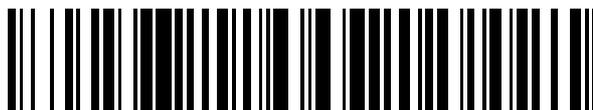


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 922**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2007 E 07819811 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2087095**

54 Título: **Cultivo in vitro de una especie de Helicobacter**

30 Prioridad:

14.11.2006 US 865723 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.09.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**BAELE, MARGOT y
HAESEBROUCK, FREDDY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 492 922 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

Cultivo *in vitro* de una especie de *Helicobacter*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los procedimientos y herramientas para el aislamiento y/o el cultivo *in vitro* de una especie de *Helicobacter*, más en concreto *Candidatus Helicobacter suis*. La invención se refiere además a la preparación de antígenos y vacunas de los cultivos de aislados de una especie de *Helicobacter*.

Antecedentes

Las infecciones de *Helicobacter pylori* en los humanos son una importante causa de úlcera gástrica y duodenal, así como de cáncer de estómago. La bacteria *H. pylori* no es la única especie de *Helicobacter* capaz de colonizar la mucosa gástrica humana. *Helicobacter heilmannii* (denominación propuesta) se ha encontrado en aproximadamente el 0,96% de las biopsias gástricas de los humanos (Heilmann y Borchard (1991) *Gut* 32, 137-140). Este microorganismo está estrechamente asociado a la gastritis, pero también está asociado a la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y al linfoma del tejido linfocítico asociado a la mucosa. Los resultados más recientes indican que *H. heilmannii* no es una única especie, sino que representa diferentes especies bacterianas con un aspecto helicoidal similar, la mayoría de las cuales tienen probablemente un origen zoonótico. La clasificación en *H. heilmannii* de tipo 1 y *H. heilmannii* de tipo 2 se estableció sobre la base de la secuencia de los genes del ARNr 16S (Solnick et al. (1993) *J. Infect. Dis.* 168, 379-385). Más del 50% de las infecciones de *H. heilmannii* en los humanos se deben a *H. heilmannii* de tipo 1 (Trebesius et al. (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39, 1510-1516). Se ha demostrado que *H. heilmannii* de tipo 1 es idéntico a *Candidatus H. suis* (O'Rourke et al. (2004) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2203-2211), una bacteria helicoidal hasta ahora incultivable que coloniza el estómago de más del 60% de los cerdos para matadero. La función real de *Candidatus H. suis* en la enfermedad gástrica de los cerdos es todavía un tema controvertido, pero se ha sugerido que esta bacteria está asociada a la úlcera gástrica del lado esofágico y con la gastritis pilórica crónica. La inoculación de esta bacteria en ratones se ha utilizado para aislarla de la mucosa del estómago del cerdo infectado (Dick et al. (1989) *J. Med. Microbiol.* 29, 55-62). En Hellemans et al. [(2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4530-4535] se modificó el modelo *in vivo* de ratón existente para la infección de *Candidatus H. suis*, con el objeto de evaluar la sensibilidad a los antibióticos que tiene este microorganismo. El cultivo *in vitro* de *Candidatus H. suis* no se ha conseguido todavía.

En la patente de los EE.UU. n.º US2001055787 se describe un medio de agar para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende el suero animal a una concentración de entre aproximadamente el 8% y el 12% del volumen final del medio de agar, en donde dicho medio se encuentra a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,25.

En Pickering et al. (1989) *Infect. Immunol.* 57, 1235-239 se describe el cultivo de *Ureaplasma urealyticum* en un agar a pH 5,5, que comprende suero de caballo al 20 %.

En Hellemans et al. (2006) *Vaccine* 24 (14), 2469-2476 se hace referencia a los procedimientos de inmunización cruzada contra *Helicobacter*, en donde los homogeneizados de estómago que comprenden *Candidatus Helicobacter suis* se utilizan para infectar animales.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de sistemas de cultivo que permiten el aislamiento y el cultivo de una especie de *Helicobacter*, más en concreto de *Candidatus Helicobacter suis*, que previamente no se había demostrado que se pudiera mantener como un aislado *in vitro*.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un recipiente del cultivo que comprende un medio de cultivo sólido, que comprende sangre entre el 7,5% y el 15% o suero entre el 12,5 y el 25%, en donde el medio sólido está ajustado a un pH entre 5,0 y el 5,5 para el aislamiento y/o cultivo de una especie de *Helicobacter*.

En una realización específica, el componente sólido comprende nutrientes para el crecimiento del microorganismo de cultivo exigente. Más en particular, estos nutrientes se seleccionan del grupo de medio para *Brucella*, medio de Mueller-Hinton o el medio de infusión cerebro-corazón.

En un segundo aspecto, la presente invención da a conocer procedimientos para el aislamiento de una especie de *Helicobacter*, más en concreto *Candidatus Helicobacter suis*, de una muestra que comprende la misma especie de *Helicobacter*, en donde dichos procedimientos comprenden las etapas de cultivar la muestra que comprende la especie de *Helicobacter* en un sistema de cultivo que comprende un medio de cultivo que tiene un pH entre 5,0 y 6,0, que se complementa con suero a al menos el 10% o sangre a al menos el 7,0%.

En realizaciones específicas de estos procedimientos, el medio de cultivo utilizado comprende nutrientes para el

crecimiento de la bacteria de cultivo exigente. Más específicamente, los nutrientes para el crecimiento de la bacteria de cultivo exigente se seleccionan del grupo que consiste en nutrientes para *Brucella*, de Mueller-Hinton o de infusión cerebro-corazón. Adicionalmente o de manera alternativa, en realizaciones específicas, el medio de cultivo comprende al menos una sustancia selectiva que inhibe el crecimiento de hongos y/o microorganismos grampositivos y/o gramnegativos diferentes a la especie de *Helicobacter* a cultivar. En otras realizaciones específicas, la al menos una sustancia selectiva se selecciona del grupo que consiste en: vancomicina, lactato de trimetoprima, polimixina B, cefsulodina, colistina, amfotericina B, violeta de genciana, nistatina y nisina.

En realizaciones específicas de los procedimientos de la presente invención descritos en la presente memoria, el medio de cultivo que comprende suero a al menos el 10% comprende suero entre el 12,5 y el 25 %. Otra alternativa es que el medio de cultivo que comprende sangre a al menos el 7,0% comprenda sangre entre el 7,5 y el 15%, más en particular entre el 10 y el 15%.

Optativamente, el medio de cultivo utilizado en los procedimientos de la presente invención comprende además uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo de vitamina B12, L-glutamina, adenina, guanina, ácido p-aminobenzoico, L-cistina, NAD (coenzima 1), cocarboxilasa, nitrato férrico, tiamina e hidrocloreuro de cisteína.

En una realización específica de los procedimientos de la invención descritos en la presente memoria, se utiliza un sistema de cultivo que comprende un componente sólido y uno líquido, en donde al menos el componente sólido comprende el medio de cultivo que se describe más arriba. En otras realizaciones, el componente sólido y/o el componente líquido comprende nutrientes para el crecimiento de la bacteria de cultivo exigente. Más específicamente, estos nutrientes se seleccionan del grupo que consiste en nutrientes para *Brucella*, de Mueller-Hinton o de infusión cerebro-corazón.

En otra realización específica de los procedimientos de la invención, el componente sólido y/o líquido de los sistemas de cultivo comprende al menos una sustancia selectiva que inhibe el crecimiento de hongos y/o microorganismos grampositivos y/o gramnegativos diferentes a la especie de *Helicobacter* a cultivar. Más en particular, la al menos una sustancia selectiva se selecciona del grupo que consiste en: vancomicina, lactato de trimetoprima, polimixina B, cefsulodina, colistina, amfotericina B, violeta de genciana, nistatina y nisina.

Otras realizaciones específicas de los procedimientos de la invención utilizan sistemas de cultivo que comprenden un componente sólido y uno líquido, en donde el componente sólido comprende suero entre el 12,5 y el 25% o sangre entre el 7,5 y el 15%, más particularmente entre el 10 y el 15%.

Otras realizaciones específicas de los procedimientos de la invención utilizan sistemas de cultivo que comprenden un componente sólido y uno líquido como se describe más arriba, en donde el componente sólido y/o líquido comprende además uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo de vitamina B12, L-glutamina, adenina, guanina, ácido p-aminobenzoico, L-cistina, NAD (coenzima 1), cocarboxilasa, nitrato férrico, tiamina e hidrocloreuro de cisteína.

Los procedimientos de la presente invención son particularmente adecuados para el aislamiento de *Candidatus Helicobacter suis*. De hecho, la presente invención da a conocer, por primera vez, un procedimiento para obtener un aislado de *Candidatus Helicobacter suis* libre de los hongos o de las bacterias presentes en el estómago.

En consecuencia, un segundo aspecto de la presente invención da a conocer aislados de *Candidatus Helicobacter suis*, en donde la secuencia del gen del ARNr 16S de *Helicobacter suis* tiene al menos una identidad de secuencia del 99% con la secuencia del gen del ARNr 16S del número de acceso de GenBank AF127028 (de noviembre de 1999) descrito en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1, libre de las bacterias u hongos presentes en el estómago, que se puede obtener por los procedimientos de más arriba y que están libres de los hongos o bacterias presentes en el estómago. Tales aislados, que se muestran aquí por primera vez, se pueden obtener por los procedimientos de la presente invención.

Un tercer aspecto de la presente invención da a conocer procedimientos para el cultivo de aislados de la especie de *Helicobacter*, en donde dichos procedimientos comprenden la etapa de aplicar el aislado de *Helicobacter* en un sistema de cultivo que comprende un medio de cultivo que tiene un pH entre 4,0 y 7,0 que está complementado con suero a al menos el 10% o con sangre a al menos el 7,5%, e incubar el aislado en éste.

En las realizaciones específicas de los procedimientos de acuerdo con este aspecto de la invención, el sistema de cultivo utilizado comprende un componente sólido y uno líquido, y al menos el componente sólido de este sistema de cultivo comprende el medio de cultivo descrito más arriba.

En otras realizaciones específicas de estos procedimientos de cultivo dadas a conocer en la presente invención, el componente sólido y el componente líquido comprenden nutrientes para el crecimiento de bacterias de cultivo exigente.

En realizaciones específicas, al menos el componente sólido del sistema de cultivo utilizado en los procedimientos de cultivo de la presente invención está tamponado a un pH entre 4,7 y 7,0.

5 En la presente memoria se describen recipientes de cultivo que comprenden un medio de cultivo sólido para el aislamiento y/o cultivo de la especie de *Helicobacter*, en donde el medio sólido comprende: nutrientes para el crecimiento de microorganismos de cultivo exigente, sangre a una concentración entre el 7,5% y 15%, o suero a una concentración entre el 12,5% y el 25%, y al menos una sustancia selectiva que inhibe el crecimiento de los hongos.

10 Aún otro aspecto más de la presente invención da a conocer vacunas que comprenden una preparación de antígenos de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*. De hecho, la presente invención da a conocer procedimientos para producir preparaciones de antígenos de *Candidatus Helicobacter suis*, en donde dichos procedimientos comprenden el aislamiento y, optativamente, el cultivo de *Candidatus Helicobacter suis* de acuerdo con los procedimientos descritos más arriba y la producción de una preparación de antígenos a partir del aislado obtenido de *Candidatus Helicobacter suis*.

15 Adicionalmente, la presente invención da a conocer vacunas que comprenden *Candidatus Helicobacter suis* atenuado, pero vivo, y/o *Candidatus Helicobacter suis* entero, pero muerto, y los procedimientos para preparar tales vacunas que comprenden el aislamiento y, optativamente, los procedimientos de cultivo descritos más arriba.

En la presente memoria se describen procedimientos para vacunar un animal contra la infección por *Candidatus Helicobacter suis*, en donde dichos métodos comprenden la administración al animal de una vacuna que comprende una o varias preparaciones de antígenos de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*, *Candidatus Helicobacter suis* atenuado pero vivo, y/o *Candidatus Helicobacter suis* entero.

