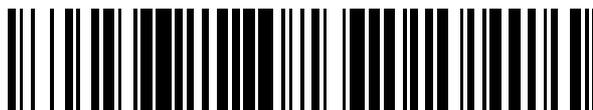


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 719**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10176013 .0**
96 Fecha de presentación: **09.09.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2298798**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2011**

54 Título: **Identificación y caracterización de una nueva adhesina fimbrial de E. coli patógena aviar (APEC)**

30 Prioridad:
10.09.2009 US 241069 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**Freie Universität Berlin
Kaiserwerther Strasse 16-18
14195 Berlin, DE y
Lohmann Tierzucht GmbH**

72 Inventor/es:
**Antao, Esther-Maria;
Ganwu, Li;
Wieler, Lothar;
Preisinger, Rudolf y
Ewers, Christa**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

ES 2 387 719 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

Identificación y caracterización de una nueva adhesina fimbrial de *E. coli* patógena aviar (APEC)

5 **[0001]** La investigación sobre *E. coli* patógena aviar (APEC) ha aumentado en gran medida a lo largo de los años, en la que se ha sabido que el patógeno provoca enfermedad entre pollos y otras aves que habitualmente da como resultado grandes pérdidas económicas para la industria de las aves de corral. Las APEC se asocian principalmente con infección de tejidos extraintestinales en pollos, pavos, patos y otras especies aviares. El síndrome de enfermedad más importante asociado con APEC comienza como una infección del tracto respiratorio y puede denominarse aerosaculitis o la enfermedad de los sacos aéreos (Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999) Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). Vet Res 30: 299-316.). Esto da como resultado inevitablemente infección sistémica grave que conduce a muerte del animal infectado. Estos patógenos han obtenido recientemente aún más importancia, clasificándose ahora en la categoría de *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), un grupo que incluye tanto patógenos humanos como la *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* meningítica del neonato (NMEC) como patógenos animales, que a su vez sugiere la posibilidad de que las APEC tengan potencial zoonótico (Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, *et al.* (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? Int J Med Microbiol 297: 163-176.).

20 **[0002]** La patogenicidad microbiana es un fenómeno complejo que abarca diversos mecanismos. Existen, sin embargo, varias estrategias comunes que los organismos patógenos usan para mantenerse y superar barreras de hospedador, siendo una de ellas la adhesión firme del microorganismo a células hospedadoras. La colonización es crucial para patogénesis de bacterias, siendo la etapa más temprana durante la aparición de la enfermedad y la capacidad para adherirse a superficies del hospedador es con diferencia la etapa más vital en la colonización exitosa por patógenos microbianos. Se dice que la presencia de adhesinas es esencial para las primeras etapas de patogenicidad bacteriana. Se dice que una familia definida de adhesinas denominada los pili adhesivos o fimbrias, codificadas por grupos de genes de adhesina y ensambladas por la ruta de chaperona-usher es ubicua en organismos Gram negativos. Algunas de las fimbrias bien conocidas presentes entre cepas de ExPEC son fimbrias de Tipo I (fim), fimbrias de tipo P o el pilus asociado con pielonefritis (pap), fibras de curli (csg), fimbrias S o las fimbrias específicas de ácido siálico (sfa), fimbrias F1C (foc), adhesina afimbrial/adhesina específica de antígeno Dr (afa/dra), aglutinina resistente al calor (hra) y otras (véase Ewers *et al.*). Cada una de estas adhesinas reconoce un receptor específico aunque como grupo comparten organización genómica común, ensamblaje e incluso rasgos estructurales cuaternarios.

35 **[0003]** El papel de alguna de estas adhesinas durante la infección por APEC está bien reconocido. Se ha indicado que la colonización bacteriana del tracto respiratorio está mediada por adhesinas fimbriales, y algunos estudios han mostrado que las fimbrias de tipo 1 y P se expresan *in vivo* por bacterias que colonizan el pulmón, los sacos aéreos y órganos internos de pollos durante la infección. También se descubrió que la adhesión bacteriana a células epiteliales faringéas de pollos se inhibía por la presencia de D-manosa, lo que demuestra el papel de fimbrias de tipo 1 durante las etapas tempranas de la enfermedad. No se vio expresión de fimbrias P en la tráquea de pollos, lo que sugiere que pueden ser importantes solamente en etapas posteriores de la infección. En otro estudio, se vio que el 99% de *E. coli* aisladas de aves enfermas poseía el gen csgA responsable de biosíntesis de curli (véase Dho-Moulin *et al.*).

45 **[0004]** Aunque hay un conocimiento aumentado sobre adhesinas fimbriales y otros factores de colonización incluyendo el papel que pueden desempeñar durante la infección, aún se requiere investigación adicional para dilucidar completamente la función de cada adhesina y su papel específico en la patogénesis. Además, la disponibilidad de secuencias genómicas completas para algunos patógenos ExPEC como UPEC cepa UT189 (O18:K1:H7) y APEC cepa APEC_O1 (O1:K1:H7) ha atraído la atención de los inventores hacia el gran aumento del número de genes con función desconocida, posiblemente implicados en adhesión y colonización y cuya contribución a la virulencia en total es en la actualidad simplemente hipotética (Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamale P, Johnson SJ, *et al.* (2007) The genome sequence of avian pathogenic Escherichia coli strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. J Bacteriol 189: 3228-3236.). La determinación de la función de estos nuevos genes conducirá a una comprensión más profunda de las interacciones de patógeno y hospedador durante las etapas iniciales de infección por APEC.

55 **[0005]** Previamente el laboratorio de los inventores aplicó mutagénesis marcada con Signature (STM) a APEC en un modelo de infección sistémica de pollos que condujo a la identificación exitosa de genes cruciales para infección sistémica en pollos, sin embargo no se identificaron adhesinas (Li G, Laturnus C, Ewers C, WIELER LH (2005) Identification of genes required for avian Escherichia coli septicemia by signature-tagged mutagenesis. Infect Immun 73: 2818-2827.).

60 **[0006]** Es un aspecto de la presente invención identificar nuevas estructuras que desempeñen un papel durante la infección de vertebrados con ExPEC y el uso de las mismas en tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades infecciosas.

65 **[0007]** La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado para su uso en tratamiento o diagnóstico de

enfermedades infecciosas, estando asociadas las enfermedades infecciosas con infección de un vertebrado con bacterias APEC patógenas extraintestinales en las que el ácido nucleico comprende o consiste en:

- 5 - la secuencia de ácido nucleico del gen *yqi* con SEC ID N°: 1 o el complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1 o un complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o con su complemento inverso.

10 **[0008]** En una realización preferida, se proporciona un ácido nucleico comprendiendo o consistiendo el ácido nucleico en:

- la secuencia de ácido nucleico del grupo del gen *yqi* con SEC ID N°: 2 o el complemento inverso de la misma;
- 15 - una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 2 o un complemento inverso de la misma; o
- una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 2 o con su complemento inverso.

20 **[0009]** La presente invención también se refiere a un péptido aislado para su uso en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades infecciosas en el que la enfermedad infecciosa se asocia con infección de un vertebrado con bacterias APEC patógenas extraintestinales, en los que la enfermedad infecciosa se asocia con infección de un vertebrado con bacterias ADEC patógenas extraintestinales en las que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de una de las reivindicaciones 1 a 3, preferiblemente por la secuencia de ácido nucleico del gen *yqi* con SEC ID N°: 1 o por una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1.

30 **[0010]** Sorprendentemente, una exploración de mutagénesis marcada con identificación (STM) en APEC en un modelo de infección sistémica de pollos condujo a la identificación exitosa de que el gen de adhesina *yqi* es crucial para la infección sistémica en pollos y desempeña un papel crucial en el inicio de dicha infección por APEC. La delección del gen de adhesina *yqi* en APEC da como resultado una reducción significativa de la colonización de células *in vitro* y del pulmón de pollo *in vivo*. Inesperadamente se descubrió que la prevalencia del gen *yqi* con la SEC ID N°: 1 entre una gran colección de cepas de *E. coli* reveló una incidencia particularmente alta de este gen en cepas de ExPEC como por ejemplo, APEC, UPEC, NMEC y *E. coli* asociada con septicemia (SePEC), mientras que este gen se descubrió solamente de forma poco frecuente entre cepas de *E. coli* no patógenas y se descubrió que estaba completamente ausente entre cepas de *E. coli* patógenas intestinales.

35 **[0011]** Por lo tanto, parece que un ácido nucleico que comprende el gen de adhesina *yqi* y/o un polipéptido codificado por dicho gen y/o un anticuerpo que se une específicamente a dicho polipéptido puede usarse en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades infecciosas, en particular de una enfermedad infecciosa asociada con infección de un vertebrado con bacterias ExPEC, por ejemplo con bacterias de cepas de APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC.

45 **[0012]** El ácido nucleico de la invención está aislado. Un ácido nucleico "aislado" es uno que está sustancialmente separado de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (por ejemplo, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está sin algunas o ninguna de las secuencias, que flanquean de forma natural el ácido nucleico en su replicón de origen natural, es decir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. En diversas realizaciones, el ácido nucleico aislado de la invención puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula bacteriana de la que deriva el ácido nucleico. Un ácido nucleico también se considera aislado si se ha alterado por intervención humana, o se ha situado en un locus o localización que no es su sitio natural, o si se introduce en una célula por ejemplo por transfección o transformación. Además, un ácido nucleico "aislado", tal como una molécula de ADNc, puede estar sin parte del otro material celular con el que se asocia de forma natural, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza de forma química. Específicamente se excluyen de la definición de "ácido nucleico aislado": cromosomas de origen natural (tales como extensiones de cromosomas), bibliotecas genómicas, y ADN genómico celular completo o preparaciones de ARN celular completo de fuentes de origen natural (incluyendo preparaciones de células completas que se cortan de forma mecánica o se digieren de forma enzimática). Pueden proporcionarse ácidos nucleicos y/o polipéptidos de la presente invención en forma aislada, es decir purificados de su ambiente natural, preferiblemente en forma sustancialmente pura u homogénea o sin o sustancialmente sin ácidos nucleicos o genes de la especie de origen distintos de la secuencia deseada.

65 **[0013]** El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede incluir ADN, ARN, mezclas y/o sustituyentes funcionales de los mismos, particularmente ADNc, ADN genómico y ARNm y puede ser completa o parcialmente

sintético. Los ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias polinucleotídicas monocatenarias o completa o parcialmente bicatenarias. La expresión "ácido nucleico aislado" abarca todas estas posibilidades. Para el fin de la presente invención, cuando se especifica una secuencia de ADN, por ejemplo con referencia a una SEC ID N° particular, a no ser que el contexto requiera otra cosa, se abarca el equivalente de ARN, con T sustituido con U cuando aparezca. El ácido nucleico de la invención puede producirse por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, PCR, RT-PCR y/o transcripción *in vitro* o *in vivo*.

[0014] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de:

- la secuencia de ácido nucleico del gen de adhesina *yqi* con SEC ID N°: 1 o el complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico con al menos 95%, preferiblemente al menos 99%, de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1 o un complemento inverso de la misma, en la que la identidad de secuencia se determina sobre un segmento de secuencia de la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 de al menos 18 bases consecutivas, preferiblemente sobre un segmento de secuencia de al menos 20 bases consecutivas, más preferiblemente sobre un segmento de secuencia de al menos 50 bases consecutivas, incluso más preferiblemente sobre un segmento de secuencia de al menos 250 bases, más preferiblemente sobre la secuencia completa de SEC ID N°: 1;

iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o con su complemento inverso.

[0015] Se entiende que la identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico significa la identidad de las secuencias respectivas sobre una longitud de secuencia dada en cada caso, que se calcula por comparación con la ayuda del algoritmo de programa GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Estados Unidos), estableciendo los siguientes parámetros:

Peso de Hueco: 12
 Peso de Longitud: 4
 Coincidencia de Media 10: 2,912
 Emparejamiento Erróneo Medio: -2,003

[0016] Por ejemplo, se entiende que una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia SEC ID N°: 1 basándose en ácido nucleico significa una secuencia que, tras comparación con la secuencia SEC ID N°: 1 por el algoritmo del programa anterior con el anterior conjunto de parámetros, tiene al menos 95% de identidad.

[0017] El ácido nucleico aislado de la invención puede comprender o consistir en al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o con su complemento inverso. La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" debe entenderse en sentido amplio y significa condiciones de hibridación rigurosas como se describen por ejemplo en Sambrook J. *et al.* en *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en *Current Protocols in Molecular Biology*, John 10 Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

[0018] Por ejemplo, las condiciones durante la etapa o las etapas de lavado pueden seleccionarse de la serie de condiciones limitada por las de un nivel de rigurosidad más bajo (con aproximadamente 2*SSC a 50 °C) y de un nivel de rigurosidad alto (con aproximadamente 0,2*SSC a 50 °C, preferiblemente a 65 °C) (20*SSC: citrato sódico 0,3 M, NaCl 3 M, pH 7,0). Además, la temperatura durante la etapa de lavado puede elevarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones más rigurosas a aproximadamente 65 °C. Ambos parámetros, la concentración salina y la temperatura, pueden variarse simultáneamente, y también es posible mantener constante uno de los dos parámetros y variar solamente el otro. También es posible emplear agentes desnaturizantes tales como, por ejemplo, formamida o SDS durante la hibridación. La hibridación en presencia de formamida 50% se lleva a cabo preferentemente a 42 °C. Se proporcionan a continuación algunas condiciones ejemplares para etapas de hibridación y lavado:

(1) Condiciones de hibridación con por ejemplo

- a) 4*SSC a 65 °C,
- b) 6*SSC, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturizado 100 µg/ml a 65 °C,
- c) 4*SSC, formamida 50%, a 42 °C,
- d) 2* ó 4*SSC a 50 °C,
- e) 2* ó 4*SSC, formamida de 30 a 40% a 42 °C,
- f) 6*SSC a 45 °C, o
- g) tampón de fosfato sódico 0,05 M pH 7,0, EDTA 2 mM, BSA 1% y SDS 7%.

(2) Etapas de lavado con por ejemplo

- a) 0,1*SSC a 65 °C,
- b) 0,1*SSC, SDS 0,5% a 68 °C,
- c) 0,1*SSC, SDS 0,5%, formamida 50% a 42 °C,
- d) 0,2*SSC SDS 0,1% a 42 °C,
- e) 2*SSC a 65 °C, o
- f) tampón de fosfato sódico 40 mM pH 7,0, SDS 1%, EDTA 2 mM.

[0019] Las condiciones que se aplican durante una reacción de PCR y que permiten la hibridación específica de un cebador de PCR con su secuencia diana también están abarcadas por la expresión “condiciones de hibridación específicas”.

