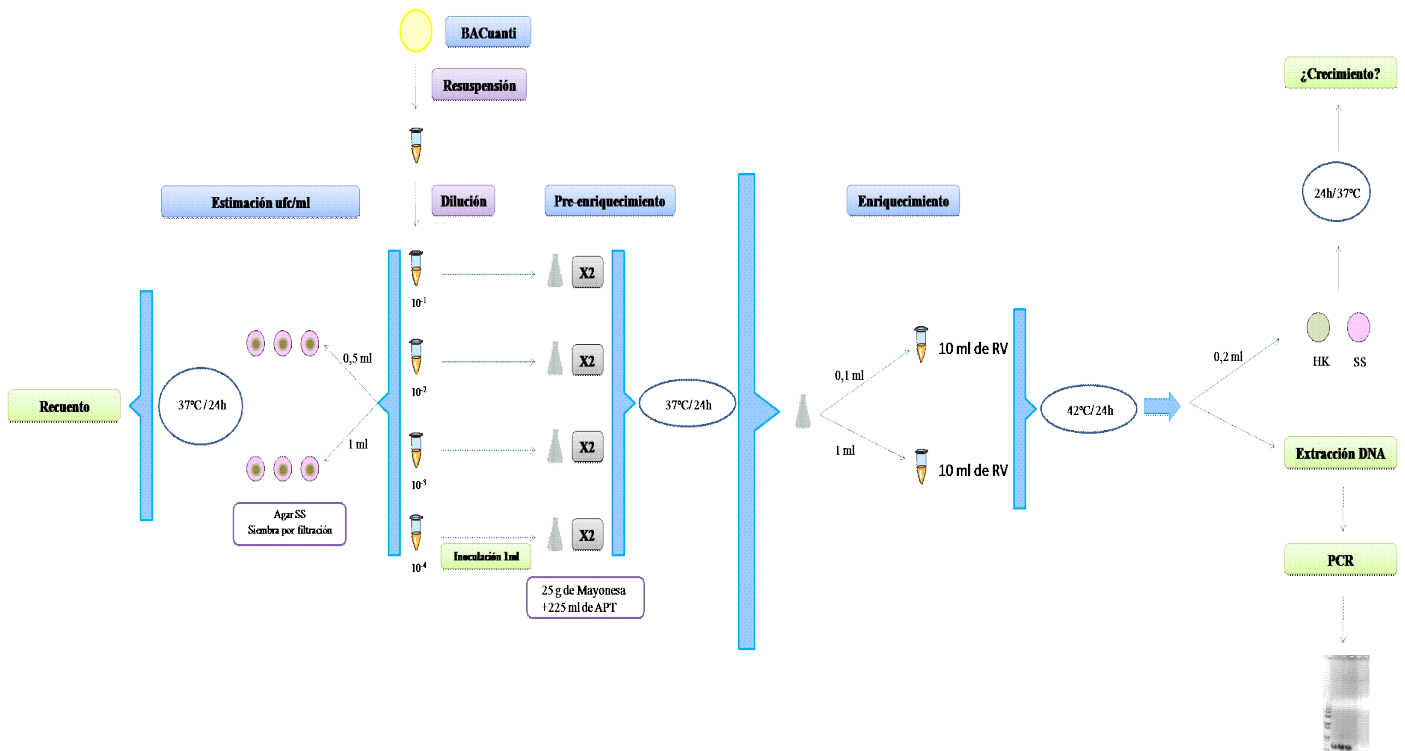


FIGURA 5. Representación esquemática del análisis por CRISPR-PCR de muestras de mayonesa.

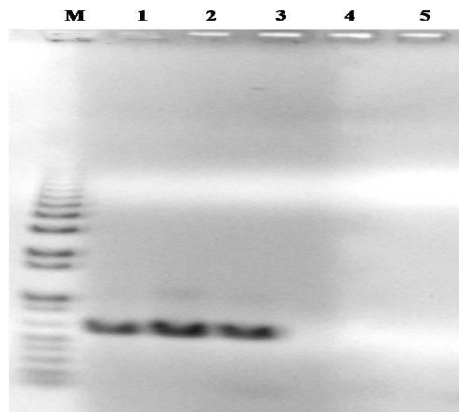


FIGURA 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los enriquecimientos. Se incluyen muestras de enriquecimientos inoculados con 0,1 ml (calles 1-4) y 1 ml (calle 5) procedentes de pre-enriquecimientos a partir de diluciones 10^{-1} (calle 1), 10^{-2} (calle 2), 10^{-3} (calle 3) y 10^{-4} (calles 4 y 5). Se incluye el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (M).