20 De igual forma, la presente invención contempla el uso de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*, que se puede aislar y/o cultivar mediante los procedimientos descritos en la presente memoria, o el uso de preparaciones de antígenos obtenidas a partir de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*, para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de una infección por una especie de *Helicobacter*. Más en particular, se contempla el uso de una preparación de *Candidatus Helicobacter suis* para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de una infección por una especie de *Helicobacter*, más en concreto para la inmunización contra *Candidatus Helicobacter suis*.

Breve descripción de las figuras

30 En la figura 1 se muestra una secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de *Helicobacter suis* de n.º de acceso de GenBank AF127028 tal y como se envió el 17 de noviembre de 1999. El mismo dibujo también se muestra en la SEQ ID n.º 7.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con referencia a determinadas realizaciones, pero la presente invención no está limitada por éstas sino sólo por las reivindicaciones.

35 La terminología *Candidatus Helicobacter suis* (o *Candidatus H. suis* o *H. suis*) tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una bacteria que se conocía anteriormente como *Helicobacter heilmannii* de tipo 1 (Trebesius et al., (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39, 1510-1516). Ahora se acepta que *H. heilmannii* de tipo 1 es idéntica a *Candidatus H. suis* (O'Rourke et al., (2004) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2203-2211; De Groote et al. (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1769-1777), una bacteria con forma helicoidal que coloniza el estómago de más del 60% de los cochinos para matadero. *Candidatus Helicobacter suis* también se define a nivel molecular como la especie de *Helicobacter* que tiene una secuencia de ARNr 16S de n.º de acceso de GenBank AF 127028 [SEQ ID n.º 7 y figura 1] (De Groote et al., (1999) citada más arriba) y AF506788-92 (O'Rourke et al., (2004) citada más arriba) y una secuencia del gen de la ureasa como la descrita en el n.º de acceso de GenBank AF508013-AF508014 (O'Rourke et al., (2004) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2203-2211).

45 La terminología «aislado», tal y como se utiliza en la presente memoria, es un cultivo *in vitro*, homogéneo y puro procedente de una población silvestre y heterogénea de microorganismos.

La terminología «recipientes de cultivo», tal y como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a un recipiente adecuado para cultivar microorganismos, tales como, pero sin limitarse a ellos, placas de Petri, matraces de cultivo, botellas rodantes y factorías celulares.

50 La terminología «preparación de antígenos», tal y como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a una composición que comprende al menos una proteína o fragmento de la misma que provoca una respuesta inmunitaria (de aquí en adelante denominada «antígeno») cuando se administra a un animal.

La terminología «vacuna» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una composición, tal como una

preparación de antígenos descrita más arriba, para la administración a un animal o humano con el objeto de estimular una respuesta inmunitaria en el animal o en el humano dirigida contra un microorganismo que ocasiona una enfermedad, para proteger al animal o al humano de la afección o enfermedad ocasionada por dicho microorganismo. Las vacunas pueden comprender los microorganismos que ocasionan la enfermedad enteros (muertos o debilitados), o partes de tales microorganismos, o moléculas sintéticas que corresponden a todo o a parte de tales microorganismos. La terminología vacuna abarca tanto las composiciones utilizadas para el uso preventivo, a saber, para la administración al animal o al humano antes de la infección, con la intención de impedir la infección inicial (y/o recurrente), y composiciones para el uso terapéutico, a saber, para la administración al animal o al humano después de la infección con la intención de reducir o detener la progresión de la enfermedad ocasionada por el microorganismo.

El procedimiento de vacunar por medio de antígenos de una especie se utiliza para proteger contra la enfermedad ocasionada por el uso de otra especie se denomina «vacunación cruzada» o «vacunación heteróloga».

La terminología «material gástrico» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier material obtenido directa o indirectamente del tubo digestivo de humanos o de otros animales. Tales materiales incluyen, por ejemplo, epitelio gástrico, mucosa gástrica y líquidos digestivos.

La terminología «medio» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una composición líquida, sólida o semisólida adecuada para el crecimiento de microorganismos.

La terminología «organismos de cultivo exigente» se utiliza en la presente memoria de acuerdo con su significado estándar en bacteriología, a saber, se refiere a las bacterias que tienen requisitos nutricionales complejos [Diccionario Médico de Stedman].

Un primer aspecto de la invención da a conocer procedimientos *in vitro* para aislar y/o cultivar la especie de *Helicobacter*, en particular *Candidatus Helicobacter suis*. El aislamiento *in vitro* de *H. suis* todavía no se ha descrito hasta la fecha. La presente invención da a conocer los procedimientos que permiten el crecimiento selectivo de la especie de *Helicobacter*, más en concreto *Candidatus Helicobacter suis*.

Las condiciones del crecimiento selectivo para *Candidatus Helicobacter suis* se han conseguido mediante la combinación de concentraciones elevadas de sangre o suero y la provisión de condiciones de pH óptimas. Las condiciones de pH que son beneficiosas para el crecimiento de la especie de *Helicobacter* son, al mismo tiempo, perjudiciales para una serie de bacterias que no sean *Helicobacter* y hongos. Al aplicar un pH bajo se reduce la contaminación, lo que permite la expansión de *Candidatus Helicobacter suis*.

En los procedimientos de aislamiento de la presente invención, una muestra que comprende la especie de *Helicobacter* se cultiva en un medio cuyo pH se ajusta a un valor entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. Este ajuste del pH se puede realizar mediante la adición de un ácido concentrado a los nutrientes del medio, lo que le proporciona una capacidad de tamponamiento suficiente por la presencia de aminoácidos que actúan como iones dipolares. Otra alternativa es que se añadan al medio de cultivo los tampones biocompatibles con una alta capacidad de tamponamiento alrededor de pH de 5,0 a 5,5 (tal como acetato, fosfato). Resultó sorprendente hallar que el aislamiento de *Candidatus Helicobacter suis* a valores de pH entre 5,0 y 6,0 dio lugar a bacterias helicoidales móviles, mientras que fuera de esta región de pH, *Candidatus H. suis* aparece como formas inmóviles y con aspecto de cocos. Tal y como se explica más adelante en detalle en los ejemplos, el efecto del pH sobre *Candidatus H. suis* cambia un poco con los pasos posteriores. Así pues, se ha logrado aislar *Candidatus H. suis* a un pH entre 5,0 y 6,0.

De acuerdo a una realización, los procedimientos de la presente invención comprenden la aplicación de una muestra que contiene *Helicobacter*, más en concreto *Candidatus H. suis*, a un sistema de cultivo, que es un sistema de cultivo de dos componentes, que comprende un componente sólido y un componente líquido (o semilíquido), mediante lo cual la muestra se proporciona en el componente líquido. Típicamente, el componente sólido comprende agar y el componente líquido es un caldo que comprende al menos nutrientes. Se ha observado que en tales sistemas de cultivo, el aislado de *Helicobacter* permanece en la fracción líquida y que se puede subcultivar transfiriéndolo a otro componente sólido. Cuando se utiliza un sistema de dos componentes en los procedimientos de aislamiento de la presente invención, al menos el componente sólido tiene un pH entre 5,0 y 6,0.

El medio de cultivo en los procedimientos de aislamiento de la presente invención comprende concentraciones elevadas de sangre (entre el 7,5% y el 25%) o un componente de la sangre tal como suero (entre el 12,5% y el 30%). A menos que se indique de otra manera, la concentración de suero y de sangre son porcentajes de volumen (v/v) en el medio. En determinadas realizaciones, la concentración de suero en el medio está entre el 12,5% y el 25%, lo que incluye concentraciones tales como 12,5%, 15%, 17,5%, 20% y 25%. En otras realizaciones concretas, la concentración de la sangre en el medio está entre el 7,5% y el 25%, más en particular entre el 8% y el 20%, en especial entre el 9% y el 15%, lo que incluye concentraciones tales como 9,5%, 10% y 12,5%. Cuando se utiliza un sistema de cultivo de dos componentes, al menos el componente sólido, pero optativamente también el componente líquido del sistema de cultivo, debe contener la concentración especificada de suero o sangre.

El suero presente en el medio de cultivo utilizado en el contexto de la presente invención puede ser suero de feto, de recién nacido o de adulto de diferentes especies de animales, tales como, pero sin limitarse a ellas, ganado vacuno, caballo, oveja, cabra o cerdo, más en particular suero de caballo, o una combinación de los mismos. Típicamente, el suero contiene, entre otros, proteínas fijadoras de hierro, tales como albúmina y transferrina, que proporcionan hierro a *Helicobacter*. También se pueden utilizar sustitutos adecuados del suero o de la sangre que contienen tales componentes esenciales de los mismos.

Para los procedimientos de la presente invención resultan adecuados diferentes tipos de sangre, tales como, pero sin limitarse a ellos, sangre de ganado vacuno, caballo, oveja, cabra o cerdo. En determinadas realizaciones, la concentración de la sangre en el medio está entre el 7,5% y el 15%, lo que incluye concentraciones de sangre tales como del 10% y del 12,5%.

De acuerdo con una realización concreta, el medio de cultivo utilizado en los procedimientos de aislamiento iniciales de la presente invención comprende además sustancias antimicrobianas que además aseguran el crecimiento selectivo de *Helicobacter*. Tales sustancias antimicrobianas incluyen antibacterianos y antimicóticos, que limitan o inhiben el crecimiento de las bacterias que no sean *Helicobacter* o la levadura potencialmente presente en la muestra. Cuando se utiliza un sistema de dos componentes, estos agentes antimicrobianos están presentes al menos en el componente sólido y optativamente también en el componente líquido o semilíquido.

En determinadas realizaciones, el medio de cultivo utilizado en la presente invención comprende uno o varios antibióticos que inhiben el crecimiento de hongos y/o microorganismos grampositivos y/o gramnegativos diferentes de la especie *Helicobacter* a cultivar. Ejemplos de tales antibióticos son vancomicina, lactato de trimetoprima, polimixina B, cefsulodina, colistina, amfotericina B, violeta de genciana, nistatina y nisina. Una composición antibiótica disponible en el mercado que es adecuada para los procedimientos de la presente invención es, por ejemplo, complemento de Skirrow (Oxoid) que da lugar a una concentración final en el medio de 10 mg/ml de vancomicina, 5 mg/l de lactato de trimetoprima y 2500 UI/l de polimixina B. Otros compuestos antibióticos son, por ejemplo, compuestos antimicóticos tales como la amfotericina B (Fungizone®).

Una vez que se ha obtenido un aislado de *Helicobacter*, tal como *Candidatus H. suis*, se puede seguir cultivando en las condiciones de cultivo descritas más arriba para los procedimientos de aislamiento de la presente invención. Sin embargo, se ha observado que se puede cultivar un cultivo aislado en un intervalo de pH más amplio, a saber, entre 4,0 y 7,0. El pH es más decisivo para el procedimiento de aislamiento, ya que a un pH por encima de 6,0 los contaminantes presentes en las muestras de estómago recién aisladas (otras bacterias y hongos) harán crecer el *Helicobacter* presente en la muestra, lo que es perjudicial para el aislamiento. Sin embargo, se ha observado que los aislados de *Candidatus H. suis* que contienen menos contaminantes se pueden hacer crecer a un pH de incluso 7,0. En consecuencia, la presente invención da a conocer además procedimientos de cultivo para aislados de *Helicobacter*, más en concreto de *Candidatus H. suis*, tal y como se describe más arriba, en donde el pH del medio de cultivo está entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0, en particular entre (y estos valores incluidos) aproximadamente 4,7 y 6,0.

Los antibióticos y antimicóticos descritos más arriba son especialmente adecuados para el procedimiento de aislamiento en el que están presentes en una muestra diferentes bacterias y hongos. Sin embargo, una vez que se obtiene un aislado puro, el cultivo se puede lograr con menos antibióticos o antimicóticos, o sin ellos, en el medio de cultivo.