[0020] En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención es un ácido nucleico, comprendiendo o consistiendo el ácido nucleico en:

- la secuencia de ácido nucleico del grupo de gen *yqi* con SEC ID N°: 2 o el complemento inverso del mismo;
- una secuencia de ácido nucleico con al menos 95%, preferiblemente al menos 99%, de identidad de secuencia con SEC ID N°: 2 o un complemento inverso de la misma; o
- una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 2 o con su complemento inverso.

[0021] El ácido nucleico de la invención puede comprender o consistir en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEC ID N°: 1, 2, 4 a 15 o un complemento inverso de la misma.

[0022] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un péptido aislado, en el que el polipéptido de la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la invención, preferiblemente el polipéptido de la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o por una secuencia de ácido nucleico con al menos 95%, preferiblemente con al menos 99%, de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1.

[0023] En una realización preferida particular el polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 3.

[0024] El término “polipéptido” como se usa en el presente documento es un término reconocido en la técnica que se refiere a una estructura química que comprende o consiste en un polímero de aminoácidos, en el que al menos una fracción de los aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos. El término “polipéptido” como se usa en el presente documento se refiere a péptidos con una secuencia de aminoácidos de al menos 8 aminoácidos y también abarca proteínas completas. El polipéptido de la invención puede consistir solamente en aminoácidos proteinérgicos, sin embargo, el polipéptido de la invención también abarca polipéptidos que comprenden o consisten en aminoácidos que no son de origen natural en proteínas.

[0025] La presente invención también se refiere a un anticuerpo específico para un polipéptido de la invención, preferiblemente específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3. Para el fin de la presente invención, el término “anticuerpo” no se limita a un anticuerpo con la arquitectura de cadena pesada y ligera clásica. Los términos “anticuerpo” o “anticuerpos” como se usan en el presente documento son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen específicamente a antígenos dados, es decir a un polipéptido de la invención.

[0026] Como se usa en el presente documento las expresiones “se une específicamente” o “específico para” en referencia a un anticuerpo como un ácido nucleico, un aptámero o cualquier otra clase de agente de unión específico significa que la molécula se une a su diana con mayor afinidad que a un epítipo estructuralmente diferente.

[0027] Se pretende que “anticuerpos” dentro del alcance de la presente invención incluyan anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, biespecíficos, humanos y humanizados así como fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de anticuerpos incluyen cadenas pesadas y ligeras separadas, Fab, Fab/c, Fv, scFv, diacuerpos, fragmentos Fab’ y F(ab’)2, incluyendo fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos mencionados anteriormente.

[0028] El ácido nucleico, el polipéptido y/o el anticuerpo de la invención son adecuados para su uso en tratamiento o diagnóstico de enfermedades infecciosas. Tales enfermedades infecciosas comprenden enfermedades que están asociadas o provocadas por infección de un vertebrado con bacterias *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), en particular con bacterias de cepas de APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC. Preferiblemente se tratan y/o diagnostican vertebrados aviares y/o mamíferos.

5 [0029] El ácido nucleico, el polipéptido y/o el anticuerpo de la invención pueden usarse en tratamiento de tales enfermedades infecciosas. Como se usa en el presente documento, el término “tratar” se refiere a revertir, aliviar o inhibir el progreso de una enfermedad, trastorno o afección, o uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, al que se aplica dicho término. Como se usa en el presente documento, “tratar” también puede referirse a
 10 reducir la probabilidad o incidencia de la aparición de una enfermedad, trastorno o afección en un mamífero en comparación con una población de control no tratada, o en comparación con el mismo mamífero antes del tratamiento. Por ejemplo, como se usa en el presente documento “tratar” puede referirse a prevenir una enfermedad, trastorno o afección y puede incluir retardar o prevenir la aparición de una enfermedad, trastorno o afección, o retardar o prevenir los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección. Como se usa en el presente
 15 documento, “tratar” también puede referirse a reducir la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección o síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o afección antes del padecimiento de la enfermedad, trastorno o afección por un mamífero. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección antes de su padecimiento se refiere a administración de la composición de la presente invención, como se describe en el presente documento, a un sujeto que no está en el momento de la administración aquejado de la enfermedad, trastorno o afección. Como se usa en el presente documento “tratar” también puede referirse a prevenir la
 20 recurrencia de una enfermedad, trastorno o afección o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o afección. Los términos “tratamiento” y “terapéuticamente”, como se usan en el presente documento, se refieren al acto de tratar, como se ha definido anteriormente “tratar”.

25 [0030] Los anticuerpos de la invención pueden usarse para bloquear la unión de la proteína adhesina *yqi* con su receptor y de este modo pueden afectar a y reducir la tasa de infección con bacterias ExPEC. Los anticuerpos pueden conjugarse con una molécula efectora lo que permite destruir o desactivar bacterias que expresan la proteína adhesina *yqi*.

30 [0031] El polipéptido de la invención puede usarse como estructura de dirección para permitir la dirección eficaz y específica de las bacterias ExPEC para detectar, desactivar o matar estas bacterias. El polipéptido de la invención también puede usarse para tratar enfermedades infecciosas mediante su uso en la fabricación de una vacuna contra infección con bacterias ExPEC. En particular el ácido nucleico de la invención o el polipéptido de la invención puede usarse en la fabricación de una vacuna para su uso en tratamiento, por ejemplo, terapia o profilaxis, de un vertebrado contra infección con bacterias ExPEC, por ejemplo con bacterias de cepas de APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC.

35 [0032] El ácido nucleico de la invención puede usarse como una diana para dirigir a sitio una molécula terapéutica a un área en la que la infección tiene lugar o ya se ha producido. Como alternativa el ácido nucleico de la invención como tal puede usarse directamente en dicho tratamiento, por ejemplo, como molécula antisentido, compuesto de ARNi o como modalidad de dirección de un conjugado que comprende un dominio efector que tras su unión específica es capaz de ejercer un efecto terapéutico.

40 [0033] El ácido nucleico de la invención y/o el anticuerpo de la invención pueden usarse en diagnóstico de una enfermedad infecciosa. Preferiblemente la enfermedad infecciosa es una enfermedad asociada y/o provocada por infección de un vertebrado con bacterias ExPEC, por ejemplo con bacterias de cepas de APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC.

45 [0034] El ácido, el polipéptido y/o el anticuerpo de la invención pueden usarse en diagnóstico diferencial de infección de un vertebrado permitiendo la diferenciación entre infección con bacterias ExPEC, por ejemplo, infección con APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC, frente a infección con *E. coli* patógena intestinal, como por ejemplo EPEC o EMEC. Puesto que las bacterias *E. coli* patógenas intestinales carecen del gen *yqi*, puede distinguirse fácilmente entre una infección con ExPEC y una infección con *E. coli* patógena intestinal simplemente comprobando la presencia de un ácido nucleico de la invención o un polipéptido de la invención.

50 [0035] El diagnóstico o diagnóstico diferencial puede comprender las siguientes etapas:

- provisión de una sonda: El término “sonda” se refiere a una composición que va a investigarse con respecto a la presencia del ácido nucleico de la invención o el polipéptido de la invención y que, en caso de una
 55 infección, puede contener material infectado o infeccioso. Preferiblemente, la sonda abarca material biológico y/o médico, es decir material derivado de una fuente biológica como por ejemplo un organismo o célula o un componente de un organismo (por ejemplo tejido) o una célula. El material puede someterse a etapas de tratamiento adicionales antes del uso de dicho material como sonda en el método de diagnóstico, por ejemplo para situar el material en una condición que permite la detección del ácido nucleico o el polipéptido de la invención. Preferiblemente la sonda comprende o consiste en material derivado de un tejido o fluido corporal. Dicho fluido corporal puede ser sangre, plasma, suero, orina, heces, fluido sinovial, fluido intersticial, linfa, saliva, sudor, fluido espinal y/o fluido lacrimal. Preferiblemente dicha sonda o fluido corporal es de origen vertebrado, más preferiblemente de origen aviar o mamífero, por ejemplo origen humano.
- poner en contacto la sonda con un agente de unión, siendo el agente de unión específico para un ácido
 65 nucleico de la invención o un polipéptido de la invención: realizándose dicha puesta en contacto en

condiciones que permitan la unión específica del agente de unión con dicho ácido nucleico y/o polipéptido de la invención.

- detección del agente de unión que se une específicamente al ácido nucleico de la invención y/o el polipéptido de la invención: tras la unión específica del agente de unión con el ácido nucleico o polipéptido de la invención, la presencia de tales conjugados se detecta. La selección de agentes de unión y medio de detección correspondiente se coordina de modo que se asegura la detección apropiada de acontecimientos de unión específicos. El agente de unión puede ser un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de la invención, como por ejemplo un cebador de PCR o una sonda de hibridación para una hibridación de northern o southern. El agente de unión que se une específicamente a un ácido nucleico o un polipéptido de la invención puede ser un aptámero o un anticuerpo, en particular el agente de unión puede ser un anticuerpo de la invención. Dependiendo de la selección del agente de unión el método de detección de unión específica se prepara en consecuencia. Las etapas del método de diagnóstico pueden prepararse como método de PCR o de hibridación y el agente de unión puede ser un ácido nucleico que es complementario o hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de la invención. Pueden prepararse etapas alternativas del método de diagnóstico como ELISA, RIA, transferencia de western, ensayo de tira o similares y el agente de unión puede ser un aptámero o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de la invención.

[0036] Como alternativa, el ácido nucleico o el polipéptido de la invención puede ponerse en contacto con una sonda y se detecta si dicha sonda comprende un agente de unión que se une específicamente a dicho ácido nucleico o polipéptido de la invención. Un agente de unión tal puede ser un anticuerpo específico para el polipéptido de la invención comprendido en la sonda. En caso de que un vertebrado se infecte o estuviera infectado con bacterias ExPEC, dicho vertebrado puede haber desarrollado anticuerpos contra estructuras de dichas bacterias ExPEC como por ejemplo la proteína adhesina *yqi*. Mediante el uso del ácido nucleico o polipéptido de la invención, es posible detectar tales anticuerpos en una sonda de un vertebrado tal y diagnosticar de este modo la infección para determinar una titulación de anticuerpos y por ejemplo comprobar la inmunización exitosa con una vacuna basada en la proteína adhesina *yqi*.

[0037] La presente invención también se refiere a un kit para su uso en diagnóstico de una enfermedad infecciosa, preferiblemente una enfermedad asociada con infección de un vertebrado con bacterias *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), por ejemplo con bacterias de cepas de APEC, UPEC, SePEC y/o NMEC, comprendiendo el kit un ácido nucleico o polipéptido de la presente invención, siendo un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico de la invención, o un anticuerpo de la invención, y opcionalmente un manual y/o consumibles configurados para su uso en dicho diagnóstico. El kit de la invención puede comprender un ácido nucleico o polipéptido de la presente invención, un ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico de la invención, o un anticuerpo de la invención inmovilizado en un soporte sólido.

[0038] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2. La presente invención también se refiere a un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 3.

[0039] A continuación la presente invención se explicará en más detalle mediante ejemplos.

Figuras:

[0040]

Figura 1. Gráfica que ilustra el crecimiento del mutante de transposón EA7F9 en competición con IMT5155 y de forma separada en medio de crecimiento Luria Bertani (LB). Se calculó un índice de competición (CI) *in vitro* en un punto temporal de 4 h.

Figura 2. Mapa físico que muestra la organización genómica del grupo de gen de adhesina *yqi* en la cepa de APEC IMT5155. Una proteína hipotética precede a la proteína usher de membrana externa potencial, seguido de la chaperona potencial y finalmente la adhesina potencial.

Figura 3. Dendrograma que muestra las distancias entre las secuencia génicas de *yqi* entre cepas que pertenecen a diferentes tipos de secuencia (ST: Tipo de secuencia; STC: Complejo de tipo de secuencia)

Figura 4A. Adhesión bacteriana a células fibroblásticas de pollo 1,5 h y 3 h después de la infección con una MOI=100. Las diferencias entre IMT5155 e IMT5155Δ*yqi* fueron estadísticamente significativas con una $p < 0,005$ a 1,5 h y $p < 0,05$ a 3 h.

Figura 4B. Adhesión bacteriana a células de riñón caninas Madin Darby polarizadas (MDCK-1) 3 h después de infección con una MOI=100. La diferencia entre IMT5155Δ*yqi* e IMT5155*yqi* (pDSK602:*yqi*) fue significativa con una $p < 0,04$.

Figura 5A. Colonización bacteriana de los pulmones de pollo 24 h después de infección intratraqueal con 10^6 UFC de bacterias. Las diferencias entre IMT5155 e IMT5155 Δ yqi fueron estadísticamente significativas con una $p < 0,05$ (n=6). La cepa IMT11327 es el control negativo.

Figura 5B. Colonización bacteriana de los pulmones de pollo 24 h después de infección intratraqueal con 10^9 UFC de bacterias. Las diferencias entre IMT5155 e IMT5155 Δ yqi fueron estadísticamente significativas con una $p < 0,02$ (n=6). La cepa IMT11327 es el control negativo.

Figura 6. Reaislamiento bacteriano de IMT5155, IMT5155 Δ yqi e IMT11327 de los pulmones, bazo, hígado, corazón, riñones y cerebro 24 h después de infección intratraqueal con 10^9 UFC de bacterias (n=6). La ausencia de columnas indica que no se aislaron bacterias del órgano.

Figura 7. Microfotografías electrónicas que muestran cepa de *E. coli* afimbriada teñida de forma negativa AAEC189 (pKESK:yqi_4975_XB) sobreexpresada con el grupo de gen de adhesina yqi a un aumento de 45.000x (A), 65.000x (B) y 100.000x (C), cepa de *E. coli* afimbriada de control negativo AAEC189 (D), cepa de *E. coli* fimbriada de tipo silvestre IMT5155 (E). Las flechas indican la localización de las fimbrias.