CONCLUSIONES

- 1.- La amplificación por PCR de la agrupación CRISPR1 (CRISPR1-PCR) de *Salmonella* permite identificar y detectar de manera específica la presencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en alimentos.
- 2.- La agrupación CRISPR2 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* no es un marcador genético apropiado para la detección de cepas de la subespecie mediante PCR.
- 3.- El método CRISPR1-PCR permite detectar niveles de contaminación por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferiores a 10 ufc en muestras de alimento.
- 4.- La ausencia de espaciadores CRISPR1 comunes a todas las cepas de *Salmonella* Typhimurium impide una identificación específica del serotipo basada exclusivamente en la detección de una de dichas secuencias.
- 5.- La amplificación por PCR de las agrupaciones CRISPR de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y su secuenciación podría permitir la identificación del origen de brotes de infección alimentaria en casos concretos.

REFERENCIAS

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315:1709-12.
- Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJ. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2010; 156:1351-61.
- Ellermeier, C D., Slauch J M. The Genus *Salmonella* en The Prokaryotes: Vol. 6, Proteobacteria: Gamma Subclass. Dworkin, M.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (Eds.). Springer. 2006.
- Godde JS, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*. 2006; 62:718-29.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8:172.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005; 1:e60.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987; 169:5429-33.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002; 43:1565-75.
- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*. 2007; 8:R61
- Liu F, Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ, and Dudley EG. Novel Virulence Gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Multilocus Sequence Typing Scheme for Subtyping of the Major Serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*†. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2011, p. 1946–1956 Vol. 77, No. 6
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, Van der Oost J and Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*. Volume 9. June 2011.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 2006; 1:7.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000; 36:244-6.
- Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993; 9:613-21.
- Sambrook, J, MacCallum, P, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000.
- Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, and Lovley DR. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, May, Vol. 70, No. 5 P. 2959–2965 (2004).
- Touchon M, Rocha EP, The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *Plos One* 2010. Jun 15; 5(6)

ANEXO I

Secuencias de amplicones CRISPR-PCR

>T02/CRISPR 1

GTGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTGTCGACTGCGGAACGC
CCCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCGAAATAGTGGGGAAAACCCCT
GGTTAACCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGAAACACTAGGCCTTGATAACCATCGCT
CGCACCTCGTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTATCGTCAATGC
GAAATTTTCCGCGACGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCCCATTCACCA
ACAACAATATCGCCCTGCAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCCGTTGCGT
CAGGTTGATCCAGTGCGTCAGCGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTC
GGTCTCGGTCTCGGTCTCGGTAGTGACGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
ACTTCTTCAGTCTTAACGATAATCCGCAACGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
ACACGCAAAATAGCGATGAGCTGGCTACGCCACTGGCGGTTTATCCCCGCTGGCGC
GGGGAACACGCAAAATAGCGATGAGCTGGCTACGCCACTGGCGGTTTATCCCCGCT
GGCGCGGGGAACACAGCCGGCGCGAGCCTGGAGGGTTGAATAATGGCGGTTTATCCC
CGCTGGCGCGGGGAACACGAGGGGATAGGAGTTACGATCCAGCCTGGTTGCGGTTTA
TCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTGGTTGCAGACCAATCAGCCCGCCAGCGGTTCCG
TTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCAGCACGAAAAATTATTTACTGTGCTTGCTC
ACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC

>T27/CRISPR 1

GTGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAGGCCTTGATAACCATCGCTCGCACCTC
GTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTTATTACTGCTTAGTTAATTA
TGGGTTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGCGAATAATCTCTAATAG
TCTCAATTCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAAATCTGGCGTCGAG
ACATTCGAAATAGTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTTGATTTT
GCTGCGATGTTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTATCCACA
TATACCCGCAATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAATC
ACTGCGGGGTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
CAGCACGAAAAATTATTTACTGTGCTGCTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
ACAC