En determinadas realizaciones de los procedimientos de aislamiento y/o cultivo de la presente invención, el medio de cultivo comprende además otros factores de crecimiento. Una mezcla comercial de factores de crecimiento se vende, por ejemplo, con el nombre de Vitox (Oxoid). La concentración final de los factores de crecimiento de esta composición comercial en un medio de crecimiento (agar o caldo) son vitamina B12 (0,5 mg/l), L-glutamina (50,0 mg/l), adenina (5,0 mg/l), guanina (0,15 mg/l), ácido p-aminobenzoico (0,65 mg/l), L-cistina (5,5 mg/l), NAD coenzima 1 (1,25 mg/l), cocarboxilasa (0,5 mg/l), nitrato férrico (0,1 mg/l), tiamina (0,015 mg/l) e hidrocloreuro de cisteína (130,0 mg/ml). Cuando se utiliza un sistema de dos componentes, los factores de crecimiento pueden estar presentes en el componente sólido, o bien en el componente líquido, o en ambos. De acuerdo con una realización particular, los factores de crecimiento se añaden al componente sólido.

Típicamente, el medio utilizado en los procedimientos de aislamiento y/o cultivo de la presente invención contiene nutrientes para el crecimiento de microorganismos de cultivo exigente. Estos nutrientes se suministran típicamente mediante la adición de medios tales como, pero sin limitarse a ellos, el medio para *Brucella*, el medio de Mueller-Hinton, infusión cerebro-corazón de cerdo y de bovino, y los medios equivalentes, tal como, pero sin limitarse a ellos, agar de Columbia y agar de soja triptica. El medio para *Brucella* típicamente comprende en 1 l del medio 10 g de hidrolizado pancreático de caseína, 10 g de digestión péptica de tejido animal, 1 g de dextrosa, 2 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y 0,1 g de bisulfito de sodio. En la presente memoria, las peptonas proporcionan el nitrógeno orgánico. El extracto de levadura es una fuente potente de las vitaminas B. La dextrosa se utiliza como fuente de energía. El medio de Mueller-Hinton comprende típicamente en 1 l de medio 2 g de infusión de carne, 17,5

g de hidrolizado de caseína y 1,5 g de almidón. Tales medios están disponibles en el mercado de compañías tales como Difco y Oxoid.

La presente invención da a conocer procedimientos para el aislamiento y/o cultivo de una especie de *Helicobacter*, lo que permite el aislamiento y cultivo de un aislado de *Helicobacter* verdadero, más en concreto un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*. Sin embargo, se sabe que existen otros factores que influyen en el enriquecimiento de la especie de *Helicobacter*. Tales factores incluyen el modo en el que se obtiene la muestra que comprende la especie de *Helicobacter*, más en particular, el modo en el que el estómago y la pared del estómago se tratan tras la retirada del material gástrico para disminuir al mínimo la contaminación con otros microorganismos.

En consecuencia, determinadas realizaciones de los procedimientos de aislamiento de la presente invención comprenden además una primera etapa en la que se proporciona una muestra de material gástrico que comprende la especie de *Helicobacter*, en las condiciones específicas. En una realización, una parte de la pared del estómago se incuba en condiciones ácidas que destruyen un número considerable de microorganismos sensibles al ácido. En otra realización concreta, la pared del estómago se procesa aislando sólo la mucosidad de la superficie del estómago.

El medio utilizado en los procedimientos de cultivo y/o aislamiento de la presente invención comprenden optativamente uno o varios componentes más.

En determinadas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el medio de cultivo comprende además carbón activo. Cuando se utiliza un sistema de dos componentes, el carbón activo está típicamente presente al menos en el componente sólido.

En determinadas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el medio de cultivo comprende además un indicador de pH biocompatible cuyo color cambia a un pH entre 5,5 y 6,0. Por ejemplo, se podría utilizar el rojo fenol que se vuelve amarillo por debajo de pH 6,6 y rojo por encima de pH 8. Tales indicadores son especialmente útiles en la placas que comprenden suero. Típicamente, en un sistema de dos componentes, tal indicador del pH está presente en el componente sólido.

En determinadas realizaciones, los procedimientos de aislamiento y/o los procedimientos de cultivo de la presente invención comprenden la aplicación de una muestra que comprende una especie de *Helicobacter* en un sistema de dos componentes, en donde el componente sólido comprende nutrientes, factores de crecimiento y antibióticos, y se ajusta a un valor de pH entre 4,7 y 7,0 (o más en particularmente entre 5,0 y 6,0), mientras que el componente líquido sólo comprende nutrientes sin que se haya ajustado del pH. Optativamente, el pH del componente líquido se ajusta a un valor de pH entre 4,7 y 7,0 (o más en particular, entre 5,0 y 6,0) y/o el componente líquido también comprende factores de crecimiento y antibióticos.

Se pueden considerar determinadas configuraciones prácticas para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención. Típicamente, el aislamiento y el cultivo se lleva a cabo en matraces de cultivo o en placas de Petri. En determinadas realizaciones, los procedimientos implican un sistema de dos componentes por medio del cual el componente sólido cubre todo el fondo del recipiente de cultivo (con un grosor típico de entre 1 mm y 5 mm) y el componente líquido o semilíquido se extiende sobre toda o una parte de la superficie del componente sólido.

En una realización muy concreta, el aislamiento se consigue en un recipiente de tipo placa de Petri con un diámetro de 10 cm que comprende entre aproximadamente 5 y 15 ml de un agar sólido con la composición que se describe más arriba. En la parte superior del agar se añaden a modo de componente líquido entre aproximadamente 500 y 1000 µl de caldo líquido.

En otra determinada realización, el sistema de dos componentes que se utiliza comprende una base de agar que no lleva nutrientes, ni suero ni otros aditivos, pero que comprende un tampón a pH 5. En la parte superior de esta base de agar se aplica un agar superior que contiene todos los ingredientes necesarios para el cultivo de *Candidatus Helicobacter suis*. Gracias a este tampón se utiliza un mínimo de ingredientes caros, mientras que el pH del agar superior se mantiene estable por la presencia de la base de agar subyacente.

Los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar para el aislamiento y/o cultivo de la especie de *Helicobacter*, más en concreto de *Candidatus Helicobacter suis*. Típicamente, en los procedimientos de la presente invención, la muestra del material gástrico se incuba en el sistema de cultivo durante un tiempo entre 1 y 15 días, según el grado de contaminación con microorganismos y la utilización de nutrientes del medio. Cuando se utiliza un medio sólido, una señal agotamiento del medio es típicamente la aparición de áreas translúcidas en el medio sólido. Adicionalmente o de forma alternativa, se puede valorar la movilidad de la especie de *Helicobacter* en el medio líquido, mediante lo cual una reducción de la movilidad es indicativa de un agotamiento del medio. Adicionalmente o de forma alternativa, el aislado bacteriano se puede transferir a una placa recién preparada cuando el pH del medio de cultivo (o el componente sólido y/o líquido) se incrementa a un valor de pH de 6,0 o más.

Típicamente, los procedimientos de la presente invención implican la incubación de muestras que comprenden la especie de *Helicobacter* o los aislados de la especie de *Helicobacter* a 37 °C. Se encontró que por debajo de 25 °C o por encima de 40 °C no se produce ningún crecimiento de la bacteria *Helicobacter*. Por lo general, las placas con la especie de *Helicobacter* se hacen crecer en las condiciones microaerobias, a saber, entre el 2% y el 8% de oxígeno, más en particular aproximadamente 4% o 5% de O₂. Sin embargo, la especie de *Helicobacter* no crece en condiciones completamente anaerobias.

Una realización particular de los procedimientos para el aislamiento de la especie de *Helicobacter* de una muestra comprende las etapas de:

a) aplicar la muestra en un sistema de cultivo que comprende un componente sólido y uno líquido,

- 10 – en donde al menos el componente sólido está tamponado a un pH entre 5,0 y 6,0, y
- en donde el componente sólido comprende suero a al menos el 10% o sangre a al menos el 7,5%, y
- en donde el componente sólido y el componente líquido comprenden nutrientes para el crecimiento de bacterias de cultivo exigente, y
- 15 – en donde el componente sólido y/o el componente líquido comprende al menos una sustancia selectiva que inhibe el crecimiento de hongos y/o microorganismos grampositivos y/o gramnegativos que no son de la especie de *Helicobacter* a cultivar,

el procedimiento comprende además la etapa de

b) incubar la muestra en este sistema en condiciones microaerobias.

Con los procedimientos descritos más arriba para el aislamiento y el cultivo de la especie de *Helicobacter* se pueden obtener aislados verdaderos de la especie de *Helicobacter*, en concreto de *Candidatus Helicobacter suis*, a partir de muestras de material gástrico. Además, los procedimientos de la presente invención permiten el cultivo *in vitro* para formar masa. Se ha demostrado que con el uso de los procedimientos de la presente invención, aproximadamente 1 ml de mucosidad gástrica aplicada sobre una placa bacteriana de 10 cm genera un cultivo de entre aproximadamente 10⁶ y 10⁹ bacterias/ml en 3 días. Tras los pases, los cultivos se pueden diluir con un factor de 1 a 5. En consecuencia, se pueden conseguir rendimientos elevados incluso con sistemas a pequeña escala. No obstante, se puede incrementar aún más el rendimiento en la producción a gran escala.

Los procedimientos de la presente invención por primera vez permiten generar gran cantidad de aislados verdaderos de la especie de *Helicobacter*, en concreto de *Candidatus Helicobacter suis*. Esto es importante porque permite la fabricación de vacunas que utilizan *Candidatus Helicobacter suis* aislado o preparaciones de antígenos obtenidas del mismo.

En consecuencia, otro aspecto de la invención se refiere al uso de *Candidatus Helicobacter suis*, tales como los que se pueden obtener mediante los procedimientos descritos en la presente memoria para la producción de preparaciones antigénicas, que son útiles como vacunas. De hecho, la presente invención permite, por primera vez, generar una vacuna basada en aislados verdaderos de *Candidatus Helicobacter suis*.

Las preparaciones de antígenos a partir de aislados de *Candidatus Helicobacter suis* contempladas en el contexto de la presente invención incluyen tanto preparaciones con células bacterianas enteras como preparaciones de componentes de aislados de *Candidatus Helicobacter suis*. Tal preparación de antígenos puede comprender bacterias (inactivas) enteras y muertas, bacterias (debilitadas) vivas y atenuadas, o preparaciones bacterianas procesadas y/o artificiales, o combinaciones de las mismas. Las preparaciones bacterianas procesadas incluyen preparaciones de proteínas bacterianas que están parcial o completamente purificadas y/o pretratadas. Éstas se pueden utilizar solas o en combinación con preparaciones artificiales de antígenos tales como preparaciones de proteínas que o se obtienen en parte o bien completamente mediante procedimientos sintéticos o recombinantes.

De acuerdo con una realización concreta, las preparaciones de antígenos dadas a conocer en la presente invención comprenden uno o más antígenos procedentes de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis*. La ventaja de trabajar con preparaciones de antígenos procedentes de aislados es la pureza, que reduce la posibilidad de contaminación con compuestos antigénicos de otros microorganismos o especies bacterianas, lo que incrementa el riesgo de efectos secundarios indeseados de la preparación antigénica cuando se inyectan en los humanos o en otros animales.

De acuerdo con una determinada realización, la preparación de antígenos es un lisado celular de *Candidatus Helicobacter suis*, a saber, una mezcla obtenida tras la lisis de las células bacterianas. Un ejemplo concreto de un lisado de células bacterianas es la fracción soluble de un cultivo bacteriano tratado con ultrasonidos, p. ej., obtenido

después de la filtración. Adicionalmente o de forma alternativa, las bacterias se pueden fragmentar con un homogeneizador de alta presión (p. ej., modelo EmulsiFlexC5 de Avestin).