Ejemplos:

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

[0041] Todas las cepas de *E. coli* y plásmidos usados se enumeran en la tabla 1. El aislado de APEC de tipo silvestre IMT5155 (O2:K1:H5) se obtuvo de órganos internos de una gallina ponedora clínicamente diagnosticada con infección por APEC sistémica durante un brote en la parte norte de Alemania en el año 2000 (Li G, Laturus C, Ewers C, Wieler LH (2005) Identification of genes required for avian Escherichia coli septicemia by signature-tagged mutagenesis. Infect Immun 73: 2818-2827). La cepa posee varios genes asociados con virulencia típicos de cepas ExPEC, gen de fibras curli (crl), fimbrias de tipo 1 (*fimC*), hemaglutinina sensible a temperatura (*tsh*), gen receptor de hemo (*chuA*), proteína de membrana externa (*ompA*), invasión del endotelio cerebral (*ibeA*), isla genética asociada con meningitis del neonato (*gimB*), plásmido de colicina V (colV) y se clasifica en el grupo filogenético B2, y tipo de secuencia de locus múltiple 140 del complejo ST95. Se usó una cepa de *E. coli* adicional IMT11327 (Ont:H16), aislado del intestino de un pollo clínicamente sano, como un control no virulento en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que se usó *E. coli* – cepa K12 (MG1655) como un control negativo *in vitro*. Se usó IMT5155 para todos los estudios de manipulación genética. Todos los aislados usados en los estudios de prevalencia son parte de una colección de cepas en el laboratorio de los inventores obtenida de diversas fuentes (Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, *et al.* (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? Int J Med Microbiol 297: 163-176).

Se cultivaron de forma rutinaria cepas bacterianas a 37 °C en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) y en placas de agar LB con antibióticos apropiados cuando se requirieron en las siguientes concentraciones: Kanamicina (Kan), 50 μ g/ml; Nalidixina (Nal), 30 μ g/ml; Ampicilina (Amp), 50 μ g/ml; Cloranfenicol (Cm), 30 μ g/ml; Espectinomicina (Spec) 50 μ g/ml. Todas las cepas se almacenaron a -70 °C en caldo de cultivo LB con glicerol 10% (v/v) hasta su uso posterior.

Análisis de PCR

[0042] Todos los cebadores oligonucleotídicos se enumeran en la tabla 2. A no ser que se especifique de otro modo, se cultivaron aislados de *E. coli*, de los que se iba a usar ADN como el molde para amplificación por PCR, durante una noche en caldo de cultivo Luria-Bertani a 37 °C y se liberó ADN de organismos completos hirviendo durante 10 minutos. Después de centrifugación, se tomaron 2 μ l del sobrenadante como ADN molde y se añadieron a una mezcla de reacción de 25 μ l que contenía 0,1 μ l de cada par de cebadores en una concentración de 10 pmol, 0,3 μ l de 10 mM de los cuatro desoxinucleósido trifosfatos (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Múnich Alemania), 2,5 μ l de tampón de PCR 10x, 1 μ l de cloruro de magnesio 50 mM y 1 unidad de Taq-Polimerasa (Rapidozym GmbH, Berlín Alemania). Las muestras se sometieron a 25 ciclos de amplificación en un termociclador (GeneAmp PCR system, Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel en un gel de agarosa 1,5% (Biodeal, Markkleeberg, Alemania), se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron en exposición a UV.

Establecimiento de un modelo de infección de colonización pulmonar

[0043] Se estableció un modelo de infección de colonización pulmonar modificado basándose en el modelo de infección sistémica existente, para el fin de explorar grupos de mutantes de STM con respecto a factores de colonización y adhesión como se ha descrito previamente (Antao EM, Glodde S, Li G, Sharifi R, Homeier T, *et al.* (2008) The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic Escherichia coli

(APEC). Microb Pathog 45: 361-369). El modelo de infección pulmonar difirió del modelo de infección sistémica porque la dosis de infección se redujo a 10^6 UFC de modo que no se indujo infección sistémica.

Brevemente, se usaron pollos sin patógenos específicos (SPF) leghorn blancos de cinco semanas de edad (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Alemania) para fines de infección. Se infectaron grupos de 10 pollos por vía intratraqueal con una suspensión de 0,5 ml que contenía 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC de la cepa virulenta IMT5155 respectivamente. Se usó IMT11327 como un control negativo durante la infección. Los pollos se sacrificaron 24 h después de la infección y se determinó una puntuación clínica que controlaba la infección que variaba de puntuación 0 (sin síntomas) a puntuación 4 (síntomas graves). Se determinó de forma similar una puntuación de lesión de órganos con una puntuación mínima y máxima de 1 y 5 en los pulmones respectivamente que representan la gravedad de las lesiones en los pulmones, y una puntuación de 0 (sin hiperplasia) o 1 (hiperplasia) en el bazo. Se aislaron bacterias de los pulmones y el bazo como sigue: se pesaron las muestras de órganos, se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (1 ml/g) y se homogenizaron con un aparato Ultra-Turrax. Se sembraron diluciones en serie en placas de agar LB que se incubaron después a 37 °C durante 24 h. Las colonias se contaron después para determinar la UFC por gramo en cada órgano. Se seleccionó como la dosis de infección una dosis de infección de 10^6 en infecciones posteriores, puesto que el número de bacterias aisladas de nuevo con esta dosis de infección fue óptimo para análisis de STM (datos no mostrados).

Mutagénesis de transposón Tn5km2 e identificación de una nueva adhesina

[0044] Se realizó mutagénesis de inserción de cepa de APEC IMT5155 de forma aleatoria usando transposón pUTmini-Tn5km2 como se ha descrito previamente (LiG, LaturnusC, EwersC, WielerLH (2005) Identification of genes required for avian Escherichia coli septicemia by signature-tagged mutagenesis. Infect Immun 73: 2818-2827). Se generó una biblioteca de mutantes de transposón de la cepa IMT5155 en este estudio y se exploró como se ha descrito previamente por Li *et al.*, en el modelo de infección de colonización pulmonar de pollo en la búsqueda de factores de colonización y adhesión cruciales para infección por APEC. Se seleccionó un mutante EA7F9 en esta exploración y se identificó el gen interrumpido *yqi*, que codifica una adhesina potencial, usando PCR arbitraria también descrita previamente (Li *et al.*). Esta adhesina, temporalmente renombrada adhesina ExPEC I (EA/I) se caracterizó adicionalmente con respecto a su papel en la patogénesis de APEC.

Caracterización funcional de adhesina ExPEC I(EA/I)

Ensayos de competición in vitro e in vivo

[0045] Se realizaron ensayos de competición *in vitro* e *in vivo* mezclando cultivos de cepas mutantes y de tipo silvestre con una $DO_{600}=1$ en una relación de 1:1. Para ensayos *in vitro*, la mezcla bacteriana se incubó en caldo de cultivo LB durante 4 h a 37 °C y después se sembró en placas LB con y sin Kanamicina y Nalidixina. Para ensayos *in vivo*, se infectaron cuatro pollos con 10^6 UFC/ml de esta mezcla bacteriana. A las 24 h después de la infección se sacrificaron los pollos, se homogeneizaron los pulmones y las diluciones seriadas se sembraron en placas LB con y sin Kanamicina y Nalidixina para selección de cepa mutante y de tipo silvestre respectivamente. Se calculó un índice competitivo (CI) dividiendo la relación de producción (UFC mutante: UFC tipo silvestre) por la relación de aportación (UFC mutante: UFC tipo silvestre) a 0 h y 4 h o 24 h para ensayos *in vitro* e *in vivo* respectivamente.

Secuenciación de una región de grupo de gen EA/I de 4975 pb en IMT5155

[0046] Para secuenciar el grupo de gen EA/I (*yqi*) en IMT5155, la región de 4975 pb se amplificó usando los cebadores IMT3045 e IMT3046 y el producto de PCR se clonó en vector pCR2.1 TOPO de acuerdo con el manual de clonación de TOPO convencional (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). El producto clonado se transformó en *E. coli* TOP10 por electroporación y se sembró en LB con Kanamicina para seleccionar clones positivos. Se ensayaron colonias con respecto a la presencia del grupo de gen *yqi* (4975 pb) usando los cebadores convencionales IMT1560 e IMT1561. El plásmido que contenía el inserto se aisló de la cepa huésped y se secuenció comercialmente por AGOWA Genomics de LGC, Berlín, Alemania.

Generación de un mutante isogénico de yqi

[0047] Para generar un mutante knock-out de la adhesina fimbrial en IMT5155, el gen *yqi* se reemplazó con un casete de resistencia a Cloranfenicol usando el sistema de recombinasa lambda red. El gen de Cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se amplificó a partir del plásmido pKD3 usando PCR con los cebadores IMT2510 e IMT2511 (Tabla 2), parte de los cuales tienen homología de secuencia con la región flanqueante de *yqi*. El producto de PCR se purificó en un gel de agarosa 1% y se transformaron 2 µl de la muestra por electroporación en IMT5155 que contenía el plásmido de expresión de recombinasa lambda red pKD46. Después de electroporación las muestras se incubaron a 28 °C durante 1 h en caldo de cultivo SOC y se sembraron en agar LB con Cloranfenicol para seleccionar clones positivos (CAT). Después de incubación durante una noche a 37 °C, los transformantes se seleccionaron y se ensayaron con respecto a pérdida del gen *yqi* usando PCR con pares de cebadores IMT718/IMT2558 e IMT719/IMT2559 (Tabla 2).

Complementación de yqi

[0048] Para estudios de complementación y sobreexpresión el producto de PCR de gen *yqi* IMT5155 (1050 pb) se clonó en vector pCR2.1 TOPO de acuerdo con el manual de clonación de TOPO convencional (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) usando los cebadores IMT2910 e IMT2911 (Tabla 2) con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y se transformó en *E. coli* TOP10 mediante electroporación. Se seleccionaron colonias positivas en agar LB con Kanamicina y se ensayaron con respecto a la presencia de *yqi* usando cebadores convencionales IMT1560 e IMT1561 (Tabla 2). El vector TOPO con el inserto IMT5155 *yqi* se secuenció comercialmente por AGOWA Genomics de LGC, Berlín, Alemania para determinar que la secuencia estaba en fase. El vector pCR2.1 TOPO:*yqi* y el vector de expresión pDSK602 se digirieron después con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* durante 1 h a 37 °C, y se ligaron usando ADN ligasa T4 durante una noche a 4 °C. Después se introdujeron por electroporación tres microlitros de la mezcla de ligación en *E. coli* TOP10 y se sembraron en agar LB que contenía espectinomicina. Las colonias se ensayaron con respecto a la presencia de *yqi* usando PCR con cebadores IMT2910 e IMT2911 (Tabla 2). El plásmido modificado pDSK602 con el inserto *yqi* se aisló de *E. coli* TOP10 y se transformó en IMT5155Δ*yqi* para complementar el gen suprimido. En ensayos de adhesión de colonización, la cepa complementada se indujo con IPTG en una concentración final de 100 mM para expresión de la proteína.

Ensayos de adhesión in vitro con Fibroblasto de Pollo (CEC) y líneas celulares epiteliales de riñón canino Madin Darby (MDCK-1)

[0049] Se usaron células fibroblásticas de pollo (CEC) entre los pases 6 y 9 y se sembraron en placas de microtitulación de 12 pocillos a una densidad de $\sim 2 \times 10^5$ células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ 5% sin antibióticos antes de los ensayos de adhesión. Se usó medio de cultivo celular esencial mínimo (Pan™ Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) con suero de ternero fetal 5% (FCS) (Pan™ Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) para cultivar células. Se usaron monocapas después de 6 días de incubación.

Se usaron células de Riñón Caninas Madin Darby (MDCK-1) entre los pases 1 y 5. Las células se cultivaron en medio de eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Pan™ Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) con FCS 10% y se incubaron a 37 °C en CO₂ 5%. Las unidades de filtro Transwell (Costar) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Múnich Alemania) contenían una membrana de filtro poroso de 1,12 cm² (poros de 0,4 μm) que se había tratado para cultivo tisular. Las unidades de filtro se incubaron en placas de microtitulación de 12 pocillos (Costar) y se situaron en DMEM que contenía FCS 10% durante 1 h, a 37 °C antes de sembrar. Se añadieron 40 μl de una suspensión celular de MDCK tripsinizada a cada unidad de Transwell. Se usaron monocapas después de 4 días de incubación momento en el cual había $\sim 3 \times 10^5$ células MDCK por filtro.

Para ensayos de adhesión, se añadieron bacterias a los pocillos apropiados por triplicado en medio sin FCS a una MOI de 100, es decir, $2-3 \times 10^7$ bacterias por pocillo. Se centrifugaron placas de microtitulación a 250 x g durante 10 minutos, y después se incubaron durante 1,5 h y 3 h para células CEC, y 3 h para células MDCK, después de lo cual el sobrenadante se descartó; las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con Fosfato (PBS) y se sembraron en placas en agar LB para determinar el número de bacterias adherentes en cada pocillo.

Estudios de infección de animales

[0050] También se llevaron a cabo experimentos animales para determinar la capacidad de colonización de la cepa IMT5155Δ*yqi* en comparación con IMT5155. Se usó IMT11327 como el control negativo. Brevemente, en un ensayo que implicaba el modelo de pollo de colonización pulmonar, se infectaron grupos de 6 pollos de cinco semanas de edad por vía intratraqueal con una suspensión bacteriana que contenía 10⁶ bacterias por ml. A las 24 horas después de la infección, los pollos se sacrificaron y se diseccionaron. Se registró una puntuación clínica y de órganos y se homogeneizaron los pulmones y el bazo.

En el modelo de infección sistémica de pollo, se infectaron grupos de 6 pollos de cinco semanas de edad por vía intratraqueal con una suspensión bacteriana que contenía 10⁹ bacterias por ml. A las 24 horas después de la infección, los pollos se sacrificaron, se diseccionaron y se registró una puntuación clínica y de órganos. Se homogeneizaron los pulmones, corazón, hígado, riñones, bazo y cerebro.

Todos los homogeneizados se diluyeron de forma apropiada y se sembraron en placas en agar LB y agar LB con antibióticos cuando se requirió, para determinar el número de bacterias que colonizan el pulmón de pollo y el número de bacterias en órganos internos durante la infección sistémica.

Sobreexpresión del grupo de gen de adhesina EA/I de 4975 pb en E. coli fimbrial negativa cepa AAEC189

[0051] El grupo de gen de adhesina EA/I de 4975 pb se amplificó y el producto de PCR se clonó en vector pCR2.1 de acuerdo con el manual de clonación de TOPO convencional (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) usando los cebadores IMT3259 e IMT3260 con sitios de corte de enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y se transformó en células *E. coli* electrocompetentes TOP10 mediante electroporación. Se seleccionaron clones positivos en agar LB con Kanamicina y se ensayaron con respecto a la presencia del grupo de gen de 4975 pb usando los cebadores convencionales IMT1560 e IMT1561.

El plásmido pCR2.1-TOPO:*yqi*_4975_XB y el vector de expresión pKESK-22 se digirieron con enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y se ligaron usando ADN ligasa T4 durante una noche a 4 °C y finalmente se introdujeron por electroporación en células *E. coli* electrocompetentes TOP10 y se sembraron en placas con agar LB que contenía

espectinomycin. Las colonias se ensayaron con respecto a la presencia del grupo de gen de adhesina de 4975 pb usando PCR con los cebadores IMT3138 e IMT3139.

