

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 713**

51 Int. Cl.:
A61K 39/106 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06754304 .1**
96 Fecha de presentación: **12.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1896067**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **VACUNAS PARA LA INMUNIZACIÓN CONTRA HELICOBACTER.**

30 Prioridad:
16.06.2005 US 691394 P
01.07.2005 US 695995 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
UNIVERSITEIT GENT
SINT-PIETERSNIEUWSTRAAT 25
9000 GENT, BE

72 Inventor/es:
DUCATELLE, Richard y
HELLEMANS, Ann

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 713 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas para la inmunización contra *Helicobacter*

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a herramientas y métodos para la inmunización de animales contra la infección por la especie *Helicobacter*.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

10 Las infecciones por *Helicobacter (H.) pylori* en las personas son una de las principales causas de las úlceras de estómago y de duodeno, así como del cáncer de estómago. Se recomiendan terapias triples con inhibidores de la bomba de protones y claritromicina y amoxicilina, como tratamiento de primera línea. Cada vez con mayor frecuencia, estas terapias estándar se enfrentan con problemas de resistencia al antibiótico y recurrencia de la infección, especialmente en áreas en las que el *H. pylori* es endémico. Varios estudios en modelos animales han mostrado la viabilidad de la vacunación tanto profiláctica como terapéutica contra *H. pylori* (Del Giudice (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19, 523 - 563; Sanchez et al. (2001) *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 30, 157-165). Las proteínas de *H. pylori* expresadas en ratones infectados, y por tanto expuestas al sistema inmunitario del ratón, parecen similares a las detectadas en las infecciones humanas, lo que sugiere que el modelo de ratón es adecuado para el cribado preclínico de candidatos de antígeno (Bumann et al. (2002) *Inf. Imm.* 70, 6494 - 6498). Se ha encontrado que las inmunizaciones con ureasa recombinante inducen respuestas inmunitarias locales y en el suero en ratones, y protegen contra la infección de *Helicobacter pylori* (Kleanthous et al. (1998) *Inf. Imm.* 66, 2879-2886). El documento WO 2004069184 describe vacunas contra infecciones por *Helicobacter* que usan preparados antigénicos de *H. cerdo*.

20 *H. pylori* no es el único agente bacteriano patógeno capaz de colonizar la mucosa gástrica humana. El "*H. heilmannii*" ha sido encontrado realmente en aproximadamente el 0,96% de las biopsias gástricas. Este organismo está fuertemente asociado con la gastritis, pero también con la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (mucosa associated lymphoid tissue: MALT).

25 Algunos estudios revelaron una suficiente reactividad cruzada antigénica entre *H. felis* y *H. pylori* para generar protección contra la sensibilización por *H. felis* después de la inmunización con una solución de antígeno de *H. pylori* sonicada (tratada con ultrasonidos) (Lee & Chen (1994) *Inf. Imm.* 62, 3594 - 3597; Michetti et al. (1994) *Gastroenterology* 107, 1002 - 1011). Un estudio indica que la infección por *H. heilmannii* puede ser evitada por vacunación tanto con UreB de *H. heilmannii* como con UreAB de *H. pylori*, confirmando que la inmunidad protectora contra infecciones por *Helicobacter* puede ser provocada por ureasa de *Helicobacter* tanto homóloga como heteróloga (Dieterich et al. (1999) *Inf. Imm.* 67, 6206 - 6209).

30 Recientemente se ha señalado que *H. heilmannii* no representa una única especie, sino un grupo de especies bacterianas diferentes con una morfología en espiral similar, muchas de las cuales son probablemente de origen zoonótico. Sobre la base de las secuencias del rRNA 16S, "*H. heilmannii*" ha sido clasificado en dos tipos (Soinick et al. (1993) *J. Infect. Dis.* 168, 379 - 385). Los organismos "*H. heilmannii*" del tipo 2 están estrechamente relacionados, si es que no son idénticos, a *Helicobacter* spp. canina y felina, a saber *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*. Más del 50% de las infecciones por "*H. heilmannii*" en seres humanos, sin embargo, son debidas a "*H. heilmannii*" del tipo I. Se acepta ahora que el "*H. heilmannii*" del tipo 1 es idéntico al "*Candidatus H. suis*" (O'Rourke et al. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 2203 - 2212; De Groot et al. (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1769 - 1777), una bacteria en forma de espiral que coloniza el estómago de más del 60% de los cerdos de matadero.

40 Se dispone de poca información en la bibliografía acerca del potencial de la protección, inducida por vacuna, contra cepas de *helicobacter no pylori*, tales como "*Candidatus H. suis*". El cultivo *in vitro* de "*Candidatus H. suis*" no es posible actualmente, pero puede usarse la inoculación en ratones para desarrollar y mantener esta bacteria viable durante más de dos años, partiendo de mucosa estomacal de cerdos infectados (Mendes et al., (1991) citado anteriormente; Dick et al. (1989) *J. Med. Microbiol.* 29, 55 - 62; Park et al., (2003) *J. Comp. Pathol.* 129:154 - 160).

SUMARIO DE LA INVENCION.

45 La presente invención se refiere al uso de un preparado antigénico de una especie relacionada con un *Candidatus Helicobacter suis* para vacunación de animales contra especies de *Helicobacter*, más en particular contra *Candidatus H. suis*, en el que dicha especie relacionada con un *Candidatus Helicobacter suis* tiene una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank nº de entrada AF127028, como se representa en la SEC ID NO:16. Un primer aspecto de la invención se refiere entonces al uso de una composición que comprende uno o más preparados antigénicos de una o más especies relacionadas con *Candidatus H. suis* para la elaboración de una vacuna contra especies *Helicobacter*, más en particular contra *Candidatus H. suis*, en la que la especie bacteriana relacionada con *Candidatus Helicobacter suis* prevista dentro del contexto de la presente invención es o son especies de bacterias que tienen una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank nº de entrada AF127028, como se representa en la SEC ID NO:16. De acuerdo con una realización en

particular, la composición usada comprende uno o más preparados antigénicos de una o más especies relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* elegidas entre el grupo consistente en *Helicobacter felis*, *Helicobacter salomonis*, *Helicobacter heilmannii* (tipo II), *Helicobacter cynogastricus*, *Helicobacter pylori* o *Helicobacter bizzozeronii*.

5 De acuerdo con realizaciones particulares de la invención, las especies relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* se eligen entre *H. felis*, *H. bizzozeronii*, o *H. cynogastricus*. Otra realización de la invención se refiere al uso de un preparado antigénico de *H. cynogastricus* en la preparación de una vacuna contra especies *Helicobacter*, más en particular contra *Candidatus H. suis*.

10 Otro aspecto de la invención proporciona entonces vacunas para ser usadas en la vacunación de animales contra *Helicobacter spp.* (especies), más en particular contra *Candidatus H. suis*. Más en particular, las vacunas de la presente invención comprenden uno o más preparados antigénicos de una o más especies bacterianas relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* previstas dentro del contexto de la presente invención, son especies de bacterias que tienen una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank nº de entrada AF127028, como se representa en la SEC ID NO:16. De acuerdo con una realización particular las vacunas comprenden uno o más preparados antigénicos de una o
15 más especies relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* elegidas entre el grupo que consiste en *Helicobacter felis*, *Helicobacter salomonis*, *Helicobacter heilmannii* (tipo II), *Helicobacter cynogastricus*, *Helicobacter pylori* o *Helicobacter bizzozeronii*. Las vacunas pueden comprender además opcionalmente un coadyuvante y/o un vehículo aceptable farmacéuticamente.

20 Las vacunas de la presente invención pueden ser usadas para inmunización profiláctica o bien terapéutica, y las vías de vacunación adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, la inmunización intranasal, subcutánea, oral e intramuscular. Las vías de vacunación adecuadas comprenden también administraciones combinadas (p. ej. administración oral/intramuscular).

25 De acuerdo con una realización particular, el preparado antigénico usado en la preparación de una vacuna comprende un lisado de bacterias. Las realizaciones alternativas incluyen vacunas en las que el preparado antigénico comprende bacterias totalmente muertas o bacterias de vida atenuada. Adicionalmente o alternativamente la vacuna de acuerdo con la invención comprende un preparado antigénico que comprende un preparado bacteriano procesado y/o artificial.

30 En el presente texto se describen métodos de vacunación de un animal contra la infección por *Helicobacter spp.*, más en particular contra una a infección por *Candidatus H. suis*, que comprende la etapa de administrar al animal una composición que comprende uno o más preparados antigénicos de una o más especies relacionadas con *Candidatus H. suis*, bien sea antes de la infección (para la vacunación profiláctica) o bien después de que la infección haya sido identificada (como vacunación terapéutica). Opcionalmente el preparado antigénico es administrado junto con un coadyuvante y/o un vehículo aceptable farmacéuticamente. Los ejemplos específicos de estos métodos se refieren a preparados antigénicos que comprenden preparados de *H. felis* y/o *H. bizzozeronii* y/o *H. cynogastricus*. Más específicamente, el preparado antigénico usado comprende un lisado de una o más de estas bacterias, pero
35 realizaciones alternativas incluyen preparados antigénicos que comprenden bacterias de vida atenuada o preparados bacterianos procesados y/o artificiales. Estos métodos pueden comprender administración intranasal o subcutánea de la vacuna de la invención.

40 También se describe en el presente texto un modelo animal para la infección por *Candidatus Helicobacter suis*, más en particular un modelo de ratón. Este modelo permite la propagación *in vivo* de *Candidatus Helicobacter suis* en un animal distinto de su hospedador natural. Este modelo se obtiene infectando un ratón con material infectado con *Candidatus Helicobacter suis*. Más en particular esto comprende aislar células de la pared del estómago de un cerdo infectado con *Candidatus Helicobacter suis*, opcionalmente hacer un homogeneizado del mismo, e infectar ratones por vía intragástrica con las células o el homogeizado. La infección en los ratones y el efecto de la vacunación pueden seguirse mediante PCR fecal.

45 También se describe en el presente texto una bacteria aislada de la especie *Helicobacter cynogastricus* depositada bajo el número de entrada LMG P-23100. La invención se refiere además al uso de *Helicobacter cynogastricus* en la producción de una vacuna.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

50 La presente invención se describirá con referencia a ciertas realizaciones y a ciertas Figuras, pero la presente invención no está limitada a ellas, sino solamente por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a las vacunas y describe métodos de vacunación contra *Helicobacter spp.*, más en particular contra *Candidatus Helicobacter suis*. La presente invención se refiere al uso de antígenos y preparados antigénicos de ciertas especies de *Helicobacter* para vacunar animales, especialmente ganado (vacas, ovejas, caballos, etc.), más en particular cerdos, lo más en particular cerdos de cría, que están infectados o son susceptibles de infección
55 con *Helicobacter spp.*, más en particular *Candidatus Helicobacter suis*. También otros animales tales como, pero sin limitarse a ellos, seres humanos, monos, conejos, roedores, gatos y perros, que son sospechosos de estar infectados con *Helicobacter spp.*, más en particular con *Candidatus Helicobacter suis*, pueden ser vacunados con el preparado antigénico de la presente invención.

El “*Candidatus Helicobacter suis*” que se menciona en el presente texto es una bacteria que anteriormente se conocía como “*H. heilmannii*” tipo I (Trebesius et al. (2001) *J Clin Microbiol.* 39, 1510 - 1516. Ahora se acepta que “*H. heilmannii*” tipo 1 es idéntico a “*Candidatus H. suis*” (O’Rourke et al. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 2203 - 2211; De Groote et al. (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1769 - 1777), una bacteria en forma de espiral que coloniza el estómago de más del 60% de los cerdos de matadero. El *Candidatus Helicobacter suis* se define también a nivel molecular como la especie de *Helicobacter* que tiene una secuencia de rRNA 16S Genbank número de entrada AF 127028 (D. De Groote et al. (1999) citado antes) y AF506788-92 (O’Rourke et al. (2004) citado anteriormente) y una secuencia génica de ureasa como se representa en Genbank entrada AF508013-AF508014 (O’Rourke et al. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 2203 - 2211).

Las especies bacterianas adecuadas para los propósitos de la invención son bacterias distintas del *Candidatus Helicobacter suis* del género *Helicobacter*, más en particular especies que están relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis*, pero no son idénticas al mismo. La frase “relacionadas con” en el contexto de las especies bacterianas se usa en el presente texto para indicar una relación filogenética, preferentemente expresada por parámetros de biología molecular. De un modo más general, las bacterias relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* tienen una secuencia de rRNA 16S que es al menos el 93%, 95%, 98% 99% idéntica a la secuencia de rRNA 16S del *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank entrada AF127028 como se representa en la SEC ID NO:16. O, expresándolo de una forma alternativa, las bacterias relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis* comprenden una secuencia que codifica ureasa que es al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a nivel de DNA a la secuencia de la ureasa de *Candidatus Helicobacter suis*. Las especies que se identifican como “estrechamente relacionadas con el *Candidatus Helicobacter suis*”, basándose en los criterios anteriores (con una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos aproximadamente del 93% al 99% de identidad de secuencias con el *Candidatus Helicobacter suis*) pueden sin embargo identificarse como especies distintas basándose en otros criterios tales como, pero sin limitarse a ellos, perfiles de proteína de la célula entera, como se describe en el presente texto. La secuencia de referencia de rRNA 16S de *Candidatus Helicobacter suis* corresponde a la de GenBank entrada AF 127028 (SEC ID No: 16).

“Preparado antigénico”, como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a una composición que comprende al menos una proteína o un fragmento de la misma, que provoca una respuesta inmunitaria (en adelante denominada “antígeno”) cuando se administra a un animal. Para su uso como vacuna en el contexto de la presente invención, el preparado antigénico puede comprender bacterias totalmente muertas (inactivas), bacterias con vida atenuada (debilitadas) o preparados bacterianos procesados y/o artificiales, o combinaciones de los mismos. Los preparados bacterianos procesados incluyen preparados de proteínas bacterianas que son parcial o completamente purificadas y/o pretratadas. Los ejemplos de preparados bacterianos artificiales incluyen preparados de proteína obtenidos en parte o en la totalidad por métodos de síntesis o recombinantes.

De acuerdo con ciertas realizaciones, los preparados antigénicos usados para la vacunación de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más antígenos obtenidos a partir de distintas especies *Helicobacter* que están relacionadas con *Candidatus Helicobacter suis*. Los ejemplos de antígenos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, la enzima ureasa, proteínas de choque térmico, cagA y VacA.

Una “vacuna”, como se usa en el presente texto, se refiere a una composición tal como el preparado antigénico descrito en el presente texto que es administrado para estimular una respuesta inmunitaria que proteja a una persona de la enfermedad debida a ese agente. La vacuna de la presente invención está destinada al uso como vacuna terapéutica (para tratamiento), es decir para la administración al animal después de la infección, con la intención de reducir o detener el progreso de la enfermedad, o como vacuna preventiva (profiláctica), para la administración al animal antes de la infección, con la intención de evitar la infección inicial (y/o la recurrente). La vacunación que protege contra una especie usando antígenos de otra especie se denomina “vacunación cruzada” o “vacunación heteróloga”.

La presente invención se basa en la observación de que la vacunación mucosal y parenteral con antígenos heterólogos procedentes de *H. pylori* SS1 o *H. felis* CS1, provocó una reducción importante en la carga bacteriana, pero no inmunidad esterilizante en la sensibilización con “*Candidatus H. suis*”. Filogenéticamente, el *H. felis* está más estrechamente relacionado con el “*Candidatus H. suis*” que el *H. pylori* (De Groote et al. (1999) citado anteriormente), y por consiguiente se podría esperar obtener mejores resultados con la inmunización con *H. felis* heterólogo. La presente invención demuestra que se encuentran diferencias solamente minoritarias o no significativas en el nivel de protección entre estos dos grupos.