Optativamente, el lisado de células se inactiva adicionalmente antes o después del tratamiento con ultrasonidos mediante uno de una serie de procedimientos conocidos tales como, pero sin limitarse a ellos, el tratamiento con formol, etilenimina binaria (BEI), propriolactona β (BPL), glutaraldehído, radiación o calor. Por lo general, no todas las proteínas de un lisado provocarán una respuesta inmunitaria. Otra alternativa es que la preparación de antígenos de acuerdo con la presente invención se obtenga mediante fraccionamiento y/o purificación de una o más proteínas a partir de un lisado o medio de cultivo bacteriano para obtener una composición de antígenos purificados o enriquecida en ellos. Los ejemplos de proteínas bacterianas aisladas o purificadas que son adecuadas en el contexto de la presente invención son las proteínas de choque térmico y/o proteínas de la ureasa, cagA y vacA.

En consecuencia, otro aspecto de la presente invención da a conocer vacunas que comprenden las preparaciones de antígenos obtenidas de aislados de *Candidatus Helicobacter suis* según se describe más arriba. Las vacunas de la presente invención que comprenden una preparación de antígenos de un aislado de *Candidatus Helicobacter suis* se pueden utilizar para obtener una inmunidad preventiva o terapéutica contra la infección por una especie de *Helicobacter*, más en concreto por *Candidatus Helicobacter suis*.

La vacuna de la presente invención contiene optativamente sólo la preparación de antígenos de la invención. Otra alternativa es que la vacuna puede comprender, además de la preparación de antígenos de la presente invención, un adyuvante adecuado. Por ejemplo, las preparaciones de antígenos de las vacunas de la presente invención se pueden formular en o con liposomas, preferiblemente liposomas neutros o aniónicos, microesferas, complejos inmunoestimulantes, o partículas parecidas a virus (VLP, por su nombre en inglés), para favorecer la selección de la proteína o del polipéptido, o para incrementar la respuesta inmunitaria. Las personas expertas en la técnica pueden disponer de estos compuestos sin dificultad; por ejemplo, véase *Liposomes: A Practical Approach*. RRC New Ed, IRL Press (1990).

Se pueden utilizar también adyuvantes diferentes a los liposomas. Los expertos en la técnica conocen un gran número de ellos. El tipo de adyuvante variará en función del tipo de preparación de antígenos y de la vía de administración utilizada. De acuerdo a una determinada realización de la presente invención, la preparación de antígenos es una solución de antígenos tratada con ultrasonidos que se administra por vía intranasal con la toxina del cólera (TC) o por vía subcutánea con saponina como adyuvantes. En la composición de la vacuna se puede utilizar cualquier adyuvante conocido en la técnica, entre ellos adyuvantes de naturaleza oleosa, tales como el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund, adyuvantes a base de micolato (p. ej., dimicolato de trehalosa), lipopolisacárido bacteriano (LPS), peptidoglucanos (a saber, mureínas, mucopéptidos o glucoproteínas tales como N-Opaca, muramildipéptido [MDP] o análogos del MDP), proteoglucanos (p. ej., extraído de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (p. ej., OK432), Biostim™ (p. ej., 01K2), los complejos inmunoestimulantes de las patentes europeas EP 109.942, EP 180.564 y EP 231.039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tales como migliol), aceites vegetales (tales como aceite de cacahuate), liposomas, polioles Pluronic®. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitarse a ellos, el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, p. ej., los adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, lípido A monofosforilado, adyuvante de amina lipoide Avridine, enterotoxina termoinestable de *E. coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera o muramildipéptido, entre muchos otros. De acuerdo con una determinada realización, el mutante recombinante de la toxina termoinestable de *Escherichia coli* se añade a la preparación de antígenos antes de inyectarla en el animal.

Para la administración parenteral se pueden añadir componentes específicos, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio. De acuerdo con los procedimientos estándares, en un compuesto de aluminio se pueden absorber o precipitar uno o varios antígenos de la preparación de antígenos. Otros adyuvantes útiles para la administración parenteral incluyen, en particular, polifosfaceno (patente internacional WO 95/2415), DC-col (3- β -[N-(N',N'-dimetilaminometano) carbamoil] colesterol] (patente de los EE.UU. n.º 5.283.185 y la patente internacional WO 96/14831), QS-21 (patente internacional WO 88/9336) y RIBI.

Los componentes de las vacunas de la presente invención se pueden fabricar de modo convencional. En particular, un polipéptido, una mezcla o una molécula de ADN contenido en la composición de acuerdo con la invención se combina con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, p. ej., agua o una disolución salina tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS). En general, el diluyente o el vehículo se selecciona basándose en el modo y la vía de administración y en las prácticas farmacéuticas estándares. Los diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables así como todo lo que es necesario para su uso en formulaciones farmacéuticas se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Las vacunas de la presente invención pueden ser en forma sólida o líquida tales como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones.

5 Las formas sólidas de dosis unitaria pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula, tal como un tipo de gelatina ordinario que contiene las proteínas o péptidos de la presente invención y un vehículo, por ejemplo, lubricantes y rellenos inertes tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz. En otra realización, estos compuestos se comprimen con bases convencionales para comprimidos tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz, en combinación con aglutinantes tipo goma arábica, almidón de maíz o gelatina, disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o ácido alginico, y un lubricante de tipo ácido esteárico o estearato de magnesio.

10 Las vacunas de la presente invención se pueden administrar también en dosis inyectables mediante solución o suspensión de estos materiales en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico. Tales vehículos incluyen líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los aceites ilustrativos son los que tienen origen en petróleo, animales, vegetales o síntesis, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y solución de azúcar relacionada y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son los vehículos líquidos preferidos, en particular para las soluciones inyectables.

15 Para el uso como aerosoles, las vacunas de la presente invención que comprenden la preparación de antígenos en solución o suspensión se puede envasar en un contenedor de aerosol presurizado junto con los propulsores adecuados, por ejemplo, propulsores de hidrocarburo tales como propano, butano o isobutano, con los adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención también se pueden administrar de una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

20 La vacuna que comprende una preparación de antígenos de *Candidatus Helicobacter suis* se puede utilizar para la vacunación autóloga o heteróloga. En la vacunación autóloga que utiliza las vacunas de la presente invención, el objeto es la protección contra la infección por *Candidatus Helicobacter suis*. En la vacunación heteróloga, el objeto es obtener, mediante la inyección con una preparación antigénica de *Candidatus Helicobacter suis*, la protección contra la infección por una o otras especies más de *Helicobacter*.

25 En consecuencia, en un aspecto más de la presente invención se dan a conocer los procedimientos para la vacunación de los humanos y de otros animales con las vacunas de la presente invención. El objeto de los esquemas de vacunación con las vacunas obtenidas de los aislados de *Candidatus Helicobacter suis* de acuerdo con la presente invención incluye obtener la protección completa (inmunidad esterilizante) contra *Helicobacter spp.*, más en particular contra *Candidatus Helicobacter suis* en un animal, pero también reducir la carga bacteriana de *Helicobacter spp.*, más en particular de *Candidatus Helicobacter suis* hasta al menos el 25%, 40%, 60%, 80% en comparación con antes de la vacunación y/o en comparación con los animales que no han recibido la vacuna de la presente invención y están sometidos o se han sometido al mismo agente infeccioso. Más en particular, la presente invención se refiere a vacunas y estrategias de vacunación que aseguran un efecto protector o una carga bacteriana reducida durante un periodo de tiempo prolongado, tal como durante al menos 4, 6, 10, 12 o más de 12 semanas.

30 La administración de las vacunas de la presente invención puede tener lugar en una dosis única o en una dosis repetida una vez o varias veces después de un cierto tiempo. La dosis adecuada varía de acuerdo con diferentes parámetros, por ejemplo, el individuo tratado (adulto o niño), el propio antígeno de la vacuna, el modo y la frecuencia de administración, la presencia o ausencia de adyuvante y, si está presente, el tipo de adyuvante y el efecto deseado (p. ej., protección o tratamiento), como determinarán los expertos en la técnica. Por ejemplo, cuando se utilizan las preparaciones de antígenos que comprenden *Candidatus Helicobacter suis* entero pero inactivado, las dosis adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, dosis de 10 µg, 50 µg, 100 µg, 250 µg, 500 µg y 1 mg de preparación de antígenos. Otra alternativa es que las dosis se puedan expresar como UFC, en donde 100 µg corresponden a aproximadamente 10⁷ UFC. Las preparaciones brutas de antígenos (a saber, que contienen vestigios del medio de cultivo, etc.) pueden requerir para ser eficaces dosis más altas que las preparaciones parcialmente purificadas o purificadas.

35 Los procedimientos de vacunación pueden incluir la administración al animal o al humano de una o más composiciones antes, o después, de la administración (oral) de la vacuna que comprende la preparación de antígenos de *Candidatus Helicobacter suis* de acuerdo con la invención. Tales componentes incluyen compuestos que reducen la producción de ácido en el estómago (p. ej., cimetidina (Tagamet®, GlaxoSmithKline, Genval, Bélgica)).

40 La identificación y cuantificación de la infección y/o de la carga bacteriana en un animal se puede hacer de muchas formas. Clásicamente, esto se realiza mediante la determinación de la presencia del agente infeccioso, o de una proteína o secuencia de ADN del mismo, en una muestra de líquido corporal o en la orina o en las heces. Otra alternativa es que se mida la reacción del sistema inmunitario, p. ej., la presencia de anticuerpos contra el agente

infeccioso. Un diagnóstico exacto y la cuantificación de la infección por *Helicobacter* se obtiene mediante la identificación del ADN de *Candidatus Helicobacter suis*, p. ej., mediante PCR tal y como se describe en la técnica (Fox y Lee (1997) *Lab. Anim. Sci.* 47, 222-255). Otra alternativa es que se utilice la prueba cuantitativa de la ureasa para cuantificar el *Candidatus H. suis*. Brevemente, las muestras de tejido de la mucosa (aproximadamente 0,5 cm²) se sumergen en 1,000 µl del CUTest (Temmler Pharma; Marburg, Alemania) y se incuban a 37 °C durante aproximadamente 3 horas (como describe Corthésy-Theulaz et al., (1995), *Gastroenterology* 109, 115-121). Después de la centrifugación, el sobrenadante se utiliza para la cuantificación espectrofotométrica a una densidad óptica (DO) de 550 nm. El valor discriminatorio para distinguir entre si hay infección o no se calcula para cada región del estómago y se corresponde a la media más dos veces la desviación estándar (DE) de los valores de absorbancia obtenidos con especímenes de biopsia gástrica de animales de control sin exposición al antígeno. Los valores por encima de este valor discriminatorio se consideran la prueba de la colonización por *Candidatus Helicobacter suis*.

Tal y como se detalla más arriba, el uso de vacunas de la presente invención se contempla tanto en los esquemas de vacunación autóloga como en los de la heteróloga. Los procedimientos se dan a conocer para el tratamiento y/o la protección de humanos y/o de otros animales contra la infección mediante una o más especies de *Helicobacter* diferentes, que optativamente incluye *Candidatus Helicobacter suis*. Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren al uso de las vacunas obtenidas de aislados de *Candidatus Helicobacter suis* para proporcionar la inmunidad preventiva o terapéutica contra otras especies de *Helicobacter* tales como, pero sin limitarse a ellas, *H. pylori*, *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonii*. Otras especies adecuadas de *Helicobacter* son *H. bilis*, *H. fenelliae*, *H. pametensis*, *H. nemestrinae*, *H. nemestrinae*, *H. pametensis*, *H. acinonychis*, *H. pullorum*, *H. mustelae*, *H. hepaticus*, *H. cinaedi* y *H. canis*.