El plásmido pKESK yqj _4975_XB se aisló de *E. coli* TOP10 y se transformó en células *E. coli* electrocompetentes AAEC189 (cepa de *E. coli* afimbriada), para sobreexpresar el grupo de gen de adhesina.

5

Microscopía electrónica

[0052] Se cultivaron cepas de *E. coli* AAEC189, AAEC189 (pKESK: yqj _4975_XB) e IMT5155 en 5 ml de caldo de cultivo de infusión cerebro cardíaca después de inocular con 150 μ l de los cultivos de una noche respectivos. Las cepas AAEC189 e IMT5155 se usaron como controles negativos y positivos respectivamente. Se proporcionó adicionalmente a la cepa AAEC189 (pKESK: yqj _4975_XB) Kanamicina en su medio de crecimiento, y se indujo con IPTG 0,1 M después de 30 minutos de crecimiento. Las tres cepas se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 2,5, permitiendo un tiempo de inducción de 2,5 h para la cepa AAEC189 (pKESK: yqj _4975_XB). Se centrifugó un mililitro de cultivo bacteriano a 8000 x g y el sedimento bacteriano se lavó tres veces con PBS 1 x y después se resuspendió en 500 μ l de PBS 1 x. Se aplicaron 20 μ l de suspensión bacteriana a rejillas de cobre de malla 200 recubiertas con Formvar y se tiñeron con acetato de uranilo 1% durante 2 minutos. Las preparaciones teñidas de forma negativa se examinaron en un microscopio Zeiss EM900.

10

15

Prevalencia del gen de *EAI1 yqj* entre ExPEC, *E. coli* patógena intestinal (IPEC) y comensales (cepas A_{fecal})

20

[0053] Para determinar la prevalencia de yqj entre cepas de *E. coli*, se ensayaron 406 cepas de *E. coli* patógena aviar (APEC), 138 *E. coli* uropatógenas (UPEC), 25 *E. coli* meningíticas de neonato (NMEC), 19 *E. coli* asociadas con Septicemia (SePEC), 153 *E. coli* patógenas intestinales (IPEC) y 159 cepas fecales de pollos clínicamente sanos (A_{fecal}) con respecto a la presencia del gen yqj usando reacciones de PCR convencionales con los cebadores IMT2512 e IMT2513 por medio de amplificación de una región de 400 pb del gen de adhesina como se describe bajo análisis de PCR. IMT5155 se usó como un control positivo, e IMT11327 como un control negativo para todas las reacciones de PCR. Se observaron resultados como una banda clara sencilla en un gel de agarosa y se registró como positivo y negativo para todas las cepas respectivamente.

25

Secuenciación del gen de *EAI1 yqj* y análisis evolutivo

30

[0054] Se seleccionó un total de 77 cepas que representaban tipos de secuencia de locus múltiple (MLST) ST12, ST73, ST95, ST104, ST135, ST140, ST141, ST358, ST363, ST368, ST372, ST390, ST416, ST417 y ST421 con respecto a secuenciación del gen yqj (1050pb), a partir de un estudio previo en el Instituto de Microbiología y Epizootica que implicaba análisis de MLST, usando los pares de cebadores IMT3706/IMT3707 e IMT2512/IMT2559. Los productos de PCR se secuenciaron comercialmente por AGOWA Genomics de LGC, Berlín, de modo que se obtuvo una secuencia bicatenaria para cada cepa. Las secuencias se analizaron usando software Kodon disponible de Applied Maths. Se calculó un árbol filogenético que mostraba las distancias entre cepas de diferentes ST por un algoritmo de parsimonia máxima usando Software Kodon de Applied Maths.

35

40

45

La secuencia del gen de adhesina de las cepas APEC_O1 (APEC) (Acceso: CP000468), CFT073 (UPEC) (Acceso: AE014075), UT189 (UPEC) (CP000243) se obtuvo a partir de la base de datos de nucleótidos disponibles, y se comparó con las cepas secuenciadas en este estudio. Las tasas de mutación no sinónima (Dn) y sinónima (Ds) se calcularon usando software DnaSP 4.50.3 para el gen de adhesina secuenciado entre las cepas que pertenecían al complejo ST95 para determinar la relación Dn/Ds para cada locus como se ha descrito previamente.

Análisis estadístico

[0055] Todos los análisis estadísticos para experimentos animales *in vivo* y experimentos de cultivo celular *in vitro* se llevaron a cabo usando el software SPSS (paquete Estadístico para las ciencias sociales), versión 15.0 llevando a cabo el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico y el ensayo de t de student al nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

50

Resultados

Atenuación de IMT5155 con mutación en el gen de adhesina ExPEC I (*EAI1 yqj*)

55

[0056] Entre los muchos genes identificados durante la exploración de STM, estaba el gen de adhesina ExPEC I (*EAI1*), también indicado como yqj . Los ensayos de competición *in vitro* de mutante de transposón EA7F9 frente a cepa de tipo silvestre IMT5155 mostraron que no había defecto de crecimiento significativo *in vitro* como se determinó por las curvas de crecimiento (Figura 1). Se observó un índice de competición *in vitro* de 1,2 para EA7F9. Por otro lado, se descubrió que el mutante se atenuaba en el pollo con un índice de competición *in vivo* de 0,6. Este resultado confirmó la atenuación del mutante EA7F9 durante la exploración de STM.

60

Secuenciación de la región del grupo de gen *EAI1* en IMT5155

65

[0057] El grupo de gen de adhesina yqj potencial se secuenció completamente en la cepa de APEC IMT5155. La

organización genómica del grupo de gen de adhesina *yqi* IMT5155 fue como sigue: el usher de membrana externa potencial precedió a la chaperona periplásmica, seguido del gen de adhesina. Un gen de proteína hipotética conservado precede al gen usher que puede codificar la proteína de subunidad de adhesina aunque esto aún no se ha confirmado (Figura 2). Esta región de 4.975 pb mostró una identidad de secuencia del cien por cien con el grupo de gen de adhesina *yqi* de UPEC y APEC en cepas secuenciadas UTI89 (Acceso: CP000243) y APEC_O1 (Acceso: CP000468). Comparando la secuencia con genomas disponibles en la base de datos pública, este grupo de gen de adhesina se encuentra solamente entre cepas de ExPEC incluyendo APEC, UPEC y NMEC y no se alberga por *E. coli* patógena intestinal como *E. coli* enteropatógena (EPEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* no patógena.

EAI desempeña un papel en la adhesión de APEC a fibroblastos de pollo y células epiteliales de riñón in vitro

[0058] Para determinar el efecto de EAI en APEC, se realizaron inicialmente ensayos de adhesión *in vitro* usando células fibroblásticas de pollo. Se ensayaron la cepa EA7F9 con una rotura en el gen *yqi* mediante un transposón (mutante generado por STM) (Tabla 1) y la cepa IMT5155Δ*yqi* desprovista del gen de adhesina ExPEC I frente al patógeno de tipo silvestre IMT5155 y una cepa de control negativo MG1655. La determinación bacteriana en dos puntos temporales diferentes reveló una reducción de la capacidad tanto de EA7F9 como de IMT5155Δ*yqi* para adherirse a células fibroblásticas hasta aproximadamente cuarenta por ciento de la adhesión total por IMT5155 (Figura 4A). Como se esperaba MG1655 también mostró capacidad de adhesión reducida en comparación con IMT5155. Se calculó una UFC media a partir de tres pocillos independientes y los resultados fueron reproducibles entre experimentos de adhesión. El análisis estadístico de los valores de UFC mostraron una diferencia significativa entre IMT5155 de tipo silvestre y los mutantes ensayados, con una $p < 0,005$ y $p < 0,05$ a 1,5 h y 3 h respectivamente (Figura 4A).

Para confirmar adicionalmente el papel de *yqi* en APEC *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de adhesión usando células epiteliales de Riñón Canino de Madin-Darby polarizadas (MDCK-1). Se ensayaron las cepas IMT5155Δ*yqi* e IMT5155Δ*yqi*⁺, una cepa que porta un plásmido de expresión modificado con el gen *yqi*, es decir, el mutante complementado, frente a IMT5155, el control positivo, e IMT11327, una cepa de control negativo de origen aviar sin el gen *yqi*. Se vio una reducción de la colonización por IMT5155Δ*yqi*, hasta el veinte por ciento de la adhesión total por IMT5155, 3 h después de la infección (Figura 4B). La cepa complementada IMT5155Δ*yqi* (pDSK602:*yqi*) recuperó su capacidad para adherirse a células MDCK-1 mediante introducción del gen *yqi* en comparación con su mutante de delección IMT5155Δ*yqi* con una significación de $p < 0,04$. Todos los resultados fueron reproducibles en experimentos de adhesión consecutivos.

Efecto de EAI en la colonización del pulmón de pollo in vivo

[0059] La colonización del pulmón de pollo *in vivo* se estudió infectando pollos de 5 semanas de edad por vía intratraqueal, y aislando bacterias de los pulmones 24 h después de la infección. Para este fin, se hizo uso de dos preparaciones de infección diferentes, incluyendo el modelo de infección de colonización de pulmón y el modelo de infección sistémica. IMT5155 e IMT11327 actuaron como controles positivo y negativo respectivamente. Los resultados de los experimentos *in vitro* confirmaron las observaciones realizadas *in vitro* en modelos de cultivo celular descritas anteriormente. Cuando se infectaron pollos con una dosis de 10^6 UFC de IMT5155Δ*yqi* en un modelo usado para estudiar las capacidades de colonización del pulmón de pollo por diversas cepas, se observó una reducción clara de los números de bacterias aisladas en comparación con IMT5155 como se representa en la figura 5A. Las diferencias entre cepas fueron estadísticamente significativas con una $p < 0,05$. La puntuación de pulmón media en pollos infectados con IMT5155Δ*yqi* fue de 1,63 en comparación con 1,71 y 1,21 en pollos infectados con IMT5155 e IMT11327 respectivamente. Ninguno de los pollos infectados mostró ningún síntoma clínico.

Además, cuando se infectaron pollos con una dosis más alta de bacterias, es decir 10^9 UFC, en un modelo diseñado para inducir infección sistémica, aún hubo una diferencia significativa en la colonización de pulmón por las cepas IMT5155 e IMT5155Δ*yqi* como se ve en la figura 5B con una $p < 0,02$ [19]. Se descubrió que la puntuación de pulmón media en pollos infectados con IMT5155Δ*yqi* era 1,52 en comparación con 2,4 y 0,6 en pollos infectados con IMT5155 e IMT11327 respectivamente. En ambos modelos de infección, la capacidad de IMT11327 para colonizar el pulmón de pollo fue mucho menor que tanto IMT5155 como IMT5155Δ*yqi* como se ve en la figura 5.

Efecto de EAI durante infección sistémica en pollos

[0060] Pueden inducirse infección sistémica en pollos infectando aves de cinco semanas de edad por vía intratraqueal con una dosis de infección de 10^9 UFC. Como se ha mencionado anteriormente, la infección de pollos con esta dosis de infección dio como resultado reducción significativa de la colonización bacteriana del pulmón de pollo. Cuando se volvieron a aislar bacterias de órganos internos de pollo incluyendo bazo, riñones, corazón, hígado y cerebro, hubo una reducción de los números bacterianos cuando se infectaron con IMT5155Δ*yqi* en comparación con IMT5155 como se ve en la figura 6, aunque sólo muy pequeña. La única excepción fue el cerebro, en el que no se aisló casi ninguna bacteria cuando se infectó con IMT5155Δ*yqi* en comparación con IMT5155. Todas las puntuaciones de órganos se redujeron considerablemente en pollos infectados con IMT5155Δ*yqi* en comparación con pollos infectados con IMT5155 como se ve en la tabla 4.

La microscopía electrónica revela apéndices de tipo fimbrial asociados con grupo de gen de adhesina ExPEC I (yqi)

5 **[0061]** El grupo de gen de adhesina ExPEC I (*yqi*) de 4975 pb que codifica la subunidad potencial, chaperona, usher y adhesina se clonó y sobreexpresó en una cepa afimbriada de *E. coli* AAEC189 usando un vector de expresión adecuado. La tinción negativa de la cepa AAEC189 (pKESK:*yqi*_4975_XB) reveló la expresión de apéndices de tipo fimbrial cortos formándose en la membrana externa de la célula bacteriana (Figura 7). Estos apéndices fueron de aproximadamente 0,04 μm de longitud y 0,005 μm de grosor y no se detectaron en la cepa afimbriada AAEC189, es decir, el control negativo (Figura 8A). La cepa de tipo silvestre IMT5155, que alberga otras adhesinas como fimbrias de Tipo 1, curli y hemaglutinina sensible a temperatura, además de adhesina ExPEC I, se usó como un control positivo para el método de tinción, y se observaron fimbrias largas con una longitud de aproximadamente 0,5 μm (Figura 8B) que eran morfológicamente diferentes de las estructuras fimbriales observadas en la cepa AAEC189 (pKESK:*yqi*_4975_XB).

15 *Prevalencia de EAII entre ExPEC revela su potencial como un factor de virulencia*

20 **[0062]** Se exploró una colección de cepas de ExPEC, *E. coli* patógena intestinal y comensales aviares disponibles en el Instituto de Microbiología y Epizootica, Freie Universität Berlin, para determinar la presencia del gen *yqi* entre estas cepas. De un total de 588 aislados de ExPEC ensayados con respecto a la presencia de *yqi*, incluyendo 406 APEC, 138 UPEC, 25 NMEC y 19 SePEC, se descubrió que 368 aislados eran positivos para *yqi*, lo que suma un total de 62,5% de los aislados patógenos que albergan el gen *yqi* (Tabla 3). Entre los aislados de APEC solamente, se descubrió que 221 aislados eran positivos haciendo un total de 54,4% de positivos para *yqi* en este grupo. Entre los aislados de UPEC se descubrió que 91 aislados eran positivos en un porcentaje total de 65,9% de positivos para *yqi* y entre los aislados de NMEC se descubrió que 15 eran positivos sumando 60,0% de positivos para *yqi*. Finalmente, entre los aislados de SePEC, 10 fueron positivos en un porcentaje de 52,6%. De un total de 159 aislados de *A_{fecal}* ensayados, se descubrió que 31 eran positivos para *yqi*, lo que representa solamente el 19,4% de las cepas no patógenas ensayadas.

