

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 053**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

C07K 14/30 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006 E 06818865 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1957103**

54 Título: **Vacuna bacteriana contra agentes infecciosos bacterianos para la aplicación en animales**

30 Prioridad:

30.11.2005 DE 102005057643

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

03.12.2014

73 Titular/es:

**STIFTUNG TIERARZTLICHE HOCHSCHULE
HANNOVER (100.0%)
BISCHOFSHOLER DAMM 15
30173 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:

**GERLACH, GERALD-F.;
MEENS, JOCHEN;
MAAS, ALEXANDER y
SELKE, MARTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 524 053 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

Vacuna bacteriana contra agentes infecciosos bacterianos para la aplicación en animales

- 5 La invención se refiere a una vacuna bacteriana de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 y a un procedimiento para su producción de acuerdo con la reivindicación 3. Además, la invención se refiere a una bacteria de acuerdo con la reivindicación 4, a una proteína inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7, a su uso de acuerdo con la reivindicación 10 y a un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11.
- 10 En la explotación agraria de animales útiles, en particular en explotaciones porcinas, las afecciones de las vías respiratorias y las infecciones del aparato gastrointestinal son responsables de considerables daños económicos. Las afecciones no solamente causan una elevada mortalidad, índices de crecimiento reducidos y una peor calidad de la carne, sino que también son responsables de más de la mitad de todos los tratamientos antibióticos en el sector de la explotación de cerdos de engorde (Elbers *et al.*, 1990, Sero-epidemiological screening of pig sera collected at the slaughterhouse to detect herds infected with Aujeszky's disease virus, porcine influenza virus and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* in the framework of an integrated quality control system. Vet.Q. 12, 221-230).
- 15 Las vacunas, en particular contra infecciones bacterianas, en la explotación agraria de animales útiles se emplean casi en exclusiva de forma metafiláctica y no profiláctica. A este respecto, en el centro de las medidas se encuentra la cabaña y no el animal individual. De este modo se vacunan en particular cabañas en las que es endémico un patógeno contra este patógeno, independientemente de si un animal individual ya está infectado o no.
- 20 Las vacunas usadas actualmente en veterinaria contra agentes infecciosos bacterianos son, sobre todo, bacterinas formuladas con adyuvante sencillas, por ejemplo, bacterias completas inactivadas con formalina. En este caso, por un adyuvante se ha de entender una sustancia que se administra como mezcla con una sustancia (antígeno), que desencadena una respuesta inmune y que induce anticuerpos, o por separado de la misma y, de forma inespecífica, aumenta o modifica la respuesta inmune a este antígeno. Causan una protección frecuentemente serotípica frente a afecciones clínicas, sin embargo, sin impedir una colonización latente de las mucosas. Por ello, el agente infeccioso se puede continuar propagando también por animales vacunados.
- 25 Los patógenos más significativos de enfermedades infecciosas respiratorias, tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* o *Mycobacterium bovis*, son altamente contagiosos y aparecen frecuentemente como colonizadores latentes de mucosas del tracto respiratorio. En particular, *A. pleuropneumoniae* y *M. hyopneumoniae* tienen en común que los animales convalecientes siguen siendo frecuentemente durante meses portadores del patógeno. Por ello, respaldado por el comercio con animales y transportes de animales, se ha producido una extensa propagación de los patógenos. Las vacunas que se encuentran actualmente en el mercado son, casi en exclusiva, bacterianas. Ninguna de las vacunas evita una infección latente ni permite una diferenciación entre animales vacunados e infectados.
- 30 Las infecciones por *Salmonella* Typhimurium representan, bajo el punto de vista de la protección sanitaria del consumidor, la afección más importante del aparato gastrointestinal en cerdos. Actualmente hay vacunas en el mercado contra la salmonelosis de los terneros y contra la colonización por salmonelas de los cerdos y de las gallinas ponedoras. En todos los casos están disponibles también o exclusivamente vacunas vivas atenuadas. En terneros se evita de forma eficaz, gracias a la vacunación, la aparición de manifestaciones clínicas. En gallinas ponedoras se reduce claramente la transmisión intraovárica así como la excreción del patógeno, en cerdos se reduce la excreción del patógeno.
- 35 Las vacunas vivas admitidas contra salmonelas incluyen patógenos atenuados producidos mediante mutaciones químicas que se pueden diferenciar genotípica y fenotípicamente de la cepa natural. Pero no es posible una diferenciación serológica de animales vacunados e infectados en el caso de la aplicación de estas vacunas.
- 40 Por tanto, las vacunas de bacterinas actuales no permiten ninguna diferenciación serológica de animales útiles vacunados e infectados, por ejemplo, mediante aplicación de un ensayo ELISA. Por tanto, no es posible crear, con ayuda de estas vacunas, cabañas libres de patógenos especificados (SPF) y mantenerlas controlables bajo protección vacunal. La generación de cabañas SPF, sin embargo, es el ivo ideal en el sentido de la protección preventiva del consumidor y la rentabilidad.
- 45 Además es problemático vacunar cerdos en explotaciones controladas en cuanto a salmonelas ((BMVEL 1996; Leitlinie zur Reduzierung des Eintrags von Salmonellen durch Schlachtschweine in die Fleischgewinnung; un reglamento correspondiente está en preparación), ya que la clasificación y supervisión de estas explotaciones se realiza a través de la serología y los animales vacunados reaccionan serológicamente de forma positiva.
- 50 El fin de la generación de cabañas SPF se ha conseguido para la enfermedad de Aujeszky en cerdos (causada por el virus herpes porcino I) y en infecciones de bovinos por el virus herpes bovino 1 (BHV1) mediante la inclusión de vacunas marcadoras. Las vacunas marcadoras se basan en cepas vacunales estructuralmente modificadas que
- 55
- 60
- 65

posibilitan una diferenciación, por norma general serológica, de animales vacunados e infectados de forma natural. Se diferencia entre vacunas de marcador positivo y negativo.

5 Para la producción de vacunas de marcador positivo se introduce, por norma general, un antígeno marcador mediante ingeniería genética en la cepa vacunal, que por norma general induce la formación de anticuerpos adicionales o, al menos, se puede comprobar genotípica o fenotípicamente. Es desventajoso que las infecciones posteriores por un agente infeccioso nativo después de una vacunación, es decir, vacunado más infectado, ya no se pueden comprobar. Por tanto, la vacuna de marcador positivo solamente permite la diferenciación de animales no vacunados, no vacunados más infectados y vacunados.

10 Las vacunas de marcador negativo están caracterizadas por que al genoma del patógeno le falta una región definida del genoma. Estas mutaciones se pueden producir por vía natural o mediante ingeniería genética. La ausencia de una sección definida de un gen que codifica una proteína inmunógena conduce a la modificación de la respuesta inmune humoral, que permite una diferenciación entre animales solamente infectados, solamente vacunados y vacunados más infectados. No es posible una delimitación de animales vacunados más infectados y solamente infectados, siendo, sin embargo, esta delimitación médica y económicamente irrelevante. La ventaja de vacunas de marcador negativo sin ADN extraño además es que, ciertamente se trata de organismos modificados genéticamente, pero que no se incluyen en la ley alemana sobre ingeniería genética.

20 Para prevenir y combatir enfermedades infecciosas bacterianas en animales útiles, sin embargo, a diferencia del sector de las enfermedades infecciosas víricas, hasta la fecha no se han desarrollado de forma específica vacunas de marcador.

25 KOTLOFF K L ET AL: "*Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set, and guaBA, is highly attenuated in humans". INFECTION AND IMMUNITY MAR 2000, tomo. 68, N° 3, marzo 2000 (2000-03), páginas 1034-1039, XP002454965 ISSN: 0019-9567 describe una vacuna de la cepa CVD 1207 de *Shigella flexneri* 2a (*Enterobacteriaceae*) con mutaciones de delección específicas en los genes virG, sen, set y guaBA.

30 El artículo de revisión MASTROENI P ET AL: "Salmonella: immune responses and vaccines". VETERINARY JOURNAL (LONDON, ENGLAND: 1997) MAR 2001, tomo 161, N° 2, marzo 2001 (200103), páginas 132-164, XP002454966 ISSN: 1090-0233 describe la facilitación de vacunas contra infecciones por salmonela. Se describen como vacunas adecuadas distintos mutantes de simples a triples. En una tabla están indicadas diversas dianas génicas.

35 MEYER P N ET AL: "Virulence of a *Salmonella* Typhimurium OmpD mutant". INFECTION AND IMMUNITY ENE 1998, tomo 66, N° 1, enero 1998 (1998-01), páginas 387-390, XP002455109 ISSN: 0019-9567 describe mutantes de OmpD de *Salmonella* Typhimurium. Sin embargo, estos mutantes no son adecuados como vacuna bacteriana, ya que los mismos no se diferencian en su virulencia del tipo natural.

40 DORMAN C J ET AL: "CHARACTERIZATION OF PORIN AND OMP-R MUTANTS OF A VIRULENT STRAIN OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM OMP-R MUTANTS ARE ATTENUATE IN-VIVO" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, EEUU, tomo 57, N° 7, julio 1989 (1989-07), páginas 2136-2140, XP002112175 ISSN: 0019-9567 se refiere a mutantes de *Salmonella* Typhimurium con delecciones en las porinas ompC, ompD, ompF y el regulador ompR, conduciendo la mutación en ompR a una cepa avirulenta, mientras que las otras mutaciones no influyen en la virulencia en absoluto o solo ligeramente.

45 Por tanto, la presente invención se basa en el objetivo de desarrollar vacunas marcadoras para combatir enfermedades infecciosas bacterianas que permitan una diferenciación serológica sencilla de animales agrarios vacunados e infectados de forma natural, en particular en la explotación porcina.

50 Este objetivo se consigue mediante una vacuna bacteriana con las características de la reivindicación 1.

55 La vacuna bacteriana de acuerdo con la invención para la aplicación en animales, en particular en animales útiles, comprende al menos un serotipo del organismo *Salmonella enterica* con al menos, respectivamente, una mutación de desactivación (*knock-out*) en al menos tres genes cromosómicos distintos, comprendiendo el serotipo *Salmonella* Typhimurium con al menos una mutación de desactivación en un gen que codifica la proteína OmpD.

60 La mutación de desactivación en la región que codifica la proteína inmunógena, por lo tanto, causa que la proteína inmunógena correspondiente y, por tanto, también los anticuerpos correspondientes en un animal vacunado ya no se formen. Ya que la proteína inmunógena, que ya no se sigue expresando debido a la manipulación genética, sin embargo, no es esencial para una inmunidad protectora, la vacuna de acuerdo con la invención sigue ofreciendo al igual que antes una protección inmune eficaz.

65 Por el contrario, las proteínas esenciales para la respuesta inmune protectora no se manipulan, de tal manera que la vacuna ofrece una protección activa del animal vacunado frente al respectivo agente infeccioso. Por tanto, es posible diferenciar entre animales vacunados e infectados de forma natural mediante ensayos serológicos sencillos, tales

como ELISA, ya que el patógeno natural no manipulado produce todas las proteínas inmunógenas, sin embargo, al patógeno usado como vacuna le faltan algunas proteínas inmunógenas no necesarias para la protección.

5 La manipulación del agente infeccioso, por tanto, se basa esencialmente en proteínas inmunógenas no esenciales para la protección y sus correspondientes genes, en una cepa diana genéticamente manipulable y un sistema para la contraselección para la identificación de la cepa diana manipulada.

10 Preferentemente están introducidas otras mutaciones de desactivación en genes cromosómicos que no codifican proteínas inmunógenas, que, sin embargo, sirven para atenuar el patógeno bacteriano.