La invención da a conocer procedimientos de protección preventiva y/o terapéutica contra la infección por *Candidatus Helicobacter suis*, que comprende la administración de las vacunas de la presente invención obtenidas de aislados de *Candidatus Helicobacter suis*. Más específicamente, las preparaciones de antígenos se dan a conocer para el uso en la vacunación preventiva, lo que asegura la protección contra *Helicobacter spp.*, más en concreto contra *Candidatus Helicobacter suis*, cuya protección es más que transitoria.

También se dan a conocer los procedimientos para la inmunización terapéutica, cuando los microorganismos ya han orientado la respuesta inmunitaria del hospedador para su beneficio.

Los procedimientos de inmunización incluyen procedimientos mediante los cuales la vacuna se administra a través de cualquier vía adecuada, tal como mediante la administración mucosa (intranasal), parenteral o intramuscular, oral, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, transdérmica/transcutánea o subcutánea. Las vías de vacunación adecuadas también comprenden administraciones combinadas (p. ej., administración oral/intramuscular). La inmunización terapéutica se puede realizar mediante la administración parenteral de las preparaciones o vacunas de antígenos de la invención. La inmunización parenteral puede movilizar células de origen sistémico que no se han sensibilizado aún en una dirección dada con una infección por *Helicobacter* (Guy et al., (1999) *Vaccine* 17, 1130-1135). La administración intramuscular se puede utilizar para la vacunación eficaz.

Los diferentes aspectos de la presente invención se ilustran mediante los ejemplos que se detallan a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: aislamiento y cultivo *in vitro* de *Candidatus Helicobacter suis*

En este ejemplo se aísla *Candidatus Helicobacter suis* en un sistema de cultivo de dos componentes, en donde el componente sólido es una placa de agar para *Brucella*.

Las placas de agar para *Brucella* (Becton-Dickinson, Erembodegem, Bélgica) se complementaron con complemento Vitox (Oxoid, Basingstoke, GB), complemento Skirrow (Oxoid), suero de ternera fetal al 20% (FCS; QB Perbio Tattenhall, GB), carbón activado GR al 0,1% (AC; Merck, Darmstadt, Alemania), 0,00001% de violeta de genciana (Clin-Tech Ltd, Essex, GB) y 0,001% de nisina (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EE.UU.). Después de esterilizar en el autoclave, pero antes de la gelificación del agar, se añadieron 0, 0,2, 0,5 y 0,7 ml de una solución de HCl (mín. 37%; Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) a 500 ml de agar para *Brucella*, lo que da lugar a unos valores de pH de 7,0, 6,3, 5,5 y 5,0, respectivamente. A menos que se indique de otra manera, las placas para *Brucella* con suero comprenden suero al 20%.

En este ejemplo, el componente líquido del sistema de cultivo de dos componentes es caldo para *Brucella*, sin añadir otros complementos ni suero y sin el ajuste del pH.

Día 0

Se recogieron del matadero (Porc Meat N. V., Zele, Bélgica) el estómago de cinco cochinos (A a E) y se conservaron a +4 °C hasta su uso posterior. Se abrieron por la curvatura mayor y se enjuagaron con agua del grifo. Una mitad del

estómago se sometió a tratamiento con ácido (inmersión en un baño de HCl al 1% durante 1 hora). Después, sólo se recogió la mucosidad de la superficie rascando el estómago con un portaobjetos de vidrio. La mucosidad se recogió en un tubo estéril. El examen de la mucosidad gástrica de los cochinos al microscopio mostró que todos los estómagos tenían *Candidatus Helicobacter suis*.

- 5 La mucosidad se licuó ligeramente con el caldo para *Brucella* que comprende suero al 20% (hasta un volumen de aproximadamente 5 ml) y se inoculó en cuatro placas de agar para *Brucella* complementadas con suero con valores de pH de 5,0, 5,5, 6,3 y 7. La muestra se inoculó en el centro de la placa y posteriormente se añadieron tres gotas de caldo para *Brucella* (aproximadamente 150 µl) encima de la muestra de mucosidad del centro.

- 10 En total se incubaron cuatro placas por cochino durante una noche en una atmósfera microaerobia a 37 °C. El entorno microaerobio se creó al evacuar el 80% de la atmósfera normal e introducir una mezcla de gas con CO₂ al 8%, H₂ al 8% y N₂ al 84%.

Día 1

- 15 El aislamiento primario de bacterias helicoidales móviles (lo que indica la presencia de la especie de *Helicobacter*) fue satisfactorio en cuatro de las cinco muestras de estómago. En el estómago D no se había producido suficiente crecimiento el día 1. Las placas que se habían secado se humedecieron ligeramente con caldo para *Brucella* que lleva suero.

Día 2

- 20 Con todos los estómagos se observó que las placas en las que el agar estaba a pH 7 y 6,3 estaban contaminadas con otras bacterias. El caldo de estas placas se filtró (por un filtro con poros de 0,65 µm) y se pasó a nuevas placas de agar al mismo pH.

Sólo estaban contaminadas algunas de las placas a pH 5,5 o 5,0, en cuyo caso el caldo también se filtró y se pasó a nuevas placas. Cuando no se observó ninguna contaminación, las placas se siguieron incubando. Este fue el caso de las placas a pH 5,0 de las muestras de estómago D y E.

- 25 Cuando el tamaño del poro de los filtros con poros de 0,65 µm era demasiado pequeño para filtrar el medio sin que se obturaran, se realizó la filtración con filtros de 0,8 µm. Este fue el caso de las placas contaminadas a pH 7, 6,3 y 5,5 de la muestra de estómago E.

Día 3

Las placas que se inocularon con el medio filtrado el día 2 daban principalmente negativo para el crecimiento de bacterias contaminantes.

- 30 La placa original a pH 5,0 sin filtrar y sin contaminar del estómago E se analizó al microscopio y mostró muchas bacterias de *Candidatus Helicobacter suis* con una movilidad notable, cuyo número se estimó que era de aproximadamente 10⁸ o 10⁹/ml. El caldo de cultivo (aproximadamente 500 µl) se transfirió a un nuevo medio de agar a pH 5.

Día 4

- 35 La placa original a pH 5,0 del estómago E y su placa de pase estaban recubiertas de contaminantes. El caldo de estas placas se transfirió a nuevas placas de agar mediante filtros con poros de 0,65 µm.

También se contaminaron y se descartaron muchas placas de los otros estómagos. Del estómago A, dos placas pasadas por filtro dieron negativo para la contaminación bacteriana y se siguieron incubando. De los estómagos B, C y E, una placa pasada por filtro dio negativo y se siguió incubando.

- 40 Del estómago D, la placa a pH 5,0 seguía dando negativo para el crecimiento bacteriano contaminante y se siguió incubando.

Día 5

Todas las placas pasadas por filtro que dieron negativo el día 4 para *Candidatus Helicobacter suis* seguían siendo negativas para *Helicobacter* y se siguieron incubando. Algunas placas mostraban bacterias contaminantes.

- 45 Día 7

El caldo de la parte superior de la placa a pH 5,0 del estómago D mostraba bacterias de *Candidatus Helicobacter suis* móviles y viables, cuyo número se estimó que era de 10⁶/ml. La mucosidad no estaba visiblemente contaminada

con otras bacterias. Esta placa se siguió incubando.

Día 8

5 Del estómago D, la placa original a pH 5,0 mostró que la bacteria de *Candidatus Helicobacter suis* seguía creciendo. El caldo se transfirió a una placa de agar a pH 7. En la placa original se añadieron 500 µl del caldo para *Brucella* con suero.

Día 11

El pase de la muestra D del día 8 a una placa a pH 7 dio negativo para el crecimiento de *Helicobacter*. La placa original a pH 5,0 todavía mostraba un cultivo viable de *Candidatus Helicobacter suis* (se estimaron 10^8 bacterias/ml). Este caldo se transfirió a una placa a pH 5,0 y se le añadió una cantidad igual de caldo para *Brucella* con suero.

10 A la placa original se le añadieron 500 µl de caldo para *Brucella* con suero.

Día 13

El pase en la placa a pH 5,0 el día 11 fue satisfactorio para el aislado que procedía de la muestra D. El caldo contenía *Helicobacter* móviles (se estimaron 10^8 bacterias/ml). El caldo se transfirió de nuevo a una placa a pH 5,0, mientras que la placa del primer pase se humedeció con 1 ml de caldo para *Brucella* con suero.

15 El caldo de la placa original de la muestra D también contenía un cultivo viable, del cual se congelaron a -70 °C aproximadamente 200 µl en una cantidad igual de LYM (1/4 de caldo de BHI + 3/4 de suero de caballo + glucosa al 7,5 % (p/v)). Se le añadieron de nuevo 500 µl del caldo para *Brucella* con suero antes de seguir incubando.

De los estómagos B y C, los pases por filtro del día 4 en las placas a pH 5 eran ligeramente positivos para *Candidatus Helicobacter suis*.

20 Día 14

El cultivo D congelado del día 13 se descongeló y se aplicó en una placa de agar para *Brucella* complementada a pH 5, y se incubó en una atmósfera microaerobia.

Día 15

25 El segundo pase de la muestra D (HS1) dio positivo para *Candidatus Helicobacter suis* (se estimaron 10^8 bacterias/ml). El caldo de esta placa (aproximadamente 500 µl) así como el caldo de la placa a pH 5,0 de la muestra D original se añadió a un volumen igual de caldo para *Brucella*, 3 vol. de FCS y glucosa al 7,5% (p/v) y se congeló a -70 °C.

El primer pase contenía más caldo (aproximadamente 1 ml) y se pasó a dos placas de agar recién preparadas a pH 5. Se le añadió la misma cantidad de caldo para *Brucella* con suero.

30 El pase por filtro de B era aún ligeramente positivo para *Helicobacter*, mientras que el pase por filtro de C contenía aproximadamente 10^6 bacterias/ml. Estas placas se humedecieron ligeramente con caldo para *Brucella* con suero.

Día 17

35 La placa original a pH 5,0 de la muestra D de nuevo dio positivo para *Helicobacter*, pero eran menos móviles. Como el medio del agar estaba probablemente agotado, el caldo se transfirió de nuevo a una placa de agar recién preparada (pH 5) con el medio y se descartó la placa original.

El segundo pase de D dio positivo y el caldo se transfirió de nuevo a nueva placa de agar, y la placa se humedeció de nuevo con caldo para *Brucella* complementado y se siguió incubando.

De las placas pasadas por filtro de B y C, el caldo se transfirió a nuevas placas de agar a pH 5. A las placas originales se les añadió caldo para *Brucella* con suero.

40 Día 19

45 Las muestras se tomaron de los cultivos procedentes de los estómagos D (aislado HS1), C (aislado HS2) y B (aislado HS3). El ADN se extrajo de células bacterianas con el kit de tejido DNeasy (Qiagen). Se realizó la PCR con los cebadores específicos para *Candidatus H. suis* (De Groote et al., 1999, *Bacteriology* 49, 1769-1777; 2000 *J. Clin. Microbiol.* 38, 1131-1135). La electroforesis en gel de agarosa mostró un fragmento de PCR de 433 pb de longitud en los tres aislados. Se utilizó de control positivo el ADN de un cultivo de *Candidatus Helicobacter suis* pasado por ratón *in vivo*.

La placa inoculada el día 14 con material descongelado de HS1 dio positivo para *Candidatus Helicobacter suis*. El caldo se transfirió a dos nuevas placas (segundo pase).

El segundo pase de HS1 se mezcló con una cantidad igual de 1 vol. de caldo para *Brucella*, 3 vol. de FCS, al 7,5% (p/v), y se congeló a -70 °C.

- 5 El caldo del tercer pase de HS1 dio positivo y se transfirió a una nueva placa.

Día 20

Para HS2 y HS3, el caldo de los segundos pases se mezcló con una cantidad igual de 1 vol. de caldo para *Brucella*, 3 vol. de FCS y glucosa al 7,5% (p/v), y se congeló a -70 °C.

Día 22

- 10 En la placa inoculada con material descongelado de HS1, *Candidatus Helicobacter suis* ya no creció mucho más. Sin embargo, los pases del día 19 de este aislado mostraban más *Helicobacter*.