30 Los resultados se compararon con los datos de MLST/EcoR depositados en la base de datos públicamente disponible (www.mist.net), de los que 292 de los aislados patógenos ensayados se conocían por su tipo de secuencia (ST) y 607 se conocían por sus grupos de EcoR de acuerdo con Herzer *et al* (Herzer PJ, InouyeS, InouyeM, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli. J Bacteriol 172: 6175-6181.), que se llevó a cabo como parte de un estudio separado en el Instituto de Microbiología y Epizootica. De los aislados positivos para *yqi*, 68 aislados pertenecían al grupo A de EcoR (18,9%), 4 a B1 (1,1%), 255 a B2 (70,8%) y 33 a D (9,1%) haciendo B2 el grupo predominante para aislados que albergan *yqi*. Entre los aislados negativos para *yqi*, 122 aislados pertenecían al grupo de EcoR A (49,3%), 29 a B1 (11,7%), 42 a B2 (17,0%) y 54 a D (21,8%) en los que A es el grupo predominante para aislados sin *yqi*.

35 Al comparar la distribución del gen *yqi* entre cepas de ExPEC con los datos de MLST disponibles, se observó que las cepas positivas para *yqi* están asignadas principalmente a los tipos de secuencia 12, 68, 73, 95, 104, 140, 141, 349, 355, 358, 372, 390, 420, 913. Todas las cepas que pertenecen a los tipos de secuencia 141, 372 y el complejo de tipo de secuencia 95 fueron positivas para *yqi*.

40 Entre las 153 *E. coli* patógenas intestinales ensayadas en este estudio, no se descubrió que ninguno de los aislados fuera positivo para *yqi* como se ve en la tabla 3.

45 Debido a la asociación exclusiva del gen de adhesina fimbrial potencial *yqi* con *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), es decir, su alta prevalencia entre aislados de ExPEC en comparación con *E. coli* no patógena, y ausencia completa en *E. coli* patógena intestinal, la adhesina se designó temporalmente adhesina ExPEC I (EAII).

EAII evoluciona bajo selección positiva

50 **[0063]** El gen de adhesina ExPEC I (*yqi*) se secuenció en muchas cepas y se comparó con datos de tipación de secuencia de locus múltiple existentes (MLST). MLST es un enfoque basado en secuencia de nucleótidos para la caracterización no ambigua de aislados de bacterias usando secuencias de fragmentos internos de siete genes constitutivos. La estructura de la población de especies microbianas con niveles intermedios de recombinación puede revelarse por lo tanto por análisis basados en alelos. Wirth *et al.* describieron que los polimorfismos de secuencia podrían definir secuencias únicas para cada uno de los siete loci de genes constitutivos, que se denominan alelos y a cada combinación única de alelos se le asigna un número de tipo de secuencia (ST). Los ST relacionados se asignan a complejos llamados ST, usando los principios del algoritmo eBurst: cada complejo de ST incluye al menos tres ST que difieren de su vecino más cercano en no más de dos de los siete loci mientras que los complejos de ST difieren entre sí en tres o más loci, y los ST que no cumplieron los criterios para inclusión dentro de un complejo de ST se denominan simplemente por su designación de ST.

60 Las secuenciación del gen de adhesina de ExPEC I (*yqi*) en cepas que pertenecen a los diversos tipos de secuencia (ST) y complejos de tipo de secuencia (STC) incluyendo STC10, STC12, STC73, STC95, ST141 y ST372, y cálculo de las distancias del locus del gen de adhesina entre estas cepas reveló la distribución de las cepas ensayadas en dos grupos (Figura 3). Un grupo incluyó cepas que pertenecían al complejo ST73, mientras que todas las otras cepas se asignaron a un segundo grupo. Se observó homología de secuencia entre cepas que pertenecían a un tipo de secuencia particular o complejo de tipo de secuencia como sucede con ST141, ST372, STC12 y STC73 dentro

del tipo de secuencia o complejo de tipo de secuencia (Figura 3). Una excepción a la norma fue la cepa IMT15008, ST73, STC73 que mostró variaciones en su secuencia del gen *yqi* en comparación con otras cepas en el complejo ST73, y podría asignarse mejor al grupo que alberga otras cepas ensayadas. Resulta interesante que solamente las cepas que pertenecían al complejo de tipo de secuencia 95 mostraron mutaciones en la secuencia del gen *yqi*. Por lo tanto, los inventores determinaron la relación de la tasa de mutación no sinónima (Dn) con la tasa de mutación sinónima (Ds) dentro de este complejo usando software DnaSP 4.50.3. $Dn/Ds < 1$ indica purificación o selección neutra, favoreciendo las sustituciones de aminoácidos. Los datos de los inventores muestran una tasa de mutación no sinónima de 0,00095496 y una tasa de mutación sinónima de 0,00024 que da como resultado una relación de Dn/Ds de 3,979, lo que indica selección positiva fuerte para evolución estructural del gen de adhesina *yqi* dentro del complejo de tipo de secuencia 95.

Análisis

[0064] Una etapa necesaria en la colonización exitosa y progreso de enfermedad por patógenos microbianos es la capacidad para adherirse a superficies del hospedador. El presente estudio hizo uso de un modelo de infección de pollo de colonización de pulmón para identificar genes de APEC específicos para etapas tempranas de la infección incluyendo adhesión a y colonización del hospedador mediante su patógeno a través de mutagénesis marcada con identificación. Como se anticipaba, los inventores identificaron proteínas fimbriales incluyendo la proteína reguladora fimbrial de tipo 1, y otros nuevos genes implicados de forma explícita en las etapas tempranas de patogénesis de APEC como se determinó por ensayos de competición con mutantes. El hallazgo más interesantes de los inventores fue una nueva adhesina *yqi* que se vio que desempeñaba un papel muy significativo en la colonización del pulmón aviar por APEC. La adhesina fimbrial potencial de nueva identificación que codifica el gen *yqi*, se denominará temporalmente adhesina ExPEC I (EA/I) hasta que se haya identificado el receptor de hospedador específico para esta adhesina para permitir una mejor clasificación y nomenclatura de la nueva adhesina fimbrial de *E. coli*.

Se sabe que las adhesinas facilitan la colonización del hospedador mediando en la interacción primera y crucial con el tejido hospedador. En ciertos casos se han notificado patógenos que tienen una cantidad sustancial de diferentes adhesinas expresadas en un momento u otro. En *E. coli*, dos de las adhesinas mejor caracterizadas son las fimbrias de tipo 1 y las fimbrias P que se regulan por los operones *fim* y *pap*. La secuenciación genómica de cepa UPEC de cistitis prototípica UT189 ha revelado ahora diez sistemas de adhesina usher-chaperona diferentes, entre los que los operones *auf*, *yad*, *yfc*, *yqi*, *yeh* y *fml* aún no se han caracterizado (Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, *et al.* (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of Escherichia coli: a comparative genomics approach. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 5977-5982.). Resulta interesante que los inventores identificaron el gen de adhesina *yqi* UPEC en una exploración de STM diseñada especialmente para detectar factores que desempeñarían un papel crucial en el inicio de la infección por APEC. Como se ha indicado anteriormente, el gen *yqi* de APEC mostró identidad de secuencia completa con el *yqi* de UPEC y es parte de un grupo de gen de adhesina de ~5 kb aún no caracterizado. Al comparar esta secuencia de gen de adhesina con genomas de *E. coli* públicamente disponibles, se descubrió que la adhesina estaba presente entre cepas de ExPEC incluyendo APEC y UPEC y no se alberga por *E. coli* no patógena ni por ninguna de las *E. coli* patógenas intestinales como *E. coli* Enteropatógena (EPEC) o *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), haciéndola única para infecciones extraintestinales. Este resultado valida por lo tanto el nombre temporal de adhesina ExPEC I (EA/I) asignado a la nueva adhesina. Las adhesinas fimbriales comparten organización genética común, porque los genes reguladores de adhesina preceden al gen de subunidad principal, que se sigue de la chaperona periplásmica, usher de membrana externa y finalmente los genes de adhesina. Esta organización de grupo génico se ve en fimbrias de tipo 1 (*fim*), fimbrias S (*sfa*), fimbrias F1C (*foc*) y las fimbrias que reconocen el antígeno Dr (*dra*). La organización del grupo de gen de adhesina *yqi* difiere por tener las posiciones del usher y la chaperona invertidas, lo que también sucede para el grupo del gen de adhesina *pap* de las fimbrias P, aunque la razón para esto aún no está clara.

Hasta la fecha, no hay estudios que impliquen el papel de la adhesina ExPEC I (*yqi*) en la colonización de tejidos hospedadores durante la infección. Previamente, se ha mostrado que la adhesina *fimH* de las fimbrias de tipo 1, y la adhesina *papG* de las fimbrias P son las proteínas de unión específica al receptor que se localizan en la punta de la estructura de pilus. También se ha indicado que la delección del gen *papG* no tuvo ningún efecto en la formación de pilus; sin embargo, los pili aislados de una cepa de delección de *papG* no eran adhesivos. Los inventores tienen ahora pruebas que muestran que la delección del gen EA/I, *yqi*, en la cepa de APEC IMT5155 da como resultado una reducción significativa de la colonización de fibroblastos y células epiteliales *in vitro* y del pulmón de pollo *in vivo*. Es posible que la adhesina *yqi* sea la proteína específica de receptor responsable de la unión inicial a células hospedadoras; sin embargo, este receptor aún debe identificarse.

La cepa de APEC IMT5155 se ha ensayado previamente con respecto a la presencia de adhesinas importantes como *fim*, *pap*, *crl*, *sfa*, *tsh*, *afa*, *dra*, *foc* y otras, y se ha descubierto que alberga solamente los genes de fimbria de tipo 1 (*fim*), curli (*crl*) y hemaglutinina sensible a temperatura (*tsh*) (Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, *et al.* (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? Int J Med Microbiol 297: 163-176.). La ausencia de fimbrias P, F1C, S y Dr en IMT5155, que se conocen por su papel en patogénesis de UPEC, hizo evidente que podría haber de hecho adhesinas no identificadas que participan de forma crucial durante el inicio de la infección. Los inventores observaron que en ambos modelos de infección usados en el presente estudio, hubo siempre una reducción sustancial de la colonización del pulmón de

pollo cuando se infectó a los pollos con IMT5155Δ*yqi*. Por lo tanto, los inventores creen que la adhesina de ExPEC I realiza una contribución significativa a la adhesión bacteriana total y colonización del pulmón de pollo por cepa de APEC IMT5155 durante la infección.

5 Un resultado interesante fue la prevalencia de EA/I entre una colección relativamente grande de cepas, particularmente su alta incidencia entre cepas de ExPEC como APEC, UPEC, NMEC y cepas de *E. coli* asociadas con septicemia (SEPEC), aparición infrecuente entre cepas no patógenas y ausencia completa entre cepas de *E. coli* patógenas intestinales. Se ha indicado previamente que cepas distintivas de *E. coli* responsables de la mayoría de los casos de infección del tracto urinario, sepsis y meningitis del neonato derivan predominantemente del grupo filogenético de *E. coli* B2. Adicionalmente, diversos estudios muestran que los grupos clonales virulentos derivan principalmente del grupo filogenético B2 y en menor grado del grupo D. Las observaciones de los inventores muestran que el 66,1% de los aislados positivos para *yqi* pertenecen al grupo filogenético B2 a diferencia de solamente el 11,5% de aislados negativos para *yqi* que pertenecen a este grupo.

15 Además, los inventores descubrieron que todos los aislados que pertenecen a las secuencias de tipo 95, 140, 141 y 372 fueron positivos para *yqi*. ST95 y ST140 pertenecen al complejo de tipo de secuencia 95. Se sabe que patógenos bien definidos que están asociados con ST específicos o complejos de ST, por ejemplo, el complejo ST95 contiene bacterias patógenas relacionadas de los serogrupos O1, O2 y O18 que expresan el polisacárido K1, es decir, los aislados de K1. Fue, por lo tanto, de enorme interés, el análisis evolutivo de las secuencias de gen de adhesina de cepas que pertenecen a diferentes tipos de secuencia, que mostraron que dentro de un complejo de tipo de secuencia particular (STC), la secuencia de adhesina era homóloga, lo que sucede para STC12 y STC73 así como otros tipos de secuencia como ST372, ST141 y ST358 con una sola excepción, la cepa IMT15008. Puesto que esta cepa no tenía característica única que la diferenciara de otras cepas dentro del complejo ST73, una posible explicación podía ser que el gen *yqi* en la cepa IMT15008 es el resultado de un acontecimiento de recombinación.

25 Resulta interesante que dentro del complejo ST95, la secuencia del gen de adhesina mostró la presencia de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP), que se confirmaron como una selección positiva en el gen dentro de este complejo. Las mutaciones que producen modificaciones funcionales se denominan adaptativas a patogenicidad o patoadaptativas, y son con frecuencia SNP que producen reemplazos de aminoácidos en proteínas esenciales para el éxito de un patógeno y se ha mostrado que dos adhesinas principales de *E. coli* patógena intestinal (ExPEC), adhesinas fimbriales de tipo 1 y P, adquieren SNP estructurales a una velocidad rápida, y esta adaptación constituye un factor importante en la macroevolución patoadaptativa y diversificación genética de grupos clonales de ExPEC. Es posible que la adhesina ExPEC I también experimente mutaciones estructurales o mutaciones patoadaptativas, particularmente, entre cepas que pertenecen al complejo ST95, lo que confirma adicionalmente la importancia de esta adhesina dentro de este complejo altamente patógeno. No es sorprendente por lo tanto, el hecho de que la cepa de tipo silvestre usada en este estudio, IMT5155, también pertenezca al complejo ST95 y albergue el mayor número de SNP en el gen que codifica la adhesina ExPEC I.

40 Tiene sentido por lo tanto asumir que la adhesina ExPEC I podría quizás desempeñar un papel muy específico en la patogénesis de ExPEC, especialmente durante las etapas de colonización temprana de la infección. Sin embargo, una adición interesante a esto es la reducción de la adhesión a células epiteliales de riñón como se muestra por los experimentos de adhesión *in vitro* de los inventores. Esto indicaría la importancia de *yqi* en UPEC, que colonizan particularmente el tracto urinario durante infección del tracto urinario (UTI). Además, proporciona pruebas del potencial zoonótico de APEC, un tema de gran interés en el campo de ExPEC.