La invención se refiere entonces a una vacunación heteróloga, es decir, al uso de un preparado antigénico de una especie relacionada con *Candidatus H. suis*, para obtener protección contra la infección por *Helicobacter* spp., más en particular por *Candidatus H. suis*.

El objeto de la vacuna y la vacunación con la misma de acuerdo con la presente invención incluye obtener una protección completa (inmunidad esterilizante) contra *Helicobacter* spp., más en particular contra *Candidatus Helicobacter suis*, en un animal, pero también reducir la carga bacteriana de *Helicobacter* spp., más en particular de *Candidatus Helicobacter suis*, en al menos un 25, 40, 60, 80% en comparación con la anterior vacunación y/o en comparación con animales que no han recibido la vacuna de la presente invención y son o han sido sometidos al mismo agente infeccioso. Lo más en particular, la presente invención se refiere a vacunas y a estrategias de vacunación que

aseguran un efecto protector o una carga bacteriana reducida durante un periodo de tiempo prolongado, como es durante al menos 4, 6, 10, 12 o más de 12 semanas.

La identificación y la cuantificación de tal infección y/o carga bacteriana en un animal pueden hacerse de varias formas. Clásicamente, esto se hace determinando la presencia del agente infeccioso, o una proteína o una secuencia de DNA del mismo, en una muestra de fluido corporal o en orina o heces. Alternativamente, puede medirse la reacción del sistema inmunitario, p. ej. la presencia de anticuerpos contra el agente infeccioso. De acuerdo con una realización particular de la invención, se obtiene un diagnóstico y una cuantificación exactos de la infección por *Helicobacter*, mediante la identificación del DNA de *Candidatus H. suis*, p. ej. mediante PCR, como se describe en la técnica (Fox and Lee (1997) *Lab. Anim. Sci.* 47, 222 - 255). Como el "*Candidatus H. suis*" es hasta ahora incultivable, se usa una prueba cuantitativa de ureasa para cuantificar esta especie. Este ensayo ha sido usado en la técnica anterior para cuantificar la infección por *H. heilmannii*, *H. felis* y *H. pylori* en estudios de inmunización de ratones (Michetti et al. (1994) *Gastroenterology* 107: 1002 - 1011; Kleanthous (2001) *Vacuna* 19, 4883 - 4895; Saldinger et al. (1998) *Gastroenterology* 115, 891 - 897). Se encontró que esta prueba de ureasa es menos sensible que la determinación del número de bacterias después del cultivo.

De acuerdo con un primer aspecto, se usa un preparado antigénico de una o más especies relacionadas con *Candidatus H. suis* para obtener inmunidad profiláctica o terapéutica contra *Candidatus H. suis*. Más en particular, la invención se refiere a preparados antigénicos de una o más especies que tienen al menos un 93% de identidad de secuencia en el rRNA 16S depositado en GenBank entrada nº AF127028 como se representa en la SEC ID NO: 16. De acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, la especie relacionada con *Candidatus Helicobacter suis* es una o varias especies elegidas entre el grupo de *H. pylori*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, y *H. salomonii*. Otras especies de *Helicobacter* adecuadas son *H. bilis*, *H. fenelliae*, *H. pametensis*, *H. nemestrinae*, *H. nemestrinae*, *H. pametensis*, *H. acinonychis*, *H. pullorum*, *H. mustelae*, *H. hepaticus*, *H. cinaedi* y *H. canis*.

Además, una realización particular de una cepa útil para la vacunación contra *Candidatus H. suis*, es decir *H. cynogastricus*, como se describe en los Ejemplos en el presente texto.

De acuerdo con una realización particular, el preparado antigénico es un lisado de células, es decir una mezcla obtenida en la lisis de células bacterianas. Un ejemplo particular de lisado de células bacterianas es la fracción soluble de un cultivo bacteriano sonificado, p. ej. obtenido después de filtración. Alternativamente, o además, las bacterias pueden ser fragmentadas usando un homogeneizador de alta presión (p. ej. EmulsiFlexC5 modelo Avestin). Opcionalmente, el lisado de células se inactiva aún más mediante tratamiento con formalina, o con un agente comparable. Generalmente no todas las proteínas de un lisado van a provocar una respuesta inmunitaria. Alternativamente, el preparado antigénico de acuerdo con la presente invención se obtiene mediante fraccionamiento y/o purificación de una o más proteínas a partir de un lisado o medio de cultivo bacteriano, para obtener una composición de antígenos enriquecidos o purificados. También entran dentro del concepto de la presente invención proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas usadas como preparado antigénico. Los ejemplos más particulares de proteínas bacterianas aisladas, purificadas y/o recombinantes, adecuadas en el contexto de la presente invención, son proteínas de choque térmico y/o proteínas de ureasa.

La vacuna de la presente invención contiene opcionalmente tan solo el preparado antigénico de la invención. Alternativamente, la vacuna puede comprender, además del preparado antigénico de la presente invención, un coadyuvante adecuado. El tipo de coadyuvante variará, dependiendo del tipo de preparado antigénico y de la vía de administración usada. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, el preparado antigénico que es una solución de antígeno tratada por ultrasonidos es administrado intranasalmente con toxina del cólera (Cholera toxin: CT) o subcutáneamente con saponina como coadyuvante. Cualquier coadyuvante conocido en la técnica puede ser usado en la composición de la vacuna, incluyendo coadyuvantes con base oleosa tales como Coadyuvante Completo de Freund y Coadyuvante Incompleto de Freund, coadyuvantes basados en micolato (p. ej., trehalosa dimicolato), lipopolisacárido bacteriano (LPS), peptidoglicanos (es decir, mureinas, mucopéptidos, o glicoproteínas tales como N-Opaca, muramil dipéptido [MDP], o análogos de MDP), proteoglicanos (p. ej., extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparados estreptocócicos (p. ej., OK432), Biostim™ (p. ej., 01K2), los "Iscoms" de EP 109 942, EP 180 564 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tales como migliol), aceites vegetales (tales como aceite de cacahuete), liposomas, polioles Pluronic®. Los coadyuvantes incluyen, pero sin limitarse a ellos, el sistema coadyuvante RIBI (Ribi Inc.), alum, gel de hidróxido de aluminio, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, p. ej., coadyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero de bloques (CytRx, Atlanta Ga.), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), coadyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galénica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, coadyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otra forma), toxina del cólera, o muramil dipéptido, entre otros muchos. De acuerdo con una realización particular se añade al preparado antigénico toxina termolábil de *Escherichia coli* recombinante mutante antes de la inyección al animal.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de las vacunas de la presente invención para obtener inmunidad profiláctica o terapéutica contra *Helicobacter* spp. tales como los citados en el presente texto, más en particular contra *Candidatus H. suis*.

De acuerdo con una primera realización, la invención proporciona preparados antigénicos para su uso en la vacunación profiláctica que asegure la protección contra *Candidatus H. suis* que es más que transitoria. La infección transitoria de ratones inmunizados profilácticamente solamente ha sido publicada una vez en el modelo de *H. pylori* (Garhart et al. 2002, *Infect. Immun.* 70: 3529 - 3538). La presente invención muestra la evolución de la protección a lo largo del tiempo. Se lleva a cabo por un método para la detección de la infección en muestras fecales, en particular desarrollado para este fin. Se lleva a cabo una PCR en muestras fecales recogidas a valores del tiempo subsiguientes, que da una impresión de la colonización en el estómago con "*Candidatus H. suis*". La reacción PCR se lleva a cabo en un pequeño fragmento del gen de rRNA 16S. Típicamente, este fragmento tiene una longitud de menos de 400 pb (p. ej. un fragmento entre 200 y 400 pb, un fragmento entre 200 y 100 pb o un fragmento entre 100 y 50 pb), más en particular un fragmento que comprende secuencias para amplificación por PCR que son específicas para la especie. Esto permite la detección de rRNA 16S degradado de una especie de *Helicobacter* específica en muestras fecales. Fragmentos más grandes o rRNA 16S de longitud completa, tal como se detecta en las muestras gástricas (De Groofte et al. (2000) citado anteriormente), no podrían ser detectados en muestras fecales de cerdos. Se demuestra en el presente texto que hay una disminución de la excreción DNA de *Helicobacter* a partir de una semana después de la infección en los ratones inmunizados, en comparación con los ratones no inmunizados, y que la colonización en los ratones inmunizados nunca alcanza el mismo nivel que en ratones no inmunizados.

En la presente invención se describen métodos para la inmunización terapéutica, cuando los organismos han orientado ya la respuesta inmunitaria del hospedador en su beneficio.

Los preparados antigénicos o vacunas de la presente invención pueden ser administrados a través de cualquier vía adecuada, tal como la administración mucosal (intranasal), parenteral, o intramuscular, o administración oral, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, o subcutánea. Las vías de vacunación adecuadas comprenden también administraciones combinadas (p. ej. administración oral e intramuscular). La inmunización terapéutica puede realizarse por administración parenteral del preparado antigénico de la invención. La inmunización parenteral puede movilizar células de origen sistémico que no han sido ya cebadas en una dirección dada por una infección por *Helicobacter* (Guy et al. (1999) *Vaccine* 17, 1130 - 1135). De acuerdo con otra realización específica de la invención, se usa la administración intramuscular para una vacunación eficiente.

Los antígenos de la presente invención pueden ser administrados solos o con vehículos farmacéuticos adecuados, y pueden estar en forma sólida o líquida tal como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Las formas de dosis unitarias sólidas pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula, tal como una de tipo de gelatina corriente que contiene las proteínas o los péptidos de la presente invención o los anticuerpos o porciones de unión de los mismos de la presente invención, y un vehículo, por ejemplo, lubricantes y cargas inertes tal como lactosa, sacarosa o almidón de maíz. En otra realización, estos compuestos se conforman como comprimidos con bases para comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz, en combinación con aglutinantes como la acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes desintegrantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o ácido alginico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio.

Los antígenos de la presente invención pueden también ser administrados en dosificaciones inyectables mediante solución o suspensión de estos materiales en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico. Tales vehículos incluyen líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un agente tensioactivo y otros coadyuvantes aceptables farmacéuticamente. Aceites ilustrativos son los de petróleo y los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, el agua, solución salina, solución acuosa de dextrosa y solución de azúcar relacionado, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, son vehículos líquidos preferidos, en particular para soluciones inyectables.

Para su uso como aerosoles, los antígenos de la presente invención en solución o suspensión pueden ser envasados en un recipiente para aerosol presurizado, junto con propulsores adecuados, por ejemplo propulsores de hidrocarburo tales como propano, butano o isobutano, con coadyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención pueden también ser administrados en forma no presurizada tal como en un nebulizador o un atomizador.

Se describe también en el presente texto un modelo animal *in vivo* para la infección con *Candidatus H. suis*, y se proporciona también un método para obtener infección por *Candidatus H. suis* en laboratorio o en un modelo animal, tal como ratones, el cual método comprende inocular por vía intragástrica al animal de laboratorio o modelo, con homogeneizados de células obtenidas de la pared del estómago de animales infectados, más en particular cerdos infectados. Con este propósito, las capas superiores de células y moco se raspan del antro y se homogenizan. Alternativamente, el material de la pared estomacal de los animales infectados es homogenizado en medio para liofilización (2 volúmenes de suero de caballo, 1 volumen de caldo BHI (caldo de cerebro corazón) y 10% de glucosa) (LYM). Opcionalmente, las partículas más grandes se eliminan mediante centrifugación. De acuerdo con un ejemplo particular, el estómago del animal de laboratorio infectado o animal modelo así obtenido se disecciona de nuevo y se homogeniza durante al menos dos pasos adicionales en el mismo animal. La infección se sigue opcionalmente por PCR fecal como se describe en el presente texto.

Leyendas de las figuras.

Las Figuras que siguen ilustran la invención.

Figura 1: Ensayo cuantitativo de ureasa en tejido gástrico del estómago, de diferentes sitios (cardias, fundus o fondo, antrum o antro) de cerdos infectados con *Candidatus Helicobacter suis* a partir de ratones (n = 5) y testigos (n = 5), de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 2: Excreción de DNA de “*Candidatus Helicobacter suis*” en las heces de ratones BALB/c inmunizados intranasalmente con antígenos de *H. pylori* (◆) o antígenos de *H. felis* (◇) en comparación con ratones no inmunizados (▲), 1 a 16 semanas después de la infección con “*Candidatus Helicobacter suis*”, de acuerdo con una realización de la invención. La excreción se expresa como porcentaje de ratones positivos en PCR por grupo.

Figura 3: Excreción de DNA de “*Candidatus Helicobacter suis*” en las heces de ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con antígenos de *H. pylori* (◆) o *H. felis* (◇), en comparación con animales no inmunizados (▲), 1 a 16 semanas después de la infección con “*Candidatus Helicobacter suis*”, de acuerdo con una realización de la invención. La excreción se expresa como porcentaje de ratones positivos en PCR por grupo.

Figura 4: Actividad cuantitativa de ureasa del tejido gástrico del estómago, representada como valor de la OD (densidad óptica) (550 nm), de ratones inmunizados intranasalmente con antígenos de *H. pylori* o *H. felis* de acuerdo con una realización de la invención. Las líneas de trazo continuo representan la media geométrica para cada grupo estudiado. (Cs) sensibilización de animales infectados con “*Candidatus Helicobacter suis*”; (Cp) sensibilización de animales infectados con *H. pylori*; (Cf) sensibilización de animales infectados con *H. felis*; (IN,p) inmunización intranasal con antígenos de *H. pylori*; (IN,f) inmunización intranasal con antígenos de *H. felis*.

Figura 5: Actividad de ureasa cuantitativa de tejido gástrico del estómago, representada como valor de la OD (550 nm), de ratones inmunizados subcutáneamente con antígenos de *H. pylori* (SCp) o *H. felis* (SCf) de acuerdo con una realización de la invención. Las líneas de trazo continuo representan la media geométrica para cada grupo estudiado. Las diferencias significativas (P < 0,05) entre animales sensibilizados inmunizados y no inmunizados, para cada *Helicobacter* sp., se indican con la letra a. (Cs) sensibilización de animales infectados con “*Candidatus Helicobacter suis*”.

Figura 6: Excreción de DNA de “*Candidatus Helicobacter suis*” en las heces de ratones BALB/c inmunizados intranasalmente con antígenos de *H. felis* CS1 o *H. bizzozeronii* tres semanas después de la sensibilización con “*Candidatus Helicobacter suis*” de acuerdo con realizaciones particulares de la invención. La excreción se expresa como porcentaje de ratones positivos en la PCR. Las diferencias entre las condiciones experimentales se exponen con detalle en la Tabla 1.

Figura 7: Actividad cuantitativa de ureasa de tejido gástrico del estómago, representada como valor de la OD (550 nm). Las líneas de trazo continuo representan la media geométrica para cada grupo estudiado. Se encontró una disminución significativa (P < 0,05) en la actividad de ureasa entre animales no inmunizados, sensibilizados (grupo 9) e inmunizados para el grupo 1 y el grupo 2, representando ambos inmunización intranasal con solución de antígeno de *H. felis* CS1 tratada con ultrasonidos o *H. bizzozeronii* respectivamente (a), de acuerdo con realizaciones particulares de la invención. Las diferencias entre las condiciones experimentales se exponen con detalle en la Tabla 1.