La vacuna comprende al menos un agente infeccioso del grupo de las bacterias gram negativas, en particular de la familia de las enterobacterias, *Pasteurellaceae* o micoplasmas, que son responsables de distintas enfermedades infecciosas en animales útiles.

15 El agente infeccioso contenido en la vacuna puede ser también al menos un serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Mycoplasma hyopneumoniae*.

20 La vacuna presenta también ventajosamente al menos un agente infeccioso del grupo de las bacterias gram positivas, preferentemente de la familia de las micobacterias que causan afecciones de las vías respiratorias, tales como *Mycobacterium bovis*.

25 Las mutaciones de desactivación introducidas en el agente infeccioso representan ventajosamente deleciones no marcadas, habiendo de entenderse por una deleción no marcada una deleción de una sección del genoma sin introducción de un marcador de selección especial, tal como casetes de resistencia a antibióticos en esta sección del genoma.

30 Ventajosamente, al menos un serotipo del organismo *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta mutaciones de desactivación en al menos tres de los genes que codifican las proteínas ApxIIA (Nº de Acceso AAU847009), UreC (Nº de Acceso AAC00060), DmsA (Nº de Acceso AAN28298), AspA (Nº de Acceso NC_003998), HypB (Nº de Acceso ZP_00134397) y/o FurA (NC_004130).

35 La proteína ApxIIA es una toxina secretada muy inmunógena que aparece en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* a excepción del serotipo 10. UreC es un componente del complejo de enzima ureasa que hidroliza la urea hasta dar amoníaco y dióxido de carbono y, por tanto, facilita al patógeno la persistencia en el medio ácido del "fluido de revestimiento epitelial" del pulmón.

40 El gen *dmsA* codifica una DMSO-reductasa asociada a virulencia, expresada en condiciones anaerobias (Baltes *et al.*, 2003, Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. Infect.Immun. 71, 6784-6792). Un mutante sencillo correspondiente del serotipo 7 de *A. pleuropneumoniae* resultó como ligeramente atenuado en el ensayo de infección.

45 El gen *aspA* codifica una subunidad de la aspartato-amonió-liasa (Jacobsen *et al.* 2005, Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. Infect Immun 73, 226-234) y el gen *hybB* codifica la enzima [Ni,Fe]-deshidrogenasa 2 (Baltes, Kyaw *et al.*, 2004, Lack of influence of the anaerobic [NiFe] hydrogenase and L-1,2 propanediol oxidoreductase on the outcome of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. Vet.Microbiol 102, 67-72). Ambas enzimas tienen una importancia en el metabolismo anaerobio de *A. pleuropneumoniae* y posibilitan al patógeno sobrevivir en el medio anaerobio de las lesiones pulmonares.

50 El gen *furA* (ferric uptake regulation, *fur*) codifica un regulador dependiente de hierro global. El mismo es un represor transcripcional de promotores regulados por hierro, que se une al ADN cuando está presente hierro. Ya se ha construido un mutante de *fur* del serotipo 7 de *A. pleuropneumoniae* y se ha ensayado en animales (Jacobsen *et al.* 2005, Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. Infect Immun 73, 226-234). A este respecto, se ha comprobado que el mutante ya solamente causa síntomas muy moderados de la enfermedad, pero todavía induce una fuerte respuesta inmune.

55 El objetivo de la invención se consigue también mediante un procedimiento para la producción de la vacuna de acuerdo con la reivindicación 3.

60 El procedimiento de acuerdo con la invención para la producción de la vacuna está caracterizado por que para la mutagénesis de OmpD en el serotipo *Salmonella* Typhimurium se usa un vector pROKB1 con un replicón R6K que contiene el gen de OmpD con una mutación de desactivación. El plásmido de transconjugación contiene un gen del agente infeccioso con al menos una mutación de desactivación. Preferentemente, el gen contiene una deleción interna y codifica una proteína inmunógena que genera anticuerpos no esenciales para la protección inmune eficaz.

65

- 5 El plásmido de transconjugación descrito en el documento DE 19928073 comprende la región de movilización mobRP4, un polienlazador, un replicón del tipo ColE1, un determinante de resistencia y una fusión de transcripción del gen de sacB de *Bacillus subtilis* con el promotor omIA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El gen que codifica una proteína inmunógena con una delección no marcada, a este respecto, está insertado como ADN exógeno en el polienlazador.
- La introducción de las mutaciones de desactivación en los al menos tres genes cromosómicos se realiza ventajosamente de forma sucesiva.
- 10 La vacuna de acuerdo con la invención se usa ventajosamente como vacuna viva bacteriana de marcador negativo y como vacuna inactivada bacteriana de marcador negativo.
- Una vacuna viva comprende, a este respecto, una cepa atenuada, infecciosa pero debilitada, que es capaz de replicarse pero es avirulenta. A diferencia de esto, una vacuna inactivada no tiene capacidad de replicación. La inactivación se realiza mediante alcoholes o aldehídos. La inducción de una respuesta inmune se desencadena por adyuvantes tales como Al(OH)₃. En vacunas de subunidades no se requiere ninguna inactivación.
- 15 La solución para el objetivo de acuerdo con la invención se consigue también mediante una bacteria de acuerdo con la reivindicación 4 usada en la vacuna bacteriana de acuerdo con la invención así como un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11.
- El procedimiento de diagnóstico para la diferenciación de animales infectados y animales vacunados con la vacuna bacteriana de acuerdo con la invención está caracterizado por la determinación serológica de proteínas inmunógenas no esenciales para la protección inmune, en particular mediante un ensayo ELISA.
- 25 El objetivo planteado se consigue también mediante una proteína inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7 y su uso de acuerdo con la reivindicación 10.
- Por consiguiente, la proteína inmunógena de acuerdo con la invención de al menos un agente infeccioso bacteriano de un animal, usada en una vacuna, está caracterizada por que genera anticuerpos que preferentemente no son esenciales para una respuesta inmune protectora, interaccionando con anticuerpos de al menos un suero de cerdos infectados por *Salmonella* Typhimurium y con anticuerpos de al menos un suero de cerdos vacunados frente a *Salmonella* Typhimurium.
- 30 La proteína de acuerdo con la invención se puede comprobar preferentemente al interaccionar la proteína con anticuerpos de al menos un suero de animales infectados de forma natural o infectados de forma natural y vacunados, pero no, o solo parcialmente, con anticuerpos de al menos un suero de animales solamente vacunados con vacunas marcadoras de la misma especie.
- 40 La interacción específica de la proteína de acuerdo con la invención con los sueros de un animal infectado de forma natural o infectado de forma natural más vacunado se basa en la unión de un anticuerpo presente en los sueros a su antígeno específico.
- En el caso de una infección de un animal por un agente infeccioso natural, normalmente, se expresa una pluralidad de proteínas inmunógenas del agente infeccioso, tanto proteínas esenciales para la protección inmune como proteínas no esenciales. Por el contrario, los agentes infecciosos usados como vacunas vivas son bacterias debilitadas en cuanto a su virulencia, que están construidas de tal manera que no expresan al menos una proteína inmunógena que no es esencial para la inmunización. Por tanto, los sueros de animales vacunados contienen otro espectro de anticuerpos y, por lo tanto, se diferencian de los sueros de los animales infectados de forma natural.
- 50 Las proteínas de acuerdo con la invención, por tanto, se pueden detectar preferentemente en animales infectados de forma natural o en infectados de forma natural más vacunados y, por tanto, forman la base para un procedimiento de ensayo serológico para la diferenciación de animales vacunados con la vacuna de acuerdo con la invención y animales infectados de forma natural así como infectados de forma natural más vacunados.
- 55 Ventajosamente, la proteína inmunógena muestra una interacción con anticuerpos de sueros de cerdos infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae*, sin embargo, ninguna interacción, o solamente una muy débil, con anticuerpos de sueros de cerdos vacunados frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*. La vacuna usada en esta vacunación se basa, ventajosamente, en patógenos inactivados de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las proteínas inmunógenas preferentes son las lipoproteínas hipotéticas proteína MHP 378 (Nº de Acceso YP_115889) y MHP 651 (Nº de Acceso YP_116159) de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 60 Pero la proteína inmunógena de acuerdo con la invención también se puede comprobar al interaccionar, preferentemente, con anticuerpos de al menos un suero de cerdos infectados por *Salmonella* Typhimurium y con anticuerpos de al menos un suero de cerdos vacunados frente a *Salmonella* Typhimurium. Una proteína inmunógena preferente identificada en *Salmonella* Typhimurium es la proteína OmpD.
- 65

- 5 Para proveer una vacuna viva ya existente contra *Salmonella* Typhimurium de un marcador, es necesario que el gen a mutar codifique una proteína inmunógena que es reconocida por anticuerpos que son generados tanto por animales infectados de forma natural como por vacunados. Los sueros de animales que obtienen la vacuna viva provista del correspondiente marcador en forma de un gen deleciónado ya no reaccionan posteriormente con esta proteína.
- La proteína de acuerdo con la invención y su ácido nucleico correspondiente forman la base para la mutagénesis del respectivo agente infeccioso para el desarrollo de una vacuna marcadora.
- 10 Preferentemente, la proteína de acuerdo con la invención se usa para la detección de animales infectados de forma natural y/o animales infectados de forma natural y vacunados, en particular de cerdos, y/o como vacuna.
- Además, el objetivo planteado se consigue mediante un ácido nucleico y su uso.
- 15 El ácido nucleico codifica al menos una proteína inmunógena que induce preferentemente anticuerpos no esenciales para una respuesta inmune protectora y está caracterizado por al menos una mutación para la adaptación a la utilización de codón específica de al menos un hospedador de expresión adecuado.
- 20 Ventajosamente, el ácido nucleico codifica la proteína MHP 378 de *Mycoplasma hyopneumoniae* y contiene las mutaciones A629G, A761G y A1757G. El ácido nucleico codifica, en particular, el extremo carboxi de MHP 378 comenzando en la posición de aminoácido 286 (posición de ácido nucleico 856, SEC ID N° 1). El ácido nucleico codifica también ventajosamente la proteína MHP 651 de *Mycoplasma hyopneumoniae* y presenta las mutaciones A731G, A931G, A1055G, A1424G y A1811G, codificando el ácido nucleico preferentemente el extremo carboxi de MHP 651 comenzando en la posición de aminoácido 351 (posición de ácido nucleico 1051, SEC ID N° 2).
- 25 El ácido nucleico se usa preferentemente para la producción de proteínas recombinantes, en particular en *E. coli* y/o *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- 30 Un vector de ADN recombinante comprende ventajosamente al menos un ácido nucleico, estando presente el vector en particular en una célula hospedadora. Para la producción de una proteína recombinante se cultiva ventajosamente la célula hospedadora que contiene el vector de ADN en condiciones para la expresión de la respectiva proteína inmunógena y la enzima se obtiene de la célula hospedadora.
- 35 Ventajosamente se usa la proteína recombinante para la detección de animales infectados de forma natural y/o vacunados y como vacuna.
- La invención se explica con más detalle a continuación con referencia a varios ejemplos de realización y figuras. Muestran:
- 40 La Figura 1, deleción en *apxIIA* que comprende 1518 pares de bases
- La Figura 2, análisis de PCR de cepas de mutantes generados $\Delta apxIIA$ con cebadores internos, con carril 1, tipo natural de serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*; carril 2, serotipo 1 de $\Delta apxIIA$; carril 3, tipo natural de serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*; carril 4, serotipo 2 de $\Delta apxIIA$; carril 5, tipo natural de serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*; carril 6, serotipo 5 de $\Delta apxIIA$; carril 7, tipo natural de serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae*; carril 8, serotipo 9 de $\Delta apxIIA$ y carril M marcadores
- 45 La Figura 3, análisis de PCR de los mutantes contruidos triples, cuádruples y quíntuples, habiéndose comprobado las deleciones en *aspA* (A) y en *hybB* (B) con cebadores que se encuentran fuera de la región génica deleciónada. El carril 1 muestra respectivamente el tipo natural del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*; el carril 2, el mutante triple del serotipo 2; el carril 3, el mutante cuádruple del serotipo 2 ($\Delta hybB$); el carril 4, el mutante cuádruple del serotipo 2 ($\Delta aspA$); el carril 5, el mutante quíntuple del serotipo 2 y el carril M, el marcador.
- 50 La Figura 4, "puntuación de lesión pulmonar" de cerdos infectados de forma experimental, representada como "cajas entalladas", a este respecto la constricción central en cada caja representa la media geométrica, la delimitación superior e inferior de esta caja muestran respectivamente el centro de los valores en cada mitad de datos y los puntos más superiores e inferiores se corresponden con los valores mínimos o máximos
- 60 La Figura 5, análisis de PCR del gen *fur* en los mutantes contruidos de triples a séxtuples con cebadores internos, habiéndose usado para el mutante séxtuple con una deleción en el gen *fur* cebadores que se encuentra fuera de la zona deleciónada del gen *fur*; con el carril 1, el tipo natural del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*; el carril 2, el mutante triple del serotipo 2; el carril 3, el mutante cuádruple del serotipo 2 ($\Delta hybB$); el carril 4, el mutante quíntuple del serotipo 2; el carril 5, el mutante séxtuple del
- 65

serotipo 2 con delección en el gen *fur* y el carril M, marcador.