45 La presencia de un factor de virulencia sencillo casi nunca hace virulenta una cepa, mientras que una combinación de factores de virulencia habitualmente determina su capacidad para provocar enfermedad. Por lo tanto, de forma muy similar a numerosos otros genes que se clasifican en la clase de factores de virulencia cuando son excesivamente prevalentes entre los patógenos, el gen *yqi* también podría con el tiempo ser una adición a esta categoría basándose en su presencia regular en cepas de ExPEC altamente patógenas a diferencia de cepas no patógenas. Debe tenerse en cuenta que el grupo exiguo de cepas A_{fecal} que se descubrió que eran positivas para *yqi* en el presente estudio son cepas no patógenas no clásicas como se ha visto en un estudio anterior (Ewers C, Antao EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH (2009) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains with zoonotic potential. Appl Environ Microbiol 75: 184-192.). Ewers *et al* indicaron que varias cepas de *E. coli* A_{fecal} tienen características típicas de ExPEC humana y animal, y algunas cepas no de brote son capaces de provocar enfermedad sistémica en pollos de 5 semanas de edad inmunocompetentes, lo que sugiere la hipótesis del depósito de intestino aviar. Además se indicó que estas cepas suponen un riesgo zoonótico debido a que podrían transferirse directamente de aves a seres humanos o actuar como un grupo genético para cepas de ExPEC. Por lo tanto, tomados juntos, los resultados del estudio de prevalencia de adhesina ExPEC I (*yqi*) en *E. coli* son de hecho intrigantes, puesto que la búsqueda de nuevos factores de virulencia aún continúa.

65 Un resultado interesante en este estudio fue la expresión exitosa de adhesina ExPEC I *in vitro*. Los inventores han presentado la hipótesis de que la clonación del grupo del gen de adhesina potencial que codifica la proteína subunitaria potencial, proteínas usher y chaperonas potenciales y adhesina potencial, que se cree que juntas son responsables de la expresión de estructuras fimbriales, cuando se clonan exitosamente en una cepa de *E. coli*

afimbriada permitirían la expresión de fimbrias EA1 visibles bajo el microscopio electrónico. Usando tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión, la hipótesis de los inventores efectivamente se confirmó, ya que se detectaron estructuras de tipo fimbrial cortas en la cepa afimbriada sobreexpresada con el grupo de gen de adhesina, que no se observaron en la cepa afimbriada o control negativo. La cepa de tipo silvestre IMT5155 usada como un control positivo reveló estructuras fimbriales largas que representan todas las adhesinas fimbriales albergadas por la cepa incluyendo adhesina ExPEC I lo que explica la diferencia de longitud de las estructuras fimbriales observadas. Las estructuras fimbriales cortas observadas en la cepa afimbriada sobreexpresada con adhesina ExPEC I tendrán que confirmarse usando anticuerpo específico y tinción inmunológica con oro en el futuro; sin embargo, este estudio proporciona pruebas preliminares para las estructuras fimbriales de esta adhesina fimbrial de nueva identificación. Se confirma por lo tanto que la adhesina ExPEC I es una nueva adhesina fimbrial.

Los inventores han identificado una adhesina que desempeña un papel significativo en las etapas iniciales de infección por APEC. Esto sugiere que los anticuerpos inducidos contra esta adhesina pueden impedir la colonización, bloquear la infección y evita la enfermedad, es decir, la vacunación profiláctica con dicha nueva adhesina puede inhibir infecciones bacterianas. El bloqueo de las etapas iniciales de infección puede ser una de las estrategias más eficaces para evitar las infecciones bacterianas.

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa	Descripción
IMT5155	O2:K1:H5; <i>csgA</i> , <i>fimC</i> , <i>tsh</i> , <i>chuA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ireA</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>sit</i> , <i>neuC</i> , <i>ibeA</i> , <i>gimB</i> , <i>colV</i> , <i>ompA</i> , ST140, STC95, B2
IMT5155 Nal ^K	Derivado de IMT5155, resistente a Nalidixina
S17λ.pir	<i>recA thi pro hsdR-</i> M+ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lisogenizado con fago λ pir
IMT11327	<i>Ont:H16; fimC, crlA, ompA</i> , ST 295, B1
MG1655	F ⁻ , Lam ⁻ , Fim ⁺
EA7F9	IMT5155 Nal ^R <i>yqi</i> ::mini-Tn5
IMT5155Δ <i>yqi</i>	IMT5155 Nal ^R Δ <i>yqi</i> ::Cm ^R
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
pCR2.1-TOPO: <i>yqi</i>	<i>E. coli</i> TOP10 [pCR2.1 TOPO: <i>yqi</i>]
pDSK602: <i>yqi</i>	<i>E. coli</i> TOP10 [pDSK602: <i>yqi</i>]
IMT5155Δ <i>yqi</i> (pDSK602: <i>yqi</i>)	IMT5155 Nal ^K Δ <i>yqi</i> ::Cm ^K [pDSK602: <i>yqi</i>]
IMTS155Δ <i>yqi</i> (pDSK602)	IMT5155 Nal ^K Δ <i>yqi</i> ::Cm ^K [pDSK602]
IMT5155 (pDSK602- <i>yqi</i>)	IMT5155 Nal ^K [pDSK602: <i>yqi</i>]
pCR2.1-TOPO: <i>yqi</i> operon	<i>E. coli</i> TOP10 [pCR2.1TOPO: <i>yqi</i> -5kb]
Top10 (pKESK: <i>yqi</i> _4975_XB)	<i>E. coli</i> TOP10 [pKESK-22: <i>yqi</i> _4975bp_XbaI-BamHI]
<i>E. coli</i> AAEC189	Δ <i>fim</i> , Δ <i>lac</i> , <i>recA</i> ⁻ , <i>endA</i> ⁻ , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁺
<i>E. coli</i> AAEC189 (pKESK: <i>yqi</i> _4975_XB)	<i>E. coli</i> AAEC189 [pKESK-22: <i>yqi</i> _4975bp:XbaI-BamHI]
Plásmido	
pUTmini-Tn5km2	Kan ^R , Amp ^R
pKD46	Amp ^R , expresa recombinasa λ red
pKD3	gen <i>cat</i>
pCR2.1 TOPO	Kan ^R , Amp ^R , LacZα, promotor T7
pKESK-22	Neo ^K , Kan ^K , promotor <i>tac</i>
pDSK602	Spec ^K , Sm ^K , triple <i>lac</i> UV5, intervalo de huéspedes amplio

Tabla 2. Cebadores oligonucleotídicos usados en el presente estudio.

	Número de cebador	Región diana	Secuencia de cebador (5'-3')	T _m (°C)	SEC ID N°
5	IMT2510	<i>cat</i> (pKD3)	AATCCCTCTGCCAAAGCTCTCCTGCTAAGAAGG GGAAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	75	16
	IMT2511	<i>cat</i> (pKD3)	TAAATATGAAAATGCCGGGGTGTCCCGGCATT TTGCTGTCATATGAATATCCTCCTTAG	71	17
10	IMT2512	<i>yqi</i>	ATGCAATGGCAGTACCCTTC	60	4
	IMT2513	<i>yqi</i>	CTGGTGGCAACATCAAATTG	60	5
	IMT2558	221 pb cadena arriba de <i>yqi</i>	ATTACCGTCGGTTATATCGGC	52	6
	IMT2559	110 pb cadena debajo de <i>yqi</i>	ATAAACACAATATGGCGCTCG	50	7
15	IMT2910	<i>yqi</i> con <i>EcoRI</i>	CGGATACGAATTCATGATTACGCTTTTTTCGTT	59	8
	IMT2911	<i>yqi</i> con <i>HindIII</i>	TTCTCAAAGCTTTGTCGTTTCAGTTATAGTTTA	57	9
	IMT3045	operón de <i>yqi</i> con <i>BamHI</i>	CGGATACGGATCCATGTTAAAAAAAACATTGTT ATCTATGTTTCGCAAC	56	10
20	IMT3046	Operón de <i>yqi</i> con <i>HindIII</i>	TTCTCAAAGCTTTTCAGTTATAGTTTATTTTTTAC	53	11
	IMT1560	Vector de clonación pCR2.1 TOPO (-20)	GTAAAACGACGGCCAG		18
25				50	
	IMT1561	Vector de clonación pCR2.1 TOPO	CAGGAAACAGCTATGAC		19
30				50	
	IMT718	<i>Cat</i>	TTATACGCAAGGCGACAAGG	57,3	20
	IMT719	<i>Cat</i>	GATCTTCCGTACAGGTAGG	59,4	21
	IMT3138	Vector de expresión	AATGTGTGGAATTGTGAGCGG	60,6	22
35					
	IMT3139	pKESK-22 Vector de expresión	GCCGACATGATCCAACTGA	60,1	23
40					
	IMT3706	pKESK-22 <i>yqi</i>	AGTTAGGCTTTGTGGCGGAC	56,3	12
	IMT3707	<i>yqi</i>	GTTACCGTCTATCTCCT	53,6	13
	IMT3259	Operón de <i>yqi</i> con <i>XbaI</i>	CGGTACTCTGAATGTTAAAAAAAACATTGTTAT CTATGTTTCGCAAC	67,3	14
45	IMT3260	operón de <i>yqi</i> con <i>BamHI</i>	1TCTCGATCCTCAGTTTAGTTTATTTTTACGGGA TC	66,6	15

Tabla 3. Prevalencia de gen codificante de adhesina ExPEC I *yqi* entre cepas de *E. coli* patógenas y cepas *A_{fecal}* no patógenas

Grupo de <i>E. coli</i>	Aislados ensayados	Prevalencia de <i>yqi</i> (%)
APEC	406	54,4
UPEC	138	65,9
NMEC	25	60,0
SePEC	19	52,6
STEC	49	0,0
EHEC	46	0,0
EPEC	28	0,0
aEPEC	12	0,0
ETEC	8	0,0
EIEC	6	0,0
EAEC	4	0,0
Comensales/aislados (<i>A_{fecal}</i>)	159	19,4

APEC= *E. coli* patógena aviar, UPEC= *E. coli* uropatógena, NMEC= *E. coli* meningítica del neonato, SePEC=*E. coli* asociada con Septicemia, STEC=*E. coli* productora de Toxina Shiga, EHEC=*E. coli* Enterohemorrágica, EPEC=*E. coli* Enteropatógena, aEPEC=*E. coli* Enteropatógena Atípica, ETEC= *E. coli* Enterotoxigénica, EIEC=*E. coli* Enteroinvasiva, EAEC=*E. coli* Enteroagregativa.

Tabla 4. Valores de puntuación para gravedad de lesiones de órganos ± desviación típica en órganos respiratorios y otros.

Cepa	Puntuación media de órganos (Dosis infección: 10 ⁹ UFC)				
	Sacos aéreos	Pulmón	Hígado	Corazón	Bazo
IMT5155	2,0 ± 1,0	2,4 ± 0,9	0,8 ± 0,8	1,8 ± 1,3	1,0 ± 0,0
IMT5155Δ <i>yqi</i>	1,1 ± 0,7*	1,5 ± 0,6*	0,1 ± 0,3*	0,7 ± 0,8	0,9 ± 0,3
IMT11327	1,6 ± 0,5*	2,0 ± 0,5*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,5

Infección con IMT5155, IMT5155Δ*yqi* e IMT11327 a dosis de infección 10⁹ UFC. Las diferencias en puntuaciones de órganos entre IMT5155 e IMT5155Δ*yqi* y entre IMT5155 y el control negativo IMT11327 fueron estadísticamente significativas para sacos aéreos, pulmones e hígado con una $p < 0,05^*$.

LISTA DE SECUENCIAS

[0065]

- <110> Freie universitat Berlin
- <120> Identificación y Caracterización de una nueva adhesina fimbrial de *E. coli* patógena aviar (APEC)
- <130> p693709EP
- <150> US 61/241.069
- <151> 10-09-2009
- <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211>1050
- <212>
- ADN

ES 2 387 719 T3

<213> Escherichia coli cepa IMT5155
<400> 1

5 atgattacgc tttttcgttt actggcgatt ctttgccctgt tttttaacgt ttcagctttt 60
 gctgttgatt gctatcagga tgggtacaga ggaacaaccc tcataaatgg agatttacca 120
 gcgttcaaaa ttccagagaa cgcgcaacct gggcaaaaaa tttgggagag tggagatatt 180
 10 aatatcacgg tttattgtga caatgcacca ggatggacaa cagacaatcc atcagaaaat 240
 atctatgcct ggatcaaatt accccaaata aatagtgccg acatgttgaa taatccatat 300
 ttaacctttg gcgtgactta taatgggtga gattatgaag ggataaatga aagaattgat 360
 15 actcatgcat gcctggataa atatgagcaa tactataatg ggtattatta tgaccctgta 420
 tgcaatggca gtacccttca aaaaaatgta acatttaatg cccattttcg cgtctatgta 480
 20 aaattcaaaa gccgcccagc aggagatcag acggtgaact ttggcatagt caacgtgtta 540
 caattcgatg gcgaaggagg ggcaaacatg tcctctaacg cgaagaattt acgctatgtg 600
 attacgggat tagataatat ttcattcctt gactgtagtg tcgacgtccg gatttttcca 660
 25 gaaagccaga tagttaattt cgggcaaatt gctgcaaact ctattgctac ttatcgacca 720
 aaagctgcat ttagcgtatc tactataaaa gatgttgctg ccgattgtac cgagcaattt 780
 gatgttgcca ccagctttta tacgacagat acgttacatg atgatacgca tctggaaatg 840
 30 ggtaatgggt tgttgatgcg tattactgat caaaaaacac aagaagacat taagtttaat 900
 cagtacaac gcttcaccac atatattcca ggtcagactg gagcgatggt taccctgat 960
 35 taccaggctg aactttcaca aaaaccgggg gagactctcg tttatgggcc tttcaaaaaa 1020
 gatctcatcg taaaaataaa ctataactga 1050

40 <210>2
<211> 4975
<212> ADN
<213> Escherichia coli cepa IMT5155

45 <400> 2
 atgttaaaaa aaacattggt atctatgttc gcaaccgcat tgttatcagg cgttgctttt 60
 50 aacgctcttg ctgacgatgc taatcagggt tcaggtaaaa ttacttttaa aggtgaagtt 120