Figura 8A: Seroconversión (valores de s/p) contra antígenos de *H. felis* después de la vacunación con antígenos de *H. felis* (datos de serología en el cerdo) (grupo 1: ■; grupo 2: ◆; grupo 3: ▲) y antígenos de *H. bizzozeronii* (grupo 4: ●) (solamente coadyuvantes: ▭) Pre: pre inmunización; 1x: 3 semanas después de la primera inmunización; 2x: dos semanas después de la segunda inmunización.

Figura 8B: Seroconversión (valores de s/p) contra antígenos de *H. bizzozeronii* después de la vacunación con antígenos de *H. felis* (grupo 3: ▲) y de *H. bizzozeronii* (grupo 4: ●) (solamente coadyuvantes: ▭) Pre: pre-inmunización; 1x: 3 semanas después de la primera inmunización; 2x: dos semanas después de la segunda inmunización.

Figura 9A: Dendrograma (A) derivado del análisis numérico de los perfiles de proteína de la célula completa (B) de las cepas de referencia *H. cynogastricus*, *H. pylori*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. felis*.

Figura 9B: Matriz de similitud basada en la comparación con la secuencia de rRNA 16S.

Figura 10: Arbol filogenético para 25 cepas de especies *Helicobacter* basado en la similitud con la secuencia de rRNA 16S. La barra de escala representa un 10% de diferencia en las secuencias de nucleótidos, determinada midiendo las longitudes de las líneas horizontales que conectan dos especies cualesquiera.

Figura 11: Secuencia genómica del gen rRNA 16S de *Helicobacter cynogastricus*.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, pero sin limitarse a ellos.

EJEMPLOS

Metodología general

Ratones. Todos los experimentos en los que intervienen animales fueron aprobados por el Animal Care and Ethics

Committee (Comisión para el cuidado y la ética con los animales) de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Ghent. Los ratones SPF BALB/c de cinco semanas de edad fueron adquiridos de un criador autorizado (HARLAN, Horst, Holanda). Los animales fueron albergados individualmente en jaulas de parte superior de filtro autoclavadas y se les dio una dieta comercial (TEKLAD, HARLAN) y agua a voluntad. Tras un periodo de adaptación de una semana, los animales fueron usados en los experimentos.

Antígenos para la vacunación. *H. pylori* SS1, *H. felis* CS1 (ATCC 49179) y *H. bizzozeronii* (CCUG 35545) fueron desarrollados en placas de agar con infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid, Inglaterra) suplementadas con 10% de sangre de caballo, 5 mg/ml de anfotericina B, 10 mg/ml de vancomicina, 5 mg/ml de lactato de trimetoprim y 2500 unidades/l de polimixina B (Skirrow, Campylobacter Selective Supplement, Oxoid) y suplemento Vitox (Oxoid). Las placas se incubaron a 37° C en condiciones microaerobias. Los antígenos usados para la inmunización fueron preparados recolectando cultivos de 3 días en solución salina estéril tamponada con fosfato. La suspensión bacteriana se trató con ultrasonidos (8 veces, 30 segundos, 50% de capacidad; Misonix, Incorporated, EE.UU.). Después de la centrifugación (5.000 g, 5 min., 4° C) el sobrenadante se filtró a través de un filtro de poros de 0,22 µm Schleisser Schuell, Dassel, Alemania) y se almacenó a -20° C. A continuación, se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo de Lowry (Lowry et al. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275).

Se prepararon cultivos bacterianos inactivados con formalina transfiriendo cultivos bacterianos desde placas de agar a caldo BHI suplementado con 0,2% de Skirrow, 0,6% de Vittox y 10% suero de caballo. Después de 24 h de incubación a 37° C, se añadió 0,5% de formaldehído y se siguió incubando a 37° C. Veinticuatro horas más tarde se enfrió el cultivo a 4° C y se comprobó al microscopio para ver la presencia de bacterias intactas. Se añadió un veinte por ciento de bisulfito sódico 0,166 M para neutralizar el formaldehído. A continuación se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo de Lowry.

Inmunización intranasal. Cuarenta y cinco ratones fueron divididos en siete grupos de seis animales (grupos 1 a 7) y un grupo de tres animales (grupo 8). Todos los animales de los grupos 1 y 3 fueron inmunizados intranasalmente con *H. felis* CS1 y los de los grupos 2 y 4 con *H. pylori* SS1, dos veces con un intervalo de tiempo de tres semanas. La inmunización intranasal se hizo aplicando aproximadamente 100 µl con 100 µg solución de antígeno tratada con ultrasonidos mezclada con 5 µg de toxina del óvulo (List, Campbell, CA, EE.UU.) en los orificios nasales externos de los ratones no anestesiados. Los ratones de los grupos 5, 6, 7 y 8 eran no inmunizados. Cuatro semanas después de la inmunización final, todos los animales de los grupos 2 y 5 y todos los animales de los grupos 1 y 6 fueron sensibilizados con *H. pylori* o *H. felis* respectivamente, por inoculación intragástrica con 0,3 ml de la suspensión bacteriana. Este experimento de vacunación homóloga sirve de testigo. Al mismo tiempo, todos los animales de los grupos 3, 4 y 7 fueron inoculados intragástricamente con "*Candidatus H. suis*". Con este fin, un material congelado de "*Candidatus H. suis*" se puso a 37° C durante 15 minutos.

Durante 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 y 15 semanas después de la sensibilización se recogió el material fecal durante tres días consecutivos de cada ratón individual inoculado con "*Candidatus H. suis*", para cribar la presencia de DNA bacteriano. La PCR en las muestras fecales se realizó como se describe más adelante.

Diez y seis semanas después de la sensibilización, todos los animales fueron sacrificados por eutanasia mediante dislocación cervical después de anestesia con isoflurano (IsoFlo, Abbot, Illinois, EE.UU.). De todos los animales se usó la mitad del estómago para una prueba de ureasa cuantitativa (Corthésy-Theulaz et al. (1995) citado anteriormente) como se describe más adelante. De la otra mitad, se congelaron muestras de tejido de 2 mm² de la región fúndica (-20°) y se usaron para PCR específica para "*Candidatus H. suis*" (muestras de los grupos 3, 4 y 7), *H. felis* (muestras de los grupos 1 y 6) o *H. pylori* (muestras de los grupos 2 y 5) como se describe más adelante.

Inmunización subcutánea. 21 ratones fueron divididos en tres grupos de seis animales (grupos 1 a 3) y un grupo de tres animales (grupo 4). Los animales de los grupos 1 y 2 fueron inmunizados con *H. pylori* o *H. felis* respectivamente, tres veces con tres semanas de intervalo. Con este fin aproximadamente 100 µl con 100 µg de la solución de antígeno bacteriano tratada con ultrasonidos se mezclaron en iguales cantidades con coadyuvante de saponina y se inyectaron subcutáneamente en el lomo inferior de los animales. Cuatro semanas después de la inmunización final, los animales de los grupos 1, 2 y 3 fueron infectados con "*Candidatus H. suis*" como se describe en el protocolo 1. Los animales del grupo 4 no fueron inmunizados ni sensibilizados. El muestreo de material fecal de los grupos 1, 2 y 3, durante el experimento, y el muestreo del material de estómago de todos los animales, al final del estudio, se hizo como se describe en el protocolo 1.

Preparación de *Candidatus H. suis* en un sistema *in vivo*, para ser usado en experimentos de sensibilización. Se obtuvieron 30 estómagos de cerdo en un matadero. Los estómagos se abrieron y el alimento que queda se recogió con agua corriente autoclavada (37° C). Se tomó un pequeño fragmento de la mucosa del antro (1 cm desde el torus pyloricus) para cribar la presencia de "*Candidatus H. suis*". La mitad de este fragmento se usó para una prueba rápida de ureasa (CUT, Temmler Pharma, Marburg, Alemania, 37° C durante 1 h). La otra mitad se congeló (-20° C) y se usó para la detección específica de "*Candidatus H. suis*" por PCR (De Groote et al. (200) *J. Clin. Microbiol.* 38, 1131 - 1135) como confirmación para la prueba de ureasa. Los estómagos para los cuales la prueba de ureasa da los resultados positivos más rápidos fueron procesados en primer lugar. Por tanto las capas celulares superiores y el mucus del antro fueron raspados. Las raspaduras se homogeneizaron en medio para liofilización (2 volúmenes de suero de caballo, 1 volumen de caldo BHI y 10% de glucosa) (LYM). El homogenizado fue después centrifugado (5000 g, 5 min) para

eliminar las partículas grandes. El sobrenadante se diluyó 1/10 en LYM y se inoculó intragástricamente en tres ratones BALB/c. Dos semanas más tarde, estos ratones se sacrificaron mediante eutanasia, los estómagos se vaciaron y se tomó una muestra de tejido del fundus para una prueba rápida de ureasa. Los estómagos positivos a ureasa fueron homogeneizados en LYM (5 ml LYM/estómago). Después de este primer paso, se realizaron dos pasos extra de ratón. Finalmente, el homogeneizado de estómago de ratón infectado de 15 ratones se congeló a -70° C.

Preparación de *H. pylori* y *H. felis* para su uso en experimentos de sensibilización. *H. pylori* SS1 o *H. felis* CS1 fueron desarrollados en placas de agar con BHI, estáticamente a 37° C en condiciones microaerobias. Al cabo de 3 días, las bacterias fueron recolectadas, transferidas a caldo BHI suplementado con 0,2% de medio Skirrow, 0,6% de Vittox y 10% de suero de caballo, y se incubaron estáticamente a 37° C en condiciones microaerobias durante 24 h. Se prepararon consiguientemente una suspensión bacteriana con una absorbancia de 1,5 (450 nm) y con una absorbancia de 1,5 (660 nm) para *H. pylori* y *H. felis* respectivamente en caldo de BHI, correspondiente a aproximadamente 107 ufc/ml para *H. pylori* y 108 ufc/ml para *H. felis* como se confirmó mediante la valoración.

Análisis estadístico. La presencia de bacterias en las heces, que determinada mediante PCR, fue comparada entre los grupos de tratamiento por un modelo mixto generalizado con positividad en PCR como variable de respuesta binaria, tiempo y tratamiento como efectos fijos categóricos, y ratón como efecto aleatorio. Se realizaron comparaciones por pares entre el grupo no inmunizado y los grupos inmunizados de *H. pylori* y *H. felis* a un nivel de significación global de 5%, y un nivel de significación de comparación de 1,3% (ajustado por la técnica de Bonferroni con 3 comparaciones).

Las pruebas de ureasa cuantitativas fueron comparadas por un modelo de efectos fijos con “valor de OD” como variable de respuesta y “grupo de tratamiento” como efecto fijo. Se realizaron comparaciones por pares entre los grupos de tratamiento a un nivel de significación global de 5% usando de nuevo la técnica de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Las pruebas cuantitativas de ureasa mostradas en la Figura 7 fueron comparadas entre los grupos de tratamiento mediante una prueba de la t de Student.

Ejemplo 1: Infección experimental de cerdos con *Candidatus H. suis*.

Se adquirieron cerdos de cinco semanas de edad ($n = 10$) de una unidad de cría libre de patógenos específicos (specific pathogen free, SPF) negativos para *Candidatus H. suis* y se dividieron aleatoriamente en un grupo testigo (grupo A) y un grupo infectado (grupo B) con 5 cerdos en cada grupo. Después de un periodo de adaptación de 1 semana, los cerdos se usaron en el experimento. Antes de la inoculación con el patógeno, todos los cerdos fueron tratados por vía intramuscular con 60 mg/kg de cimetidina para reducir la producción de ácido del estómago y fueron anestesiados. El grupo A era el grupo testigo y fue inoculado falsamente (*sham*) (inóculo a partir de estómagos negativos a ureasa de ratones BALB/c no infectados) el día 7, el día 14 y el día 21. El grupo B fue inoculado con *Candidatus H. suis* (un homogeneizado de estómago de ratones infectados con *Candidatus H. suis*) el día 7, el día 14 y el día 21. Inmediatamente antes e inmediatamente después de la administración del homogeneizado de estómago murino, los cerdos fueron inoculados intragástricamente con caldo Brucella (Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 0,75% de agar, para retrasar el tránsito de la suspensión bacteriana a través del duodeno. Se supone que la exposición prolongada de la mucosa gástrica a las bacterias hace al estómago más susceptible a la colonización con bacterias *Helicobacter*.

Todos los animales fueron sacrificados por eutanasia 5 semanas después de la tercera inoculación, y sometidos a necropsia inmediatamente. En la necropsia, se cortaron los estómagos. La superficie de la mucosa de la *pars oesophagea* fue examinada macroscópicamente y las lesiones fueron puntuadas en una escala de 0 a 5 usando el método de Hessing et al. (1992) (puntuación 0 = mucosa intacta, puntuación 1 = hiperqueratosis suave (< 50% del área de la superficie), puntuación 2 = hiperqueratosis severa (50% o más del área de la superficie), puntuación 3 = hiperqueratosis y unas cuantas erosiones pequeñas (menos de 5 y más cortas de 2,5 cm), puntuación 4 = hiperqueratosis y erosiones extensas (más de 5 erosiones y/o más largas que 2,5 cm), puntuación 5 = hiperqueratosis y erosiones muy grandes (más de 10 erosiones o más largas que 5 cm) y/o úlceras.

En el grupo B, inoculado con “*Candidatus H. suis*”, tres animales tenían una puntuación de la lesión de 3, un animal una puntuación de 4 y un animal una puntuación de 5. En el grupo testigo, las puntuaciones de la lesión fueron 2 (un animal), 3 (dos animales) y 4 (dos animales). La diferencia de las puntuaciones de la lesión entre los animales infectados con “*Candidatus H. suis*” y los animales testigo no fue significativa ($P = 0,36$).

Después de la puntuación, tres sitios de la mucosa glandular ($0,5 \text{ cm}^2$) de cada estómago fueron muestreados para PCR, prueba cuantitativa de ureasa e histología. Estos tres sitios correspondían al cardias (inmediatamente adyacente al *margo plicatus*), el *fundus*, y el *antrum pyloricum* (1 cm apartado del *torus pyloricus*).

PCR para la detección específica de la infección de “*Candidatus H. suis*” en tejido gástrico. El DNA fue extraído con el equipo DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La PCR para la detección específica de “*Candidatus H. suis*” se llevó a cabo como describen De Groote et al. (2000) citado anteriormente. Las muestras de todos los animales testigo fueron negativas. Todas las muestras del *fundus* y del *antrum* y 3/5 de las muestras del cardias del grupo B fueron positivas en la PCR.

El ensayo de ureasa se llevó a cabo como describen Corthésy-Theulaz et al. (1995) citado anteriormente. Los valores medios de la OD para cada sitio de muestreo se indican en la Figura 1. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre animales testigo y animales infectados con "*Candidatus H. suis*" para todas las muestras de tejido procedentes del *fundus* y el *antrum* (cardias, $P = 0,0676$; *fundus*, $P = 0,0038$; *antrum pyloricum* $P = 0,0011$). No había diferencias significativas en el valor medio de OD para los distintos sitios de muestreo en animales infectados (cardias frente a *fundus* $P = 0,2280$; cardias frente a *antrum pyloricum* $P = 0,1733$ y *fundus* frente a *antrum pyloricum* $P = 0,7824$).

