



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 620**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05023400 .4**

86 Fecha de presentación : **05.06.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **1645567**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54

Título: **Cultivo de *Lawsonia intracellularis*, vacunas anti-*Lawsonia intracellularis* y agentes de diagnóstico.**

30

Prioridad: **05.06.1995 US 465337**
04.06.1996 US 658194

73

Titular/es:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, Inc.
1568 North Main Avenue
Sioux Center, Iowa 51250-0050, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

72

Inventor/es: **Knittel, Jefferey, P. y**
Roof, Michael, B.

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 294 620 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 de *Lawsonia intracellularis*, vacunas anti-*Lawsonia intracellularis* y agentes de diagnóstico.

5 Campo de la invención

La presente invención está dirigida a vacunas anti-*Lawsonia intracellularis*, y a métodos para proteger contra la infección por *Lawsonia intracellularis*, y para diagnosticarla. Los productos y procesos de la invención se pueden conseguir, en parte, como resultado del método mejorado que los autores de la invención han descubierto para cultivar grandes cantidades de *L. intracellularis*.

Descripción de la técnica relacionada

L. intracellularis, el agente causante de la enteropatía proliferativa porcina (siglas inglesas "PPE"), afecta virtualmente a todos los animales, entre ellos a los seres humanos, conejos, hurones, hámsters, zorros, caballos, y otros animales tan distintos como avestruces y emús.

L. intracellularis causa pérdidas particularmente grandes en piaras de cerdos. Se ha estimado que la prevalencia e incidencia de la PPE en los Estados Unidos alcanzan hasta el 20% de la cabaña porcina, con unas pérdidas estimadas de 20 millones de dólares al año.

Una característica recurrente de la PPE es la presencia de bacilos intracitoplasmáticos curvados, no ligados a membrana, dentro de enterocitos en las porciones del intestino afectadas. Las bacterias asociadas con la PPE han sido denominadas "organismos similares a campilobacteria" (S. McOrist y otros., Vet. Pathol., volumen 26, 260-64 (1989)). Se ha identificado posteriormente a las bacterias causantes como género y especie taxonómicos nuevos, denominados en nuestro idioma *simbionte ileal* (siglas inglesas: *IS*) intracelular (C. Gebhart y otros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, volumen 43, número 3, 533-38 (1993)). Más recientemente, se ha dado a estas nuevas bacterias el nombre taxonómico *Lawsonia (L.) intracellularis* (S. McOrist y otros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, volumen 45, número 4, 820-25 (1995)). Se han empleado estos tres nombres, de manera intercambiable, para designar al mismo organismo, que es identificado y descrito con mayor detalle en la presente memoria. Los autores de la invención se han propuesto emplear el nombre taxonómico, *L. intracellularis*, a lo largo de la discusión de la presente invención.

L. intracellularis es una bacteria intracelular obligada que no puede ser cultivada por métodos bacteriológicos normales en medios convencionales, exentos de células, y se ha pensado que para crecer precisa células epiteliales unidas. S. McOrist y otros, Infection and Immunity, volumen 61, número 10, 4286-92 (1993) y G. Lawson y otros, J. of Clinical Microbiology, volumen 31, número 5, 1136-42 (1993) discuten el cultivo de *L. intracellularis* empleando monocapas de células IEC-18 del epitelio intestinal de rata en frascos convencionales para cultivo de tejidos. Además, H.-Stills, en Infection and Immunity, volumen 59, número 9, 3227-36 (1991) discute el empleo de monocapas de células intestinales embrionarias humanas Intestine 407 y de monocapas de células GPC-16 de adenocarcinoma de colon de cobaya en frascos convencionales para cultivo de tejidos. Estos métodos de cultivo existentes son muy laboriosos e inadecuados para ser escalados.

Los fastidiosos requisitos de crecimiento de *L. intracellularis* en cultivos *in vitro* han dificultado en gran medida la comprensión actual de la infección por *L. intracellularis* y el tratamiento y control eficaces de la enfermedad. Existe actualmente la necesidad de un método mejorado para cultivar *L. intracellularis*. Existe también la necesidad de vacunas contra *L. intracellularis*, y de herramientas eficaces para diagnosticar la infección por *L. intracellularis*.

Sumario de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar vacunas anti-*L. intracellularis*.

Otro objeto de la invención es proporcionar métodos para detectar la presencia de anticuerpos contra *L. Intracellularis* en muestras biológicas.

Es un objeto adicional proporcionar un método de cultivo mejorado que permita el cultivo a gran escala de *L. intracellularis*, para producir vacunas y agentes de diagnóstico.

Para conseguir estos y otros objetos, y de acuerdo con el propósito de la invención, tal como se realiza y se describe a grandes rasgos en la presente memoria, la presente invención proporciona un método para cultivar *L. intracellularis*, y suministrar a gran escala bacterias producidas mediante dicho método.

Según dicho método, se incuban bacterias de *L. intracellularis* bajo una concentración de oxígeno de aproximadamente 0 por ciento a aproximadamente 18 por ciento, mientras se agitan las bacterias para cultivar *L. intracellularis*, manteniendo las bacterias en suspensión.

Según otra realización, se proporciona un método para cultivar bacterias de *L. intracellularis* inoculando una monocapa de células HEp-2, McCoys, ó IEC-18, que presente aproximadamente 30 por ciento de confluencia, con un inóculo que comprenda bacterias de *L. intracellularis*, a fin de infectar las células con las bacterias. Después se in-

cuban las células infectadas, a una temperatura de aproximadamente 36°C hasta aproximadamente 38°C, bajo una concentración de oxígeno de aproximadamente 0 por ciento hasta aproximadamente 8,0 por ciento, hasta que las células alcanzan la confluencia. A continuación se disponen las células infectadas y medio de cultivo en un fermentador, biorreactor, matraz agitado u otro recipiente adecuado para mantener las células en suspensión. Se incuban las células infectadas mientras son agitadas, a fin de cultivar las bacterias de *L. intracellularis* mientras se mantienen en suspensión las células infectadas. A continuación se traspasa una porción de *L. intracellularis* cultivada a nuevas células de cultivo, para incrementar la producción de bacterias de *L. intracellularis*.