55

60

65

ES 2 387 719 T3

atcgatgcac cttgttctat tgctcctggt gatgaagatc agacaataaa cctcggtgaa 180
 gttgctgata ccgtattaaa aagcggtcag aaatcactgc ctgtagatgc caccattcat 240
 5 ttgcaggatt gtattttatc tgacggcact aacactgttg ataaagtcaa aatcaccttt 300
 agttctgcca gtgttgacgc taccgactcc aacctgctta aaaacactct ggaaggtaac 360
 atcggcggcg caactgatgt aggcgtacgt ctggtgaaat cagacaacac caacgtgact 420
 10 cttggcactc caatcactat caacttcccg acgactagct cttaccagga gttgaacttt 480
 aaagcccgta tggagtctct gggacgcacc gcgaccccgg gtaacgtgca ggcacaggct 540
 15 aattacgtac tcgactacaa gtaatcggtg gtcaatacct acacaacgcc aggcggtaaa 600
 gccgatgaaa tttcatcggc aactttgggc ctttttagaa atggattttt atgaacaata 660
 aaaacacgtt ttcccgggat aagttatccc atgcaattaa aaatgccctg tctggcgttg 720
 20 tgtgttccct actcttcggt ttgccagtcc acgccgtaga attcaacgtc gatatgattg 780
 acgcagaaga ccgtgagaat atcgacatct ctcgttttga gaaaaaggc tatatcccc 840
 ctggtagata cctcgttcgt gtgcaataaa ataaaaatat gttgccacaa acgttaatac 900
 25 tggaatgggt aaaagccgat aatgaaagtg gttcgttact ctgcttaacc aaagaaaatt 960
 tgactaattt cggctcttaat acggaattta ttgaatcatt gcaaaacata gctggcagcg 1020
 30 aatgtctcga ttttaagccaa cgtcaggagt taacgacacg acttgataaa gctacgatga 1080
 tattatcgct aagtgttccc caggcatggt taaaatacca ggcaacaaac tggacgccac 1140
 cagagttttg ggataccggt atcgccgggt ttatccttga ttacaacgtg tacgccagcc 1200
 35 agtatgcccc acatcacgga gacagcacc aaacgtcag ctctatggt acgttaggct 1260
 ttaacctcgg cgcattggcg ttacgtagcg attaccaata taatcagaat tttgctgatg 1320
 gacgctcggg aaaccgcgac agcgaatttg cgcgaactta tctgtttcgc cctatcccc 1380
 40 cctggtcgtc aaaattcact atgggccagt acgacctgag ctccaatctt tacgatacct 1440
 tccactttac tggcgcacg ctggaagtg atgaaagcat gctgccgcca gatttacagg 1500
 45 gttatgcgcc acaaattacc ggcacgcgc agaccaacgc gaaagtaact gtggcacaaa 1560
 atggtcgtgt actttatcaa accactgtcg cgccaggccc ttttactatt tctgatttgg 1620
 ggcaatcggt tcaggggctg ctggatgtca cagtggaaga agaagatggc cgaccagca 1680
 50 ccttccagggt tggctccgca tccattccct atttaaccg taaagggcaa gtgcgctata 1740
 aaacgtcact gggaaaaccg acatccgctg ggcataacga tatcaataat ccctttttct 1800
 55 ggacggcgga agcctcctgg ggctggctga acaatgtgtc gttgtatggt ggtggcatgt 1860
 tcaccgctga tgattatcag gctatcacta ccggtattgg ctttaacctt aaccaattcg 1920
 gttcgctttc ttttgatgtc actggagcag acgcgtcttt acagcaacaa aatagcggca 1980
 60 atctgcgtgg ttacagctat cgcttcaact atgcaaagca tttcgaatcg acaggcagtc 2040
 agattacctt cgcgggttat cgcttctcag ataaagatta cgtgtcgatg agtgggtacc 2100
 65 tcagctcgcg taatggcgat gagtcaaccg ataataaaaa agagagttat gtcatttcct 2160

ES 2 387 719 T3

tgaaccagta ctttgaaacg ctggaattaa actcttatct caacgttaca cgcaataactt 2220
 5 attgggacag cgccagcaat accaactact ccgtatctgt aagcaaaaac tttgatattg 2280
 gcgatttcaa aggtatatct gcatcgctgg cagtaagtcg aatccgctgg gatgacgacg 2340
 aagagaaatca atattacttc tctttctctc tacctttaca acaaaaaccgc aacatctcct 2400
 10 acagtatgca gcgaacggga agcagtaata cttcgcagat gatttcctgg tacgattcat 2460
 cagatcgcaa caatatctgg aatatttcag cgtcggcagc ggacgacaat atacgtgatg 2520
 gcgaaccaac actgcgcggc agctaccagc actattcgcc gtggggacgt ctgaacatta 2580
 15 atggcagtgat acagccgaat cagtacaatt ctgttaccgc aggctggtac ggttcaacta 2640
 ccgctacacg tcatggtatc gcccttcacg attatagcta tggcgataac gcccgcata 2700
 tggtcgatac cgatggcatc tccggcattg aaatcaactc taaccgtacc gttaccaacg 2760
 20 ggctgggcat cgccgtgata ccttcgttat cgaactacac cacctccatg ttgcggtga 2820
 acaataacga tctgccagaa ggtgtcgatg tcgaaaactc ggttattcgc accacgctca 2880
 25 cccaggggtgc catcggctac gcaaaaactga atgccaccac cggttaccaa atcgtcggcg 2940
 ttattcgtca ggaaaatggg cgcttccctc cactaggtgt gaatgtcacg gataaagcga 3000
 caggtaaaga tgtgggcctg gtcgcggaag acggcttcgt ttatctcagc ggtattcagg 3060
 30 aaaatagtac tctgcattta acctgggggtg ataatacctg tgaagtcacg ccgccaacc 3120
 aaagtaacat tagcgaaagc gcaataatth taccttghta aacagtcaaa taattcagga 3180
 tgaatataat gaaatcacca ttaatcacia caggaatgat ttgtttactg gggatctgca 3240
 35 actttgcccc ggcgactgtc tctcccgaca gaacacgcat ctttttaat gcttcgaata 3300
 aaagcgcaac ggttcgcctg accaaccaaa gtaaaatcga tccctatctg gctcagtcgt 3360
 40 ggattgaaga tgccagcggg aaaaaaacgc gtgattacat ctcgacattg ccgccgatgg 3420
 aacgtattga gcctgatgaa cagatacaaa ttcgcctgat ggcactggcc tcgttaaacg 3480
 acttaccaca ggaccgagaa acgttgttct actataacgt gcgagaaatt ccgccgcgcg 3540
 45 ccaaagaaca gaatgtaatg caaatcgcca tgcaaagccg cctgaagcta ttctggcggc 3600
 caaaagcgat tgagttaaaa gagggggaga tgattcctct gcaaaaagta acgattacc 3660
 gcaccgccgc cggctctgacc ctgaataacc cgacgcctca tcatattacc gtcggttata 3720
 50 tcggcactaa tggcaagaca ctgatccccg gtgcggacag tattatgggtg gtaccattta 3780
 cttctgcaac tcaacaccta agcagcctgc cctctacctt ccagttaggc tttgtggcgg 3840
 55 actacggcgg gctggagatg tttaaagtgc aatgtaattc catccaatcc ctctgcaaaa 3900
 gctctcctgc taagaagggg aaaatatgat tacgcttttt cgtttactgg cgattctttg 3960
 cctgtttttt aacgtttcag cttttgctgt tgattgctat caggatgggt acagaggaac 4020
 60 aaccctcata aatggagatt taccagcgtt caaaattcca gagaacgcgc aacctgggca 4080
 aaaaatttgg gagagtggag atattaatat cacggtttat tgtgacaatg caccaggatg 4140
 65 gacaacagac aatccatcag aaaatatcta tgcctggatc aaattacccc aaataaatag 4200

ES 2 387 719 T3

tgccgacatg ttgaataatc catatttaac ctttggcgtg acttataatg gtgtagatta 4260
 tgaagggata aatgaaagaa ttgatactca tgcatgcctg gataaatatg agcaatacta 4320
 5 taatgggtat tattatgacc ctgtatgcaa tggcagtacc cttcaaaaaa atgtaacatt 4380
 taatgccccat tttcgcgtct atgtaaaatt caaaagccgc ccagcaggag atcagacggt 4440
 10 gagctttggc atagtcaacg tgttacaatt cgatggcgaa ggaggggcaa acatgtcctc 4500
 taacgcgaag aatttacgct atgtgattac gggattagat gatatttcat tccttgactg 4560
 tagtgtcgac gtccggattt ttccagaaag ccagatagtt aatttcgggc aaattgctgc 4620
 15 aaactctatt gctacttadc gaccaaagc tgcatttagc gtatctacta taaaagatgt 4680
 tgctgccgat tgtaccgagc aatttgatgt tgccaccagc ttttatacga cagatacggt 4740
 acatgatgat acgcatctgg aaatgggtaa tggttttttg atgcgtatta ctgatcaaaa 4800
 20 aacacaagaa gacattaagt ttaatcagta caaacgcttc accacatata ttccagggtca 4860
 gactggagcg atggttaccg gtgattacca ggctgaactt tcacaaaaaac cgggggagac 4920
 25 tctcgtttat gggcctttca aaaaagatct catcgtaaaa ataaactata actga 4975

<211> 349

<212> PRT

<213> Escherichia coli cepa IMT5155

30

<400> 3

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

ES 2 387 719 T3

<212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400>5
 ctggggcaa catcaaattg 20

 10 <210>6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 6
 20 attacgctcg gttatatcgg c 21

 <210>7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 7
 30 ataacacaa tatggcgctc g 21

 <210>8
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 8
 40 cggatacga tcatgatta cgcttttcg tt 32

 <210>9
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 9
 ttctcaaaag cftgtcgtt cagttagt tta 33

 <210> 10
 55 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 10
 cggatacga tccatgtaa aaaaaacatt gttatctatg ttcgcaac 48

 65 <210> 11

ES 2 387 719 T3

<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 11
ttctcaaaag ctttcagtta tagtttatt ttacgatgag atc 43

10 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 12
20 agttaggctt tggggcgac 20

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
25 <213> artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 13
gttcaccgtc tatctcct 18

<210> 14
<211> 46
35 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador

40 <400> 14
cgggtactctg aatgttaaaa aaaacattgt tatctatggt cgcaac 46

<210> 15
<211> 36
45 <212> ADN
<213> artificial

<220>
50 <223> cebador

<400> 15
ttctcgatcc tcagtttagt ttatftttac gggatc 36

55 <210> 16
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 16

65

aatccctctg ccaagctct cctgctaaga aggggaaaat gtgtaggctg gagctgcttc 60
 ga 62

5 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 17
 taaatatgaa aatgccgggg tgtcccggc atttgctgt catatgaata tctccttag 60
 15 <210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 gtaaacgac ggccag 16
 25 <210> 19
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 35 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 20
 ttatacgcaa ggcgacaagg 20
 <210> 21
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 55 <223> cebador
 <400> 21
 gatctccgt cacaggtagg 20
 60 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>

ES 2 387 719 T3

<223> cebador

<400> 22

aatgtgtgga attgtgagcg g 21

5

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> cebador

<400> 23

gccgacatga tccaactga 19

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado para su uso en tratamiento o diagnóstico de enfermedades infecciosas, comprendiendo el ácido nucleico o consistiendo en:

- la secuencia de ácido nucleico del gen *yqi* con SEC ID N°: 1 o el complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1 o un complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 1 o con su complemento inverso.

caracterizado por que

la enfermedad infecciosa es una enfermedad asociada con infección de un vertebrado con bacterias APEC patógenas extraintestinales.

2. Ácido nucleico de la reivindicación 1, comprendiendo o consistiendo el ácido nucleico en:

- la secuencia de ácido nucleico del grupo del gen *yqi* con SEC ID N°: 2 o el complemento inverso de la misma;
- una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 2 o un complemento inverso de la misma; o
- una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico con SEC ID N°: 2 o con su complemento inverso.

3. Ácido nucleico de la reivindicación 1, comprendiendo o consistiendo el ácido nucleico en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEC ID N°: 1, 2, 4 a 15 o un complemento inverso de la misma.

4. Polipéptido aislado para su uso en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades infecciosas, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de una de las reivindicaciones 1 a 3, preferiblemente por la secuencia de ácido nucleico del gen *yqi* con SEC ID N°: 1 o por una secuencia de ácido nucleico con al menos 95% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 1; **caracterizado por que**

la enfermedad infecciosa es una enfermedad asociada con infección de un vertebrado con bacterias APEC patógenas extraintestinales.

5. Polipéptido de la reivindicación 4, comprendiendo o consistiendo el polipéptido en la secuencia de aminoácidos con SEC ID N°: 3.

6. Anticuerpo que es específico para un polipéptido de la reivindicación 4 ó 5 para su uso en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades infecciosas, **caracterizado por que** la enfermedad infecciosa es una enfermedad asociada con infección de un vertebrado con bacterias APEC patógenas extraintestinales.

7. Ácido nucleico y/o polipéptido de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en diagnóstico de una enfermedad infecciosa, comprendiendo el diagnóstico las etapas de:

- proporcionar una sonda;
- poner en contacto la sonda con un agente de unión que es específico para un ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 ó 3 y/o un polipéptido de la reivindicación 4 ó 5 en condiciones que permiten la unión específica del agente de unión con dicho ácido nucleico o polipéptido; y
- detección del agente de unión que se une específicamente al ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 ó 3 y/o el polipéptido de la reivindicación 4 ó 5.

8. Ácido nucleico y/o polipéptido de la reivindicación 7, en el que el agente de unión es un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 ó 3, un aptámero o un anticuerpo de la reivindicación 6 ó 7.

9. Uso de un ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 ó 3 y/o un polipéptido de la reivindicación 4 ó 5 en la preparación de una vacuna para su uso en profilaxis de un vertebrado contra infección con bacterias APEC.