La Figura 6, resultados patológicos y serológicos después de exposición heteróloga. A) la parte de lesiones pulmonares en forma de "cajas entalladas" se muestra para todos los cerdos. Cuatro cerdos del grupo vacunado con el mutante séxtuple se sacrificaron el día 7 después de la infección, todos los restantes cerdos supervivientes el día 21 después de la infección. La estrella muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el ensayo de Wilcoxon. B) respuesta inmune humoral de los cerdos de control y de los cerdos vacunados un día antes y 21 días después de la infección establecida mediante el uso de un extracto de detergente (deELISA) o de la proteína ApxIIA recombinante (ApxII-ELISA) como antígenos de fase sólida. La respuesta inmune para el ApxIIA-ELISA está representada en unidades de ELISA basándose en un patrón externo. Se consideraron positivas las actividades con mayor igual 25 unidades ELISA en un ApxII-ELISA normalizado. Para el deELISA se indicó la respuesta inmune como título sérico en comparación con un control interno.

La Figura 7, representación esquemática de la construcción del vector de expresión mhp378

La Figura 8, reactividad de las proteínas de fusión GST-Mhp378-C y GST-Mhp651-C con sueros hiperinmunes de conejo dirigidos contra *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. flocculare*. A) placas de ELISA comerciales (IDEXX HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae*, IDEXX Laboratories) recubiertas con el antígeno celular de *M. hyopneumoniae* completo. B) placas de microtitulación de 96 pocillos Polysorb® (Nunc, Roskilde, Dinamarca) recubiertas con proteína de fusión GST-Mhp651-C y C) con proteína de fusión GST-Mhp378.

La Figura 9 representación esquemática de la estructura calculada de la proteína OmpD en relación con el genotipo. Epitopos antigénicos (azul) / zonas expuestas a superficie (verde).

La Figura 10, comprobación de la mutación *ompD* mediante PCR (A), transferencia de Southern después de digestión con PstI y BspDI (B) y electroforesis de campo pulsado (PFGE) después de digestión con XbaI (C) con el tipo natural en carril 1 y el mutante $\Delta ompD$ en carril 2.

Ejemplo de realización 1

1.1. Construcción de mutantes negativos a toxina de ApxII de los serotipos 1, 2, 5 y 9 A. pleuropneumoniae para su uso como vacuna inactivada de marcador negativo

El gen *apxIIA* codifica la toxina ApxIIA, una toxina excretada muy inmunógena que aparece en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* a excepción del serotipo 10. Gracias a la delección, los animales que se han vacunado con la vacuna marcadora se deben poder diferenciar serológicamente de animales que se han infectado con el tipo natural. Un ELISA con el que se comprueban anticuerpos frente a la toxina ApxIIA ya se está usando.

La delección se realizó mediante el uso del sistema "transconjugación de una sola etapa" establecido y patentado (Oswald, Tonpitak *et al.*, 1999, A single-step transconjugation system for the introduction of unmarked deletions into *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 using a sucrose sensitivity marker. FEMS Microbiol.Lett. 179, 153-160). Para esto se incluyó el gen *apxIIA* acortado (*Dapx2A*) del serotipo 2 en el vector de conjugación pEMOC2 (Baltes *et al.*, 2003, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. Fems Microbiology Letters 220, 41-48). Este vector contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y no está en disposición de replicar *A. pleuropneumoniae*. Para facilitar los trabajos de clonación con los vectores de conjugación disponibles, al comienzo de los trabajos se secuenciaron por completo el vector pEMOC2 así como el vector de conjugación patentado, pBMK1, que lleva un gen de resistencia a kanamicina. Los datos de secuencia se han publicado en Genbank con los números de acceso AJ868289 (pBMK1) y AJ868288 (pEMOC2).

El derivado de pEMOC2 que lleva el gen *apxIIA* acortado ($\Delta apxIIA$) se denominó pAPX700 y se transfirió mediante conjugación de la cepa $\beta 2155$ de *E. coli* (*dapA*) a las correspondientes cepas de *A. pleuropneumoniae*. Allí, esta construcción se debía integrar mediante recombinación homóloga en el ADN genómico ("entrecruzamiento simple"). Se cultivaron colonias resistentes de cloranfenicol que se produjeron en la segunda etapa, la contraselección, en un medio con sacarosa. En el vector de conjugación se encuentra adicionalmente el gen *sacB*. El mismo codifica la enzima levansacarosa que en bacterias gram negativas transmite una sensibilidad frente a sacarosa. Gracias al cultivo en el medio que contiene sacarosa, por tanto, se ven favorecidas aquellas bacterias que han perdido de nuevo el vector mediante una segunda recombinación homóloga. En esta contraselección se deleciona el gen mutado o el gen de tipo natural, de tal manera que en el caso de la delección del gen de tipo natural se producen mutantes isogénicos que no contienen ADN extraño.

Para la cepa del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* se pudo llevar a cabo la delección del gen *apxIIA* de forma exitosa inmediatamente. En los serotipos 5 y 9 no se pudieron generar en primer lugar "entrecruzamientos simples". La causa de esto probablemente eran ligeras diferencias de secuencia entre los genes *apxIIA* de los serotipos. Por tanto, para los serotipos 5 y 9 de *A. pleuropneumoniae* se construyeron vectores de conjugación específicos de

serotipo que contenían el gen *apxIIA* del respectivo serotipo de *A. pleuropneumoniae* (Figura 1). Los plásmidos se denominaron pAPX705 (serotipo 5) y pAPX709 (serotipo 9).

5 Con el vector de conjugación específico de serotipo para el serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae* se pudo generar un mutante de *ApxIIA* isogénico para ese serotipo. En el serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae* ciertamente se pudieron generar colonias resistentes a cloranfenicol. Pero las mismas en la contraselección reversionaron siempre de nuevo al tipo natural.

10 Ya que para la solución de los problemas en la mutagénesis del serotipo de *A. pleuropneumoniae* eran necesarios trabajos más exhaustivos, en primer lugar se seleccionó una cepa del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* como componente alternativo para la vacuna inactivada de marcador negativo. Este serotipo es el serotipo que aparece con mayor frecuencia en América del Norte, mientras que el serotipo 9 está descrito sobre todo en Alemania y también aquí es responsable solo de una parte relativamente pequeña de las afecciones.

15 Ya que según la búsqueda en el banco de genoma los genes *apxIIA* de los serotipos 1 y 5 de *A. pleuropneumoniae* son idénticos en las zonas en las que, en el transcurso del procedimiento, tiene lugar una recombinación homóloga, se usó el vector de conjugación específico del serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae* para la creación de un mutante de delección isogénico del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*. De este modo se pudo generar para el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* con éxito un "entrecruzamiento doble", es decir, un mutante isogénico. Los mutantes construidos de este modo de los serotipos 1, 2 y 5 de *A. pleuropneumoniae* se emplearon entonces para la producción de una vacuna de subunidades. En paralelo a esto, en el transcurso del último año se ha terminado con éxito asimismo la mutagénesis del serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae*. Los mutantes de *apxIIA* de los cuatro serotipos se caracterizaron mediante análisis de PCR (Figura 2), análisis de transferencia de Southern después de digestión con enzimas de restricción de ADN cromosómico, electroforesis de campo pulsado así como secuenciación de ADN como mutantes isogénicos libres de ADN extraño. Además se demostró el silenciamiento de la toxina *ApxIIA* mediante análisis de transferencia de Western después de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de sobrenadantes de cultivo de todos los serotipos.

30 1.2. Comprobación de la eficacia de una vacuna de subunidades producida a base de los mutantes en cerdo y desarrollo de una vacuna inactivada de *A. pleuropneumoniae* de marcador negativo

De los mutantes generados de los serotipos 1, 2 y 5 de *A. pleuropneumoniae* se formuló, según el método descrito y patentado (patente DE 197 53 176) por Goethe *et al.* (2000; A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. Vaccine 19: 966-975), una vacuna inactivada. La misma se comprobó mediante análisis de transferencia de Western respecto a dos de sus proteínas antigénicas y a continuación se ensayó en un ensayo animal. A este respecto se usaron 24 cerdos con edad de 4 semanas. Las inmunizaciones se realizaron a la edad de 4 y 7 semanas, inmunizándose 14 cerdos con la vacuna marcadora inactivada generada y sirviendo 10 cerdos de animales de control y vacunándose con un placebo al cual le faltaban los componentes antigénicos. A continuación, todos los animales (a excepción de cuatro cerdos vacunados con la vacuna marcadora inactivada) se infectaron a la edad de 10 semanas con una cepa de serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* heteróloga (es decir, con otra cepa de serotipo 2 que la que había servido para la producción de la vacuna) en la cámara de aerosol. Los cuatro animales no infectados sirvieron de grupo de control para asegurar que tampoco en el transcurso posterior de la cría se formaron anticuerpos contra la proteína *ApxII*. Una mitad de los grupos de animales se eutanasió después de 7 días y el resto, después de 21 días y se examinó mediante anatomía patológica así como bacteriológicamente.

En el transcurso de este ensayo se ha podido comprobar una protección muy buena tanto frente a síntomas clínicos como frente a anatomopatológicos para animales que se habían inmunizado con la vacuna marcadora inactivada. Ocho de diez animales vacunados no tenían ningún tipo de modificación de anatomía patológica, mientras que todos los animales de control en parte presentaban lesiones muy intensas en los pulmones. Además, con ayuda del ELISA se pudieron detectar anticuerpos frente a la toxina *ApxIIA*. El serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* empleado para la exposición se pudo comprobar, en cerdos vacunados, significativamente con menor frecuencia que en cerdos no vacunados del grupo de control (ensayo de Wilcoxon, $p < 0,05$).