La invención proporciona vacunas anti-*L. intracellularis* y métodos para producir vacunas anti-*L. intracellularis*. Se produce una bacteria *L. intracellularis* avirulenta traspasando un número de veces suficiente las bacterias *L. intracellularis* cultivadas, y seleccionando una cepa atenuada, o bien sometiendo a las bacterias cultivadas a medios químicos de atenuación. Empleando los métodos de cultivo de la invención también se preparan vacunas con *L. intracellularis* muertas. De acuerdo con una realización particularmente preferida, se cultivan de manera continua las bacterias durante al menos aproximadamente 6 a 8 meses, durante los cuales son traspasadas al menos aproximadamente 7 a 12 veces, a fin de producir una cepa atenuada destinada al empleo como vacuna. A continuación se mezclan las bacterias atenuadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y son administradas a un animal en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria. Los autores de la invención han depositado la cepa atenuada actualmente preferida (N343NP40wk) en la colección estadounidense de cultivos tipo American Type Culture Collection.

La invención también proporciona un método para determinar la presencia de anticuerpos que específicamente reaccionan con bacterias *L. Intracellularis* en una muestra biológica, recolectando al menos una parte de la bacteria *L. Intracellularis* cultivada, poniendo en contacto una muestra biológica de un animal con bacterias *L. Intracellularis* recolectadas o un componente de las mismas en condiciones en las que el anticuerpo presente en la muestra biológica reacciona con la *L. Intracellularis* o el componente, y determinar si ha ocurrido una reacción anticuerpo-antígeno.

En la descripción que sigue se expondrán características y ventajas adicionales de la invención, que serán evidentes de dicha descripción, o bien de la práctica de la invención.

Descripción de las realizaciones preferidas

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "*L. intracellularis*" significa la bacteria intracelular, curvada, gram-negativa, descrita con detalle por C. Gebhart y otros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, volumen 43, número 3, 533-38 (1993) y S. McOrist y otros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, volumen 45, número 4, 820-25 (1995) (cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad), e incluye, aunque sin estar limitada a las mismas, la bacteria depositada como ATCC 55672 en la American Type Culture Collection, Rockville, MD; las bacterias depositadas como NCTC 12656 y 12657 en la colección de cultivos tipo National Collection of Type Cultures, Colindale, London; la bacteria causante que puede ser obtenida de cerdos u otros animales infectados con PPE de todo el mundo, con el conocimiento de la técnica y las enseñanzas de la presente memoria; y variantes o mutantes de cualquiera de las bacterias mencionadas, tanto si son obtenidos de manera espontánea o de manera artificial.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "cepa atenuada" significa cualquier cepa de *L. intracellularis* que haya sido preparada según las técnicas de cultivo y traspaso que se enseñan en la presente memoria, a fin de conseguir la avirulencia y al mismo tiempo mantener las propiedades inmunogénicas cuando sea administrada a un animal anfitrión. Tal como se mostrará más adelante, se han cultivado y atenuado según las presentes enseñanzas distintas cepas de *L. intracellularis*, obteniendo cepas inmunogénicas atenuadas, que tienen eficacia como vacunas en cerdos y otros animales susceptibles a la infección por *L. intracellularis*.

Se espera que las cepas atenuadas de la invención sean útiles como inmunógenos en vacunas antimicrobianas para animales, con inclusión de pájaros, peces, ganado vacuno, cerdos, caballos, mamíferos y primates en general, y seres humanos. Estas vacunas pueden ser preparadas mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, basándose en las enseñanzas contenidas en la presente memoria. Una vacuna semejante comprendería una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa atenuada, en el seno de un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna podría ser administrada en una o más dosis. Se puede determinar si una cantidad es inmunológicamente eficaz por medios conocidos en la técnica, y sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas contenidas en la presente memoria. La cantidad de bacterias avirulentas debe ser suficiente para estimular una respuesta inmunitaria en animales susceptibles a la enfermedad, y al mismo tiempo seguir siendo avirulenta. Dicha cantidad dependerá del animal, la bacteria y la enfermedad en particular que estén implicados. La dosis recomendada que se ha de administrar al animal susceptible se sitúa con preferencia en aproximadamente 10^3 hasta 10^9 bacterias/kg de peso corporal, y muy preferentemente en torno a 10^5 hasta 10^7 bacterias/kg de peso corporal. Los vehículos son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen estabilizantes y diluyentes. Dicha vacuna puede contener también un adyuvante adecuado. Las vacunas de la invención pueden ser empleadas en combinación con otras vacunas, por ejemplo como diluyentes de otra vacuna liofilizada, o bien se pueden combinar con otra vacuna antes de la liofilización. También se pueden desecar las preparaciones de vacuna, por ejemplo liofilizándolas para su conservación o para su posterior formulación como vacunas líquidas.

ES 2 294 620 T3

Por consiguiente, la invención también comprende un método para inducir una respuesta inmune en bacterias *L. intracellularis* virulentas, de tipo salvaje, en un hospedante animal con el fin de proteger al hospedante de bacterias de este tipo. El método comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de las bacterias atenuadas o bacterias exterminadas de la invención al hospedante y, de preferencia, administrar la vacuna de la invención al
5 hospedante.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión “cultivo a gran escala” significa un nivel de cultivo de *L. intracellularis* superior a aproximadamente 2,0 a 3,0 litros, e incluye la producción a una escala de 100 litros o más. El término “cultivo” tal como se emplea en esta memoria, significa el proceso de promover el crecimiento, reproducción
10 y/o proliferación de *L. intracellularis*.

Para poner en práctica el método de cultivo de la invención, primeramente se pueden inocular células de cultivo con un inóculo que comprende bacterias de *L. intracellularis*, a fin de infectar las células con las bacterias. Para poner en práctica la invención se pueden emplear numerosas líneas celulares, que incluyen, pero sin estar limitadas a éstas,
15 células epiteliales de intestino de rata IEC-18 (ATCC-1589), células de carcinoma epidermoide humano HEp-2 (ATCC 23), células de ratón (sin especificar) McCoys (ATCC 1696), células renales caninas Madin-Darby MDCK (ATCC 34), células renales de mono búfalo verde BGMK (Biowhittaker #71-176), y células epiteliales de intestino de cerdo.