El examen histológico se levó a cabo usando un anticuerpo anti-*H. pylori* policlonal de cabra como se describe en De Groote et al. (2000). Los animales positivos para "*Candidatus H. suis*" tenían lesiones predominantemente en la mucosa antral. En esta región del estómago, estaban presentes infiltrados celulares linfoplasmacíticos focales en la mucosa en los 5 animales. En 3/5 de animales infectados estaban presentes folículos linfoides antrales con centros germinales. Debido al tamaño de los folículos, estaban asociados con desplazamiento y pérdida de ganglios gástricos. En 2/5 de los animales infectados no pudieron detectarse folículos en la mucosa antral, pero estos animales sí que mostraron agregados de linfocitos y células plasmáticas en la *lamina propria*. En el *fundus* de animales infectados con "*Candidatus H. suis*", estaba presente solamente una suave infiltración dispersa de linfocitos. En el antro, la colonización estaba presente en el moco que cubre el epitelio de la superficie y en la foveola de la superficie, pero no se extendía en profundidad en las criptas gástricas. La colonización de la mucosa fúndica con "*Candidatus Helicobacter suis*" fue detectada en la foveola glandular y se extendía hacia abajo a medio camino de las criptas gástricas. Se encontraron bacterias en contacto estrecho con células epiteliales gástricas, es decir, células productoras de moco y células parietales. No se demostraron bacterias en el estómago de los animales testigo. Los animales testigo son negativos para "*Candidatus H. suis*" (Grupo A).

Ejemplo 2: Configuración experimental de la inmunización comparativa con especies relacionadas con *Candidatus H. suis*

En un experimento paralelo, se comprobó el efecto de inmunización con *H. felis* o *H. bizzozeronii* sonicados, *H. bizzozeronii* o *H. felis* inactivados con formalina y coadyuvantes testigo, usando vías de inmunización intra-nasal o subcutánea. Sesenta ratones fueron divididos en 10 grupos de seis animales como se muestra a continuación (Tabla 1).

TABLA 1. Diseño experimental

Grupo ^a	Preparación del antígeno ^b	Coadyuvante ^c	Vía ^d	Sensibilización
1	<i>H. felis</i> sonificado	CT	IN	" <i>Candidatus H. suis</i> "
2	<i>H. bizzozeronii</i> sonificado	CT	IN	" <i>Candidatus H. suis</i> "
3	<i>H. bizzozeronii</i> inactivado con formalina	CT	IN	" <i>Candidatus H. suis</i> "
4	<i>H. felis</i> sonificado	saponina	SC	" <i>Candidatus H. suis</i> "
5	<i>H. felis</i> sonificado	saponina + LT	SC	" <i>Candidatus H. suis</i> "
6	<i>H. felis</i> inactivado con formalina	saponina + LT	SC	" <i>Candidatus H. suis</i> "
7	<i>H. bizzozeronii</i> sonificado	saponina + LT	SC	" <i>Candidatus H. suis</i> "
8	/	saponina + LT	SC	" <i>Candidatus H. suis</i> "
9	/	/	/	" <i>Candidatus H. suis</i> "
10	/	/	/	/

^a Los ratones fueron divididos en 10 grupos experimentales (1 a 10).

^b Cien microgramos de solución de antígeno sonicada o antígenos inactivados con formol fueron usados para cada inmunización.

^c Se usaron cinco μg de toxina déleca para la inmunización intranasal. Para la inmunización subcutánea, los antígenos en solución se mezclaron con una cantidad igual de coadyuvante de saponina y 1 μg de LT.

^d IN, administración intranasal; SC, administración subcutánea.

^e Los grupos 1, 2 y 3 fueron inmunizados intranasalmente dos veces con tres semanas de intervalo. Por tanto 100 μg de proteínas sonicadas de *H. felis* o *H. bizzozeronii*, mezcladas con μg de toxina del ólera (List, Campbell, California,

US), fueron aplicados a las fosas nasales externas de ratones no anestesiados.

Los grupos 4 a 7 fueron inmunizados subcutáneamente tres veces con tres semanas de intervalo. Con este fin, se mezclaron 100 µg de la *solucide* antígeno sonicada en cantidades iguales con coadyuvante de saponina. Inmediatamente antes de la inyección se añadió µg de toxina termoestable de *Escherichia coli* mutante recombinante (LTR192G, donada por J. Clements), y después se inyectó subcutáneamente el preparado antigénico en el lomo inferior de los animales.

Los animales del grupo 8 fueron inmunizados subcutáneamente con coadyuvante de saponina más LTR192G solo. Los ratones de los grupos 9 y 10 no fueron inmunizados.

Cuatro semanas después de la inmunización final, se puso un material congelado de "*Candidatus H. suis*", a 37° C durante 15 minutos. Todos los animales de los grupos 1 a 9 fueron sensibilizados por inoculación intragástrica con 0,3 ml del material de "*Candidatus H. suis*".

Durante la tercera semana después de la sensibilización, se recogió materia fecal durante cuatro días consecutivos de cada ratón individual, para cribar la presencia de DNA de "*Candidatus H. suis*". La PCR de las muestras fecales se llevó a cabo como se describe más adelante.

Seis semanas después de la sensibilización, todos los animales fueron sacrificados con eutanasia por medio de dislocación cervical después de una anestesia con isoflurano (IsoFlo, Abbot, Illinois, EE.UU.). De todos los animales se usó la mitad del estómago para una prueba cuantitativa de ureasa (Corthésy-Theulaz et al. 1995, citado antes) como se describe más adelante. De la otra mitad, se congelaron muestras de tejido de 2 mm² de la región fúndica (-20°) y se usaron para PCR específica para *Candidatus H. suis* como se describe más adelante.

Ejemplo 3. Excreción fecal de DNA de "*Candidatus H. suis*" en las heces de ratones no inmunizados e inmunizados.

Detección de DNA de "*Candidatus H. suis*" en muestras fecales.

Se llevó a cabo la PCR de muestras fecales para evaluar la excreción de DNA de "*Candidatus Helicobacter suis*". El DNA se extrajo usando el equipo QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Se usaron cebadores HS 586 gggaggacaagtcaggtgtgaa [SEC ID:1] y HS641 tctcccacactccagaaggatag [SEC ID:2], complementarios a los genes rRNA 16S de "*Candidatus Helicobacter suis*" para amplificar un fragmento de 79 pb. La especificidad del juego de cebadores fue ensayada en extractos de DNA de otras 17 especies de *Helicobacter* y de *Campylobacter jejuni* (tabla 2). La sensibilidad se ensayó añadiendo rRNA 16S clonado a una muestra fecal testigo. Después del aislamiento del DNA y la PCR, se obtuvo un fragmento cuando aproximadamente 100.000 copias fueron añadidas a una muestra testigo.

TABLA 2: ^b Cepas bacterianas usadas para la evaluación de la PCR específica para "*Candidatus Helicobacter suis*" en muestras fecales.

^b Cepa	Especie	^b Cepa	Especie
CCUG 38995	H. bilis	LMG 11759	H. fenelliae
CCUG 29260	H. pametensis	LMG 14378	H. nemestrinae
CCUG 32350	H. nemestrinae	LMG 12678	H. pametensis
NCTC 11961	H. pylori	LMG 12684	H. acinonychis
LMG 6444	C. jejuni	R 10t51	H. bizzozeronii
LMG 16318	H. pullorum	R 1053	H. salomonis
LMG 18044	H. mustelae	R 3647	H. felis
LMG 16316	H. hepaticus	LMG 7543	H. cinaedi
LMG 18086	H. canis		

Las mezclas de reacción de PCR (25) contenían 50 pmoles de cada cebador (Invitrogen Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), 200µM de cada trifosfato de desoxinucleósido (Amersham Pharmacia Biotech, Puurs, Bélgica), 0,03 U/µl de Taq platinum, 1,5 mM de MgCl₂ y 1 x tampón PCR (Invitrogen Life Technologies). Los productos de la PCR se hicieron correr en geles de 1,5% de agarosa que contienen 50 ng/ml de bromuro de etidio. Al cabo de 1 hora a 160V los productos fueron visualizados con un transiluminador de UV. El fragmento amplificado de *Candidatus Helicobacter suis* tiene una longitud de 80 pb. No se obtienen fragmentos de PCR usando cualquiera de las otras especies presentadas en la Tabla 2.

Análisis estadístico.

La presencia de bacteria en las heces, según se determina por PCR, fue comparada entre los grupos de tratamiento mediante un modelo mixto generalizado con positividad para PCR como variable de respuesta binaria, tiempo y tratamiento como efectos fijos categóricos, y ratón como efecto aleatorio. Se realizaron comparaciones por pares entre el grupo no inmunizado y los grupos inmunizados con *H. pylori* y *H. felis* a un nivel de significación global de 5%, y un nivel de significación por comparación de 1,3% (ajustado por la técnica de Bonferroni con 3 comparaciones).

La presencia de DNA en muestras fecales según se determina por el ensayo de PCR, por grupo, y calculada para cada semana de muestreo se representa en la Figura 2 y en la Figura 3 para el experimento 1 y el experimento 2, respectivamente. Había una diferencia significativa global en la excreción fecal entre animales no inmunizados e inmunizados intranasalmente tanto para solución sonicada de antígeno *H. pylori* y como para *H. felis* ($P < 0,0001$) en que los ratones inmunizados intranasalmente excretaron menos DNA de "*Candidatus Helicobacter suis*" en las heces en comparación con los animales sensibilizados no inmunizados con "*Candidatus H. suis*". La diferencia de excreción entre los dos grupos inmunizados intranasalmente no era significativa ($P = 0,0241$).

Se encontró una diferencia significativa entre ratones no inmunizados y ratones inmunizados subcutáneamente con solución de antígeno de *H. pylori* sonicado ($P = 0,0001$). La diferencia entre ratones no inmunizados y ratones inmunizados subcutáneamente con solución de antígeno de *H. felis* sonicado era significativa a $P = 0,0175$. No había diferencia significativa entre los dos grupos inmunizados subcutáneamente ($P = 0,2445$).

Los resultados del experimento, descritos en la Tabla 1, sobre el número de ratones que excretan DNA de "*Candidatus Helicobacter suis*" en las heces tres semanas después de la sensibilización se muestran en la Figura 6. La inmunización intranasal causó una menor excreción en comparación con los animales no inmunizados sensibilizados con "*Candidatus Helicobacter suis*". Para los grupos inmunizados subcutáneamente el efecto de la inmunización era solo detectable en el grupo 4, que representa animales inmunizados con solución de antígeno *H. felis* CS1 sonicado.

Ejemplo 4: Ureasa cuantitativa en el tejido gástrico.

Prueba cuantitativa de ureasa del tejido gástrico.

La muestra de estómago se sumergió en 500 μ l de CUTest y se incubó a 37° C durante 3 horas. Después de la centrifugación (5 min, 100 g) el sobrenadante fue usado para la cuantificación espectrofotométrica a una OD de 550 nm. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Corthésy-Theulaz et al. (1995) *Gastroenterol.* 109, 115 - 121).

Para la inmunización intranasal homóloga (Figura 4) hubo una diferencia significativa ($P < 0,05$) en la actividad de ureasa entre animales no inmunizados e inmunizados tanto para *H. pylori* SS1 como para *H. felis* CS1. La inmunización de animales con solución de antígeno *H. pylori* SS1 o *H. felis* CS1 sonicada antes de la sensibilización con "*Candidatus H. suis*" tuvo por resultado una disminución significativa ($P < 0,0001$) de la actividad de ureasa en comparación con el grupo sensibilizado no inmunizado.

La inmunización subcutánea (Figura 5) con antígenos de *H. pylori* o *H. felis* tuvo por resultado una disminución significativa ($P < 0,0001$) de la actividad de ureasa en comparación con el grupo sensibilizado no inmunizado.

En el experimento descrito en la Tabla 1, el valor medio de la OD de ratones no sensibilizados no inmunizados fue 0,103. El valor medio de la OD de ratones no inmunizados, sensibilizados con "*Candidatus Helicobacter suis*", fue 2,038. Se encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$) de la actividad de ureasa entre animales sensibilizados no inmunizados (grupo 9) e inmunizados para el grupo 1 y el grupo 2, que representan inmunización intranasal con solución de antígeno sonicado de *H. felis* CS1 o *H. bizzozeronii*, respectivamente. Ninguno de los grupos inmunizados subcutáneamente mostró una disminución significativa de la actividad de ureasa en comparación con el grupo 9. En el análisis estadístico, el grupo 7, que representa animales inmunizados subcutáneamente con solución de antígeno de *H. bizzozeronii* sonicado, mostró el valor de P más bajo ($P = 0,085$).

Ejemplo 5: Análisis PCR del tejido gástrico

Análisis PCR del tejido gástrico.

El DNA de la muestra de estómago fue extraído con el equipo DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Se llevaron a cabo PCR para la detección de "*Candidatus H. suis*", *H. felis* o *H. pylori* como se describió anteriormente (De Groote et al. (2000) citado antes y De Groote (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39, 1197 - 1199).

Ninguno de los animales inmunizados intranasalmente con solución de antígeno *H. felis* CS1 sonicada, seguido por sensibilización con *H. felis* CS1 contenía DNA de *Candidatus Helicobacter suis*. En cambio, la inmunización con *H. pylori* SS1 y sensibilización homóloga mostraron la presencia de DNA de *Candidatus Helicobacter suis* en las muestras de estómago. Después de la inmunización intranasal heteróloga y la subcutánea de ratones con antígenos de *H. pylori* o *H. felis*, y sensibilizados con "*Candidatus H. suis*", todas las muestras de estómago contenían DNA de *Candidatus Helicobacter suis*.

En el experimento descrito en la Tabla 1, todos los animales del grupo 10 fueron negativos en la prueba de PCR

específica para “*Candidatus Helicobacter suis*”. De los animales sensibilizados, solamente un animal del grupo 7 era negativo en la prueba de PCR.

Ejemplo 6: Seroconversión en cerdos en la inmunización con *H. felis* o *H. bizzozeronii*.

- 5 30 cerdos convencionales de 5 semanas de edad (Agrivet Merelbeke) fueron divididos en grupos de 6 animales. Todos los grupos fueron inmunizados dos veces intramuscularmente, con un intervalo de tres semanas, usando 0,5 mg de antígenos (lisado bacteriano) (grupos 1 a 4) o usando solamente coadyuvantes (5). Experimentos preliminares con 0,1, 0,5 y 1 mg de preparado antigénico mostraron que una dosis de 0,5 mg provocaba la mayor respuesta inmunitaria.

TABLA 3. Esquema de inmunización para seroconversión

Grupo	Preparado antigénico	especie	aditivos
1	0,5 mg de lisado bacteriano sonicado	<i>H. felis</i>	
2	0,5 mg de lisado bacteriano sonicado	<i>H. felis</i>	CT (toxina del cólera)
3	0,5 mg de lisado bacteriano sonicado (inactivado con formol)	<i>H. felis</i>	CT
4	0,5 mg de lisado bacteriano sonicado	<i>H. bizzozeronii</i>	CT
5	solamente coadyuvantes		CT

* *H felis* cepa ATCC 49179.

- 10 Se recolectó el pre-suero de todos los animales. Dos semanas después de la primera inmunización, antes de la segunda inmunización, se recogió sangre. Se volvió a recoger sangre después de una, dos y tres semanas después de la segunda inmunización.

Las placas de ELISA fueron recubiertas con lisado bacteriano y se usaron para la incubación con suero. Los antígenos unidos fueron detectados con anticuerpos policlonales anti cerdo de cabra marcados con fosfatasa alcalina.

- 15 Los resultados se representan en las Figuras 8a y 8b, en las que se representan los resultados de ELISA para placas recubiertas con *H. felis* y *H. bizzozeronii* respectivamente.

Usando placas de ELISA recubiertas con *H. felis*, la seroconversión pudo ser demostrada solamente en ratones inmunizados con antígenos *H. felis*. Con placas recubiertas con *H. bizzozeronii* pudo demostrarse la seroconversión contra *H. bizzozeronii*.