El cuarto pase del día 19 del cultivo original no mostró muchas bacterias.

- 15 Los segundos pases del día 17 de los cultivos que proceden de C y D mostraron muchas bacterias de *Candidatus Helicobacter suis*. El caldo de la muestra C (HS2) se transfirió a dos nuevas placas, y se le añadieron volúmenes iguales de caldo para *Brucella* complementado. El caldo de la muestra B (HS3) se transfirió a una nueva placa, y se le añadió un volumen igual de caldo para *Brucella* complementado.

Día 25

Para HS1, el segundo pase del día 15 mostró muy poco *Candidatus H. suis*. Todo el caldo se transfirió a una placa de agar recién preparada (pH 5,0) y la placa vieja se descartó.

- 20 El tercer pase del día 17 y el cuarto pase del día 19 dieron negativo y se descartaron.

La placa inoculada el día 14 con material descongelado de HS1 mostró un cultivo crecido de *Candidatus Helicobacter suis* y este caldo se inoculó en dos nuevas placas y con caldo para *Brucella* con suero. Los segundos pases del día 19 de este aislado también se inocularon en dos placas cada uno.

- 25 Para HS2 y HS3, los segundos pases del día 17 mostraron menos *Helicobacter* móviles. Las placas mostraban áreas translúcidas y estaban probablemente agotadas. Todo el caldo se transfirió a una nueva placa y se descartó la placa vieja. Los terceros pases mostraron buenos cultivos que se transfirieron a dos nuevas placas por aislado.

Día 27 y siguientes días

Del tercer y cuarto pases de HS1, el caldo se congeló en un volumen igual de 1 vol. de caldo para *Brucella*, 3 vol. de FCS y glucosa al 7,5% (p/v). El caldo del segundo pase del día 22 se inoculó en una nueva placa de agar.

- 30 Para HS2 y HS3, los pases tercero y cuarto se inocularon en una nueva placa de agar. Los cultivos se pasaron continuamente cada dos o tres días y los caldos de cultivo se congelaron con regularidad tal y como se describe más arriba.

- El gen de ARNr 16S de los aislados HS1, HS2 y HS3 se amplificó con los cebadores complementarios a los bordes conservados. Se utilizaron los cebadores de consenso $\alpha\beta$ -NOT (5'-**tcaactaggaccgagtc**-3') [SEQ ID n.º 1] y ω MB
 35 (5'-**tacctgttacttcaccccca**-3') [SEQ ID n.º 2], tal y como se describió previamente (Baele et al., (2001) *J. Appl. Microbiol.* 91, 488-491). Un amplicón de 1500 pb que se amplificó en esta reacción de PCR se secuenció con los
 cebadores pD (5'-**cagcagccgcgtaatac**-3') [SEQ ID n.º 3], γ^* (5'-**ctcctacgggaggcagcagt**-3') [SEQ ID n.º 4], β (5'-
gttgcgctcgttgccgggact-3') [SEQ ID n.º 5] y O^* (5'-**aactcaaaggaattgacgg**-3') [SEQ ID n.º 6], tal y como se describió en
 Coenye et al., (1999) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 405-413). El análisis de secuencias se realizó con el analizador
 40 genético ABI Prism™ 3100 (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) y las secuencias se alinearon con GenBank mediante BLAST. La secuencia reveló una similitud del 99% con la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* en GenBank (AF127028 descrito en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1).

- En las situaciones experimentales como las descritas más arriba, el aislamiento primario más exitoso se obtuvo en
 45 las placas que contenían el medio de valor de pH más bajo (5,0 o 5,5). En estas condiciones disminuyó el crecimiento de las bacterias contaminantes.

El aislamiento de *Candidatus Helicobacter suis* del estómago E fue satisfactorio. Al tercer día después de la

inoculación se observó un cultivo puro de aproximadamente 10^8 o 10^9 /ml al microscopio. Los contaminantes que crecen en la mucosidad se mezclaron con el caldo que contenía *Helicobacter*, lo que era inevitable, cuando se transfirió el caldo a una nueva placa de agar.

5 De los estómagos B, C y D se obtuvieron cultivos puros de *Candidatus Helicobacter suis*. Una PCR específica de la especie que amplifica un fragmento del ADNr 16S confirmó la identidad de la especie. La secuenciación de todo el gen de ADNr 16S reveló una similitud del 99% con la secuencia de *Candidatus Helicobacter suis* en GenBank.

10 Para el aislado HS1, que se originó de D, el aislamiento primario de un cultivo puro de caldo de *Candidatus Helicobacter suis* se consiguió al cabo de 7 días de incubación. La transferencia del caldo a una placa con el mismo medio a pH 7 no dio lugar a ningún crecimiento. El pase a una placa a pH 5,0 fue satisfactorio. El caldo que mostraba *Helicobacter* viables y móviles se dividió en dos volúmenes iguales y se transfirió a dos placas de agar recién preparadas. La complementación con una cantidad igual de caldo para *Brucella* (con FCS al 20%) dio lugar a un buen crecimiento de la bacteria.

15 Las células de *Candidatus Helicobacter suis* en el caldo se pueden congelar a -70 °C en una cantidad igual de 1 vol. de caldo para *Brucella*, 3 vol. de FCS y glucosa al 7,5 % (p/v). Después de descongelar un vial que estaba congelado, *Candidatus H. suis* volvió a crecer exitosamente en el mismo medio.

20 Para los aislados HS2 y HS3, que proceden de los estómagos B y C, respectivamente, los cultivos primarios en el medio a pH 5,0 estaban ligeramente contaminados con otras bacterias. A continuación, el caldo se llevó a un filtro con poros de $0,65$ μ m y se inoculó en nuevas placas de agar a pH 5. Al cabo de 11 días de incubación, estas placas dieron positivo para el crecimiento de *Helicobacter*. Después de volver a incubar durante 4 días, el caldo contenía suficiente *Helicobacter* para el pase de las cepas. Los cultivos de los pases segundo y tercero se obtuvieron después de 5 y 3 días de incubación, respectivamente.

Ejemplo 2: Efecto de la temperatura y del entorno sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

25 En este experimento y todos los siguientes, la optimización del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento se evaluaron en los aislados HS1, HS2 y HS3 de *Candidatus Helicobacter suis*. Los detalles sobre el aislamiento de estas cepas se dan en el ejemplo 1.

Los aislados HS1 y HS3 se inocularon cada uno en seis placas de agar para *Brucella* según se describe en el ejemplo anterior (a saber, que comprende FCS al 20% y está ajustado a pH 5,0). Las placas se cubrieron con caldo para *Brucella* complementado con complemento Vitox, Fungizone®, FCS al 20% y 0,7 ml de HCl por 500 ml de caldo (lo que da lugar a un pH de 5).

30 Se incubaron tres placas en un entorno microaerobio que se creó en los frascos con el sistema de 2,5 L Campygen™ (Oxoid), a 37 °C, 25 °C y 42 °C, respectivamente.

Las otras tres placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera aerobia, anaerobia y complementada con CO₂ al 5%, respectivamente.

35 Después de seis días de incubación, se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo recubridor al microscopio.

En un medio complementado con CO₂ al 5% y una atmósfera aerobia no se obtuvo ningún crecimiento. En un medio anaerobio sólo se observaron muy pocas bacterias. En las condiciones microaerobias, el buen crecimiento se observó a 37 °C, mientras a 25 °C o 42 °C, no se obtuvo ningún crecimiento.

40 Ejemplo 3: efecto del carbón activado y de los factores de crecimiento sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

Los aislados HS1 y HS3 se inocularon en placas de agar de Mueller-Hinton, complementadas con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone® y suero de ternera fetal al 20%, ajustadas a pH 5,0.

45 A estas placas se les añadieron los componentes que vienen a continuación. Un tipo de placas (MH1) contenía además complemento Vitox, pero no carbón activado. Otro tipo de placas (MH2) contenía además carbón activado, pero no complemento Vitox, mientras que un tercer tipo de placas (MH3) contenía tanto el complemento Vitox como el carbón activado.

Al cabo de tres y siete días de incubación a 37 °C en las condiciones microaerobias en un circuito cerrado, creado al evacuar el 80% de la atmósfera normal e introducir una mezcla de gases de CO₂ al 8%, de H₂ al 8% y de N₂ al 84%, se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo recubridor al microscopio.

50 Los medios MH1 y MH3 mostraron un buen crecimiento de los aislados HS1 y HS3. En el MH2 no se observó ningún

crecimiento con ninguno de los aislados.

Cuando se utiliza un medio de Mueller-Hinton, la omisión del complemento de crecimiento Vitox impide el crecimiento, mientras que la presencia o ausencia de carbón activado tiene poco efecto, o ninguno.

5 Ejemplo 4: Efecto de las composiciones alternativas de nutrientes sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

En el presente experimento, el agar de Mueller-Hinton o el agar para *Brucella* fue reemplazado por otro medio para bacterias de cultivo exigente, es decir, placas de agar de infusión corazón-cerebro (BHI, por su nombre en inglés) bovinos. Estas placas se complementaron con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone® y suero de ternera fetal al 20%, y se ajustaron a pH 5 con HCl concentrado.

10 Las placas se recubrieron con caldo de BHI, complementado con suero de ternera fetal al 20%.

Al cabo de incubar los aislados HS1 y HS2 cuatro días a 37 °C en estas placas en un entorno microaerobio, se confirmó el crecimiento mediante el examen del caldo recubridor al microscopio.

Ejemplo 5: efecto que tiene el suero en las placas sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

15 El aislado HS1 se inoculó en a) placas de agar de Mueller-Hinton complementadas con complemento Skirrow, Fungizone® y el pH ajustado a 5,0 con HCl concentrado y en b) las mismas placas que en a) que comprenden además FCS al 20% y el complemento Vitox.

Las placas se recubrieron con caldo de Mueller-Hinton, complementado con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone®, FCS al 20%, y se ajustó a pH 5,0 con HCl concentrado.

20 Al cabo de tres días de incubación a 37 °C en un entorno microaerobio en las placas a) o b), se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo al microscopio. Las formas cocoides sólo se observaron en las placas sin suero en el agar (a). Se obtuvo un buen crecimiento de HS1 en las placas que comprendían la cantidad estándar de FCS al 20% (b).

25 A continuación, el aislado HS1 se inoculó en c) placas de agar de Mueller-Hinton complementadas con complemento Skirrow, Fungizone® y el pH ajustado a 5,0 con HCl concentrado, y se recubrieron con caldo de Mueller-Hinton, complementado con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone®, FCS al 40% y con el pH ajustado a 5,0 con HCl concentrado.

Al cabo de cuatro días de incubación en las placas a 37 °C en un entorno microaerobio c), se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo al microscopio. De nuevo, sólo se observaron formas cocoides.

Ejemplo 6: efecto de la sangre sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

30 El uso de la sangre en vez de suero se evaluó con el reemplazo del FCS al 20% en las placas por sangre de oveja al 10% o sangre de caballo al 10%. El pH de las placas se ajustó a pH 5,0 con HCl concentrado.

Las placas se recubrieron con caldo de Mueller-Hinton.

Después de cuatro días de incubación a 37 °C en un entorno microaerobio, se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo recubridor al microscopio.

35 Se obtuvo un crecimiento muy bueno de ambos aislados, independientemente del origen de la sangre utilizada, lo que indica que al medio de cultivo se le puede añadir sangre en vez de suero.

Ejemplo 7: efecto de la concentración de la sangre sobre *Candidatus Helicobacter suis*

40 El aislado HS1 se inoculó en las placas de agar de Mueller-Hinton complementadas con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone® y cantidades diferentes de sangre de caballo (2,5%, 5%, 7%, 10% y 15% (v/v)). El pH de las placas se ajustó a pH 5,0 con HCl concentrado.

Las placas se recubrieron con caldo de Mueller-Hinton sin más complementos.