Las células de cultivo preferidas son células HEp-2, McCoys o bien IEC-18. De manera alternativa, se pueden cultivar las bacterias en un sistema exento de células, siempre que se mantengan las bacterias bajo la concentración apropiada de O₂ disuelto, tal como se enseña en la presente memoria.
20

Si se emplean células de cultivo, las células se encuentran preferentemente en forma de una monocapa antes de ser inoculadas, aunque no es imprescindible. Para formar una monocapa, se pueden sembrar las células en frascos convencionales. Generalmente se siembra cada frasco con una cantidad entre aproximadamente 1 x 10⁵ células y
25 aproximadamente 10 X 10⁵ células para un frasco de 25 cm², mezcladas con medio de cultivo. El medio de cultivo puede ser cualquier medio para el cultivo de células, lo cual incluye una fuente de nitrógeno, factores de crecimiento necesarios para las células cultivadas elegidas, y una fuente de carbono, por ejemplo glucosa o lactosa. El medio preferido es DMEM con 2-5% de suero fetal de bovino, aunque se pueden emplear con buen resultado otros diversos
30 medios comercialmente disponibles.

Los autores de la invención han hallado que el cultivo satisfactorio de *L. intracellularis* se ve facilitado manteniendo en un estado de crecimiento constante a las células cultivadas. Por tanto, la monocapa de células de cultivo debe presentar, en el momento de la inoculación, una confluencia de aproximadamente 20 por ciento a aproximadamente
35 50 por ciento. Preferiblemente, las células deben encontrarse en una confluencia de aproximadamente 30 por ciento hasta aproximadamente 40 por ciento en el momento de la inoculación, siendo muy preferida una confluencia de aproximadamente 30 por ciento.

El inóculo puede ser un cultivo puro de *L. intracellularis* obtenido, por ejemplo, partiendo del depósito ATCC
40 55672, de los depósitos NCTC 12656 ó 12657, o bien de cerdos u otros animales infectados, aprovechando las enseñanzas de aislamiento y purificación que se discuten en la presente memoria.

Según una realización, el inóculo para poner en práctica la invención es un homogenizado intestinal preparado raspando la mucosa del íleon de un cerdo u otro animal infectado con PPE. Cuando se prepara un homogenizado
45 intestinal, los cortes del íleon seleccionados para el cultivo deben mostrar lesiones graves, con gran engrosamiento del intestino. A causa de la naturaleza frágil de las bacterias, las muestras deben ser conservadas con preferencia a -70°C lo más rápidamente posible tras la necropsia. Preferentemente, se añade al inóculo un antibiótico al cual sea resistente *L. intracellularis*, por ejemplo vancomicina, anfotericina B, o miembros del grupo de los antibióticos aminoglicósidos, que incluyen la gentamicina y la neomicina, por nombrar algunos, con el fin de eliminar bacterias contaminantes,
50 y permitir al mismo tiempo el crecimiento de *L. intracellularis*. Sea el inóculo un cultivo puro o un homogenizado intestinal, se puede llevar a cabo la inoculación de las células de cultivo mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, y basándose en las enseñanzas de la presente memoria.

A continuación se incuban las bacterias y/o las células de cultivo inoculadas, bajo una concentración disminuida de O₂ disuelto. A concentraciones de oxígeno disuelto por encima de 18%, el crecimiento de *L. intracellularis* es inferior al óptimo, y eventualmente se produce el cese del crecimiento a concentraciones de oxígeno fuera de este
55 intervalo. Las células de cultivo inoculadas se incuban preferentemente bajo una concentración de oxígeno disuelto situada dentro del intervalo de aproximadamente 0% hasta aproximadamente 10%. Más preferentemente, se incuban las células bajo una concentración de oxígeno situada en el intervalo de aproximadamente 0% a aproximadamente 8%,
60 siendo muy preferida una concentración de oxígeno de aproximadamente 0% a aproximadamente 3,0%.

También es importante para el crecimiento adecuado de *L. intracellularis* una concentración apropiada de dióxido de carbono. A concentraciones de dióxido de carbono superiores a 10% e inferiores a 4%, se produce un crecimiento que no es el óptimo, y eventualmente se produce el cese del crecimiento a concentraciones de dióxido de carbono fuera
65 de este intervalo. Con preferencia, la concentración de dióxido de carbono se sitúa en el intervalo de aproximadamente 6% a aproximadamente 9%, siendo muy preferida una concentración de dióxido de carbono de aproximadamente 8,8%.

Además, las células son incubadas, preferentemente, a una concentración de hidrógeno situada en el intervalo de aproximadamente 73% a aproximadamente 94%. Se puede emplear nitrógeno en lugar de parte o todo el hidrógeno presente. Según una realización particularmente preferida, se incuban las células bajo aproximadamente 0-8,0% de O₂, aproximadamente 8,8% de CO₂, y aproximadamente 83,2% de H₂.

5 Se pueden incubar las células inoculadas, en un incubador de dos gases, o en cualquier otra cámara de gas que contenga las concentraciones adecuadas de oxígeno y de dióxido de carbono, y que permita que las células estén suspendidas durante la incubación. La cámara debe comprender medios para mantener en suspensión las células inoculadas, y un detector de gases y una fuente de suministro para aportar y mantener las concentraciones de gases
10 adecuadas. La temperatura de incubación debe situarse en el intervalo de 30°C a 45°C, y más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 36°C a aproximadamente 38°C. Muy preferentemente, la temperatura es aproximadamente 37°C. El equipo necesario para los métodos de cultivo y de atenuación de la invención es fácilmente asequible para los especialistas con una pericia ordinaria en la técnica, basándose en las enseñanzas de la presente memoria. Un ejemplo de equipo adecuado para llevar a cabo la presente invención es un incubador con dos gases, por ejemplo el modelo 480 disponible de Lab-Line, Melrose Park, Illinois, junto con matraces agitados, a fin de mantener en suspensión las células. El equipo aquí preferido comprende un fermentador, biorreactor o agitador giratorio que contiene al menos aproximadamente 2 litros de medio, y que es capaz de mantener en suspensión las células del cultivo mediante el borboteo de gas con la concentración apropiada, o bien mediante otros métodos de agitación mecánica, y que controla de manera continua los niveles de O₂ disuelto en el medio. New Brunswick, Braun y otras compañías fabrican
20 fermentadores y biorreactores adecuados para este fin.