- 20 Ejemplo 7: Identificación de *Helicobacter cynogastricus*

Una especie *Helicobacter* relacionada con *Candidatus H. suis* y adecuada para la preparación de una vacuna es una nueva especie *Helicobacter*, *Helicobacter cynogastricus* (también denominada en la presente invención como cepa JKM4T), que es una varilla de forma helicoidal microaerófila Gram-negativa.

Asilamiento de JKM4T

- 25 Una cepa de *Helicobacter* (JKM4^T) fue aislada de la región del *antrum* y el *fundus* del estómago de un perro sometido a eutanasia en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Ghent, Bélgica. Las muestras fueron manipuladas como se describe en Gruntar et al. (2003) *Int J Med Microbiol* 293, 65. Las bacterias se desarrollaron en agar con infusión de corazón cerebro (BHI; Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra), que contiene 10% (vol/vol) de sangre de caballo, 5 mg/l de anfotericina B (Fungizone; Bristol-Myers Squibb, Epernon, Francia), suplemento selectivo para *Campylobacter*
- 30 (Skirrow, Oxoid; que contiene 10 mg/l de vancomicina, 5 mg/l de lactato de trimetoprim y 2500 U/l de polimixina B), y suplemento Vitox (Oxoid). Las placas fueron incubadas con las tapas, lo más alto a 37° C, bajo condiciones microaerobias humidificadas en un circuito cerrado, creado por evacuación del 80% de la atmósfera normal e introduciendo una mezcla de gases de 8% de CO₂, 8% de H₂ y 84% de N₂.

- 35 Las placas fueron comprobadas cada dos días y se añadió caldo BHI a la superficie de agar para asegurar que las placas no se secan. El crecimiento primario ocurrió al cabo de 10 días de incubación en forma de un aspecto oleoso del caldo que cubre el medio de agar. Un examen del caldo al microscopio óptico reveló la presencia de organismos móviles en forma de espiral. La tinción Gram probó la Gram negatividad y la forma helicoidal del material aislado. El crecimiento bacteriano de subcultivos tuvo lugar como una capa extendida en las placas de agar húmedo. Se observaron colonias en puntitos cuando una cantidad abundante de bacterias se puso sobre una superficie seca de agar.
- 40 Las bacterias desarrolladas sobre un agar seco perdieron en su mayoría su morfología en espiral y se transformaron en formas cócicas.

Las bacterias con una morfología en espiral típica fueron recolectadas en caldo BHI y almacenadas a -70° C en un medio consistente en 7,5 g de glucosa, 25 ml de BHI (Oxoid) y 75 ml de suero de caballo inactivado estéril. La cepa

aislada JKM4T es una nueva especie de *helicobacter*, *Helicobacter cynogastricus* (véase más adelante), y ha sido depositada el 6 de junio de 2005 con el número de entrada LMG P23-100 en Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM™/LMG) [Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gent (RUG), K. L. Ledeganckstraat 35, 9000 Gent, Bélgica] por Katleen van den Bulck.

5 Estudios fenotípicos.

Para su examen mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, los cultivos bacterianos fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en tampón de cacodilato (0,1 M, pH 7,3). Fueron post-fijados en tetróxido de osmio al 1% (p/vol) en agua destilada. Las muestras para microscopía electrónica de barrido fueron deshidratadas en alcohol y acetona para el subsiguiente secado en el punto crítico en dióxido de carbono líquido, se pegó con cemento de carbón en salientes de aluminio, se pulverizó con una capa de oro y se examinó con un microscopio electrónico de barrido Philips 501. Las muestras para microscopía electrónica de transmisión fueron teñidas en bloque con acetato de uranilo al 2% (p/vol) en agua destilada y deshidratadas en etanol. Se incrustaron en medio de Epon-Spurr (1:1). Se cortaron secciones ultrafinas de las muestras en las que se demostraron las bacterias, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico (EM) Philips 208S. Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas y de tolerancia como recomiendan Dewhirst et al. (2000) *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2231 - 2237, para la descripción de nuevas especies del género *Helicobacter*. El material aislado se ensayó en relación con oxidasa, catalasa (con peróxido de hidrógeno al 3%) y actividad rápida de ureasa, y para observar la hidrólisis de acetato de indoxilo. Las bacterias fueron también sometidas a tiras de ensayo API Campy (Biomerieux S A, Marcy-l'Etoile, Francia), que incluyen pruebas para la actividad de ureasa, actividad de nitrato reductasa, actividad de esterasa, hidrólisis de hipurato, actividad de gamma-glutamyl transpeptidasa, actividad de fosfatasa alcalina, reducción de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), y actividad de pirrolidonil, L-arginina, y L-aspartato arilamidasa.

La tolerancia a la glicina al 1% (Merck, Darmstadt, Alemania) y NaCl al 1,5% (Merck) fue ensayada en base de agar de sangre tríptico (Oxoid) suplementado con 10% de sangre de caballo, como recomienda el protocolo de Cape Town para *Campylobacteriáceas* y *Helicobacters*. La tolerancia a la bilis de buey fue ensayada cultivando en placa las bacterias en agar de MacConkey sin sal (Oxoid).

La susceptibilidad a metronidazol, ampicilina, claritromicina, tetraciclina, enrofloxacin, lincomicina, tilosina, neomicina, espectinomina y gentamicina fue ensayada por el método de dilución en agar, usando agar de Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado con 10% de sangre de caballo, como ya se ha descrito anteriormente (Van den Bulck et al (2005b) *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2997 - 3000). Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma (St. Louis, Mo., EE.UU.) como polvos estándar con potencias conocidas, excepto para la enrofloxacin, adquirida de Bayer (Bruselas, Bélgica).

Todos los preparados de las pruebas de desarrollo y tolerancia fueron incubados durante 7 días en una atmósfera microaerobia a 37°C.

El crecimiento del organismo fue ensayado en agar BHI con sangre, agar Brucella con sangre (Oxoid) y agar Mueller-Hinton con sangre. El crecimiento a 25, 30, 37 y 42° C se determinó en agar BHI con sangre. Estos medios fueron incubados durante 7 días en una atmósfera microaerobia a 37° C. Además, el crecimiento en agar BHI suplementado con sangre fue ensayado en entorno aerobio, aerobio con 5% de CO₂, microaerobio y anaerobio.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de las proteínas de las células enteras, la cepa JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) fue desarrollada en agar de Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado con 5% (vol/vol) de sangre de caballo, y se incubó a 37° C en una atmósfera microaerobia que contiene aproximadamente 5% de O₂, 3,5% de CO₂, 7,5% de H₂, y 84% de N₂. Se preparó un extracto de proteína de células enteras y se realizó la PAGE con dodecilsulfato sódico como se ha descrito con anterioridad (Pot, et al. (1994) *J Appl Bacteriol* 77, 362 - 369.). Los perfiles de proteína de las células enteras de las cepas de referencia de *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. felis* y de cepas tipo y referencia de especies de *Helicobacter* estaban disponibles por otros estudios previos. Los análisis densitométricos, la normalización y la interpolación de los perfiles de proteína, y los análisis numéricos fueron realizados usando el paquete de software GelCompar version 4.2 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica). La similitud entre todos los pares de trazas fue expresada mediante el coeficiente de correlación momento producto de Pearson y presentada como porcentajes de similitud.

Análisis genotípicos.

El DNA genómico se extrajo usando el equipo DNeasy Tissue kit (Qiagen, Venlo, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El gen rRNA 16S fue amplificado usando cebadores complementarios a los bordes conservados. Se usaron cebadores de consenso alfa-beta-NOT (5'-TCA AAC TAG GAC CGA GTC) [SEC ID NO:3] y omega-MB (5'-TAC CTT GTT ACT TCA CCC CA) [SEC ID NO:4], como se ha descrito ya con anterioridad (Baele et al. (2001) *J Appl Microbiol* 91, 488 - 491). Un amplicón de 1500 pb [SEC ID NO: 5] que codifica una parte de rRNA 16S (Figura 11) fue amplificado y secuenciado usando cebador pD (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3') [SEC ID NO:6], cebador gamma* (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT-3') [SEC ID NO:7], cebador 3 (5'-GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT-3') [SEC ID NO:8] y cebador O* (5'-AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3') [SEC ID NO:9], como se describe en otra parte (Coenye et al.

(1999) *Int J Syst Evol Microbiol* 49, 405 - 413). El análisis de la secuencia se llevó a cabo usando el aparato ABI Prism™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) y las secuencias fueron comparadas con Genbank usando el algoritmo BLAST. El análisis filogenético se realizó usando KODON (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Las homologías de alineamiento por pares fueron calculadas y se construyó un dendrograma usando el método “neighbour-joining” (o método “del vecino más cercano”).

Para la detección del gen de la ureasa, se realizó una PCR con cebadores U430f (5'-ckgawttgatgcaagaagg-3') [SEC ID NO:10] y U1735r (5'-cttcgtgratttaarrccaat-3') [SEC ID NO:11]. Esta PCR tiene por resultado un amplicón de 1224 pb en *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y “*Candidatus H. heilmannii*” (O'Rourke et al. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2203 - 2211). También se aplicó una PCR con cebadores Hh2f y Hh2r que amplifican específicamente una parte del gen de la ureasa de “*Candidatus H. heilmannii*” (O'Rourke et al. (2004) citado anteriormente). El DNA de “*Candidatus H. heilmannii*” sirvió como control positivo, mientras que se incluyó agua altamente purificada como control negativo. Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en gel como se ha descrito con anterioridad (Baele et al. (2004) *J Clin Microbiol* 42, 1115 - 1122.). Adicionalmente, los productos de PCR obtenidos para “*Candidatus H. heilmannii*” y JKM4T (*Helicobacter cynogastricus*) fueron secuenciados usando el equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems) en un aparato ABI Prism™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los electroferogramas fueron exportados y convertidos a Kodon (Applied Maths) y las secuencias fueron comparadas con Genbank usando BLAST.

El análisis de polimorfismo de la longitud intergénica del tRNA (tDNA-PCR) se llevó a cabo con un cebador de consenso T3B (5-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C-3') [SEC ID:12] (marcado con el marcador fluorescente TET) y cebador HT135R (5-ACC AAC TGG GCT AAG CGA CC-3') [SEC ID NO:13], un cebador específico complementario al espaciador intergénico tRNA de la especie *Helicobacter*, como se describió con anterioridad (Baele et al., 2004 citado anteriormente). El DNA extraído de cultivos puros de *H. felis*, *H. salomonis* y *H. bizzozeronii* sirvió como control positivo, mientras que se incluyó agua altamente purificada como control negativo. Los productos de la PCR fueron separados por medio de electroforesis capilar usando el aparato ABI Prism™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica). Las longitudes fueron determinadas por interpolación con una mezcla estándar de tamaño interno de GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) y GeneScan 400-HD ROX (Applied Biosystems), usando GeneMapper (Applied Biosystems). Para determinar la prevalencia de la nueva especie de *Helicobacter* en gatos y perros, se recogieron muestras gástricas de la región del *corpus* de 110 perros (65 machos, 45 hembras, edad comprendida entre 1 día y 18 años) y 43 gatos (25 machos, 18 hembras, edad entre 7 semanas y 18 años), de varias razas, que fueron presentados para autopsia en el Departamento de Patología (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Ghent) entre noviembre de 2001 y septiembre de 2003 con varias patologías. El DNA fue extraído de las muestras felinas y caninas usando el equipo DNeasy tissue kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas muestras de DNA fueron sometidas a análisis de polimorfismo de la longitud intergénica del tRNA.

Estudios fenotípicos.

Los ensayos destacados que distinguen el nuevo material aislado de las otras helicobacterias gástricas caninas se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de JKM4 (*Helicobacter cynogastricus*) y Helicobacterias gástricas relacionadas.

Característica	<i>H. cynogastricus</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. pylori</i>
Longitud de la célula (µm)	10 – 18	5 – 7,5	5 – 10	5 – 7	2,5 – 5
Anchura de la célula (µm)	0,8 – 1,0	0,4	0,3	0,8 – 0,12	0,5 – 1,0
Fibrillas periplásmicas	+	+	-	-	-
Localización de los flagelos	bipolares	bipolares	bipolares	bipolares	polares
Nº de flagelos	6 – 12	14 – 20	10 – 20	10 – 23	4 – 8
Vaina flagelar	+	+	+	+	+
Actividad de catalasa	+	+	+	+	+
Actividad de oxidasa	+	+	+	+	+
Actividad de ureasa	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	-
Hidrólisis de hipurato	-	-	-	-	-
Hidrólisis de acetato de	-	-	+	+	-

indoxilo					
γ-glutamilamino peptidasa	+	+	+	+	+
Reducción de TTC	+	-	+	+	+
Actividad de fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+
Crecimiento a					
25°C	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+
42°C	-	-	+	-	-
Tolerancia a					
1% de bilis de buey	-	-	-	-	-
1,5% de NaCl	-	-	-	-	-
1% de glicina	-	-	-	-	-

- 5 Los estudios ultraestructurales de la cepa JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) revelaron grandes células en espiral que tenían una longitud de 10 a 18 μm y aproximadamente 1 μm de anchura, tres a ocho espirales por célula. Una fibrilla periplásmica estaba presente en cada célula bacteriana, a lo largo del lado exterior de la hélice. Hasta 12 flagelos enfundados fueron detectados en ambos extremos de cada célula y estos flagelos estaban ligeramente descentrados. Los flagelos tenían los extremos romos y el diámetro terminal era más ancho que el diámetro medio del cuerpo flagelar. Se observaron formas cocoides en los cultivos más viejos. Las características ultraestructurales de los organismos fueron examinadas varias veces después de varios subcultivos y fueron las mismas en todos los estudios.
- 10 El material aislado presentó actividad de oxidasa, ureasa y catalasa, y no hidrolizó el acetato de indoxilo. Los organismos fueron capaces de reducir nitratos y TTC, y eran positivos en las pruebas de esterasa, gamma-glutamil transpeptidasa, L-arginina arilamidasa, y fosfatasa alcalina, pero negativos en las pruebas de hidrólisis de hipurato, pirrolidoniil arilamidasa, y L-aspartata arilamidasa. Las bacterias crecieron bien en medios de agar con BHI suplementado con sangre, brucela y Mueller-Hinton.
- 15 Las bacterias fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, como se indica por los bajos valores de MIC, en el intervalo de 0,03 a 0,25 μg/ml. No crecieron en medios que contienen NaCl al 1,5%, 1% de bilis o 1% de glicina. Pudieron crecer a 37° C y a 30° C, pero no a 25°C y 42° C. El crecimiento fue posible en entornos tanto aerobios como microaerobios, aunque atmósferas que contienen niveles normales de oxígeno o solamente un aumento de CO₂ no eran adecuadas para cultivar las bacterias.
- 20 El perfil de proteínas de la célula entera de la cepa JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) difería considerablemente del de las cepas de referencia de otras especies de *Helicobacter* (Figura 9A). Los niveles de correlación hacia los perfiles de proteína de otras cepas de referencia de *Helicobacter* eran todos inferiores a 0,80, lo que indica que la cepa JKM4^T representa una nueva especie de *Helicobacter*. La Figura 9B muestra el resultado del análisis numérico de los perfiles de proteína de la cepa JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) y sus vecinos filogenéticos más próximos.
- Estudios genotípicos.
- 25 La secuenciación del gen rRNA 16S de JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) reveló más del 97% de homología con *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y "*Candidatus H. heilmannii*", mientras que la secuencia difería en más del 3% de la de "*Candidatus H. suis*" (Figura 9B). Un árbol filogenético reveló el agrupamiento del nuevo material aislado dentro de todas estas especies (Figura 10).
- 30 La PCR en el DNA genómico de JKM4^T (*Helicobacter cynogastricus*) usando cebadores U430f (5'-gckgawttgatgcaagaagg-3') [SEC ID NO:14] y U1735r (5'-cttcgtgrattttaarrccaat-3') [SEC ID NO:15] produjo una serie de fragmentos no específicos, y no el fragmento esperado de 1224 pb. La PCR con cebadores específicos para "*Candidatus H. heilmannii*" Hh2f y Hh2r tuvo por resultado la producción de un fragmento de 320 pb, que difería consistentemente los 380 pb esperados producidos a partir del DNA de "*Candidatus H. heilmannii*". El análisis de la secuencia del producto de la PCR reveló a única secuencia, que no coincidió con ninguna secuencia del Genbank.
- 35 El análisis de los productos de la PCR producidos a partir del DNA del nuevo material aislado en el tDNA-PCR reveló consistentemente un amplicón de 136,6 pb, que difería del tDNA-amplicón de *H. felis* (137 bp), *H. bizzozeronii* (136 bp)

y *H. salomonis* (134 bp). Un fragmento del mismo tamaño fue encontrado en 1 gato (2,3%) y en 23 perros (20,9%).