>T36/CRISPR 1

GTGTTTATCCCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTGTCGACTGCGGAACG
CCCCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCGAAATAGTGGGGAAAACCCC
TGGTTAACCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGAAACACTAGGCCTTGATAACCATCGC
TCGCACCTCGTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTTATTACTGCTTA
GTTAATTAATGGGTTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGCGAATAAT
CTCTAATAGTCTCAATTCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAAATCT
GGCGTCGAGACATTCGAAATAGTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCT
TTTGATTTTGCTGCGATGTTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CTATCCACATATAACCCGCAATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
ACACAATCACTGCGGGGTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCG
GGGACACGATCGAGTAACGTGCGCTGGAACCGTCGGCGCGGGGAACACAATTAAG
CCGAGGGTGGCACCGCGCCTTATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCAC
CTCGAAACGGTTTTAAACACTACCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CTGGACCGATGGGGCCAACATCGCCGAACGTGGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
AACACGTTACGTTTCGGTAAATGGAAAGCGGCGAATATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGC
GGGGAACACCCAGAAAGTGCCGGTAGTGCTGATGAACGACCGGTTTATCCCCGCTG
GCGCGGGGAACACCGCGCCCACTTCCGTAAAATACAGATAATCCACGGTTTATCCCC
GCTGGCGCGGGGAACACGGCAGCGGGCGAGGCAAACACATTCGGGGCGTTCGGTTTAT

CCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGCAGCGGGCGAGGCAAACACATTTCGGGGCGTCGGT
TTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGTAATTTCTCATCTAACAGCCTGTACGCCTC
AGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAATCTAATGCAACAGATGAATAAACACG
TAACGGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTATCGTCAATGCGAAATTTT
CCGCGACCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCCCATTCaCCAACAACAATA
TCGCCCTGCAACGTTATCCCCGCTGGCCGGGGGAACACGTCGTCAGTGATCAGGGGTC
AGCGGCGGTTATCCCCGCTGGCCGGGGGAACACTTTCGGTCTCGGTCTCGGTCTCGGTA
GTGACGCGGTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACACTTCCTTCAGTCTTAACGATAAT
CCGCAACCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCAAAATAGCGATGAGCTGGC
TACGCCCACTGGCGGTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGCCGGCGCGAGCCTGG
AGGGTTGAATAATGGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCAATCTCGCATTC
GTTACCCACATGCATTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAGGGGATA
GGAGTTACGATCCAGCCTGGTTGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTGGT
TGCAGACCAATCAGCCCGCCAGCGGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACC
AGCAGCAAAAATTATTTACTGTCTGCTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAA
CACTGTAACAGTCCGTCGTTAATCAGCGCGGTGGGAGGTTTATCCCCGCTGGCGCGG
GGAACAC

>T03/CRISPR 1

CACTGTTGGTAGAACTGGCGAGGCGGAAAACGTCCTGATATGCTGGTGAACGTTGTT
TATCCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTGTCGACTGCGGAACGCCCTC
GGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCGAAATAGTGGGGAAAACCCCTGGTTA
ACCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAGGCCTTGATAACCATCGCTCGCAC
CTCGTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTTGATTTTGCTGCGATG
TTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTATCCACATATACCCGC
AATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAATCACTGCGGGG
GTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGATCGAGTA
ACGTGCGCTGGAACGCGTCGGCGCGGGGAACACAATTAAGCCGAGGGTGGCACCCGC
GCCTTATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCACCTCGAAACGGTTTTAA
AACACTACCGTTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTGGACCGATGGGGCC
AACATCGCCGAACGTGGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTACGTTGCG
TAAATGGAAAGCGGCGAATATCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCCAGAAA
GTGCCGGTAGTGCCTGATGAACGACCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCGC
GCCCACTTCCGTAAAATACAGATAATCCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CGGTAATTTCTCATCTAACAGCCTGTACGCCTCAGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
AACACGAATCTAATGCAACAGATGAATAAACACGTAACGGTTTATCCCCGCTGGCGC
GGGGAACACTCTTTATCGTCAATGCGAAATTTTCGCGACCGGTTTATCCCCGCTG
GCGCGGGGAACACTCCCATTCACCAACAACAATATCGCCCTGCAACGGTTATCCCCG
CTGCGCGGGGACACCGTTGCGTCAGGTTGATCCAGTGCCTCAGCGGCGGTTATCCCC
GCTGGCGCGGGGAACACTCTCGGTCTCGGTCTCGGTCTCGGTAGTGACGCGGTTTAT
CCCCGCTGGCGCGGGGAACACACTTCCTTCAGTCTTAACGATAATCCGCAACGCGGT
TTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCAAAATAGCGATGAGCTGGCTACGCCACTG
GCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAGGGGATAGGAGTTACGATCCAGCCT
GGTTGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTGGTTGCAGACCAATCAGCCCC
CCAGCGGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTGGTTGCAGACCAATCAG
CCCGCCAGCGGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCAGCACGAAAATTA
TTTACTGTCTGTTGCTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACACTAAAATAT
ATATCTGTTCTAAGAAGCCTTTTTACTACATAACAACTACCAACGGTAAGATAAC
AATGGCTTTACTTATTTA