Manteniendo las células inoculadas en un estado suspendido durante la incubación, se consigue el máximo crecimiento de las células, y por tanto de *L. intracellularis*, cuando se aumenta la exposición de cada célula individual al medio de cultivo y a la mezcla adecuada de oxígeno y dióxido de carbono. Se pueden agitar y mantener en suspensión
25 las células de cultivo mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, frascos de cultivo, botellas rodantes, cultivos de membrana y matraces agitados. Se pueden mantener en suspensión las células durante la incubación, incubando dichas células en un matraz agitado dentro de un incubador de dos gases, o aparato similar. La expresión "matraz agitado", tal como se emplea en esta memoria, significa un matraz u otro recipiente que emplea una paleta, una hélice, u otro medio para agitar el cultivo y mantener en suspensión las células contenidas en el mismo.

30 En una realización particularmente preferida de la invención, se incuban las células inoculadas hasta que alcanzan la confluencia, y después se transfieren las células a un matraz agitado que contiene medio de cultivo y se incuban en un incubador de dos gases mientras se agita el matraz. Preferiblemente, se raspan las células inoculadas, introduciéndolas en el matraz agitado. Esto se puede realizar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo empleando un rascador de células para desprenderlas. Una vez que se han introducido las células en el matraz agitado, típicamente se hace girar la paleta del matraz agitado a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 rpm, para mantener en suspensión las células infectadas.

Después se traspa una porción de las *L. intracellularis* cultivadas a células de cultivo nuevas, para incrementar la producción de bacterias de *L. intracellularis*. El término "traspasar", o variaciones del mismo, significa en la presente memoria el proceso de transferir una porción de las *L. intracellularis* cultivadas a células de cultivo nuevas, para infectar las células nuevas con la bacteria. La expresión "células nuevas", tal como se emplea en esta memoria, significa que no han sido infectadas hasta ese momento por *L. intracellularis*. Preferiblemente, dichas células no tienen, por término medio, más de aproximadamente un día de edad.

45 El traspa de *L. intracellularis* en cultivos en suspensión puede efectuarse retirando una porción del cultivo original y añadiéndolo a un matraz nuevo que contiene células de cultivo nuevas. Si el cultivo original contiene un elevado número de bacterias por mililitro, por ejemplo más de aproximadamente 10⁴ bacterias/ml, es preferible añadir entre aproximadamente 1 y 10% (volumen/volumen) de cultivo desde el matraz infectado al matraz nuevo que contiene células nuevas. Esto se realiza preferiblemente cuando se ha infectado 50-100% de las células. Si están infectadas menos de 50% de las células, el traspa se realiza preferiblemente dividiendo el cultivo en proporción 1:2 a un frasco nuevo, y aumentando el volumen mediante la adición de medio nuevo. En cualquier caso no son necesarias lisis celulares ni otras operaciones, lo que contrasta directamente con lo que ocurre en el traspa de cultivos en monocapa, tal como se realizaba en la técnica anterior.

55 Tras un crecimiento suficiente de las células en cultivo y la subsiguiente infección por *L. intracellularis*, con una infectividad superior a aproximadamente 70% de las células, lo que se determina mediante IFA, TCID₅₀ u otro método comparable, se cosecha al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas. La operación de recolección se puede llevar a cabo separando las bacterias y extrayéndolas de la suspensión mediante diversas técnicas, conocidas por los especialistas con una pericia ordinaria en la técnica, basándose en las enseñanzas de la presente memoria. Preferiblemente, las bacterias de *L. intracellularis* se cosechan centrifugando el contenido de toda la suspensión, o una parte de la misma, para aglomerar las células del cultivo en forma de un pellet, resuspendiendo los pellets celulares resultantes, y lisando las células infectadas. Típicamente, al menos una porción del contenido es centrifugada a aproximadamente 3000 x g durante unos 20 minutos, para formar un pellet de células y bacterias.
60 Después se puede resuspender el pellet en, por ejemplo, una solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG), y se hace pasar unas cuatro veces a través de una aguja de calibre 25 para lisar las células. Si se desea una purificación adicional, se pueden centrifugar las muestras a aproximadamente 145 x g durante unos cinco minutos para eliminar los núcleos y restos celulares. Después se puede centrifugar el sobrenadante a aproximadamente 3000 x g durante unos veinte

ES 2 294 620 T3

minutos, y resuspender el pellet resultante en un diluyente adecuado, por ejemplo SPG con suero fetal de bovino (para hacer que las bacterias cosechadas sean adecuadas para la congelación o para el empleo como inoculante) o bien medio de cultivo (para hacer a las bacterias cosechadas más adecuadas para el traspaso a células nuevas).

5 Tal como se ha mencionado antes, se incrementa el crecimiento eficaz de *L. intracellularis* para la producción a gran escala si se mantienen las células del tejido creciendo activamente. Con monocapas, cuando los cultivos se hacen confluentes, la velocidad de división celular disminuye sustancialmente. Los intentos de cultivar *L. intracellularis* en cultivos de tejidos en monocapa han tenido un éxito limitado, y no ha sido posible su aumento de escala. Sin embargo, el empleo de cultivos en suspensión facilita en gran medida el mantener a las células en crecimiento activo, y permite
10 la expansión continua del cultivo y el aumento de escala. Empleando un fermentador y aproximadamente entre 0 y 3% de O₂ disuelto, tal como se ha explicado antes, los autores de la invención han sido capaces de cultivar hasta 10⁸ bacterias/ml. Los autores de la invención han sido capaces también de mantener las bacterias cultivadas en un crecimiento activo durante muchos meses, y esperan ser capaces de hacerlo así de manera indefinida.

15 Antes de la presente invención, se creía que las células debían estar unidas a una superficie para ser infectadas por *L. intracellularis*. Las suspensiones de células de la presente invención son únicas, y contradicen esta teoría. Cuando se emplean células McCoy's ó IEC-18, es preferible añadir junto con el medio de cultivo perlas de gelatina, agarosa, colágeno, acrilamida o sílice, por ejemplo los microsopores porosos Cultisphere-G fabricados por HyClone Laboratories, Logan, UT. Sin embargo, según el método de cultivo de la invención, las células HEp-2 y otras
20 no precisan microsopores. Esto proporciona una vía especialmente ventajosa y económica para el cultivo a gran escala.

Para el mantenimiento, en el caso de cultivos de HEp-2, preferiblemente se retira con periodicidad semanal 25-50% del cultivo y se reemplaza con medio nuevo. Para cultivos celulares con microsopores o perlas, se retira preferiblemente 25-50% del cultivo, y se reemplaza con microsopores o perlas nuevos, y medio nuevo, 1-2 veces por semana. Si se quiere incrementar la escala se puede añadir al cultivo 25-50% adicional de medio, o de medio con microsopores.