El presente ejemplo demuestra la existencia de una cuarta especie de *Helicobacter* cultivable, capaz de colonizar el estómago canino.

5 El análisis del gen de rRNA 16S reveló un alto grado de homología con las tres especies carnívoras de *Helicobacter* anteriormente aisladas.

10 Recientemente se ha aprobado que el gen de la ureasa es discriminante entre estas especies de *Helicobacter*. La PCR en DNA genómico del material aislado JKM4T (*Helicobacter cynogastricus*) usando cebadores que detectan el gen de la ureasa en *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* solamente produjo fragmentos no específicos. Una PCR específica para "Candidatus *H. heilmannii*" sí que reveló un fragmento de PCR pero con una secuencia diferente de la de "Candidatus *H. heilmannii*".

15 Además, el amplicón de PCR de la nueva especie de la presente invención por tDNA-PCR difiere de los amplicones de otros *Helicobacter*. Estos hallazgos, junto con los resultados del perfil de proteínas, que revelaron un patrón completamente diferente de los patrones de otras especies *Helicobacter*, demuestran que el material aislado JKM4T es una especie de *Helicobacter* nueva y distinta, que los autores de la presente invención denominan *Helicobacter cynogastricus*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University Ghent
Hellemans, Ann
5 Ducatelle, Richard

<120> Vacunas para la inmunización contra Helicobacter

<130> R3735-EP
10

<150> 60/691,394
<151> 16-06-2005

<150> 60/695,995
15 <151> 01-07-2005

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3
20

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial
25

<220>
<223> Cebador para PCR HS 586 para el gen 16S de rRNA de Candidatus Helicobacter suis

<400> 1
30 gggaggacaa gtcaggtgtg aa 22

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
35 <213> artificial

<220>

ES 2 369 713 T3

<223> Cebador para PCR HS641 para el gen 16S de rRNA de Candidatus Helicobacter suis

<400> 2

tctccacac tccagaagga tag 23

5

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial

10

<220>

<223> Cebador de consenso para PCR alfa/beta-NOT del gen 16S de rRNA

<400> 3

15 18 tcaaactagg accgagtc

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

20 <213> artificial

<220>

<223> Cebador de consenso para PCR omega-MB del gen 16S de rRNA

25 <400> 4

tacctgtta cttcacccca 20

<210> 5

<211> 1462

30 <212> DNA

<213> Helicobacter cynogastricus

<400> 5

ES 2 369 713 T3

tagtttgatc ctggctcaga gtgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtogaacg 60
 atgaagccta gcttgctagg tggattagtg gcgcacgggt gagtaacgca tagatgacat 120
 gccctttagt ttgggatagc cactagaaat ggtgattaat accaaatact accctatggg 180
 ggaaagattt atcgctaaag gattggtota tgtcctatca gcttgttggg gaggtaaagg 240
 ctcaccaagg caatgacggg tatccggcct gagaggggtga acggacacac tggaactgag 300
 acacgggtcca gactcctacg ggaggcagca gtaggggaata ttgctcaatg ggcgcaagcc 360
 tgaagcagca acgccgcgtg gaggatgaag gttttagga ttgtaaactt ccttttgtca 420
 gagaagatta atgacggtat ctgacgaata agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc 480
 ggtaatacgg agggtgcaag cgttactcgg aatcactggg cgtaaagagt gcgtaggcgg 540
 ggttgtaagt cagatgtgaa atcctatggc ttaaccatag aactgcattt gaaactacia 600
 ctctggagtg tgggagaggt aggtggaatt cttggtgtag gggtaaaatc cgtagagatc 660
 aagaggaata ctattgcga aggcgacctg ctggaacaat actgacgctg attgcacgaa 720
 agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaac gatggatgct 780
 agttgttggg gggctttgtc ctcccagtaa tgcagctaac gccttaagca tcccgcctgg 840
 ggagtacggg cgcaagatta aaactcaaag gaatagacgg ggaccgcac aagcggtgga 900
 gcatgtggtt taaattcgaa gatacacgaa gaaccttacc taggcttgac attgaaggaa 960

 tttgctagaa atagcgaagt gtctagcttg ctagaccctg aaaacagggtg ctgcacggct 1020
 gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca accctctttc 1080
 ttagttgcta acagatcatg ctgagctctc taagaatact gcctgcgtaa gcaggaggaa 1140
 ggtgaggacg acgtcaagtc atcatggccc ttacgcctag ggetacacac gtgctacaat 1200
 ggggtgcaca aagagatgca atgccgag gctgagccaa tcttaaaaaac gcctctcagt 1260
 tcggattgca ggctgcaact cgctgcctg aagctggaat cgctagtaat cgcaaatcag 1320
 ccatgttgcg gtgaatacgt tcccgggtct tgtactcacc gcccgtcaca ccatgggagt 1380
 tgtgtttgcc ttaagtcagg atgctaaagt agctactgcc cacggcacac acagcgactg 1440
 ggacgaagtc gtaacaaggt aa 1462

<210> 6

5 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

ES 2 369 713 T3

<223> Cebador de secuencia del gen 16s de rRNA de H. cynogastricus

<400> 6

gtattaccgc ggctgctg 18

5

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador de secuencia del gen 16S de rRNA de H. cynogastricus

<400> 7

15 ctctacggg aggcagcagt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de secuencia del gen 16S de rRNA de H. cynogastricus

25 <400> 8

gttgcgctcg ttgcgggact 20

<210> 9

<211> 19

30 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de secuencia del gen 16S de rRNA de H. cynogastricus

35

<400> 9

aactcaaagg aattgacgg 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR de ureasa de Helicobacter

10 <400> 10

ckgawttgat gcaagaagg 19

<210> 11

<211> 22

15 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR de ureasa de Helicobacter

20

<400> 11

cttcgtgrat ttaarrcca at 22

<210> 12

25 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador de polimorfismo de la longitud intergénica del tRNA

<400> 12

aggtcgcggg ttcgaatcc 19

35 <210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de polimorfismo de la longitud intergénica del tRNA

5

<400> 13

accaactggg ctaagcgacc 20

<210> 14

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15

<223> cebador del gen ureasa de Helicobacter

<400> 14

gckgawtga tgcaagaagg 20

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> cebador del gen ureasa de Helicobacter

<400> 15

cttcgtgrat ttaarrcca at 22

30

<210> 16

<211> 1421

<212> DNA

<213> Helicobacter suis

35

<220>

<221> característica miscelánea

ES 2 369 713 T3

<223> gen 16S de rRNA, parcial

<400> 16

tgcaagtcga acgatgaagc ctagcttgct aggttgatta gtggcgcacg ggtgagtaat 60
 gcatagatga catgcccttt agtttggaat agccactaga aatggtgatt aataccaaat 120
 actaccttac gagggaaaga tttatcgcta aaggattggt ctatgtccta tcagcttggt 180
 ggtgaggtaa aggctcacca aggctatgac gggatatccgg cctgagaggg tgagcggaca 240
 cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atattgctca 300
 atgggggaaa ccctgaagca gcaacgccgc gtggaggatg aaggttttag gatcgtaaac 360

5

tccttttggt agagaagata atgacggat ctaacgaata agcaccggct aactccgtgc 420
 cagcagccgc ggtaatacgg aggggtgcaag cgttactcgg aatcactggg cgtaaagagt 480
 gcgtaggcgg gaggacaagt caggtgtgaa atcctatggc ttaacatag aactgcattt 540
 gaaactatcc ttctggagtg tgggagaggt aggtggaatt cttggtgtag gggtaaaatc 600
 cgtagagatc aagaggaata ctattgcga aggcgacctg ctggaacatc actgacgctg 660
 attgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaaac 720
 gatggatgct agttgttggg aggctttgtc tttccagtaa tgcagctaac gccttaagca 780
 tcccgcctgg ggagtacggt cgcaagatta aaactcaaag gaatagacgg ggacccgcac 840
 aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag ttacacgaag aaccttacct aggcttgaca 900
 ttgaaggaat tccctagaaa taggggagtg tctagcttgc tagaccctga aaacaggtgc 960
 tgcacggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgc aagagcgcaa 1020
 ccctttttct tagttgctaa caggttatgc tgcgcactct aagaagactg cctgcgtaag 1080
 caggaggaag gtgaggacga cgtcaagtca tcatggccct tacgcctagg gctacacacg 1140
 tgctacaatg ggggtgcacaa agagatgcaa agccgcgagg cagagctaat ctataaaaca 1200
 cctcctagt cggattgcag gctgcaactc gcctgcatga agctggaatc gctagtaatc 1260
 gcaaatcagc tatgttgccg tgaatacgtt cccgggtctt gtactcaccg cccgtcacac 1320
 catgggagtt gtgtttgcct taagtcagga tgctaaagca gctactgcc acggcacaca 1380
 cagcgactgg ggtgaagtcg taacaaggta acccgggcgg c 1421

REIVINDICACIONES

5 1^a. Una composición que comprende uno o más preparados antigénicos de una o más especies bacterianas, para ser usada en la vacunación contra *Candidatus Helicobacter suis*, en la que dichas una o más especies bacterianas tienen una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos un 93% de identidad secuencial respecto de la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank con el nº de entrada AF 127028, como se representa en la SEC ID NO: 16.

10 2^a. La composición según la reivindicación 1^a, en la que dicha o dichas especies se eligen entre el grupo que consiste en *Helicobacter felis*, *Helicobacter salomonis*, *Helicobacter heilmanii* (tipo II), *Helicobacter cynogastricus*, *Helicobacter pylori* y *Helicobacter bizzozeronii*.

15 3^a. Una vacuna para la inmunización contra *Candidatus Helicobacter suis* que comprende una composición de uno o más preparados antigénicos de una o más especies bacterianas, en la que dichas una o más especies bacterianas tienen una secuencia de rRNA 16S que tiene al menos un 93% de identidad secuencial respecto de la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* depositado en GenBank con el nº de entrada AF 127028, como se representa en la SEC ID NO: 16.

4^a. La vacuna según la reivindicación 3^a, en la que dicha o dichas especies se eligen entre el grupo que consiste en *Helicobacter felis*, *Helicobacter salomonis*, *Helicobacter heilmanii* (tipo II), *Helicobacter cynogastricus*, *Helicobacter pylori* y *Helicobacter bizzozeronii*.