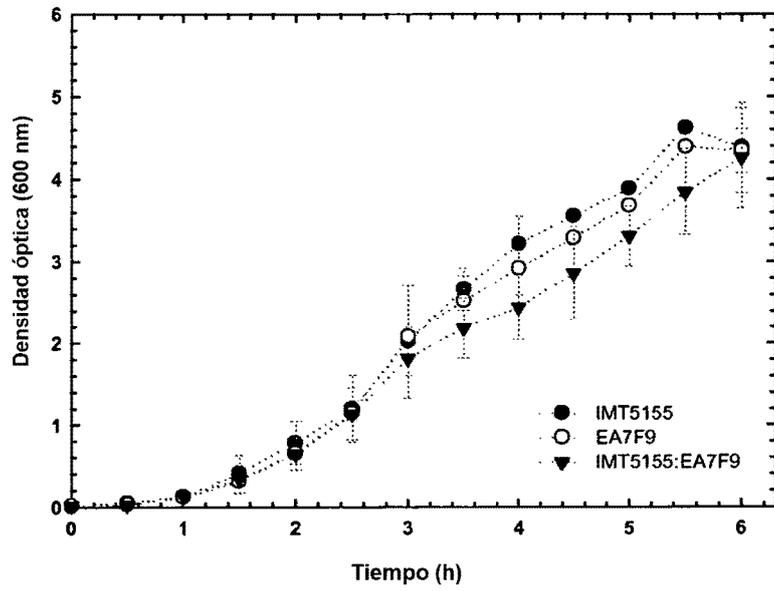


Figura 1

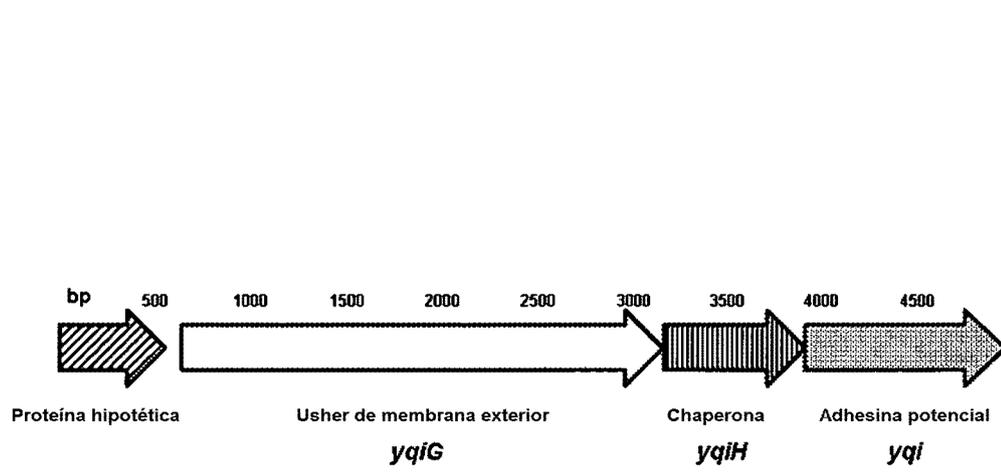


Figura 2

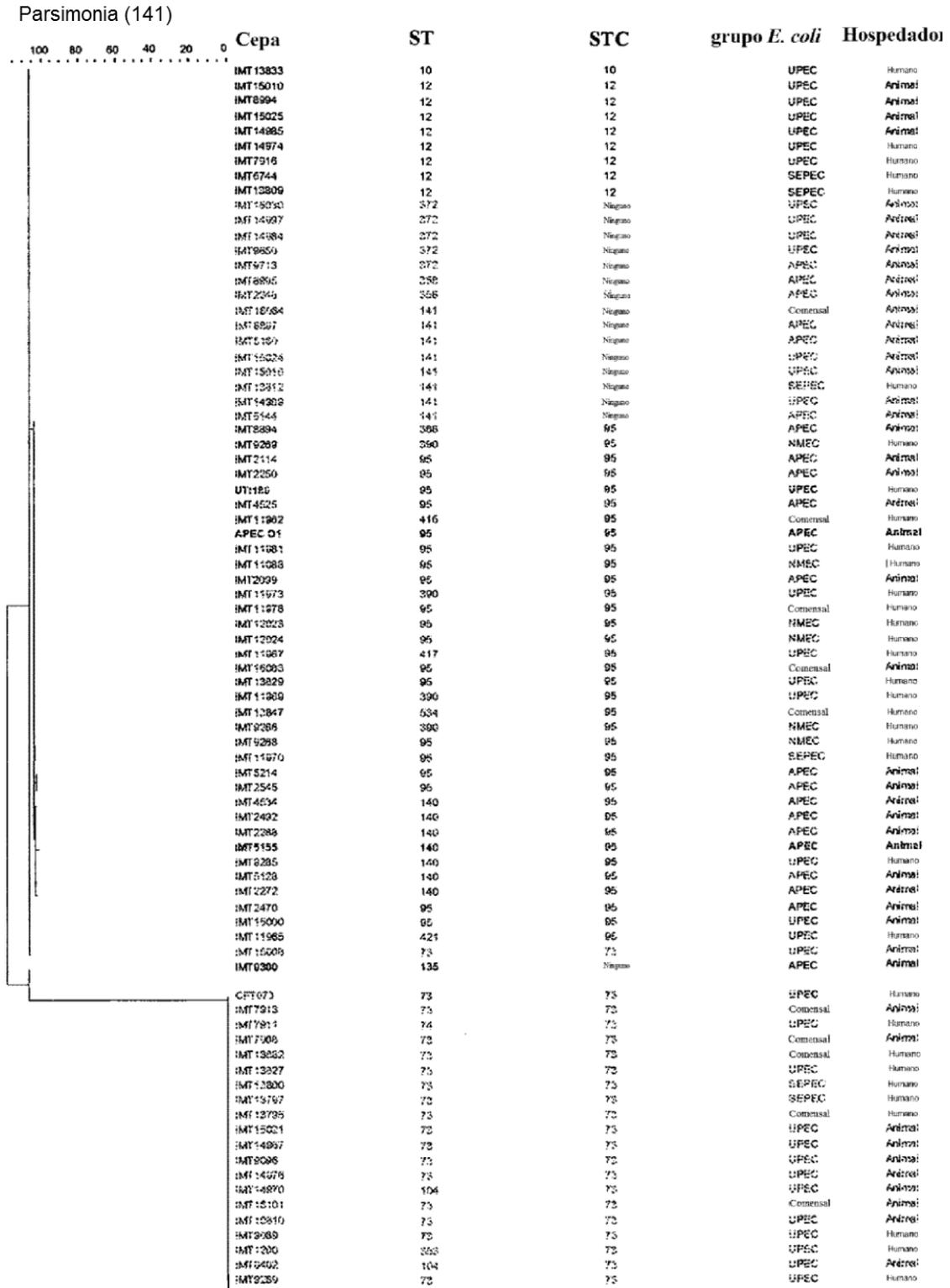


Figura 3

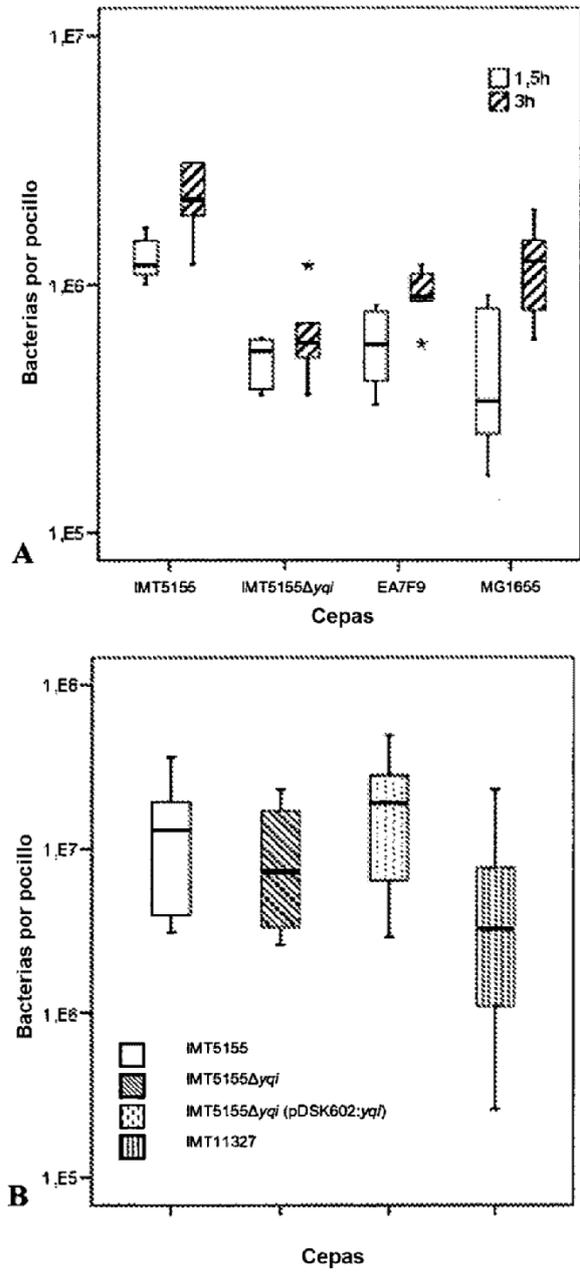


Figura 4

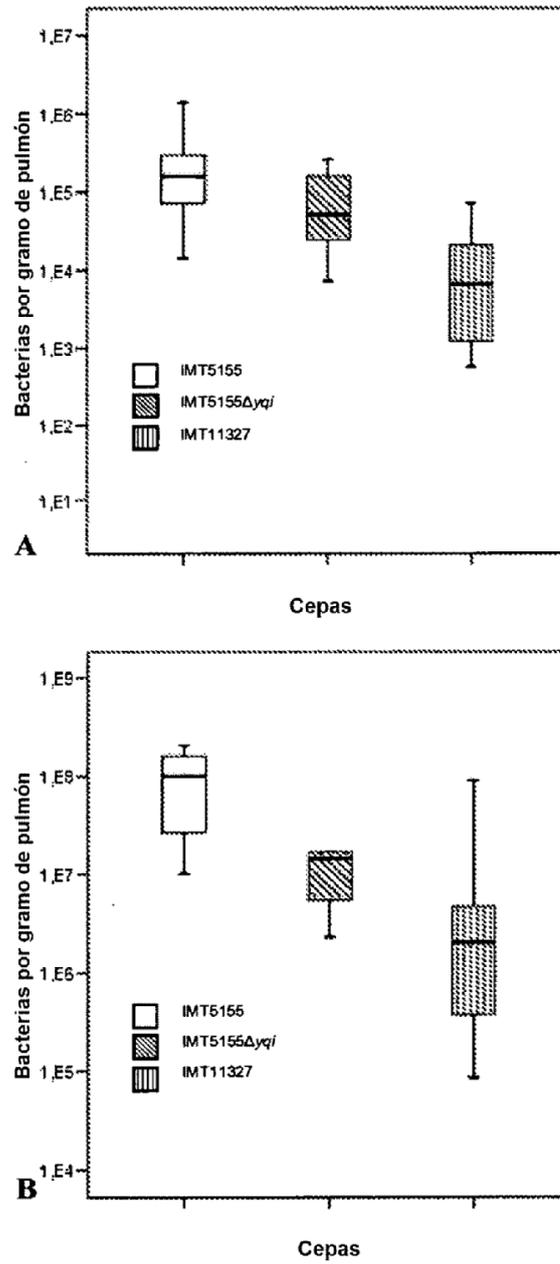


Figura 5

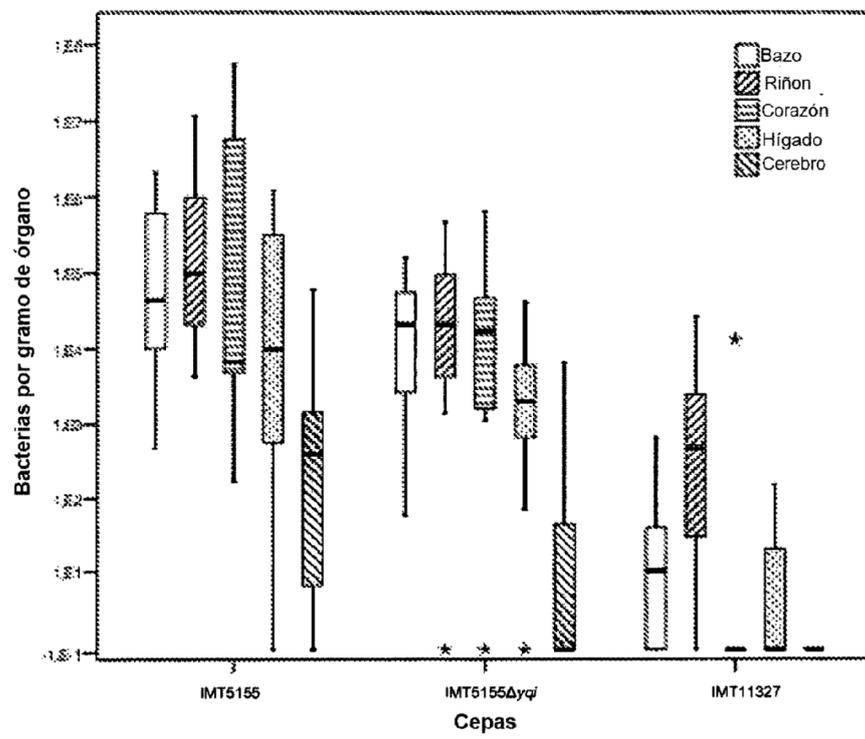


Figura 6

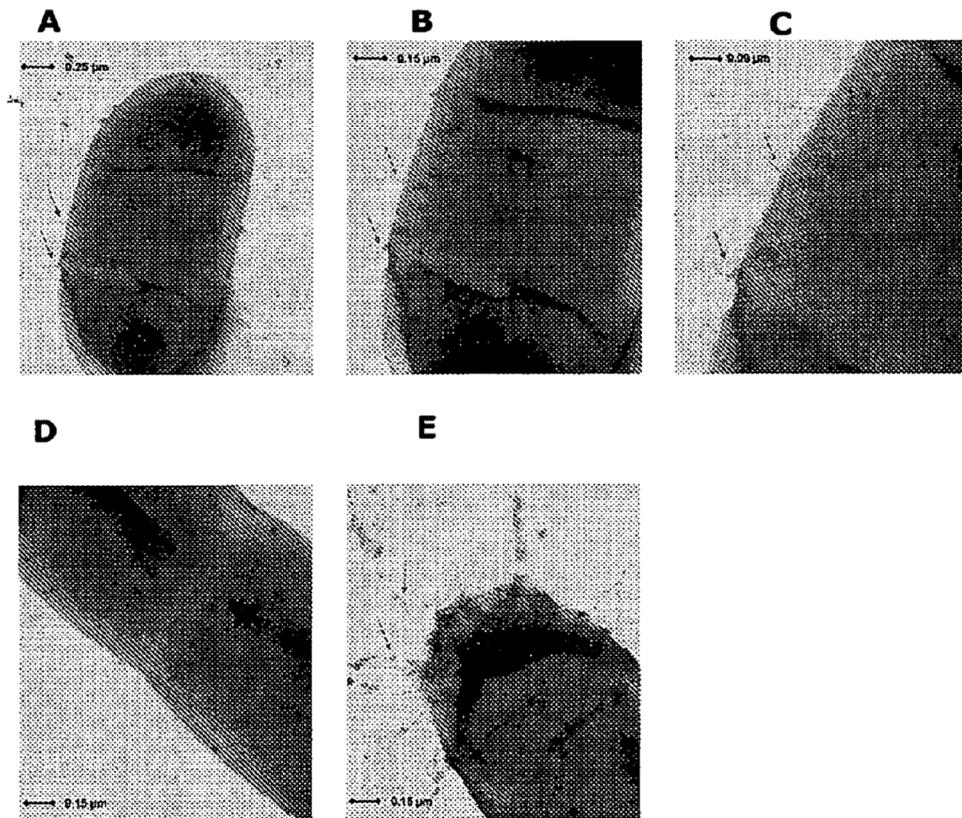


Figura 7