Dependiendo de la velocidad con la que se infecten las células del cultivo, el traspaso a células nuevas se produce por regla general a intervalos de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 semanas. Suponiendo que al menos 70% de las células de cultivo quedan infectadas en el transcurso de 2-3 semanas, el traspaso tiene lugar con preferencia aproximadamente cada 3 a 4 semanas.

La presente invención proporciona también vacunas y métodos para producir vacunas contra *L. intracellularis*. Según una realización particularmente preferida, tras haber mantenido las células en suspensión durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, 6-8 meses), se cosecha al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas, y se analiza en busca de una potencial atenuación. Este análisis se efectúa preferiblemente mediante pruebas de exposición en animales anfitrión o modelos animales, para seleccionar una cepa atenuada. Dichas cepas atenuadas se emplean en vacunas según los métodos que se enseñan en la presente memoria. Las vacunas con *L. intracellularis* atenuada de acuerdo con la presente invención han demostrado su eficacia contra a la infección por *L. intracellularis* en diversos animales, y se espera que también sean eficaces en seres humanos.

La presente invención permite una rápida expansión del cultivo, un incremento de 100-1000 veces en el rendimiento, y un coste reducido. En consecuencia, el abundante suministro de bacterias de *L. intracellularis* producido según el método de cultivo de la invención es atenuado fácilmente a fin de producir vacunas. La atenuación es difícil en cultivos en monocapa debido al bajo rendimiento de bacterias obtenido mediante el empleo de técnicas de cultivo en monocapa convencionales. Por el contrario, el método de cultivo de *L. intracellularis* de la presente invención aumenta enormemente la facilidad, la rapidez, y el número de bacterias disponibles para dicho fin. Cuanto mayor es el número de células que se producen y el número de divisiones celulares que tienen lugar, mayor es el nivel de mutaciones que suceden, lo cual resulta ventajoso para el desarrollo de vacunas. El cultivo en el seno de suspensiones, de acuerdo con la invención, incrementa la expresión de importantes inmunógenos controlados por genes regulados por el entorno y sus productos de expresión.

Las cepas atenuadas resultantes pueden ser cultivadas en monocapas de cultivo de tejido tal como se describe más adelante en el Ejemplo 1, pero preferiblemente son cultivadas en cultivos en suspensión de acuerdo con el método de la invención. Otros medios de atenuación pueden incluir la atenuación química mediante el empleo, por ejemplo, de N-metilnitrosoguanadina y otras sustancias conocidas en la técnica. Sea mediante múltiples trasposos, o sea por medios químicos, se produce una *L. intracellularis* atenuada, que es seleccionada para preparar vacunas.

De acuerdo con una realización de vacuna de la invención., el antígeno se recolecta mediante centrifugación o microfiltración según se describe antes. A continuación, el antígeno se estandariza a un nivel definido basado en la respuesta inmune óptima del animal hospedante, determinado por una titulación de la dosis en la especie del animal hospedante. Las bacterias se pueden inactivar mediante exposición prolongada, por ejemplo una semana, a niveles de O₂ ambiente, o utilizando formalina al 0,3% u otro agente inactivamente para preparar una vacuna exterminada. El antígeno se incorpora luego en un adyuvante adecuado, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, para reforzar la respuesta inmune. Después, el antígeno se utiliza para vacunar al hospedante a través de inyección intramuscular o subcutánea, en el caso de cerdos de aproximadamente 3-4 semanas de edad, con una dosis de refuerzo si es necesaria.

ES 2 294 620 T3

Alternativamente, de acuerdo con una realización de vacuna particularmente preferida utilizando los métodos de cultivo previamente descritos, las bacterias se hacen pasar en serie para inducir y seleccionar un cultivo vivo atenuado y avirulento. El cultivo se testa en el hospedante (después de preferiblemente al menos 6 a 8 meses o más de desarrollo en el cultivo en suspensión) en cuanto a signos de atenuación. El cultivo se recolecta según se describe antes y se diluye. A los cerdos, por ejemplo, se les vacuna por vía oral con un 1×10^5 a 1×10^6 bacterias. Aproximadamente veintiocho días después de la vacunación, a los cerdos se les inocula por vía oral con aproximadamente 1×10^7 organismos procedentes de un cultivo de *L. intracellularis* menos virulento traspasado (aproximadamente de 30 a 45 días de edad). Los animales infectados se necropsizan 21 días después del enfrentamiento y se observan los intestinos delgados tanto en cuanto a lesiones toscas como también lesiones microscópicas. También se debería realizar una PCR y un anticuerpo fluorescente. Aproximadamente el 80% de los animales control mostrarán también lesiones toscas o microscópicas y testarán ser positivos en cuanto a la presencia de *L. intracellularis* en las células de la mucosa de los intestinos utilizando métodos de ensayo de PCR o FA. Los animales vacunados tendrán superficies de la mucosa normales según se determina por observaciones histológicas y serán negativos por ensayo PCR.

Por regla general, se produce una cepa de *L. intracellularis* inmunogénica atenuada tras un cultivo continuo durante al menos aproximadamente 150 a 250 días, y durante este tiempo el cultivo es traspasado al menos unas 7 a 12 veces. Se pueden producir otros cultivos atenuados en los cuales estas cifras son distintas, siempre que se utilicen los métodos de control y selección que se enseñan en la presente memoria.

Luego se prepara una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de *L. intracellularis* atenuada en un soporte farmacéuticamente aceptable. El inmunógeno y soporte combinados pueden ser una solución, emulsión o suspensión acuosa. Una cantidad inmunológicamente eficaz se puede determinar por medios conocidos en la técnica sin una experimentación indebida, dadas las enseñanzas contenidas en esta memoria. En general, la cantidad de inmunógenos oscilará entre 50 y 500 microgramos y, de preferencia, entre 10^7 y 10^6 y TCD₅₀, cuando se utilizan bacterias purificadas.

Las vacunas de acuerdo con la invención se administran generalmente a animales susceptibles, preferiblemente cerdos, en una o más dosis. La vacuna viva o exterminada se puede administrar 1 o 2 veces a intervalos de 2 semanas. Para las vacunas vivas atenuadas, se prefiere una dosis. Las vías preferidas de administración de cepas atenuadas vivas son la oral o intranasal, pero también se puede utilizar la inyección intramuscular o subcutánea. Las vías de inyección intramuscular y subcutánea son las más preferidas para la vacuna exterminada.