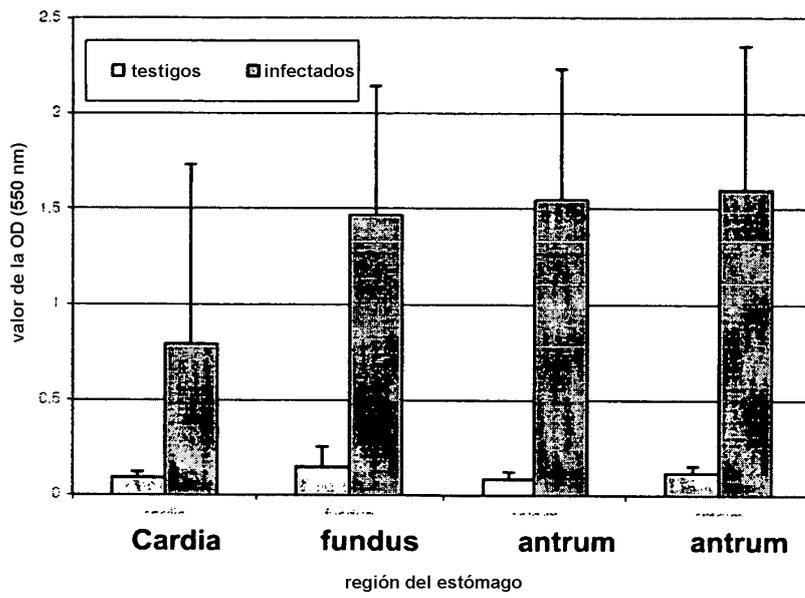


Figura 1

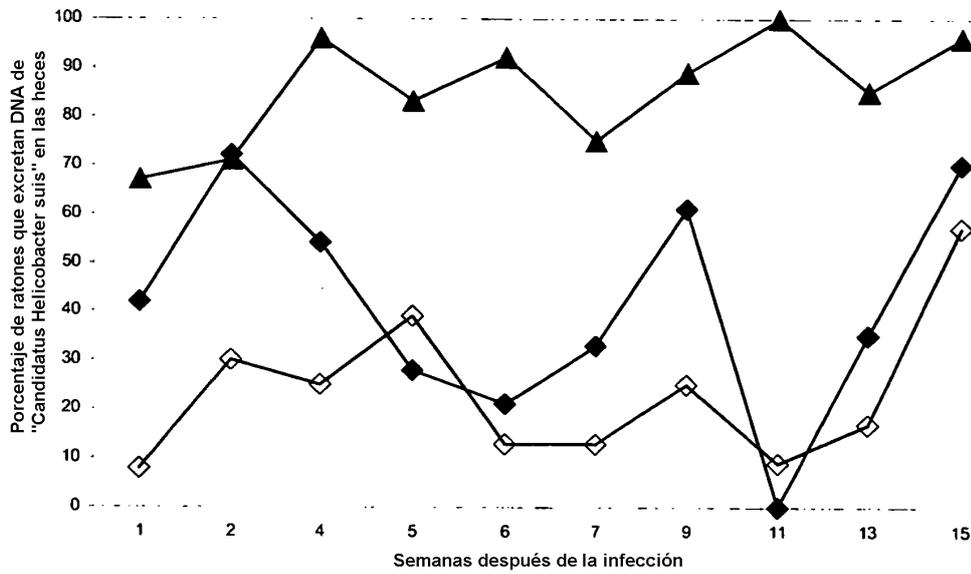


Figura 2

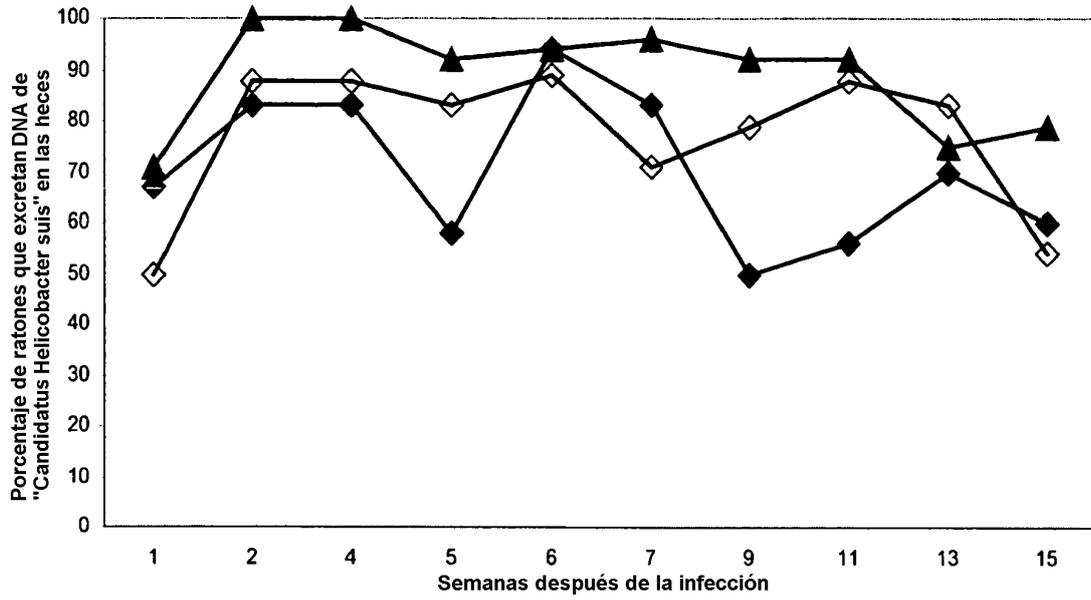


Figura 3

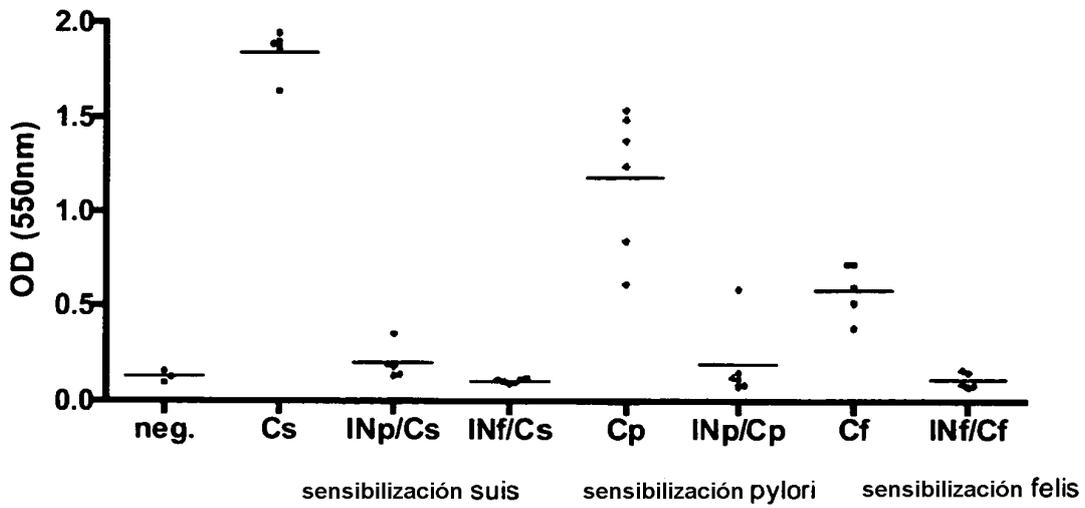


Figura 4

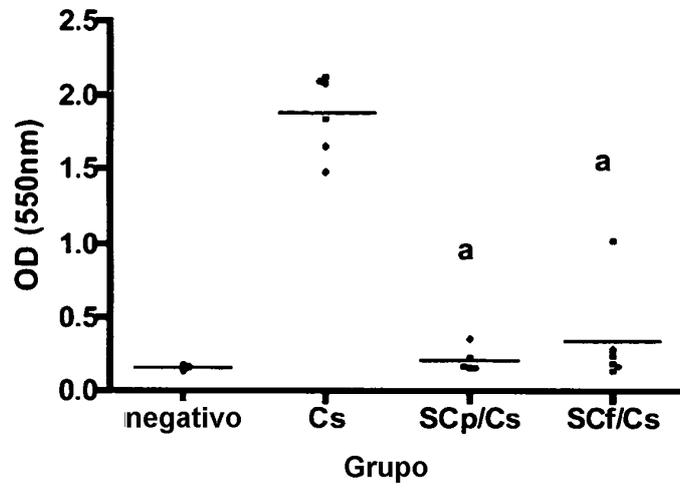


Figura 5

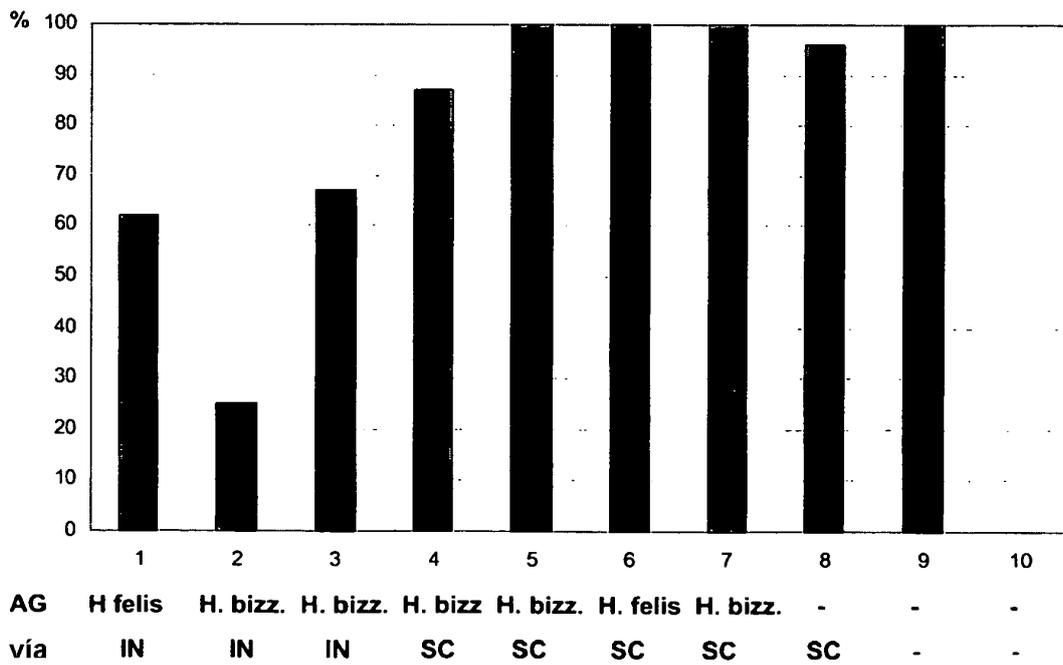


Figura 6

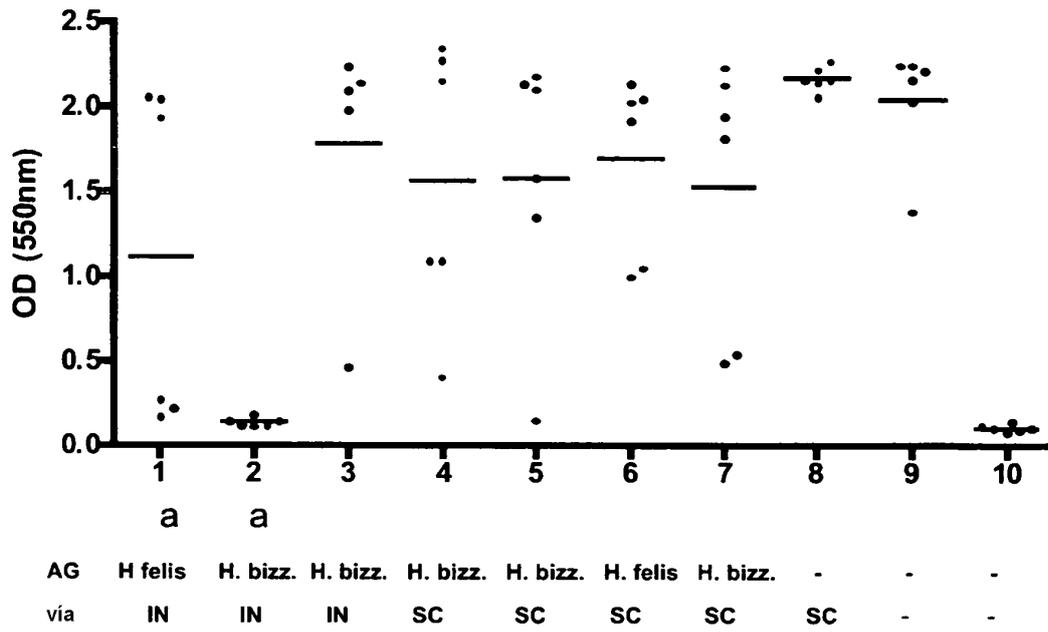


Figura 7

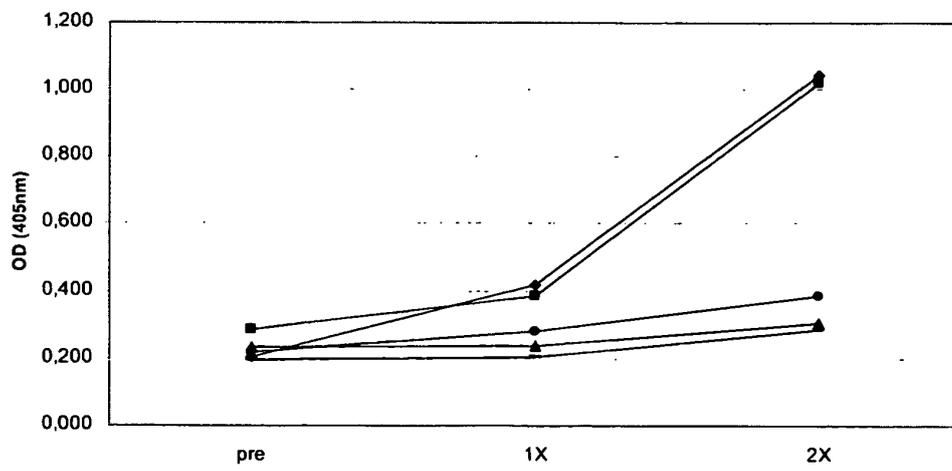


Figura 8A

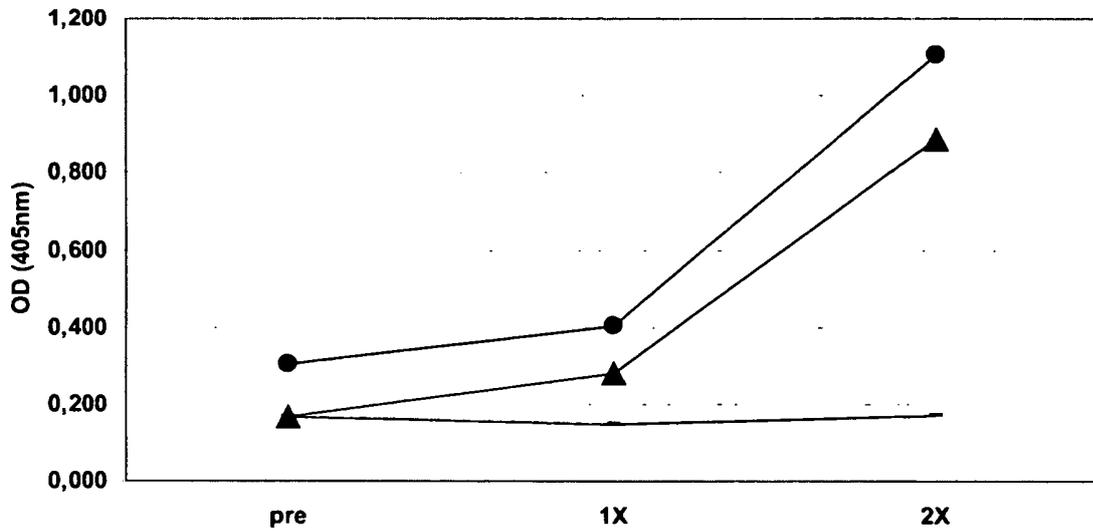


Figura 8B

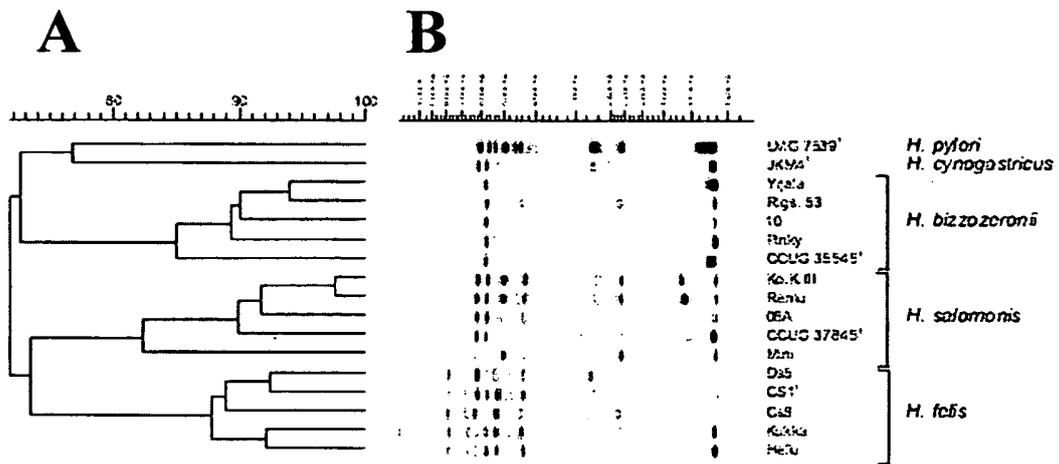


Figura 9a

	<i>H. aurum</i> MIT 97-5075c (AF297868)	<i>H. pennsylvanicus</i> (AF302105)	<i>H. cholecystus</i> Hkb-1 (U46129)	<i>H. pullorum</i> (AJ876518)	<i>H. genovae</i> CCUG 18820 (M88154)	<i>H. oxyspirillum</i> (AF072334)	<i>H. nodatum</i> (U96297)	<i>H. garmani</i> (AY61951)	<i>H. emmelenis</i> NIEP-16143 (AF262037)	<i>Candidatus H. bovis</i> (AF127027)	<i>H. pylori</i> (AF302106)	<i>H. neusestrinae</i> (AF363064)	<i>H. actinocyclus</i> Eaton 90-119-3 (M88148)	<i>H. biczceensis</i> CCUG 35046 (AF302107)
<i>H. aurum</i> MIT 97-5075c (AF297868)	0	3.08	4.03	4.10	5.86	3.86	4.75	4.84	3.48	9.69	6.83	6.69	7.18	8.07
<i>H. pennsylvanicus</i> (AF302105)	3.08	0	1.83	3.03	6.90	3.80	4.24	4.38	2.78	8.15	6.02	5.83	6.52	6.64
<i>H. cholecystus</i> Hkb-1 (U46129)	4.03	1.83	0	3.99	7.37	5.33	4.50	5.30	3.22	8.63	6.89	6.56	7.06	6.73
<i>H. pullorum</i> (AJ876518)	4.10	3.03	3.99	0	5.30	4.12	4.44	4.34	2.23	8.87	5.85	5.76	6.39	6.74
<i>H. fennelliae</i> CCUG 18820 (M88154)	5.84	6.90	7.37	5.30	0	7.06	7.37	6.89	6.90	11.61	9.99	9.89	10.48	10.06
<i>H. neusestrinae</i> (AF363064)	3.86	3.80	5.33	4.12	7.06	0	2.95	3.19	4.01	9.93	6.24	6.55	7.34	8.51
<i>H. nodatum</i> (U96297)	4.75	4.24	4.50	4.44	7.37	2.95	0	2.08	3.25	9.09	6.34	6.69	7.51	7.85
<i>H. garmani</i> (AY61951)	4.84	4.38	5.30	4.34	6.89	3.19	2.08	0	3.96	9.95	6.87	7.14	7.92	7.71
<i>H. canadensis</i> NIEP-16143 (AF262037)	3.48	2.78	3.22	2.23	6.90	4.01	3.25	3.96	0	8.32	5.97	5.92	6.34	6.73
<i>Candidatus H. bovis</i> (AF127027)	9.69	8.15	8.63	8.87	11.61	9.93	9.09	9.95	8.32	0	10.72	10.64	11.21	10.89
<i>H. pylori</i> (AF302106)	6.83	6.02	6.89	5.85	9.99	6.24	6.34	6.87	5.97	10.72	0	0.49	2.54	5.26
<i>H. neusestrinae</i> (AF363064)	6.69	5.83	6.56	5.76	9.89	6.55	6.69	7.14	5.92	10.64	0.49	0	2.19	5.36
<i>H. actinocyclus</i> Eaton 90-119-3 (M88148)	7.18	6.52	7.06	6.39	10.48	7.34	7.51	7.92	6.34	11.21	2.54	2.19	0	4.92
<i>H. biczceensis</i> CCUG 35046 (AF302107)	8.07	6.64	6.73	6.74	10.05	8.51	7.85	7.71	6.73	10.89	5.26	5.36	4.92	0
<i>Candidatus H. hiltunianii</i> BC1 (AF506772)	8.50	7.42	7.36	7.01	10.10	8.81	8.38	7.99	7.05	11.26	5.36	5.32	4.51	1.90
<i>H. felis</i> ATCC 49179 (M57398)	7.96	6.80	6.85	6.60	9.98	8.89	8.07	7.77	6.73	10.00	4.73	4.76	4.19	1.19
<i>H. schomai</i> Imken (U89351)	8.36	6.74	6.78	6.79	10.25	8.88	8.29	8.14	7.26	11.07	4.96	4.89	4.38	1.11
<i>H. cynogastri</i> JKN14 HDQ004689)	8.57	7.35	7.22	7.00	10.12	9.03	8.68	8.54	7.56	11.59	5.35	5.28	4.60	1.62
<i>Candidatus H. suis</i> (AF127028)	9.11	7.95	8.72	7.56	10.33	8.60	8.49	7.77	7.55	11.27	6.06	6.16	6.38	3.55
<i>H. rogentum</i> (AY686609)	3.95	3.80	4.40	3.86	5.68	4.53	4.60	4.79	4.39	9.00	7.50	7.62	7.74	7.66
<i>H. typhlorum</i> (AF061104)	4.25	4.83	4.54	4.91	6.84	6.16	5.50	6.78	4.09	9.63	8.07	7.81	8.33	7.98
<i>H. naidatum</i> (M80206.2)	3.95	4.16	3.87	5.05	6.64	5.82	5.27	5.88	3.52	9.17	7.33	7.61	7.89	7.56
<i>H. mustelae</i> (M55310)	5.58	3.38	4.36	6.17	13.67	5.47	3.60	7.60	3.92	7.62	7.89	7.60	7.31	7.58
<i>H. hepatica</i> (U07575)	16.62	16.83	17.05	17.68	19.21	18.18	17.48	18.16	15.77	20.90	19.51	19.37	19.88	19.85
<i>H. canis</i> (L13464)	4.45	3.82	3.68	4.43	6.92	5.39	4.70	5.83	3.43	9.27	6.72	6.71	7.48	7.67
<i>H. rinaedi</i> (AF497810)	4.53	3.79	3.74	5.02	7.20	5.30	4.46	5.45	3.40	8.99	7.70	7.44	8.01	8.09
<i>H. bilis</i> (U18766)	4.19	3.35	3.29	4.48	6.73	5.04	4.14	5.22	3.34	8.71	7.08	6.76	7.86	8.01
<i>Wohlfeldia succinogenes</i> (M88159)	7.40	6.95	7.19	7.81	9.81	8.93	7.66	9.28	7.63	12.48	10.62	10.36	10.79	11.06

Figura 9b

	<i>Candidatus H. heilmannii</i> BC1 (AF306772)	<i>H. felis</i> ATCC 49179 (M57398)	<i>H. salomonis</i> Iukina (U89351)	<i>H. cynogastricus</i> JK14 (DQ004689)	<i>Candidatus H. suis</i> (AF127028)	<i>H. trogonum</i> (AY686608)	<i>H. typhimius</i> (AF061104)	<i>H. auriferum</i> (M80205.2)	<i>H. nasidae</i> (M55310)	<i>H. hepaticus</i> (U07575)	<i>H. canis</i> (U13464)	<i>H. cinardi</i> (AF497810)	<i>H. bilis</i> (U18766)	<i>Wolffella succinogenes</i> 2954 (M88150)
<i>H. zueai</i> MIT 97-5075c (AF297368)	8.50	7.96	8.36	8.57	9.11	3.95	4.25	3.95	5.58	16.62	4.45	4.53	4.19	7.40
<i>H. panemensis</i> (AF302105)	7.42	6.80	6.74	7.35	7.95	3.80	4.83	4.16	3.38	16.83	3.82	3.79	3.35	6.95