55 Y que una vacuna para *A. pleuropneumoniae* adicionalmente a los serotipos contenidos en la vacuna también debía proteger frente a otros serotipos, se llevó a cabo otro ensayo animal. A este respecto se dividieron 15 cerdos en 2 grupos; un grupo de 10 animales se inmunizó con la vacuna marcadora inactivada compuesta de los serotipos 1, 2 y 5, el otro grupo con 5 animales, con un placebo. Las inmunizaciones se realizaron a la edad de 4 y 7 semanas. Entonces, en la 10ª semana de vida se infectaron los animales con una cepa de serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae*. La eutanasia y las necropsias se realizaron el día 7 o el día 21 después de la exposición. Los resultados después de la exposición mostraban una protección, que abarcaba serotipos, muy buena de la vacuna. De este modo, todos los animales del grupo de control desarrollaron disnea, anorexia y depresiones y murieron en el intervalo de 48 horas después de la exposición. Los animales inmunizados no mostraron ningún tipo de síntomas clínicos y la temperatura corporal no superó los 40,1 °C. El examen anatomopatológico del grupo de control no vacunado mostró una pleuritis fibrinógena intensa unida a una neumonía que afectaba a una gran parte del pulmón. Por el contrario, los animales vacunados no mostraron ningún cambio de la pleura o del pulmón. La cepa de exposición administrada se pudo

reaislar del grupo de control no vacunado en un gran número, mientras que esto fue posible en un número reducido solamente en dos de los cerdos vacunados.

Se recogieron muestras de sueros tres semanas después de la inmunización y tres semanas después de la infección y se examinaron serológicamente en dos ensayos ELISA diferentes. En el ApXII ELISA se utilizó la toxina ApXII como antígeno de fase salida. La reacción se cuantificó en forma de unidades de ELISA (EU) basándose en un patrón externo, valorándose como negativas actividades de menor/igual 10 EU en el suero, como cuestionables de 11 a 25 EU y positivas actividades mayores de 25 EU. El segundo ensayo ELISA, el denominado deELISA, usa un extracto de detergente de proteínas que están presentes asociadas a la membrana externa de *A. pleuropneumoniae* como antígeno de fase sólida. En el deELISA, la respuesta inmune está cuantificada como el título sérico en comparación con un control negativo interno. El control negativo está compuesto de una mezcla de volúmenes iguales de todas las muestras séricas que se tomaron a la llegada de los cerdos no infectados. El control positivo está compuesto de una mezcla de volúmenes iguales de todas las muestras séricas que se tomaron de cerdos infectados el día 21 después de la infección. A este respecto, el título del deELISA es la máxima dilución sérica que da como resultado una densidad óptica que es el doble de grande que la del suero de control negativo con una dilución de 1 a 100.

Los cerdos del grupo de control no presentaron ni en el de-ELISA ni en el APXIIa ELISA un título en el momento de la infección. Por el contrario, los animales vacunados en el momento de la infección y tres semanas después de la infección presentaban un elevado título de de-ELISA, pero en ambos momentos eran negativos en el ApXIIa-ELISA.

Ejemplo de realización 2

2.1. Desarrollo de una vacuna viva de *A. pleuropneumoniae* de marcador negativo

El fin es la atenuación de una cepa del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* mediante delecciones en distintos factores asociados a virulencia. Por ello se ha de conseguir que la cepa no desencadene ya síntomas clínicos, pero que después de la administración en aerosol induzca todavía una respuesta inmune. Entonces, esta cepa se emplea como vacuna viva.

La base para estos trabajos lo formaba un prototipo existente de una vacuna viva del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* de marcador negativo (Tonpitak *et al.*, 2002, Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. Infect Immun 70, 7120-7125). Este contiene dos delecciones de atenuación: una en el gen *apxIIA* que sirve también aquí como marca negativa y una en el gen *ureC* que codifica un componente de la compleja enzima ureasa. Basándose en este mutante doble se construyó un mutante triple con ayuda del sistema de "transconjugación de una sola etapa" que contiene una delección adicional en el gen *dmsA*. El mutante triple generado se confirmó, genotípica y fenotípicamente, como mutante isogénico libre de ADN extraño y se comprobó en el ensayo animal con exposición aerógena con respecto a su virulencia. Para esto se infectaron cerdos con una dosis de $1,2 \times 10^5$ ufc (unidades formadoras de colonias) del mutante triple en la cámara de aerosol. Todos los cerdos desarrollaron los signos típicos de una infección. Un cerdo murió en el intervalo de 2 días y otro cerdo, en el intervalo de 9 días después de la infección. Los cerdos supervivientes se eutanasiaron después de 21 días y se examinaron mediante anatomía patológica. A este respecto, 4 o 5 cerdos mostraron lesiones pulmonares (Figura 4), lo que para el uso como vacuna es completamente inaceptable.

Para la generación de una cepa vacunal, por tanto, se tenían que incluir otras delecciones. Como genes diana para esto se seleccionaron el gen *aspA* y el gen *hybB*. Partiendo del mutante triple se generaron dos mutantes cuádruples, respectivamente uno con gen *aspA* o *hybB* deleccionado adicionalmente. Además se creó un mutante quintuple en el que estaban presentes en forma inactivada tanto el gen *aspA* como el *hybB*. Estos mutantes se caracterizaron fenotípica y genotípicamente. A este respecto, los mutantes generados se pudieron identificar mediante análisis de PCR (Figura 3), análisis de transferencia de Southern después de digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado como mutantes isogénicos libres de ADN extraño.

A continuación, el mutante quintuple se comprobó en un ensayo animal con respecto a sus propiedades de virulencia. Según el esquema que se ha explicado anteriormente, se expusieron 9 animales en la cámara de aerosol al patógeno con una dosis de $9,1 \times 10^4$ ufc por cinco animales así como con el mutante quintuple en una dosis de $1,5 \times 10^5$ ufc por cinco cerdos. En el grupo con el mutante quintuple, 6 de 9 animales un día después de la infección mostraban una temperatura corporal elevada de más de 40,5 °C y 3 de 9 animales rechazaron la ingestión de alimentos. Tres días después de la infección, la temperatura corporal de todos los animales vacunados con el mutante quintuple se encontraba por debajo de 40,5 °C y el día 7 después de la infección, solamente un animal vacunado desarrolló tos. Los cerdos en el grupo de control, por el contrario, desarrollaron graves síntomas de enfermedad, tales como anorexia, letargia, dificultad respiratoria (disnea) o vómitos el primer día después de la infección. Los animales se eutanasiaron y se realizó su necropsia después de 7 o 21 días. Los animales que se habían infectado con el mutante quintuple a este respecto tenían significativamente menos lesiones pulmonares (Figura 4) que un grupo de control infectado con la cepa de tipo natural (ensayo de Wilcoxon, $p < 0,05$). Todos los animales mostraron 21 días después de la infección claros títulos de anticuerpos. Pero las lesiones pulmonares causadas todavía siguen siendo demasiado intensas, de tal manera que este mutante quintuple todavía no se puede

usar como cepa vacunal.

- 5 Por tanto, el objetivo posterior era continuar atenuando el mutante quintuple generado. Para esto se deletionó el gen *fur* (ferric uptake regulation, *fur*). Para la mutagénesis se tenía que construir un vector de conjugación específico de serotipo, ya que las diferencias de secuencia entre los serotipos 2 y 7 eran tan grandes que el plásmido de conjugación empleado por Jacobsen no condujo a ningún "entrecruzamiento simple" en el serotipo 2. Con ayuda del sistema de la "transconjugación de una sola etapa" se pudo generar entonces un mutante séxtuple que se ha confirmado en la caracterización genotípica y fenotípica como mutante isogénico libre de ADN extraño (Figura 5).
- 10 Para examinar las propiedades de virulencia del mutante séxtuple se expuso un grupo de 5 cerdos con el mutante séxtuple a una dosis de $1,1 \times 10^5$ ufc por cinco animales en una cámara de aerosol. Cuatro de los cinco cerdos expuestos al mutante séxtuple mostraron un día después de la infección una temperatura corporal elevada de más de 40,5 °C. No eran detectables otros síntomas. Los animales infectados se eutanasiaron tres semanas después de la infección y se examinaron mediante anatomía patológica. Todos los cerdos tenían en la necropsia solo mínimos cambios anatomopatológicos (parte de lesión pulmonar promedio de 0,3).
- 15 El día 21 después de la infección, los mutantes quintuples y séxtuples se pudieron comprobar solamente en una muestra de tejido pulmonar intacto, mientras que la cepa de tipo natural se pudo reaislar de 4 de 5 muestras.
- 20 Los cerdos infectados con, respectivamente, el mutante quintuple o séxtuple no mostraron en ningún momento después de la infección un título de anticuerpos en un ApxII-ELISA, pero mostraron una reacción mensurable en un deELISA 21 días después de la infección.
- 25 Una vacuna viva para *A. pleuropneumoniae*, compuesta de solamente un serotipo, solamente tiene un futuro comercial cuando, adicionalmente a una protección frente al serotipo propio, puede transmitir también una protección que abarque serotipos. Por tanto, se prescindió de la comprobación de una protección homóloga en caso del empleo del mutante séxtuple como vacuna viva. En lugar de esto se llevó a cabo un ensayo animal con exposición heteróloga después de la inmunización.
- 30 A este respecto se habían inmunizado 10 cerdos con edad de 7 semanas con el mutante séxtuple mediante administración por aerosol, mientras que 5 animales de control se trataron solamente con solución salina (150 mM). Ambos grupos a continuación se infectaron con un serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae*. Los grupos se eutanasiaron y sometieron a necropsia de nuevo 7 días o 21 días después de la exposición. Los resultados muestran un claro efecto que abarca serotipos de la vacuna viva. De este modo, 3 de los 5 animales del grupo de control murieron, mientras que todos los animales del grupo vacunado no desarrollaron síntomas clínicos o solamente pocos. Los cerdos vacunados mostraron un índice de lesión pulmonar claramente menor que los animales de control (Figura 6). La cepa vacunal se pudo aislar solo esporádicamente, mientras que durante el reaislamiento de la cepa natural no aparecieron diferencias entre el grupo vacunado y el de control (Tabla 1). Tres semanas después de la inmunización se ensayaron todos los cerdos en el deELISA y ApxII-Elisa. Los animales de control en ambos ensayos mostraron un título negativo, mientras que los animales vacunados mostraron un título de anticuerpos comprobable en el ensayo de deELISA, sin embargo, no en el ApxII-ELISA (Tabla 1). Tres semanas después de la infección, dos de los animales supervivientes del grupo de control mostraron un título de anticuerpos en el deELISA y un animal fue positivo en el ApxII-ELISA.
- 40 un título negativo, mientras que los animales vacunados mostraron un título de anticuerpos comprobable en el ensayo de deELISA, sin embargo, no en el ApxII-ELISA (Tabla 1). Tres semanas después de la infección, dos de los animales supervivientes del grupo de control mostraron un título de anticuerpos en el deELISA y un animal fue positivo en el ApxII-ELISA.
- 45 Los animales vacunados mostraron títulos elevados en el deELISA y dos fueron positivos en el ApxII-ELISA.