45 Al cabo tres días de incubación a 37 °C en un entorno microaerobio, se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo al microscopio. En las placas con sangre de caballo al 2,5%, 5% o 7% sólo se observaron formas cocoides. El crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis* se observó en las placas con la sangre de caballo al 10% o al 15%. De las placas con sangre al 10% y al 15%, el caldo se subcultivó a continuación en nuevas placas de agar que contienen el mismo medio con una concentración de sangre entre el 2,5% y 15%, mediante la inoculación de 1 ml de cultivo y la adición de 1 ml de caldo recién preparado. Las placas se siguieron incubando en las mismas

condiciones otros tres días más. De nuevo, sólo se observaron cultivos viables en las placas con la sangre de caballo al 10% o al 15%.

Ejemplo 8: efecto del pH sobre el crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis*

5 El aislado HS1 se inoculó en las placas de agar de Mueller-Hinton complementado con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone® y FCS al 20%, y se ajustaron a diferentes valores de pH.

Las placas se recubrieron con caldo de Mueller-Hinton, complementado con complemento Vitox, complemento Skirrow, Fungizone® y FCS al 20%, y se ajustaron a diferentes valores de pH con HCl concentrado. Las combinaciones específicas del pH del agar y del caldo se muestran en la tabla 1.

10 Al cabo de tres días de incubación a 37 °C en un entorno microaerobio, se evaluó el crecimiento mediante el examen del caldo al microscopio. A continuación, el caldo se subcultivó en nuevas placas de agar mediante la inoculación de 1 ml del cultivo y la adición de 1 ml de caldo recién preparado con el mismo valor de pH. Los cultivos primarios y los subcultivos se evaluaron al cabo de 2 días de incubación.

Los primeros subcultivos se transfirieron de nuevo a placas de agar nuevas tal y como se describe más arriba. El crecimiento se evaluó al cabo de 4 y 7 días de incubación, respectivamente.

15 Los segundos subcultivos en el medio a pH 5,3 y 4,8 se transfirieron a placas de agar recién preparadas. Los primeros subcultivos en el medio a pH de 4,75, 4,5, 4,4 y 4 también se transfirieron a placas recién preparadas. El crecimiento se evaluó al cabo de 3 y 7 días incubación, respectivamente.

Tabla 1. Crecimiento del aislado HS1 de *H. suis* después del subcultivo en el medio de Mueller-Hinton con diferentes valores de pH

pH del agar	pH del caldo	Cultivo primario		Primer subcultivo			Segundo subcultivo		Tercer subcultivo	
		3 días	5 días	2 días	4 días	8 días	4 días	7 días	3 días	7 días
5,0	7,0	++++	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
6,8	6,8	+++	++	++	+	-	NR	NR	NR	NR
6,7	6,7	++	++	++	+++	+	-	+/-	NR	NR
6,6	6,6	++	+	++	+++	+	-	-	NR	NR
6,5	6,5	++	+	++	+++	+	+	-	NR	NR
6,2	6,3	++	++++	++++	+++	++	+	-	NR	NR
5,9	6,1	+++	++++	++++	+++	++	++	+	NR	NR
5,4	5,3	+++	++++	++++	+++	+++	++++	+	+++	NR
4,8	4,8	+++	++++	+	+++	++++	++++	+++	+++	NR
4,7	4,6	+++	++	+	+	++	NR	NR	++++	++++
4,7	4,4	++	++	+	+	++	NR	NR	+	+
4,4	4,4	+	+	+	+	++	NR	NR	++	-
4,1	4,2	+	+	+	+	++	NR	NR	+	-
3,7	3,9	-	-	+	-	-	NR	NR	NR	NR
3,5	3,6	-	-	+	-	-	NR	NR	NR	NR

20 NR: no se realizó; +++++: crece muy bien; +++: crece bien; ++: crece moderadamente; +: crece poco; +/-: muy pocas bacterias; -: no crece.

25 El aislado utilizado (HS1) no pudo crecer en los medios con un pH por debajo de 4 (pH 3,5 o 3,7). Se obtuvieron cultivos primarios en el medio con valores de pH que oscilaban de 4 a 7. El subcultivo resultó satisfactorio en estas placas; sin embargo, el subcultivo repetido sólo fue satisfactorio en los medios con valores de pH que oscilaban de 4,7 a 6. El crecimiento de *Candidatus Helicobacter suis* se produce en el medio con un pH que oscila de 4,5 a 6,0 con un óptimo en los valores de pH de 4,7 y 5,5.

En resumen, *Candidatus Helicobacter suis* tiene un crecimiento óptimo a 37 °C en las condiciones microaerobias en un sistema de dos componentes. El componente sólido comprende un medio para microorganismos de cultivo exigente (tales como agar para *Brucella*, agar de infusión cerebro-corazón o agar de Mueller-Hinton), complementado con suero de ternera fetal o sangre, complementos de crecimiento y con el pH ajustado a 5,0. Las placas se recubrieron con el componente líquido que es un caldo de un medio de crecimiento para los microorganismos de cultivo exigente (tales como caldo para *Brucella*, caldo de infusión cerebro-corazón o caldo de Mueller-Hinton) con o sin complementos de crecimiento, suero o ajuste del pH.

5

Ejemplo 9: vacunación de cerdos con antígenos de *Candidatus Helicobacter suis* procedentes de aislados de *Candidatus Helicobacter suis*

- 10 La seguridad y la eficacia de la vacuna de *Candidatus Helicobacter suis* se determina con un filtrado tratado con ultrasonidos. Los antígenos de *Candidatus Helicobacter suis* se inactivan y se alteran por tratamiento con ultrasonidos, seguido de la filtración estéril y la formulación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua. La dosis de antígenos se determina en función de la cantidad de proteína total que haya presente.

Diseño del estudio

- 15 Las cerdas se seleccionan de una piara preferiblemente libre de infección por *Candidatus Helicobacter suis*, según se determinó por PCR y el escrutinio de la ureasa de estómagos de compañeros de la piara al sacrificarlos. Los cochinitos de estas cerdas se asignan luego a uno de los tres grupos: un control salino, grupo con vacuna de *Candidatus Helicobacter suis* o un tercer grupo (NTX; sin tratar y alimentados con una dieta normal). El estudio tiene un diseño completamente aleatorizado y cada animal se encuentra en la unidad experimental. Después del destete,
- 20 se sacrifican las cerdas y el estómago se analiza por PCR para detectar la presencia de *H. suis*. Del estudio se descartan los cochinitos de cualquier cerda que diera positivo por PCR para *H. suis* en el estómago.

Tabla 2. Diseño del estudio

Tratamiento	Vacuna	Administración	Edad al vacunar [#]	Exposición
T01	Disolución salina	i.m.	1, 3, 5 semanas	5, 6, 7, 8 semanas
T02	<i>H. suis</i>	i.m.	1, 3, 5 semanas	5, 6, 7, 8 semanas
NTX ⁺	NA	NA	NA	NA

[#]Inyección intramuscular (i.m.) en el cuello, alternativamente a la izquierda (semana 1), derecha (semana 3) y luego a la izquierda (semana 5)

- 25 Todos los cerdos se sacrificarán a las 14 semanas de edad.

⁺NTX = no tratados; controles alimentados con una dieta normal durante el ensayo.

Tabla 3. Preparación del antígeno y del PVI

PVI*	Dosis del antígeno	Adyuvante [^] por dosis	Volumen por dosis
Disolución salina (PBS)	NA	1 ml	2 ml
<i>H. suis</i>	250 µg las primeras dos dosis; 500 µg la tercera dosis	1 ml	2 ml

*PVI = Producto Veterinario en Investigación

- 30 [^]El adyuvante —una concentración final del 5% de Amphigen[®]— se mezclará a 1:1 con el antígeno.

Vacunación y exposición

- 35 Cada cerdo se pesa un día antes de la primera vacunación y en la autopsia. Se vacunan los cerdos mediante inyección intramuscular en el cuello a 1, 3 y 5 semanas de edad. Los cerdos de control se vacunan al mismo tiempo con un volumen igual de disolución salina. Se observan los cerdos para detectar los signos clínicos 1 día antes y dos días después de la vacunación, y en el plazo de 1 hora después de la vacunación. El día de la primera vacunación, 2 semanas después de la tercera vacunación y justo antes de la autopsia, se recoge una muestra de sangre (aproximadamente de 2 a 10 ml en tubos separadores de suero) de cada cerdo para la serología de *Candidatus*

Helicobacter suis. Tras la separación, el suero se coloca en al menos 2 viales criogénicos. Se congelan las muestras de suero a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis posterior por ELISA en busca de los anticuerpos específicos contra *Candidatus Helicobacter suis*.

5 Para la exposición de *H. suis* se utilizan homogeneizados de raspados de las capas celulares superiores y de la mucosidad del antro de las muestras gástricas que han dado positivas para *H. suis* (con la prueba de la ureasa). Para confirmar la viabilidad y la dosis del homogeneizado de estómago de cerdo utilizado como material de exposición, se administra una alícuota de cada material de exposición a ratones BALB/c SPF macho de cinco semanas de edad libres de la infección por *H. suis*. Los ratones se sacrifican 2 semanas después y se usan las pruebas de ureasa y PCR para detectar selectivamente la presencia de *H. suis* el contenido del estómago.

10 Procedimientos después de la exposición y puntuación

Para determinar la infección, se diseccionan los tubos digestivos y se examina al microscopio la superficie mucosa del lado esofágico. Las lesiones se puntúan en una escala de 0-5 con el procedimiento de Hessing et al. (1992, *Tijdschrift voor Diegeneeskunde* 117, 445-450). Brevemente, las puntuaciones se asignan del siguiente modo: 0 = mucosa intacta; 1 = hiperqueratosis leve (< 50% del área de la superficie); 2 = hiperqueratosis grave ($\geq 50\%$ del área de la superficie); 3 = hiperqueratosis y unas pocas erosiones pequeñas (menos de 5 y de menos de 2,5 cm); 4 = hiperqueratosis y erosiones extensas (más de 5 erosiones y/o de más de 2,5 cm); 5 = hiperqueratosis y erosiones muy grandes (más de 10 erosiones o de más de 5 cm) y/o úlceras. Cada estómago también se puntúa con una escala análoga visual de 0 a 100 mm, donde 0 = ninguna lesión y 100 = úlcera perforante.

Después de la puntuación, se muestrean por PCR, con la prueba cuantitativa de la ureasa y por histopatología, 20 varios sitios de la mucosa glandular (aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$) de cada estómago. Se realiza la PCR para la detección específica de *Candidatus Helicobacter suis* como describen De Groote et al. (2000, más arriba). La carga bacteriana se analiza con la prueba cuantitativa de la ureasa descrita en la presente memoria. Para el examen histopatológico, las muestras de tejido de la mucosa gástrica se fijan en formol al 10% tamponado con fosfato, se procesan con los procedimientos habituales y se incluyen en parafina. Una sección de $5\text{ }\mu\text{m}$ se tiñe 25 inmunohistoquímicamente con un anticuerpo policlonal anti-*H. pylori* de cabra (Dakacytomation, Denmark A/S: Glostrup, Dinamarca) como describen De Groote et al. (2000). Una segunda sección se tiñe con HE para la puntuación de la gastritis. Los cambios histopatológicos se puntúan por 1) linfocitos difusos, una puntuación para la infiltración difusa de los linfocitos en la mucosa propia; 2) formación de folículos linfoides en la mucosa propia; 3) formación de folículos linfoides bajo la superficie del epitelio; 4) infiltración difusa de las células plasmáticas en la 30 mucosa propia. La presencia de folículos linfoides bajo la superficie del epitelio y la infiltración de las células plasmáticas son lesiones características y muy notables. Éstas se puntúan según la gravedad con una puntuación de 0 a 3: 1 = leve; 2 = moderado y 3 = grave. También se puntúan con una escala análoga visual (0 a 100 mm).