>T06/CRISPR 1

TTAGATGTAGGGGGGAAAAAATGCGGTGGTAAAGAGCTGGCGAAGGCGGAAAAACGT
CTGATATGCTGTGAAACGTGCTATCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTG
TCGACTGCGGAACGCCCCCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGACACGCGAAATAGT
GGGGAAAAACCCCTGGTAACCCCGTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAGGCCTT
GATACCATCGCTCGCACCTCGTCACGGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTT
TATTACTGCTTAGTTAATTAATGGGTTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CAGGCGAATAATCTCTAATAGTCTCAATTCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
AACACTAAATCTGGCGTCGAGACATTCGAAATAGTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGC
GGGAACACTCTTTTGATTTTGCTGCGATGTTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTG
GCGCGGGGAACACTATCCACATATAACCGCAATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCC
GCTGGCGCGGGGAACACAATCACTGCGGGGGTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTAT
CCCCGCTGGCGCGGGGAACACCAGCACGAAAAATTATTTACTGTCTGCTCACGGT
TTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACACTAAACTATATATTGTTCTAAAAGCCCTTT
TACTACATAACAACTACCAACGGTAAGATAACAATCCTTATATGAAGACCTT

>T18/CRISPR 1

GTGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTGTCGACTGCGGAACG
CCCCCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCGAAATAGTGGGGAAAAACCC
TGGTTAACCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAGGCCTTGATACCATCGC
TCGCACCTCGTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTTATTACTGCTTA
GTTAATTAATGGGTTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGCGAATAAT
CTCTAATAGTCTCAATTCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAAATCT
GGCGTCGAGACATTCGAAATAGTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCT
TTTGATTTTGCTGCGATGTTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CTATCCACATATAACCGCAATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
AACACAATCACTGCGGGGGTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGC
GGGAACACGATCGAGTAACGTGCGCTGGAACGCGTCGGCGCGGGGAACACAATTA
AGCCGAGGGTGGCACCCGCGCCTTATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGC
ACCTCGAAACGGTTTTAAACACTACCGTTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
CACGGTAATTTCTCATCTAACAGCCTGTACGCCTCAGGTTTATCCCCGCTGGCGCGG
GGAACACGAATCTAATGCAACAGATGAATAAACACGTAACGGTTTATCCCCGCTGGC
GCGGGGAACACTCTTTATCGTCAATGCGAAATTTTCGCGACCGGTTTATCCCCG
TGGCGCGGGGAACACTCCCATTACCAACAACAATATCGCCCTGCAACGGTTTATCC
CCGCTGGCGCGGGGAACACGCAAAATAGCGATGAGCTGGCTACGCCACTGGCGGTT
TATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC

>T10/CRISPR 1

GTGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACATTTTTTCAGCCCTTGTCGACTGCGGAACGC
CCCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCGAAATAGTGGGGAAAAACCCCT
GGTTAACCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAGGCCTTGATACCATCGCT
CGCACCTCGTCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTTTATTACTGCTTAG
TTAATTAATGGGTTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGCGAATAATC
TCTAATAGTCTCAATTCGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAAATCTG
GCGTCGAGACATTCGAAATAGTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTT
TTGATTTTGCTGCGATGTTATAACCAGACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
TATCCACATATAACCGCAATCATATTCAAGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
ACACAATCACTGCGGGGGTATTTAGCGGAAACGGCTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCG
GGGAACACGATCGAGTAACGTGCGCTGGAACGCGTCGGCGCGGGGAACACAATTA

GCCGAGGGTGGCACCGCGCCTTATTCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCAC
CTCGAAACGGTTTTTAAACACTACCGTTTTCGGTTTCGTATCCCGCTTGCCGGGAACA
TGGACCGATGGGGCCAACATCGCCGAACGTGGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGA
CACGTTACGTTTCGGTAAATGGAAAGCGGCGAATATCGATTATCCCGCTGGCGCGGG
GAACACCCAGAAAGTGCCGGTAGTGCCCTGATGAACGACCGGTTTTATCCCGCTGGCG
CGGGGAACACCGCGCCCACTTCCGTAAAATACAGATAATCCACGGTTTTATCCCGCT
GGCGCGGGGAACACGGCAGCGGGCGAGGCAAACACATTCGGGGCGTCGGTTTTATCCC
CGCTGGCGCGGGGAACACGTAATTTCTCATCTAACAGCCTGTACGCCTCAGGTTTA
TCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAATCTAATGCAACAGATGAATAAACACGTAACGG
TTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTATCGTCAATGCGAAATTTTCGCGCAC
GCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCCATTACCAACAACAATATCGCCC
TGCAACGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACACTTCCTTCAGTCTTAACGATAA
TCCGCAACGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAAAATAGCGATGAGCTG
GCTACGCCCACTGGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACCAGCACGAAAAATT
ATTTACTGTCGTTGCTCACGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACAC

>T18/CRISPR 2

CGGCTATCCTTGTGGCGCGGGGAACACATCTTCATATTGCGTGACGCTGCCGATGA
ACGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCTTTATCAGCTAACCATTTCCAGA
ACTCGTCCGGTTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGAACACTATAATATGAATTAATTTTTG
CGCATAACCTGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACCGCAGCTTAGCGACGAAA
TTAAAACCGAACTACCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACTGCCAGTGACTA
CAGAAGCGTCTCTATCGGGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACACCGATAA
ACAACCGCATAGCCTCTTTCGTTTCGATTTATCCCTGCTGGCGCGGGGAACACTGCT
CAATAACGTCGTAAATAGCGTAAGCTGGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
TATTTTCGCTTCGGCACTGACGTCACCGTCAACGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGG
AACACGTTGCGTTCGTTGCCGGTATAGACCAGCGTCACGGTTTTATCCCGCTGGCGC
GGGGAACACATCGAATCGAAACCCAGCCACAGAAATAATTTCGGTTTTATCCCGCTG
GCGCGGGGAACACATCGAATCGAAACCCAGCCACAGAAATAATTTCGGTTTTATCCCC
GCTGGCGCGGGGAACACGCTCATGTCAAACGCCATCAGCGTTCGGGCATCGGTTTTAT
CCCGCTAGCGCGGGGAACACAATCGCCAGCCTCGGAAATATTCATCCTCCGCGGT
TTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGAACTAACAGCCTGACCGTTGAGGATCTG
CGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACACCGGACAAATCTTTTTTTTCTGTTCC
TGTTTCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGGCACTATGAACGGATCGGCGCT
GATGCCGGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGTAAAGCCACACCATTTTT
TATTGACCTCGCCGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACCTAGGAGGCGTAATGA
ATACTACGTATCAAACCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACCGTGGTGGCCTCA
AATAAATTCGAGCGCTGGAGCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCGACGTG
GACGAGGAGTTACTCAACCGCTGCCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGCG
CCACATGGCCCACCGGCACCACCCGATCCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
AAATGACCAAATCAGAAATCTTACCAAAGCCCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGA
ACACGATGTAACCTGATAGCGAAATATATTGGGATAACGGTTTTATCCCGCTGGCGCG
GGGAACAC

>T27/ CRISPR 2

CGTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGGCACTATGAACGGATCGGCGCTGATGCCG
GCAGTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGTAAAGCCACACCATTTTTTATTGACCT
CGCCGGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACCTAGGAGGCGTAATGAATACTACGTA
TCAAACCGTTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTGGTGGCCTCAAATAAATTCGA

GCGCTGGAGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCGACGTGGACGAGGAGTT
ACTCAACCGCTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGCGCCACATGGCCC
ACCGGCACCACCCGATCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCTGAAAACGCA
TGGAATCCGGTATAAACAGTCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGATGTAA
CTGATAGCGAAATATATTGGGATAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGAA
ACGTAAACAGGGTAAGATACAACTCTGCACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACA
CTGTAAAGGGTGGTCTGGAAGGGGATCGGCAAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG
AACAC

>T36/ CRISPR 2

CGTTATCCCCTGGCGGGAACCAATCGAATCGAAACCCAGCCACAGAAATAATTCCG
AGTATCCCCTGGCGCGGGACACGCTCATGTCAAACGCCATCAGCGTTCCGGCATCCG
GTTATCCCCTAGCGCGGGACACAATCGCCAGCCTCGGAAATATTCCATCCTCCCGG
GTTATCCCCTGGCGCGGGGACACAGGAACTAAACAGCCTGACCCTTGAGGATCTG
CGGTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACACCCGGACAAATCTTTTTTTCCTGTTCCCTG
TTCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACGGGCGGTCCCCTCAATACCGCG
CTGACGCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTTGAGGTGCCGCTTGCCGTTCT
TCTGTTTTTTCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACGGGCACTATGAACGGATCG
GCGCTGATGCCGGCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACGGTAAAGCCACACCA
TTTTTTATTGACCTCGCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACCTAGGAGGCGT
AATGAATACTACGTATCAAACCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACAC

>T02/ CRISPR 2

CGTATCCCCTGGCGGGAACCCCTAGGAGGCGTAATGAATACTACGTATCAAACCG
TTTCCCCTGGCGCGGGACACGTTGGTGGCCTCAAATAAATTCGAGCGCTGGAGCGTT
ATCCCCTGGCGCGGGGAACACTCGACGTGGACGAGGAGTACTCAACCGCTGCCG
GTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACAGCGCCACATGGCCCACCGGCACCACCCGAT
CCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACAAATGACCAAATCAGAAATCTTCACCA
AAGCCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTAATGGCCACAGTAAGTCAAACG
GTTCTGGAACGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTTGGGCGTCGGTTTTTTTCA
GGTTTAGGTCCGGCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACGAAACGTA AACAGGG
TAAGATACAACTCTGCACGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTGTAAAGGGTG
GTCTGGAAGGGGATCGGCAAACCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACAC

>T03/ CRISPR 2

CGGTTTATCCCCTGGCGGGAACACTCGACGTGGACGAGGAGTTACTCAACCGCT
GCCGTTATCCCGCCTGGCCGGGGAACACAGCGCCACATGGCCCACCGGCACCACCCG
ATCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACAAATGACCAAATCAGAAATCTTCAC
CAAAGCCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTAATGGCCACAGTAAGTCAA
CGGTTCTGGAACGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACGAGTCCGGGGGTTATAT
AGTTATTTAATGAGCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTTGGGCGTCGGTT
TTTTCAGGTTTAGGTCCGGCCGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACTCAACTGTC
AGTTCGTCGTTAGCCAGTAATTCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACCTGAA
AACGCATGGAATCCGGTATAAACAGTCCGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAACACG
ATGTAAGTATAGCGAAATATATTGGGATAACGGTTTATCCCCTGGCGCGGGGAA
CACGAAACGTAAACAGGGTAAGATACAACTCTGCACGGTTTATCCCCTGGCGCGG
GGAACAC

>T06/ CRISPR 2

CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACCTAGGAGGCGTAATGAATACTACGTATC
AAAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGTGGTGGCCTCAAATAAATTCGAG
CGCTGGAGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCGACGTGGACGAGGAGTTA
CTCAACCGCTGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGCGCCACATGGCCCA
CCGGCACCACCCGATCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAAATGACCAAAT
CAGAAATCTTCACCAAAGCCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTAATGGCC
ACAGTAAGTCAAACGGTTCGGAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACTCAA
CTGTCAGTTCGTCGTTAGCCAGTAATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
CTGAAAACGCATGGAATCCGGTATAAACAGTCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
ACACGATGTAAGTATAGCGAAATATATGGGATAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCG
GGGAACACGAAACGTAAACAGGGTAAGATACAACTCTGCACGGTTTATCCCCGCTGG
CGCGGGGAACACTGTAAAGGGTGGTCTGGAAGGGGATCGGCAAACGGTTTATCCCCG
CTGGCGCGGGGAACAC

>T10/ CRISPR 2

CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACATCGAATCGAAACCCAGCCACAGAAAT
AATTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGCTCATGTCAAACGCCATCAGCGT
TCCGGCATCGGTTTATCCCCGCTAGCGCGGGGAACACAATCGCCAGCCTCGGAAATA
TTCCATCCTCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACAGGAACTAAACAGCCT
GACCGTTGAGGATCTGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACACCGGACAAATC
TTTTTTTTTCTGTTCTGTTTCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGGCACTA
TGAACGGATCGGCGCTGATGCCGGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACACGGTA
AAGCCACACCATTTTTTTATTGACCTCGCCGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC
CTAGGAGGCGTAATGAATACTACGTATCAAAACGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGA
ACACGTGGTGGCCTCAAATAAATTCGAGCGCTGGAGCGGTTTATCCCCGCTGGCGCG
GGGAACACGAAACGTAAACAGGGTAAGATACAACTCTGCACGGTTTATCCCCGCTGG
CGCGGGGAACACTGTAAAGGGTGGTCTGGAAGGGGATCGGCAAACGGTTTATCCCCG
CTGGCGCGGGGAACAC