Tabla 1

Grupo	Dosis de infección (ufc por 5 cerdos) ^a	Momento de la necropsia	Reacción serológica		Cantidad de animales con lesiones pulmonares ^d	Media aritmética ± desviación típica del índice de lesión pulmonar	Cantidad de los animales y localización de <i>A. pleuropneumoniae</i> realiado en el análisis <i>post mortem</i>				Media aritmética ± desviación típica del índice de realislamiento	
			Enjuagado con detergentes ^b	ApxIIA ^c			Amígdala	Ganglio linfático	Pulmón neumótico	Intacto		
vacunado ^e	1,6 x 10 ⁵	día -1	1140 ± 1946	3,8 ± 2,9								
		día 7	950 ± 755	4,5 ± 3,7	3/4	4,9 ± 5,4	1/4	4/4	3/3	3/4	1,5 ± 1	
		día 21	2067 ± 2406	14,7 ± 16,1	4/6	3 ± 5,6	2/6	1/6	2/4	2/6	1,4 ± 2,8	
Grupo de control no vacunado	1,7 x 10 ⁵	día -1	0	2,8 ± 1,6								
		día 2			3/3	24,9 ± 3,1	3/3	3/3	3/3	3/3	7	
		día 21	200 ± 283	18 ± 9,9	2/2	3 ± 1,6	1/2	0/2	1/2	1/2	0,5 ± 0,7	

^a El serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae* se cultivó hasta una densidad óptica de 0,43 a 600 nm y después se diluyó 1:30.000 con solución de NaCl al 0,9 % estéril. 13 ml de esta solución se pulverizaron en la cámara de aerosol. El número indicado son las unidades formadoras de colonias en 13 ml.
^b Los antígenos de fase sólida se prepararon tal como ya se ha descrito (Goethe *et al.*, 2000). El número indicado representa la media aritmética de la máxima dilución sérica que da como resultado una densidad óptica que es el doble de grande que la del control negativo del suero con una dilución de 1:100.
^c La proteína ApxIIA *recombinante* se usó como antígeno de fase sólida. El número representa la media aritmética de la actividad sérica en unidades de ELISA.
^d El índice de lesión pulmonar se estableció según Hannan *et al.* (Res. Vet. Sci., 1982; 33:76-88). ^e El mutante séxtuple de *A. pleuropneumoniae* se cultivó hasta una densidad óptica de 0,34 a 600 nm y se diluyó 1:30.000 con una solución de NaCl al 0,9 % estéril. 13 ml de esta solución se pulverizaron en la cámara de aerosol.

Ejemplo de realización 3**3.1. Identificación, clonación y expresión de proteínas inmunógenas de *M. hyopneumoniae***

- 5 Ya que la fracción de membrana contiene la mayoría de las proteínas inmunógenas, para la identificación de nuevas proteínas inmunógenas de *M. hyopneumoniae* se prepararon principalmente fracciones de membrana de células que se habían cultivado en condiciones convencionales de laboratorio. Las proteínas de membrana y las proteínas asociadas a membrana se obtuvieron mediante extracción con Triton X114 (Regula *et al.*, Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*, Electrophoresis, 2000, 21, 3765-3780).
- 10 A continuación, los extractos de membrana se separaron en electroforesis en gel 2-D y se examinaron con una posterior transferencia de Western, ensayándose distintas condiciones de enfoque tales como gradiente de pH y concentraciones de gel. Para la detección de posibles proteínas candidatas se usó un suero de convaleciente. En este caso se trata de un combinado de cinco sueros individuales de cerdos no vacunados, en los que existía una
- 15 infección por *M. hyopneumoniae*. Para la comparación se sometieron a transferencia las muestras también con un suero hiperinmune que se había preparado mediante el uso de la vacuna "Resporc M.hyo 1 Shot" de Impfstoffwerk Dessau-Thornau (IDT, Alemania). Por ello se hallaron los puntos que reaccionaban solo, o al menos claramente de forma más intensa, con el suero de convaleciente.
- 20 De un gel teñido con azul de Coomassie se troquelaron varios puntos de proteína, de los cuales se identificaron los puntos N° 43 y N° 48. Para la identificación, los puntos se digirieron con tripsina y los péptidos producidos en este caso se analizaron con ayuda de un Q-Tof MS.
- 25 El punto 43 se identificó como lipoproteína hipotética Mhp378. La proteína muestra las máximas homologías con lipoproteínas hipotéticas de otras especies de micoplasmas. Hasta ahora no existen indicios de posibles funciones de estas proteínas. Para otros trabajos, tales como el establecimiento de un ensayo ELISA para la detección de animales infectados de forma natural, se necesitan mayores cantidades de proteína recombinante. Para esto se construyeron vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión de GST.
- 30 El gen *mhp378* correspondiente a la lipoproteína Mhp378 codifica una proteína de tamaño de 708 aminoácidos y contiene tres codones TGA en las posiciones de aminoácidos 209, 253 y 585. Con motivo de la utilización de codón específica en micoplasmas, estos tripletes no funcionan como codón de terminación, sino que codifican triptófano. Para la expresión heteróloga del gen *mhp378* en *E. coli* se mutó mediante mutagénesis de PCR según el método de Shigaki y Hirschi (2001, Use of class IS restriction enzymes for site-directed mutagenesis: Variations on Phoenix
- 35 mutagenesis; Analytical Biochemistry 298: 118-120) el codón TGA⁵⁸⁵ a TGG. Para esto se amplificó la región entre las posiciones de aminoácidos 253 y 585 con ayuda del cebador de PCR oMHP378E y oMHP378F y se amplificó la región entre las posiciones de aminoácidos 585 y el final de la fase de lectura con los cebadores oMHP378G y oMHP378H. En la zona de solapamiento se cortaron ambos fragmentos con la enzima de restricción BsmBI y se ligaron El fragmento resultante codifica el extremo carboxi de la proteína (aminoácido 286 a 708) y se clonó en el
- 40 vector de expresión pGEX5-3 (Figura 7). El vector de expresión construido de este modo pMhp378-500 posibilita en *E. coli* DH5 α la síntesis inducible de una proteína de fusión GST-Mhp378^(aa286-708). La proteína expresada está presente en *E. coli* DH5 α como agregado insoluble. Mediante el tratamiento con un tampón urea 5 M se purificó sustancialmente la proteína de fusión agregada.
- 45 El gen *mhp651* que codifica la lipoproteína Mhp651 contiene 5 codones TGA en las posiciones de aminoácidos 243, 309, 351, 474 y 603. Para examen adicional se construyeron dos vectores de expresión de forma análoga al procedimiento descrito para *mhp378*.
- 50 Para la expresión del extremo amino con los aminoácidos 19 a 210, la región del gen *mhp651* entre los dos puntos de corte de EcoRI en las posiciones de nucleótidos 53 y 623 se amplificó, cortó y clonó en el vector de expresión pGEX5-2. El vector de expresión construido de este modo pMhp651-N^(aa19 a 210) posibilita en *E. coli* DH5 α la síntesis inducible de una proteína de fusión GST con la región aminoterminal de la proteína Mhp651.
- 55 Para la expresión del extremo carboxi (aminoácidos 351 a 714) se mutaron los codones TGA en las posiciones 47 y 603 según el procedimiento que se ha descrito anteriormente hasta dar TGG. Para esto se tuvieron que amplificar los fragmentos de PCR y se cortaron con BsmBI, se ligaron y se clonaron en el vector de expresión. El vector de expresión construido pMhp651-C^(aa351-714) contiene la región carboxiterminal de la proteína.
- 60 Para la obtención de las proteínas de fusión de GST se cultivaron las cepas correspondientes de *E. coli* DH5 α en volúmenes de hasta 200 ml. La inducción de la expresión y la purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad se realizaron según la indicación del fabricante (Amersham Biosciences). Las dos proteínas de fusión GST-Mhp651-N^(aa19-210) y GST-Mhp651-501-C^(aa351-714) se expresaron como proteínas solubles en *E. coli* DH5 α y se purificaron.
- 65 Las proteínas de fusión purificadas GST-Mhp378^(aa286-708), GST-Mhp651-N^(aa19-210) y GST-Mhp651-C^(aa351-714) se

comprobaron a continuación en experimentos de transferencia de Western con respecto a su reacción con los sueros de convaleciente y el suero hiperinmune. Las tres proteínas mostraron una reacción positiva con ambos sueros, siendo la intensidad de la interacción con el suero de convaleciente claramente más intensa. La proteína GST utilizada como control no reaccionó con ninguno de los dos sueros. Los dos genes *mhp378* y *mhp651* predichos a causa de la secuencia del genoma de *M. hyopneumoniae*, por tanto, se expresan *in vivo* y las proteínas correspondientes son inmunógenas.

Para la caracterización adicional, las proteínas de fusión recombinantes GST-Mhp378^(aa286-708) y GST-Mhp651-C^(aa351-714) se aplicaron como antígeno de fase sólida sobre placas de ELISA Polysorb®. En primer lugar se ensayaron posibles reacciones cruzadas con las demás especies de *Mycoplasma* que aparecen en el cerdo. Para esto se incubaron placas de ELISA con sueros policlonales de conejo que están dirigidos contra preparaciones de células enteras de *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. flocculare*.

Las proteínas de fusión se disolvieron para esto en primer lugar en un tampón carbonato (50 mM, pH 9,6) y se estableció la concentración de recubrimiento óptima mediante titulación en damero mediante el uso del suero de convaleciente de cerdo, resultando una concentración óptima de 2,5 µg/ml.

A continuación se recubrieron las placas de microtitulación de 96 pocillos Polysorb® (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de la solución proteica diluida por pocillo a 4 °C durante una noche sin bloqueo posterior. Como control se usó una placa de ELISA (IDEXX HerdCheck *M. hyopneumoniae*) que está recubierta con el antígeno celular completo de *M. hyopneumoniae*. Los sueros diluidos y los conjugados de peroxidasa-cabra anti-cerdo o -cabra anti-cerdo (Dianova, Hamburgo, DE) se incubaron respectivamente durante una hora a temperatura ambiente. El ELISA se desarrolló a continuación mediante el uso de ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbencitiazolinsulfonato]) y se midió el aumento de la intensidad cromática con una DO de 405 nm.

Los resultados experimentales muestran una intensa reacción cruzada de los sueros hiperinmunes de conejo dirigidos contra *M. flocculare* y *M. hyorhinis* en la placa de ELISA disponible en el mercado (Figura 8A). De las dos proteínas de fusión ensayadas, únicamente la proteína de fusión GST-Mhp651-C^(aa352-714) mostró una reacción cruzada con el suero hiperinmune específico de *M. flocculare* (Figura 8B), mientras que la proteína de fusión GST-Mhp378^(aa254-708) se reconoció únicamente por el suero inmune específico para *M. hyopneumoniae* (Figura 8C). Estos experimentos muestran que las proteínas Mhp378 y Mhp651 inmunógenas aisladas de *M. hyopneumoniae* se pueden usar como marcadores específicos para la detección de animales útiles infectados por *M. hyopneumoniae* o animales útiles vacunados e infectados de forma natural sin que se produzcan reacciones de falsos positivos, debido a una colonización/infección de los cerdos con otros micoplasmas.

Ejemplo de realización 4

4.1. Identificación, clonación y expresión de proteínas inmunógenas de *S. Typhimurium*

Para la identificación de proteínas inmunógenas de *S. Typhimurium* se aislaron proteínas asociadas a superficie a través de un método de "lavado con detergente" establecido en el laboratorio del solicitante y se detectaron mediante electroforesis en gel 2D en combinación con transferencia de Western. En este caso, las proteínas en primer lugar se separaron según su punto isoelectrónico y después según su movilidad electroforética en un gel de SDS-PAGE y a continuación se transfirieron mediante un aparato de transferencia en semi-seco sobre una membrana de nitrocelulosa. Mediante tres sueros se comprobaron las proteínas transferidas con respecto a su inmunogenicidad.

El suero 1 es un suero vacunal porcino que se había obtenido después de múltiple inmunización de cerdos con la vacuna viva atenuada SALMOPORC® (fabricante: Impfstoffwerk Dessau, Alemania). El suero 2 es un combinado de sueros de animales que no se habían vacunado frente a *S. Typhimurium*, sino que resultaron positivos en la serología de jugo de carne en cuanto a anticuerpos de salmonela. El suero 3 es un combinado de sueros de en total 120 animales que se habían infectado en el marco de un ensayo de alimentación con *S. derby*. Además de la observación de proteínas expresadas de forma diferencial después del cultivo en condiciones normalizadas de laboratorio y en condiciones de carencia de hierro, se buscó sobre todo aquellas proteínas que se reconocían como inmunógenas tanto por el suero inmune como por ambos sueros de convaleciente.