El diagnóstico eficaz de PPE también ha sido impedido por el tiempo requerido para cultivar las bacterias causantes. Como resultado de la presente invención, ahora es posible el desarrollo de herramientas de diagnóstico que fomenten ensayos rápidos y fiables en cuanto a la presencia de *L. intracellularis* en muestras biológicas tomadas de cerdos y otros animales susceptibles PPE.

Las bacterias *L. intracellularis* desarrolladas de acuerdo con el método de la presente invención, o componentes derivados de bacterias de este tipo, se pueden utilizar con un antígeno en un ELISA u otro inmunoensayo, tal como el ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes ("IFA"), para detectar anticuerpos contra *L. intracellularis* en el suero u otros fluidos corporales de animales de los que se sospecha están infestados con la bacteria. El inmunoensayo actualmente preferido es un IFA según se describe en el ejemplo que figura más abajo. Alternativamente, las bacterias desarrolladas de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un ensayo de transferencia Western.

El protocolo ELISA preferido de acuerdo con esta realización de la invención es como sigue:

1. Añadir 0,1 ml/pocillo de antígeno diluido en tampón de revestimiento. Incubar durante 18 horas a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Añadir 0,25 ml de tampón de bloqueo a cada pocillo de la placa. Incubar 1 o 2 horas a 37°C.
4. Lavar 3 veces con tampón de lavado.
5. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml a los primeros pocillos de la placa. Hacer diluciones en serie 1:2 a lo largo de la placa. Incubar durante 1 hora a 37°C.
6. Lavar 3-5 veces con tampón de lavado.
7. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml a pocillos de la placa e incubar durante 1 h a 37°C.
8. Lavar 3-5 veces con tampón de lavado.
9. Añadir sustrato.
12. Medir la absorbancia de la luz con un espectrofotómetro.

ES 2 294 620 T3

13. Los pocillos en los que no se añadió antígeno se utilizan como patrones.
14. Con cada ensayo también se debería utilizar suero de cerdo control positivo y negativo.

5

El protocolo de la transferencia Western preferido es como sigue:

1. Hacer pasar antígeno sobre SDS-PAGE al 12% y transferir a membrana de nitrocelulosa.
- 10 2. Colocar la membrana en tampón de bloqueo durante 2 h.
3. Retirar el tampón de bloqueo y aclarar con PBS durante 1 minuto.
- 15 4. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadir a la membrana. Incubar durante 2 horas a la temperatura ambiente.
5. Lavar 3 veces con tampón de lavado (5 minutos para cada lavado)
- 20 6. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadir a la membrana. Incubar durante 1 h a la temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces con tampón de lavado.
- 25 8. Añadir sustrato durante 10 minutos o hasta que se produzca un bandeo fuerte.
9. Aclarar con PBS.
10. Secar al aire y almacenar en la oscuridad.

30 La presente invención queda descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan sólo con fines ilustrativos, y no deben ser considerados limitantes.

Ejemplo 1

35 *Aislamiento de L. intracellularis del intestino de cerdos de origen estadounidense con enteropatía proliferativa porcina*

Materiales y métodos

Selección de muestras de inóculo

40

La muestra N24912 fue obtenida de una piara criada en una granja del estado de Iowa, en la cual se observaron, en quince animales de un total de 300 cerdos de engorde de cinco meses de edad, heces sanguinolentas persistentes a pesar del tratamiento con penicilina. Al efectuar la necropsia de estos animales, el intestino (el íleon) presentaba una mucosa engrosada. Los exámenes histopatológicos mediante tinción con plata demostraron la presencia de bacterias intracelulares curvadas e hiperplasia enterocítica críptica, lo cual confirmó el diagnóstico de PPE. La muestra N72994 fue obtenida de un cerdo SPF de segunda camada, de 1,5 años de edad, criado en una granja del estado de Minnesota.

45 La piara tenía un tamaño de entre 70 y 80 animales, y se desconoce su tratamiento con antibióticos. Al efectuar la necropsia, la mucosa del íleon estaba engrosada, observándose cierta hemorragia. La tinción Gimenez de la mucosa demostró gran número de bacterias curvadas. La muestra N101494 fue obtenida de un cerdo de 12 semanas de edad, criado en una granja del estado de Indiana, con 600 cerdos en fases comprendidas desde la crianza hasta la finalización. El animal había sido tratado con Tylan inyectable desde el comienzo de la diarrea hemorrágica, pero el animal murió poco tiempo después del tratamiento.

Preparación de inóculos bacterianos derivados de cerdos

55 Las muestras de intestinos habían sido conservadas a -70°C. Se abrieron los intestinos, y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (siglas inglesas PBS). Se trocearon muestras de un gramo de mucosa dentro de glutamato sódico-potásico (siglas inglesas SPG), y se homogenizó durante 30 segundos con 4,0 ml de tripsina al 1% (JRH Biosciences, Lenexa, KS) en SPG. Se incubaron las suspensiones durante 35 minutos a 37°C. Se añadieron diez mililitros de SPG/suero fetal de bovino (siglas inglesas FCS) al 10% (JRH Biosciences, Lenexa, KS), y se trituraron las muestras en una trituradora de tejidos durante 1 minuto. Se añadieron diez mililitros de SPG/FCS al 10%, y se filtró una vez a través de papel de filtro (Whatman 113V; Whatman Labsales, Hillsboro, OR) y después a través de filtros de membrana en una secuencia de 5,0, 1,0, y 0,65 micrómetros. Se dividieron en alícuotas los filtrados, y se congelaron a -70°C en porciones alícuotas de 1,0 ml. Se realizó un frotis de mucosa sobre un portaobjetos, para realizar la tinción Gimenez. Se tiñeron con IFA distintos frotis de filtrados, empleando un anticuerpo monoclonal específico para *L. intracellularis* (S. McOrist y otros, Vet. Rec. 121:421-422 (1987)) (incorporada en su totalidad en esta memoria como referencia).