Resultados

35 El valor medio de la ureasa por antro, fondo o cardias del tejido del estómago de los cerdos vacunados es significativamente ($P < 0,10$) menor que para los cerdos que no están vacunados para el antro, fondo y/o cardias. El porcentaje de estómagos positivos por PCR para *Candidatus Helicobacter suis* es significativamente ($P < 0,10$) mayor para los cerdos sin vacunar y expuestos que para los cerdos vacunados y expuestos. El estómago de los cerdos NTX da negativo según se determina por PCR y con la ureasa.

40 Las variables secundarias son puntuaciones histológicas (profundidad linfocítica y formación de folículos superficiales y número de células plasmáticas) y puntuaciones de la úlcera gástrica macroscópica. Se espera que habrá una puntuación media por lesión significativamente mayor ($P \leq 0,10$) en los cerdos sin vacunar y expuestos contra *Candidatus Helicobacter suis* que en los cerdos vacunados y expuestos.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad de Gante Baele, Margo Haesebrouck, Freddy	
5	<120> Cultivo <i>in vitro</i> de una especie de <i>Helicobacter</i>	
	<130> R4479-PCT	
10	<150> US 60/865.723 <151> 2006-11-14	
	<160> 7	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1 <211> 18 <212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 1 tcaaactagg accgagtc	18
	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 2 taccttgta cttcacccca	20
35	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 3 cagcagccgc ggtaatac	18
45	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 4 ctcctacggg aggcagcagt	20
55	<210> 5 <211> 20	
60		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador	
	<400> 5	
	gttgcgctcg ttgcgggact	20
10	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
	aactcaaagg aattgacgg	19
20	<210> 7	
	<211> 1421	
	<212> ADN	
	<213> <i>Helicobacter sp.</i>	
25	<220>	
	<221> propiedad miscelánea	
	<222> (1)..(1421)	
	<223> Gen del ARN ribosómico 16S de <i>Helicobacter suis</i> , secuencia parcial. Número de acceso a GenBank	
30	AF127028	
	<400> 7	
	tgcaagtcga acgatgaagc ctagcttgct aggttgatta gtggcgcacg ggtgagtaat	60
	gcatagatga catgcccttt agtttgaat agccactaga aatggtgatt aataccaaat	120
	actaccttac gagggaaaga tttatcgcta aaggattggt ctatgtccta tcagcttggt	180
	ggtgaggtaa aggctacca aggctatgac gggatccgg cctgagaggg tgagcggaca	240
	cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atattgctca	300
	atgggggaaa ccctgaagca gcaacgccgc gtggaggatg aaggtttag gatcgtaaac	360
	tccttttggt agagaagata atgacggtat ctaacgaata agcaccggct aactccgtgc	420
	cagcagccgc ggtaatacgg agggtgcaag cgttactcgg aatcactggg cgtaaagagt	480
	gcgtaggcgg gaggacaagt caggtgtgaa atcctatggc ttaaccatag aactgcattt	540
	gaaactatcc ttctggagtg tgggagaggt aggtggaatt cttggtgtag gggtaaaatc	600
	cgtagagatc aagaggaata ctattgcga aggcgacctg ctggaacatc actgacgctg	660
	attgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccctaac	720
	gatggatgct agttgttggg aggccttgtc tttccagtaa tgcagctaac gccttaagca	780
	tcccgctgg ggagtacggt cgcaagatta aaactcaaag gaatagacgg ggacccgcac	840
	aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag ttacacgaag aaccttacct aggcttgaca	900
	ttgaaggaat tccctagaaa taggggagtg tctagcttgc tagaccctga aacaggtgc	960
	tgcacggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa	1020

ES 2 492 922 T3

cccttttct tagttgctaa caggttatgc tgc̄gactct aagaagactg cctgcgtaag 1080
caggaggaag gtgaggacga cgtcaagtca tcatggcct tacgcctagg gctacacacg 1140
tgctacaatg ggggtcacaa agagatgcaa agccgcgagg cagagctaat ctataaaaca 1200
cctcctagtt cggattgcag gctgcaactc gcctgcatga agctggaatc gctagtaatc 1260
gcaaatcagc tatgttcgg tgaatacgtt cccgggtcct gtactcaccg cccgtcacac 1320
catgggagtt gtgtttgcct taagtcagga tgctaaagca gctactgccc acggcacaca 1380
cagcgactgg ggtgaagtcg taacaaggta acccgggcgg c 1421

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento de una especie de *Helicobacter* a partir de una muestra, que comprende las etapas de cultivar dicha muestra, que comprende dicha especie de *Helicobacter*, en un sistema de cultivo, en donde dicho sistema comprende un medio de cultivo que tiene un pH entre 5,0 y 6,0, y cuyo medio está complementado con suero a al menos el 10% o con sangre a al menos el 7,5%.
5
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medio de cultivo comprende nutrientes para el crecimiento de bacterias de cultivo exigente.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos nutrientes para el crecimiento de las bacterias de cultivo exigente se seleccionan del grupo que consiste en nutrientes para *Brucella*, de Mueller-Hinton o de infusión cerebro-corazón.
10
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho medio de cultivo comprende al menos una sustancia selectiva que inhibe el crecimiento de los hongos y/o microorganismos grampositivos y/o gramnegativos que no sean la especie de *Helicobacter* a cultivar.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha al menos una sustancia selectiva se selecciona del grupo que consiste en: vancomicina, lactato de trimetoprima, polimixina B, cefsulodina, colistina, anfotericina B, violeta de genciana, nistatina y nisina.
15
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medio de cultivo comprende uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en vitamina B12, L-glutamina, adenina, guanina, ácido p-aminobenzoico, L-cistina, NAD (coenzima 1), cocarboxilasa, nitrato férrico, tiamina e hidrocloreuro de cisteína.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha especie de *Helicobacter* es *Helicobacter suis*.
20
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la secuencia del gen del ARNr 16S de dicha especie de *Helicobacter* tiene al menos una identidad de secuencia del 99% con la secuencia del gen del ARNr 16S con el número de acceso de GenBank AF127028 de 17 de noviembre de 1999 descrita en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1.
25
9. Aislado de *Helicobacter suis*, en donde la secuencia del gen del ARNr 16S de *Helicobacter suis* tiene una identidad de secuencia de al menos el 99% con la secuencia del gen del ARNr 16S con el número de acceso de GenBank AF127028 de 17 de noviembre de 1999 descrita en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1, libre de las bacterias u hongos presentes en el estómago, que se puede obtener mediante los procedimientos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
30
10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende la etapa de dar pases a una especie de *Helicobacter* como la aislada mediante un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa de aplicar dicha especie de *Helicobacter* aislada en un sistema de cultivo, en donde dicho sistema comprende un medio de cultivo que tiene un pH entre 4,0 y 7,0, en donde dicho medio está complementado con suero a al menos el 10% o con sangre a al menos el 7,5%, y la incubación en éste de la especie de *Helicobacter* aislada.
35
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha especie de *Helicobacter* es *Helicobacter suis*.
12. Utilización de un recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo sólido, en donde el medio sólido comprende sangre en una concentración entre el 7,5% y el 15% o que comprende suero en una concentración entre el 12,5% y el 25%, en donde el pH de dicho medio sólido se encuentra entre 5,0 y 5,5, para el aislamiento y/o el cultivo de una especie de *Helicobacter*.
40
13. Vacuna que comprende una preparación de antígenos de un aislado de *Helicobacter suis*, en donde la preparación de antígenos se selecciona del grupo que consiste en:
45
 - bacterias enteras muertas de *Helicobacter suis*,
 - bacterias debilitadas de *Helicobacter suis* atenuadas vivas, y
 - un lisado de bacterias enteras muertas de *Helicobacter suis* inactivas o de bacterias debilitadas de *Helicobacter suis* atenuadas vivas,
 - la fracción soluble de un cultivo bacteriano de *Helicobacter suis* tratado con ultrasonidos, y

- una proteína de *Helicobacter suis* seleccionada del grupo que consiste en una proteína de choque térmico, una proteína de la ureasa, *cagA* y *vacA*,

5 en donde dicho *Helicobacter suis* tiene una secuencia del gen del ARNr 16S que es idéntica al menos al 99% a la secuencia del gen del ARNr 16S con el número de acceso de GenBank AF127028 de 17 de noviembre de 1999 descrita en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1.

14. Procedimiento para producir una preparación de antígenos de *Helicobacter suis*, en donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

aislar *Helicobacter suis* de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de las reivindicaciones 10 u 11, y

10 producir una preparación de antígenos a partir del aislado de *Helicobacter suis* obtenido.

15. Utilización de uno o más de:

- un lisado de un aislado de *Helicobacter suis*,
- la fracción soluble de un cultivo bacteriano de *Helicobacter suis* tratado con ultrasonidos,
- una proteína de *Helicobacter suis* seleccionada del grupo que consiste en una proteína de choque térmico, una proteína de la ureasa, *cagA* y *vacA*,
- 15 – un aislado de *Helicobacter suis* atenuado vivo, y
- un aislado de *Helicobacter suis* entero muerto,

para la fabricación de una vacuna contra una infección por *Helicobacter suis*,

20 en donde dicho *Helicobacter suis* tiene una secuencia del gen del ARNr 16S que es idéntica al menos al 99% a la secuencia del gen del ARNr 16S con el número de acceso de GenBank AF127028 de 17 de noviembre de 1999 descrita en la SEQ ID n.º 7 y en la figura 1.

tgcaagtcga acgatgaagc ctagcttgct aggttgatta gtggcgcacg 50
 ggtgagtaat gcatagatga catgcccttt agtttggaat agccactaga 100
 aatggtgatt aataccaaat actaccttac gagggaaaga tttatcgcta 150
 aaggattggt ctatgtccta tcagcttggt ggtgaggtaa aggctcacca 200
 aggctatgac gggatccgg cctgagaggg tgagcggaca cactggaact 250
 gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atattgctca 300
 atgggggaaa ccctgaagca gcaacgccgc gtggaggatg aaggtttag 350
 gatcgtaaac tccttttggt agagaagata atgacggtat ctaacgaata 400
 agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc ggtaatacgg agggtgcaag 450
 cgttactcgg aatcactggg cgtaaagagt gcgtaggcgg gaggacaagt 500
 caggtgtgaa atcctatggc ttaaccatag aactgcattt gaaactatcc 550
 ttctggagtg tgggagagggt aggtggaatt cttggtgtag gggtaaaatc 600
 cgtagagatc aagaggaata ctcatcgca aggcgacctg ctggaacatc 650
 actgacgctg attgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagatacc 700
 tggtagtcca cgccctaac gatggatgct agttgttggg aggctttgtc 750
 tttccagtaa tgcagctaac gccttaagca tcccgcctgg ggagtacggt 800
 cgcaagatta aaactcaaag gaatagacgg ggaccgcac aagcggtgga 850
 gcatgtggtt taattcgaag ttacacgaag aaccttacct aggcttgaca 900
 ttgaaggaat tccttagaaa taggggagtg tctagcttgc tagaccctga 950
 aaacaggtgc tgcacggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atggtgggtt 1000
 aagtcccga acgagcgcaa ccctttttct tagttgctaa caggttatgc 1050
 tgccgactct aagaagactg cctgcgtaag caggaggaag gtgaggacga 1100
 cgtcaagtca tcatggcoct tacgcctagg gctacacacg tgctacaatg 1150
 gggtgcaaa agagatgcaa agccgcgagg cagagctaat ctataaaaca 1200
 cctcctagtt cggattgcag gctgcaactc gcctgcatga agctggaatc 1250
 gctagtaatc gcaaatcagc tatgttgagg tgaatacgtt cccgggtctt 1300
 gtactaccg cccgtcacac catgggagtt gtgtttgcct taagtcagga 1350
 tgctaaagca gctactgcc acggcacaca cagcgactgg ggtgaagtgc 1400
 taacaaggta acccgggcgg c 1421

Figura 1