De este modo se identificó la proteína DWST-5 (outer membrane porin NmpC / OmpD precursor) como expresada de forma diferencial. La proteína DWST-5 se comprobó mediante una búsqueda en banco de datos con respecto a su idoneidad para el desarrollo de una vacuna viva de marcador negativo. Una proteína adecuada tiene que presentar una elevada especificidad por salmonelas, de tal manera que se eviten en la medida de lo posible reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otras enterobacterias cuando se emplea como antígeno de fase sólida en un ensayo ELISA. La proteína DWST-5 identificada como porina D de membrana externa (OmpD) muestra una elevada especificidad por *Salmonella* spp. y dispone, además, de 14 epítomos antigénicos predichos y ocho regiones expuestas a superficie en su secuencia (Figura 9).

El gen *ompD* se amplificó mediante PCR de ADN cromosómico de la cepa de SALMOPORC[®] y se clonó "en fase" en el vector de expresión pGEX5x-3. Con el plásmido construido de este modo pSOM500 se pudo producir en *E. coli* una proteína de fusión recombinante glutatión S-transferasa-OmpD (GST-OmpD).

5 El desarrollo de una vacuna viva de marcador negativo está acoplado al desarrollo de un sistema de diagnóstico basado en ELISA que, en la práctica, posibilita la diferenciación de animales vacunados y enfermos. Para esto, la proteína recombinante GST-OmpD se aplicó como antígeno de fase sólida sobre placas de ELISA Polysorb[®] y se ensayó con distintos sueros, ya empleados con un sistema de ELISA comercial para el diagnóstico de *S. Typhimurium*.

10 Un suero nulo de un ensayo vacunal con la vacuna usada SALMOPORC[®] sirvió como control negativo, un suero hiperinmune después de la cuarta inmunización, como control positivo. Los ensayos muestran que todos los sueros positivos en el ELISA comercial presentaban en el ELISA de OmpD una absorción al menos el doble de grande que la del control negativo.

15 En una identificación masiva con sueros de cerdo en la que se examinó en paralelo con el ELISA comercial Salmotype Pigscreen[®], se emplearon placas con preparación de agregado de GST-OmpD 0,5 µg/ml y placas con proteína de fusión purificada mediante cromatografía en columna 0,5 µg/ml. Ambas reaccionaron de forma muy diferente, habiéndose de suponer que en el caso de la preparación de agregado no purificada aparecieron de forma multiplicada reacciones cruzadas con proteínas de *E. coli*. En el ELISA con la proteína de fusión purificada reaccionan más focos de forma positiva que en el ELISA de Salmotype Pigscreen, lo que habla a favor de una mayor sensibilidad o a favor de una mayor especificidad.

25 4.2. Construcción de una vacuna viva isogénica de marcador negativo con la delección del gen *ompD* en *S. Typhimurium*

Para la mutagénesis del gen *ompD* en *S. Typhimurium* se seleccionó con pROKB1 un vector que dispone de un replicón R6K. Ya que este replicón necesita para la replicación en la bacteria necesariamente el producto del gen del fago lambda *pir*, el vector se puede emplear en *Salmonella* como vector "suicida".

30 Un gen *ompD* acortado se produjo a partir de dos fragmentos de PCR que se amplificaron de regiones en los extremos 5' y 3' del gen. Los cebadores localizados hacia el centro del gen llevan, respectivamente, un punto de corte de enzima de restricción BsmBI (McCaffery *et al.*, 1996, A novel system for the rapid generation of precise DNA deletions. Nucleic Acids Res. 24, 5048-5050). Ambos trozos se cortaron después con BsmBI y se ligaron. Por ello se produjo una mutación "en fase" en el gen que no contenía ningún tipo de ADN extraño. Entonces, los fragmentos individuales ligados en primer lugar se clonaron en el vector pTOPO 2.1 (pSOM800) y después se convirtieron en el vector pROKB1 (pSOM14666).

40 El plásmido de mutagénesis pSOM14666 debía transferirse mediante conjugación de la cepa β2155 de *E. coli* auxótrofa para DAPI como donador portador de plásmido a la cepa vacunal de *S. Typhimurium* Salmopor[®] como receptor. Después de la selección (en placas que contenían kanamicina) y contraselección (en medio que contenía sacarosa) se debían aislar mediante identificación por PCR clones en los que había tenido lugar una recombinación homóloga. El protocolo para la conjugación se estableció de antemano para *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se tuvo que adaptar a *S. Typhimurium*, ya que en los primeros experimentos con el método convencional no se pudieron generar mutantes estables de delección. Para esto se optimizaron el medio de cultivo (agar sangre) así como el tiempo de cultivo del receptor de salmonela.

50 Después de la optimización del método de conjugación (cultivo del receptor en agar sangre a lo largo de aproximadamente 40 horas a 37 °C) se pudieron aislar transconjugados de salmonela con plásmido de mutagénesis integrado ("entrecruzamientos simples"). Con estos aislados se llevó a cabo una contraselección con sacarosa. En este caso se seleccionaron los patógenos que, a través de una segunda etapa de recombinación, habían eliminado de su genoma el plásmido (estos patógenos ya no llevan el gen para la levansacarasa y, por tanto, no solo son sensibles a sacarosa). También en este caso se tuvieron que adaptar las condiciones de cultivo en comparación con el protocolo establecido; de este modo, era necesario mantener los patógenos después del cultivo en el medio de contraselección durante 72 horas a 4 °C para obtener un buen rendimiento de "entrecruzamientos dobles". Los clones de la contraselección se comprobaron después en una PCR con respecto a su genotipo de *ompD* para asegurar que llevaban el gen *ompD* acortado.

60 De este modo se pudo crear un mutante de desactivación de *ompD* isogénico que se comprobó a través de PCR y transferencia de Southern. Como se muestra en la Figura 10, se seleccionó una enzima (PstI) que en el tipo natural y en el mutante corta respectivamente delante y detrás del gen diana y que da en el tipo natural un fragmento de tamaño de aproximadamente 3900 pb, en el mutante un fragmento de tamaño de aproximadamente 2900 pb. Además se seleccionó una enzima (BspHI) que corta dentro del gen de tipo natural, pero no en el gen acortado del mutante, resultando para el tipo natural fragmento de tamaño 6000 pb y 5000 pb, para el mutante un fragmento de

65 aproximadamente 9300 pb.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Gerlach, Prof. Gerald F	
5	<120> Vacuna bacteriana	
	<130> GRL104	
	<160> 2	
10	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
	<211> 1272	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	
	<220>	
	<221> Mhp378 C_region	
20	<222> (1)..(1272)	
	<223> extremo carboxi de Mhp378 comenzando en la posición de ácido nucleico 856 a 2127	
	<400> 1	
	attcttcggt cttttccaga ggcctttca ggaggatcca ctgattcggc aaaatcagtt	60
	ttaggaattg ataatcaagc aacgctagtt tttgctcttg ccagatcagt ttctgaaggt	120
	aatcgatecc aggaagttac cgttcttgat aggcaaaaga atttaattga ttatatact	180
	tttatagata aacctgattc aattaggtat aaaaatttag aaaaaatttt taatttatta	240
	agccaagggg taaaagatcg ctcaatttat tatacatctg caggggagta taattcaact	300
	ttttccgga atcatcagca ggttttctca attggttcaa cttcaggcta tttccataat	360
	tttgtaaac caacagcgac aaattatcaa atcggcttta agaaaaatga tggcttaag	420
	tcagtttata gcgtttagcta ccccaaattt agcgcaattg tatcacttga agatctcaag	480
	gatataacca aagatctaga aataacagca accgatggta gctctaaatt aaaaattgat	540
	gctaaatttt taggaaaact taagaatat gcacagcaa atccagtaa aaaagtgttt	600
	tattttactg atcgatecaga aaaaccttca ggtatcttcg aaaaagatta tattgtttta	660
	ggcaataca aaaatgacaa aaacgaagaa tttaatggcc ttgtaattcc aacttataca	720
	gaactctata aaaattcttg atcaaatgcc cttaatgatg atgaacttgc acttgaagcc	780
	ccaccgcata aattcgatec aaatagtaaa atcaccacca ttgtcgccca aggtcctgat	840
	ctaattttta ttcattcaac tgaaaaagaa gataaagccg caaaagcttt tgtaaatgg	900
	cttttgacag aaaaaatagt ctttgaggaa aatagtcagg aaaaaatgac tccgcttgag	960
	tattttgcca gagcaacttc atatttatta ccaataaaat caacacttga taaaacccat	1020
	tttagtcaa aaaatagatc acagaaattt atacttgacc aatttagtaa atttcttaat	1080
	gctgattcaa aaggaaaata ttcgcttgtc tatgataatg ccgatgcaa cgcttcatcc	1140
	ttccgtgat cactagattc ttcagttgcc cagatgcaat cattaanaagc cagcgategga	1200
	aaagtgcgta gttttaaaga gtttttagaa aaactagagg gaaatttagg tccgtctttt	1260
25	aatcaaaaat aa	1272

ES 2 524 053 T3

<210> 2
 <211> 1095
 <212> ADN
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

5

<220>
 <221> Mhp651 C_region
 <222> (1)..(1095)
 <223> Extremo carboxi de Mhp651 comenzando en la posición de ácido nucleico 1051 a 2142

10

<400> 2

```

    tggacttcag attatcttgc agaagaaacc ggaaatggcc ttgatttagt catcgatggg      60
    cattcgcata caaaaatcga aattcacaaa cccaagaag ataaaaagt ttgggtaacc      120
    caaactgagg cctatgcaa atggctcggg gacattgatt tagtttttga tactgaaact      180
    ggcgagatag taaaaattgt acaatcttta agagatatta accaaatcaa tattgtaacc      240
    agagatttat cagaacatta tatcaaaaaa cttcataaag tttatgatgt agaaaaatgat      300
    gtaaaagtat ttaattcgcc tgggtgtttt gaacatgttc aatcaattga gatcaacaaa      360
    actccttact ggattggacg ggtaaaacca acttcattag gggaatgac agcagatgcc      420
    attgcttggg aatatgcaa aagttcaaaa gaacaagtac aaagtacgaa aaatgaaatt      480
    gcaacacttg ataattcctt aggacttata aacgggtgga gtcttagaac agatctaaaa      540
    agtggtgaaa tcaaaagagg agatgtttta ggggttagtc cttttgggaa taggattgta      600
    actattaaac taaaaggaga tacacttaaa aaaactctcg aatacggact ttctatgggg      660
    aaacaaggcg catttgccca actatcttca aatatttctc ataaagtcaa agttgaaaaa      720

    gggactgatc cgaaaaccaa aatagaatcc tgggtttgga aaccagatac aacatccttt      780
    aaaattaata acaagccgat tgatgataac aaattttact atttaagcac aaatgattat      840
    ctttcagcgg gcggggacgg ctatcaaatg ttaaacttag gtaaaaacag ggatattgaa      900
    aaagtttatg agggagtcca atatattgat tctttaatta aatatgggtca atatttggac      960
    aaattaacta aagattcaag tcaaaaagat ctatttgccc acacattcca agaataatta     1020
    agttctgatt ttacaaaaaa tcaacaagtt gagattcctc aagaagctct aacgaaaagc     1080
    caaagtcaat cttaa
    
```


REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna bacteriana para la aplicación en un animal, en particular un animal útil, que comprende al menos un serotipo del organismo *Salmonella enterica* con al menos respectivamente una mutación de desactivación en al menos tres genes cromosómicos distintos, comprendiendo el al menos un serotipo *Salmonella* Typhimurium con al menos una mutación de desactivación en un gen que codifica la proteína OmpD.
- 10 2. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la al menos respectivamente una mutación de desactivación es una delección no marcada.
3. Procedimiento para la producción de una vacuna de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** para la mutagénesis de OmpD en el serotipo *Salmonella* Typhimurium se usa un vector pROKB1 con un replicón R6K que contiene el gen OmpD con una mutación de desactivación.
- 15 4. Bacteria usada en una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
5. Vacuna viva de marcador negativo que **comprende** al menos una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 20 6. Vacuna inactivada de marcador negativo que **comprende** al menos una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 25 7. Proteína inmunógena sintetizada por al menos un agente infeccioso bacteriano de un animal en una vacuna de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada por que** genera anticuerpos que preferentemente no son esenciales para una respuesta inmune protectora y donde interacciona con anticuerpos de al menos un suero de cerdos infectados por *Salmonella* Typhimurium y con anticuerpos de al menos un suero de cerdos vacunados con una vacuna frente a *Salmonella* Typhimurium, comprendiendo la proteína inmunógena la proteína OmpD de *Salmonella* Typhimurium.
- 30 8. Proteína inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** está presente en forma de una proteína de fusión glutatión S-transferasa-OmpD.
- 35 9. Uso de una proteína inmunógena de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8 para la detección de animales infectados de forma natural, de animales vacunados con una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2 y/o de animales infectados de forma natural y vacunados con una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2, en particular de cerdos.
- 40 10. Procedimiento de diagnóstico para la diferenciación de animales infectados, de animales vacunados con una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2 y/o de animales infectados de forma natural y vacunados con una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende la determinación serológica de proteínas inmunógenas no esenciales para la respuesta inmune protectora, en particular OmpD, en animales infectados de forma natural y/o en animales vacunados con una vacuna bacteriana de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 45 11. Procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** se lleva a cabo en forma de un ensayo ELISA.
- 50 12. Placas de identificación, en particular placas de ELISA, con una proteína inmunógena de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8.