<i>H. cholecystus</i> Hkb-1 (U46129)	7.36	6.85	6.78	7.22	8.72	4.40	4.54	3.87	4.36	17.06	3.68	3.74	3.29	7.19
<i>H. fulvorum</i> (AJ876518)	7.01	6.60	6.79	7.00	7.56	3.86	4.91	5.05	6.17	17.68	4.43	5.02	4.48	7.82
<i>H. fennelliae</i> CCUG 18820 (M88154)	10.10	9.98	10.25	10.12	10.33	5.68	6.84	6.64	13.67	19.21	6.92	7.20	6.73	9.81
<i>H. mexicanorum</i> (AF072334)	8.81	8.89	8.88	9.01	8.60	4.53	6.16	5.82	5.47	18.18	5.39	5.30	5.04	8.93
<i>H. rodentium</i> (U96297)	8.78	8.07	8.29	8.68	8.49	4.60	5.50	5.27	3.60	17.48	4.70	4.46	4.14	7.66
<i>H. gononzi</i> (AY631951)	7.99	7.77	8.14	8.54	7.77	4.79	6.78	5.88	7.60	18.16	5.83	5.45	5.22	9.28
<i>H. canadensis</i> NLEP-16143 (AF262037)	7.05	6.73	7.26	7.56	7.55	4.39	4.00	3.52	3.92	15.77	3.43	3.40	3.34	7.63
<i>Candidatus H. bovis</i> (AF127027)	11.26	11.00	11.07	11.59	11.27	9.00	9.63	9.17	7.62	20.90	9.27	8.99	8.71	12.48
<i>H. pylori</i> (AF302106)	5.36	4.73	4.96	5.35	6.06	7.50	8.07	7.33	7.89	19.51	6.72	7.70	7.08	10.62
<i>H. nenezstrinae</i> (AF363064)	5.32	4.76	4.89	5.28	6.16	7.62	7.81	7.61	7.60	19.37	6.71	7.44	6.76	10.36
<i>H. cecimonyliis</i> Eaton 90-119.3 (M88148)	4.51	4.19	4.38	4.60	6.38	7.74	8.33	7.89	7.31	19.88	7.48	8.01	7.86	10.79
<i>H. bizzogeronii</i> CCUG 35046 (AF302107)	1.90	1.19	1.11	1.62	3.55	7.66	7.98	7.56	7.58	19.85	7.67	8.09	8.01	11.06
<i>Candidatus H. heilmannii</i> BC1 (AF506772)	0	1.38	1.42	1.59	3.74	8.16	8.65	8.25	9.08	20.68	8.00	8.57	8.45	11.60
<i>H. felis</i> ATCC 49179 (M57398)	1.38	0	0.75	1.04	4.22	7.57	8.24	7.93	8.78	20.19	7.65	8.37	8.06	11.37
<i>H. salomonis</i> Iukina (U89351)	1.42	0.75	0	0.68	3.92	7.89	8.50	8.26	8.49	20.30	7.71	8.60	8.29	11.73
<i>H. cynogastricus</i> JK14 (DQ004689)	1.59	1.04	0.68	0	4.23	8.03	8.76	8.47	9.32	20.62	7.71	8.98	8.51	11.92
<i>Candidatus H. suis</i> (AF127028)	3.74	4.22	3.92	4.23	0	8.67	8.83	8.81	9.00	20.69	8.40	8.50	8.65	12.40
<i>H. trogonum</i> (AY686609)	8.16	7.57	7.89	8.03	8.67	0	3.84	3.77	3.38	16.53	3.77	3.84	3.60	7.16
<i>H. typhimius</i> (AF061104)	8.65	8.34	8.50	8.76	8.83	3.84	0	2.54	3.85	17.17	2.71	2.94	6.60	7.77
<i>H. auriferum</i> (M80205.2)	8.25	7.93	8.26	8.47	8.80	3.77	2.54	0	3.38	15.73	3.54	3.69	3.37	7.37
<i>H. nasidae</i> (M55310)	9.08	8.78	8.49	9.32	9.00	3.38	3.85	3.38	0	3.47	3.52	2.84	2.79	5.26
<i>H. hepaticus</i> (U07575)	20.63	20.19	20.30	20.63	20.69	16.53	17.17	15.73	3.47	0	16.05	15.57	15.43	21.08
<i>H. canis</i> (U13464)	8.00	7.65	7.71	7.71	8.40	3.77	2.71	3.54	3.52	16.06	0	1.93	1.33	7.76
<i>H. cinardi</i> (AF497810)	8.57	8.37	8.60	8.98	8.50	3.84	2.94	3.69	2.84	15.57	1.93	0	1.01	7.51
<i>H. bilis</i> (U18766)	8.45	8.06	8.29	8.51	8.65	3.60	6.69	3.37	2.79	15.43	1.33	1.01	0	7.41
<i>Wolffella succinogenes</i> (M88150)	11.60	11.37	11.73	11.92	12.40	7.16	7.77	7.37	5.23	21.08	7.76	7.51	7.41	0

Figura 9b (continuación)

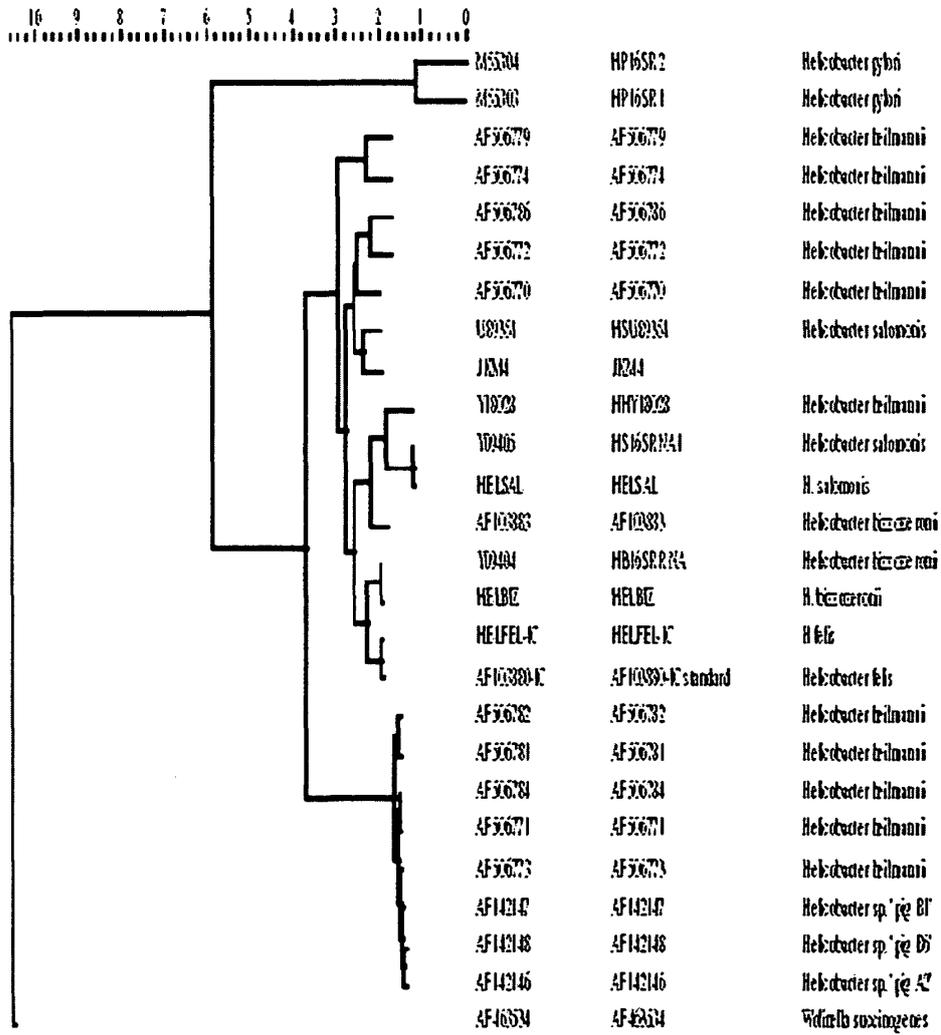


Figura 10

ES 2 369 713 T3

tagtttgatc ctggctcaga gtgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgaacg	60
atgaagccta gcttgetagg tggattagtg gcgcacgggt gagtaacgca tagatgacat	120
gccctttagt ttgggatagc cactagaaat ggtgattaat accaaatact accctatggg	180
gaaagattt atcgctaaag gattggtcta tgtcctatca gcttgttggt gaggtaaagg	240
ctcaccaagg caatgacggg tatccggcct gagagggtga acggacacac tggaaactgag	300
acacggteca gactcctacg ggaggcagca gtagggaata ttgctcaatg ggcgcaagcc	360
tgaagcagca acgccgcgtg gaggatgaag gttttagga ttgtaaactt ccttttgca	420
gagaagatta atgacggtat ctgacgaata agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc	480
ggtaatacgg agggtgcaag cgttactcgg aatcactggg cgtaaagagt gcgtaggcgg	540
ggttgtaagt cagatgtgaa atcctatggc ttaaccatag aactgcattt gaaactacaa	600
ctctggagtg tgggagaggt aggtggaatt cttggtgtag gggtaaaatc cgtagagatc	660
aagaggaata ctcattgcga agggcacctg ctggaacaat actgacgctg attgcacgaa	720
agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaaac gatggatgct	780
agttgtggg gggctttgtc ctcccagtaa tgcagctaac gccttaagca tcccgcctgg	840
ggagtacggt cgcaagatta aaactcaaag gaatagacgg ggaccgcac aagcggtgga	900
gcatgtggtt taaattcgaa gatacacgaa gaaccttacc taggcttgac attgaaggaa	960
tttgetagaa atagcgaagt gtctagcttg ctagaccctg aaaacagggtg ctgcacggt	1020
gtcgtcagct cgtgtcgtga gatggtgggt taagtcccgc aacgagcgca accctcttc	1080
ttagttgcta acagatcatg ctgagctctc taagaatact gcctgcgtaa gcaggaggaa	1140
ggtgaggacg acgtcaagtc atcatggccc ttacgcctag ggctacacac gtgctacaat	1200
ggggtgcaca aagagatgca atgccgcgag gctgagccaa tcttaaaaac gcctctcagt	1260
tcgattgca ggctgcaact cgctgcatg aagctggaat cgctagtaat cgcaaatcag	1320
ccatgttgcg gtgaatacgt tcccgggtct tgtactcacc gcccgtcaca ccatgggagt	1380
tgtgtttgcc ttaagtcagg atgctaaagt agctactgcc cacggcacac acagcgactg	1440
ggacgaagtc gtaacaaggt aa	1462

[SEQ ID NO:5]

Figura 11