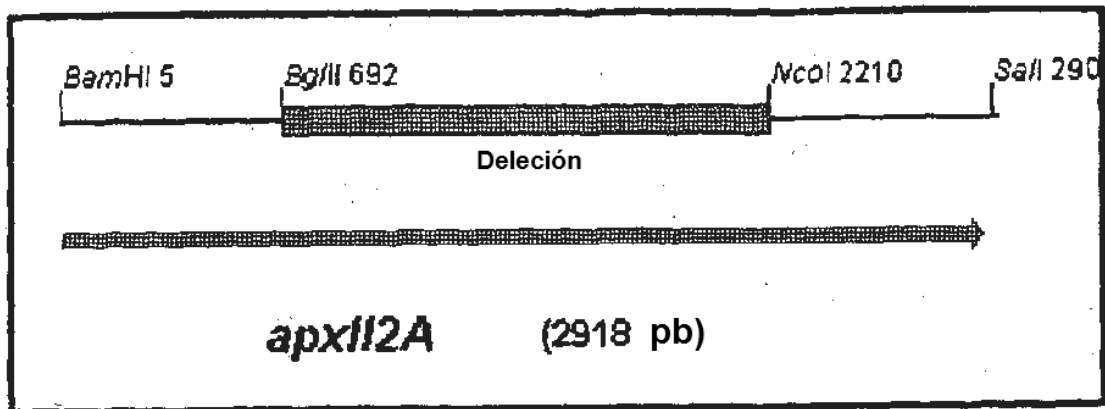


Figura 1

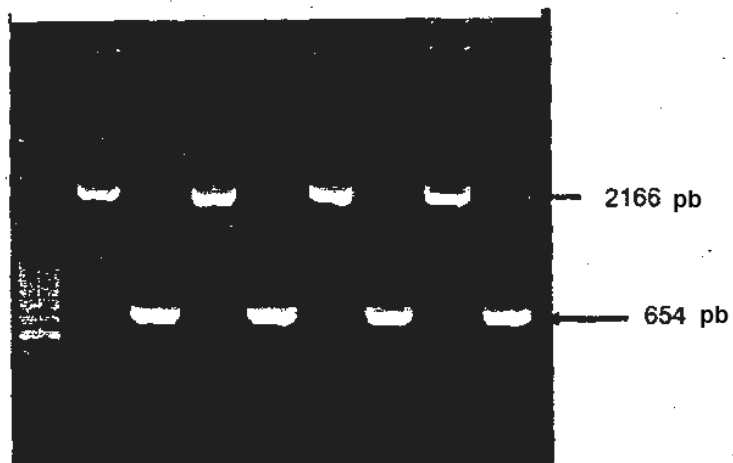


Figura 2

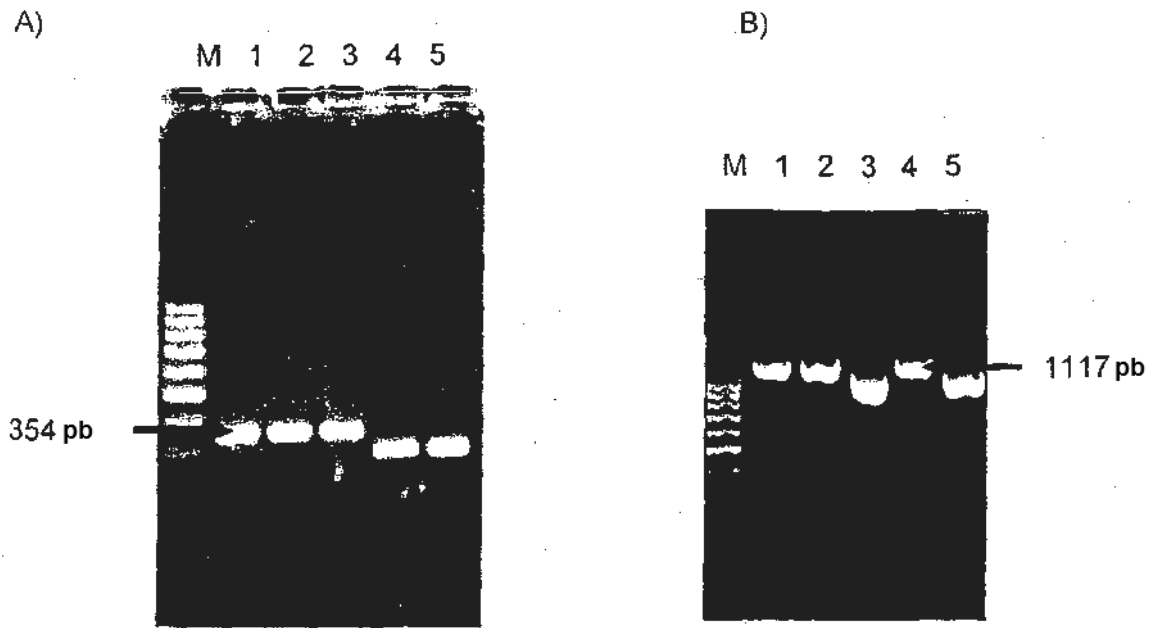


Figura 3

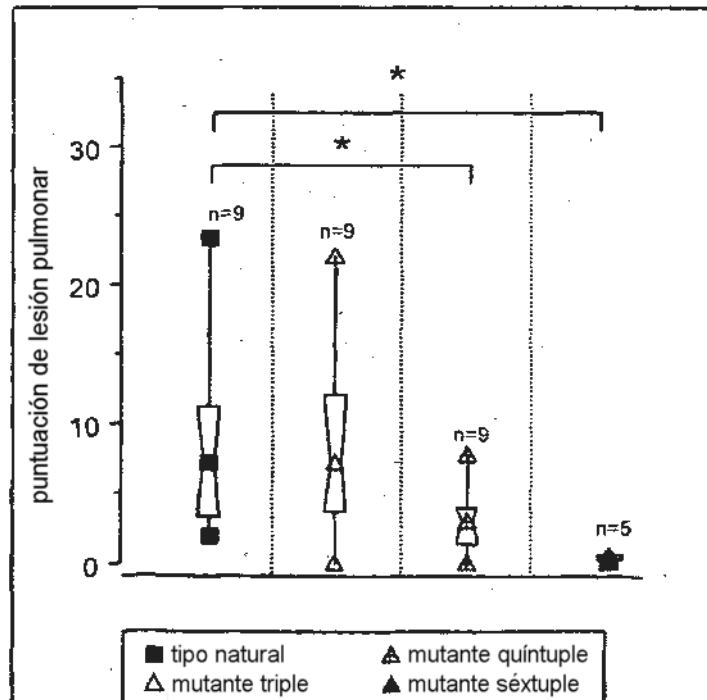


Figura 4

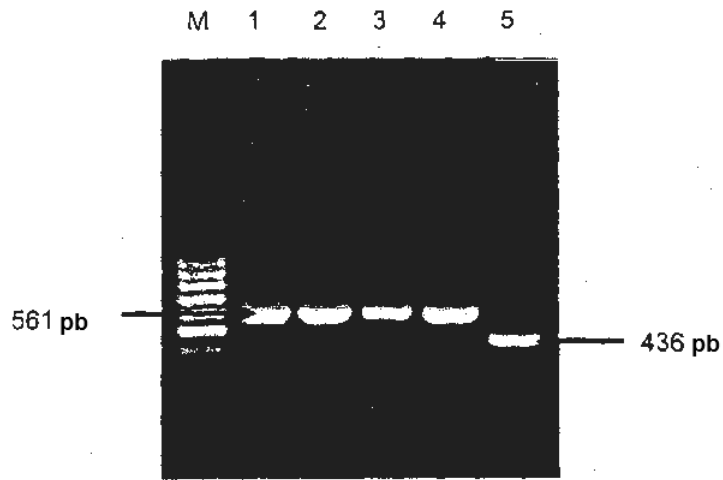


Figura 5

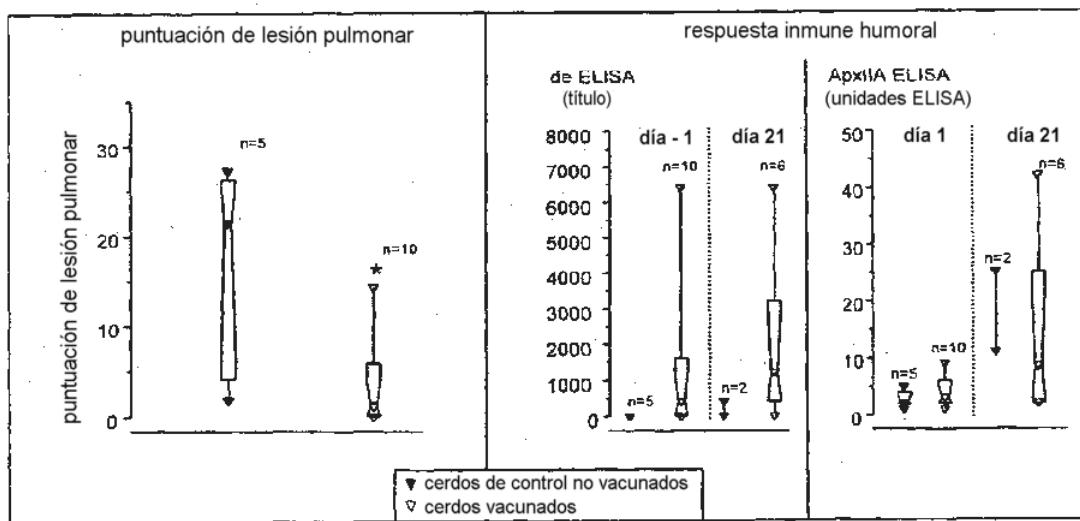


Figura 6

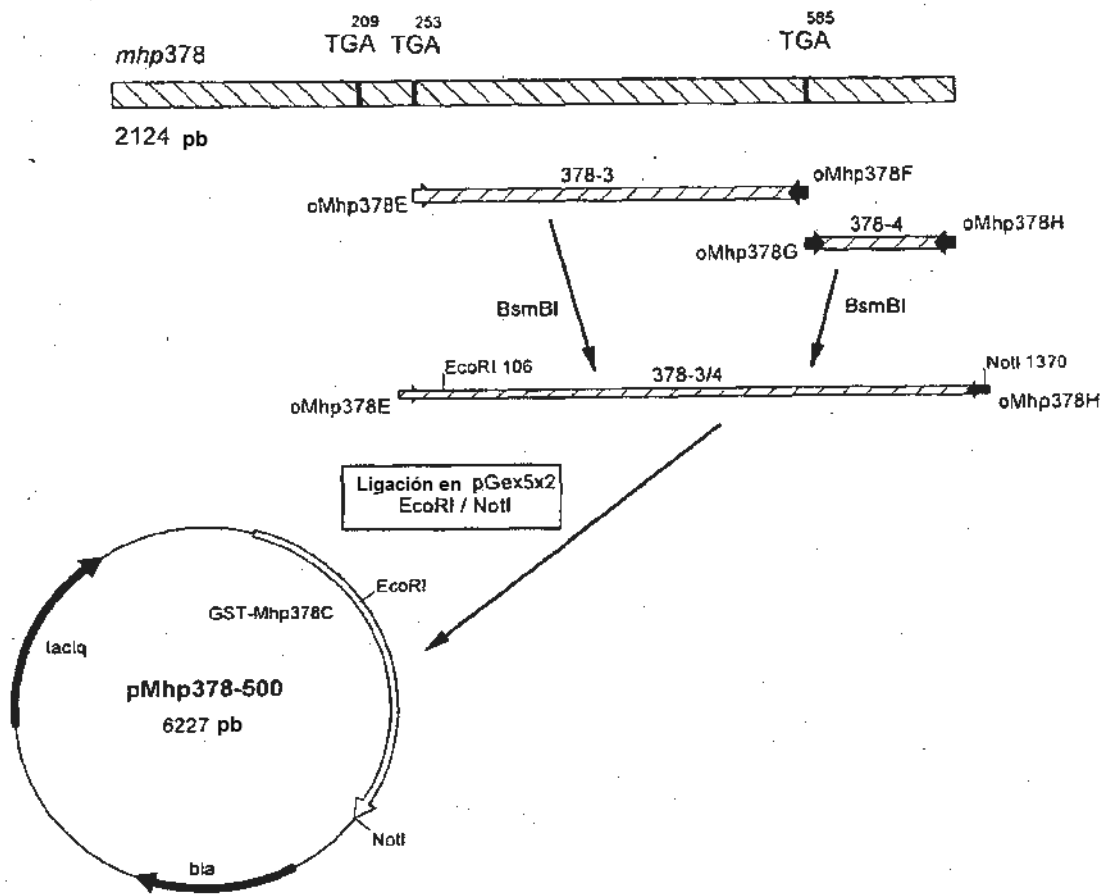
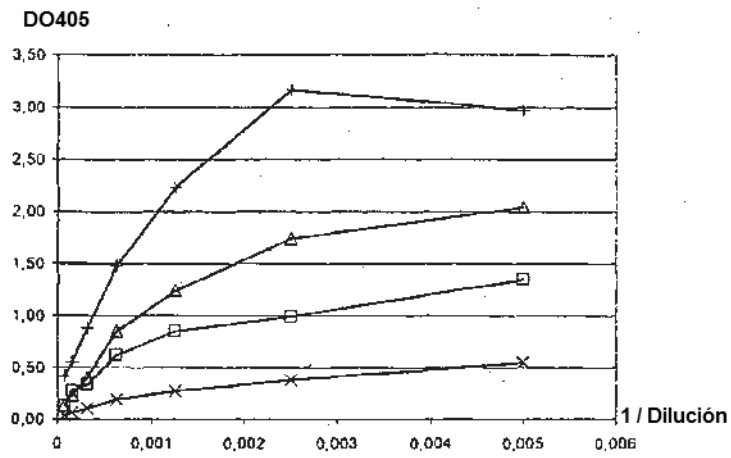
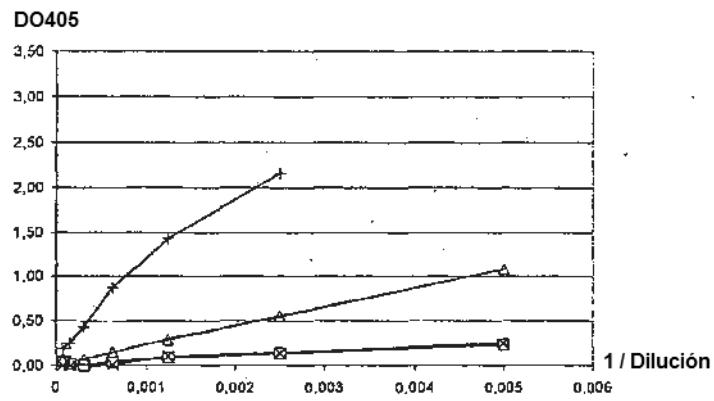


Figura 7

A)



B)



C)

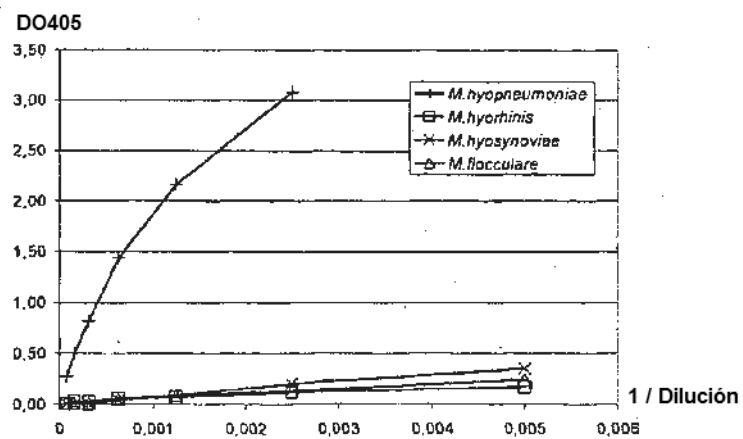


Figura 8

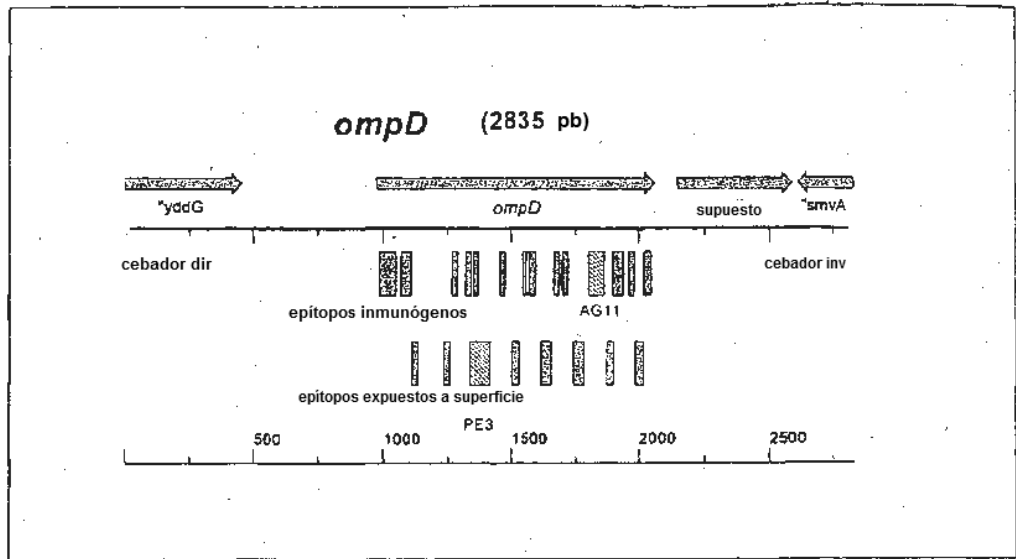
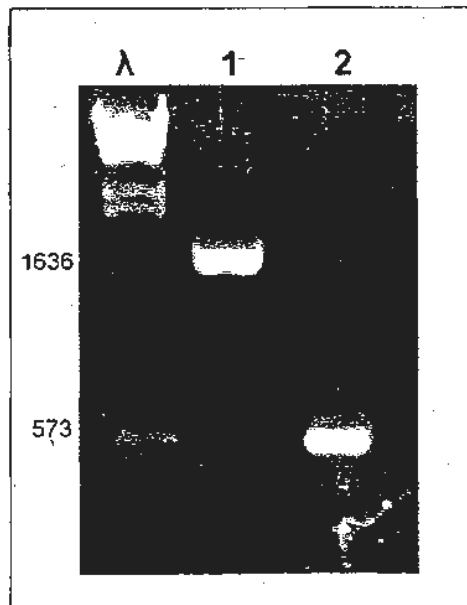
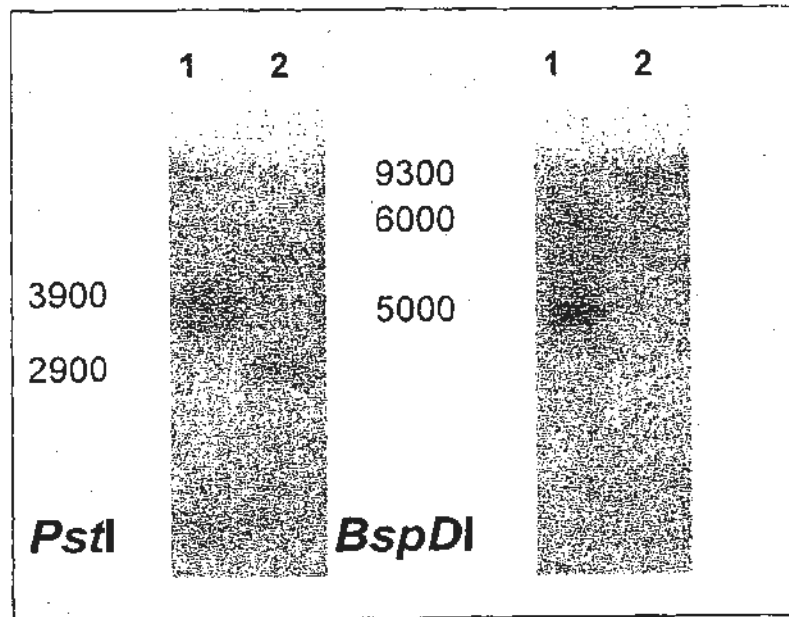


Figura 9

Figura 10
A)



B)



C)

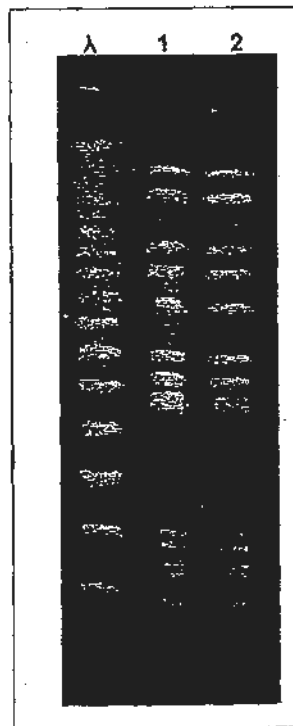


Figura 10