ES 2 294 620 T3

Cultivo celular

Se cultivaron células IEC-18 (células epiteliales del intestino de rata, ATCC CRL 1589) en DMEM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) con L-glutamina y FCS al 10%, y se traspasaron con tripsina de manera rutinaria una vez por semana. Se cultivaron monocapas de células a 37°C en aire con 5% de CO₂.

Infección del cultivo celular

Se sembraron las células IEC-18 a razón de 1,25 x 10⁵ células en frascos de 25 cm², y en cantidades comparables también en portaobjetos de cámara (Nunc, Inc., Naperville, IL), se incubaron durante 24 horas, y después se eliminó el medio. Se descongelaron rápidamente aislados bacterianos derivados de cerdos, se diluyeron en DMEM/FCS al 7% con vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml) en proporción de 1,0 ml de homogenizado para cada 15 ml de medio, y se añadieron a las monocapas. Se centrifugaron las monocapas y las suspensiones bacterianas durante 30 minutos a 2000 g, y se transfirieron a botellas anaeróbicas. Se hizo el vacío en las botellas, y se sustituyó el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂, 10% de CO₂, y 82% de H₂. Se incubaron los cultivos durante 3 horas a 37°C, y después se repuso DMEM/FCS al 7% con L-glutamina, vancomicina (100 µg/ml), neomicina (50 µg/L), y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se devolvieron los cultivos a las botellas anaeróbicas, y se incubaron durante 6 días, cambiando el medio cada 2 días.

Traspaso de L. intracellularis

Se traspasaron bacterias de *L. intracellularis* mediante lisis celular, empleando cloruro potásico de la manera descrita anteriormente en el artículo de G. Lawson y otros, J. Clin. Microbiol., 31:1136-1142 (1993) (incorporada en su totalidad en esta memoria como referencia), y después se añadieron a monocapas de IEC-18 recientes. Por decantación se separó el medio de las monocapas, se añadió KCl al 0,1%, y se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C. Se eliminó el KCl, se añadió SPG/10%, y se arrancaron mecánicamente las monocapas con un rascador de células. Se lisaron las células haciéndolas pasar tres veces a través de una jeringa con una aguja de calibre 21. Se eliminaron los núcleos de las células por centrifugación a 100 x g durante 5 minutos, y se añadió la suspensión bacteriana, que constituía el fluido sobrenadante, a monocapas de células IEC-18 recientes, con 1 día de edad.

30

Control de la infección de cultivos celulares

Se controló la infección fijando las células en portaobjetos con cámara, por medio de acetona/metanol fríos, durante 5 minutos. La tinción se llevó a cabo mediante métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Ambos métodos empleaban un anticuerpo monoclonal de ratón (tal como se describe en el artículo de S. McOrist y otros, Vet. Rec. 121:421-422 (1987)) como anticuerpo primario y, o bien conjugado de G-Fluorochrome (isotiocianato de fluoresceína; Organon Teknika Corporación, Durham, NC) e inmunoglobulina anti-ratón, o bien conjugado de peroxidasa (e inmunoglobulina G anti-ratón, de cabra; Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). La cuantificación de las bacterias se efectuó contando el número de bacterias específicamente teñidas dentro de las células en cada portaobjetos.

40

Reacción en cadena de polimerasa

Se incorporaron a una reacción en cadena de polimerasa (siglas inglesas PCR) los inóculos de muestra y las bacterias traspasadas, como plantilla de ADN, utilizando el mismo método de preparación de las muestras, los mismos cebadores, y los mismos parámetros de ciclo descritos por Jones y otros, en J. Clin. Microbiol., 31:2611-2615 (1993), y por McOrist y otros, Vet. Microbiol. 1-8 (1994) (incorporadas en cada caso en su totalidad en esta memoria como referencia). Los parámetros de ciclo fueron 93°C durante 5 minutos, 55°C durante 45 segundos, y 72°C durante 45 segundos, para el primer ciclo. Se llevaron a cabo treinta y tres ciclos a las temperaturas antes mencionadas, durante 45 segundos por temperatura, así como un ciclo a 93°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, y 72°C durante 2 minutos. Para inocular las células IEC-18 se emplearon sólo inóculos positivos. También se efectuó la PCR para controlar el material de traspaso, y confirmar las infecciones. Para determinar su secuencia, el ADN producido mediante PCR fue remitido a la Nucleic Acid Facility (instalaciones para ácidos nucleicos) de la Iowa State University. Se compararon los resultados de la determinación de la secuencia con los obtenidos por Gary F. Jones, tal como están descritos en su tesis doctoral en la University de Minnesota, Minneapolis, MN (junio de 1993).

55

Resultados

Selección de muestras de inóculo

60

Los cerdos identificados con los números N24912 y N72994 presentaban una PPE grave, con contenido intestinal hemorrágico y mucosa engrosada. N101494 presentaba PPE grave e intensa hemorragia, que había originado un gran coágulo de sangre en la luz intestinal. La tinción Gimenez de los frotis de mucosa evidenció un gran número de bacterias curvadas o con forma de S. La tinción con IFA puso de manifiesto gran número de bacterias con fluorescencia brillante en inóculos bacterianos derivados de cerdos.

65

ES 2 294 620 T3

Control de la infección de cultivos celulares

Se observaron mediante microscopía óptica las monocapas inoculadas, durante todo el ciclo de crecimiento, observándose escaso cambio morfológico de las células. Cultivadas bajo presión de oxígeno reducida (8% de O₂), las monocapas que no habían sido infectadas presentaron una morfología similar.

Los cultivos infectados teñidos por inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa revelaron un gran número de bacterias curvadas o con forma de S, específicamente teñidas, aparentemente en el interior de las células. Las monocapas no presentaron infección confluyente. Las células infectadas se presentaban a menudo estrechamente asociadas con focos infectados de 1-10 células. También se observaron células intensamente infectadas (es decir, células con 30 o más bacterias) en asociación con células que tenían menos de 30 bacterias. El número de bacterias alcanzó su máximo aproximadamente a los 6 días. La infección dependió de las condiciones de cultivo específicas. Las bacterias fueron traspasadas satisfactoriamente mediante el procedimiento de lisis celular que se describe en la presente memoria. La centrifugación de células inoculadas por vez primera no era imprescindible, pero incrementó el número de células infectadas. La centrifugación también disminuyó la contaminación al permitir realimentar a las 3 horas con medio que contenía antibiótico, a células expuestas a la infección en medio exento de antibiótico. Fue necesario disminuir la concentración de FCS en el medio, de 10% a 7%, para aminorar el crecimiento de las células IEC-18, permitiendo que las bacterias proliferasen en un número más elevado, antes de que las monocapas llegasen a ser confluentes.

Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR del ADN cromosómico generó un sub-fragmento de 319 pares de bases (contando los cebadores) a partir de cualquiera de los aislados. Se comparó visualmente un fragmento de tamaño adecuado, con una muestra positiva conocida generada por McOrist y otros (1994) por medio de PCR. El análisis de la secuencia de los productos PCR de N24912, N72994, y N101494 confirmó una estrecha homología (97-99%) respecto a la secuencia p78 determinada por Jones (1993).

Ejemplo 2

Cultivo de L. intracellularis en cultivos de células HEp-2 en suspensión

Preparación de homogenizados intestinales para inóculo

Se prepararon homogenizados intestinales separando por raspado la mucosa de una porción de 6,0 a 8,0 cm de íleon de las muestras de intestino del Ejemplo 1. Se añadió tripsina (1%) a la mucosa raspada, se homogenizaron brevemente las muestras, y después se incubaron durante 35 minutos a 37°C. A continuación se añadieron diez mililitros de SPG/FBS al 10%, y se trituraron las muestras en una trituradora de tejidos. Se añadieron otros 10 ml de SPG/FBS al 10%. Se hicieron pasar los homogenizados a través de un filtro Whatman V113, y después sucesivamente a través de filtros de 5,0, 1,0, y 0,65 µm. Se dividieron las muestras en alícuotas de 1 ml, y se congelaron a -70°C.

Infección del cultivo celular

Método A

Se sembraron células de tejido a razón de 1×10^7 células in 50 ml de DMEM/FBS al 10%, en un matraz agitado de 100 ml. Se incubaron los cultivos durante 24 horas, y después se añadieron vancomicina y fungizona. Se descongeló rápidamente un vial de homogenizado intestinal congelado, y se diluyó en 3,0 ml de DMEM/FBS al 5% con vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se hizo pasar la muestra a través de un filtro de 0,65 µm, y se añadió al matraz. Se dispuso el cultivo en una cámara de gas, se hizo el vacío, y se repuso el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂ y 8,8% de CO₂, y 83,2% de H₂. Se incubaron los cultivos durante 3 horas a 37°C, y después se añadieron neomicina y gentamicina. Se cambió el medio a las 24 horas, reponiéndolo con DMEM/FBS al 5%, que contenía L-glutamina, vancomicina (100 µg/ml), neomicina (50 µg/L), gentamicina (50 µg/L), y anfotericina B (2,0 µg/ml).

Método B

Se sembraron con $1,25 \times 10^5$ células HEp-2 en DMEM/FBS al 10% dos matraces convencionales de 25 cm², y se cultivaron durante 18-24 horas. Las células habían alcanzado 30% de confluencia en el momento de la inoculación. Se diluyó el inóculo en DMEM/FBS al 5%. Cuando el inóculo procedía de un homogenizado intestinal, el medio contenía también vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se dispusieron los cultivos en una cámara de gas, se hizo el vacío, y se repuso el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂, y 83,2% de H₂. Se incubaron los cultivos durante 3 horas a 37°C, y después se añadieron neomicina y gentamicina. Se cambió el medio a las 24 horas, reponiéndolo con DMEM/FBS al 5%, que contenía L-glutamina, vancomicina (100 µg/ml), neomicina (50 µg/L), gentamicina (50 µg/L), y anfotericina B (2,0 µg/ml). No se precisaron antibióticos cuando el inóculo era un cultivo puro. Se incubaron los cultivos durante 6 días, o hasta llegar a la confluencia. Se extrajeron las células de los matraces, raspándolas, y se añadieron a un matraz agitado de 100 ml que contenía 50 ml de DMEM/FBS al 5%.

ES 2 294 620 T3

Se diluyó 1:2 el cultivo a intervalos de una semana, o bien cosechando una mitad del cultivo y añadiendo medio de cultivo nuevo, o bien traspasándolo a un matraz agitado más grande, y añadiendo más medio.

Traspaso del cultivo

Se traspasó el cultivo a células HEp-2 nuevas sembrando estas células HEp-2 nuevas a una concentración de 1×10^7 en DMEM/FBS al 5%. Se incubó el nuevo cultivo durante una noche bajo 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂, y 83,2% de H₂. Después se inoculó el nuevo cultivo con cultivo infectado, y se incubó bajo una concentración de O₂ reducida tal como se ha indicado antes. Las cantidades de inóculo dependieron del grado de infección del cultivo original.

Recolección y conservación de los cultivos

Se recolectaron los cultivos retirando la cantidad deseada de cultivo, y centrifugándola a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendió el pellet en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG), y se hizo pasar esta suspensión 4 veces a través de una aguja de calibre 25. Se dividieron los cultivos en partes alícuotas, y se congelaron a -70°C. Para purificarla aún más, se centrifugó la muestra a 145 x g durante 5 minutos, a fin de eliminar las perlas, núcleos celulares y restos de células. Después se centrifugó el sobrenadante a 3000 x g durante 20 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en diluyente.

Estimación del número de L. intracellularis viables en un cultivo de tejido

La cuantificación del número de *L. intracellularis* viables se realizó determinando la dosis infecciosa para el 50 por ciento de los cultivos de tejido (TCID₅₀). Esto se realizó retirando 2,0 ml de cultivo a ensayar, y lisando las células al hacerlas pasar 4 veces a través de una aguja de calibre 25. Se diluyó sucesivamente la muestra 1:10 en DMEM/FBS al 5% que contenía vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se añadieron las diluciones a una placa de microvaloración de 96 pocillos, a razón de 0,1 ml por pocillo. Se sembraron las placas de microvaloración con células HEp-2 a razón de 1250 células por pocillo, y se cultivaron durante 18-24 horas antes de la infección. Se utilizaron entre 3 y 6 pocillos por cada dilución. Se incubó la placa durante 6 días bajo concentraciones gaseosas de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de H₂. Se fijaron las células con 50% de acetona y 50% de metanol, fríos, durante 2 minutos. Se añadieron a los pocillos 0,03 ml de anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis* (McOrist, 1994), diluido 1:2000 en PBS, por cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, y después se lavó 3 veces con PBS. Se añadió FITC anti-ratón, diluido 1:30, en una cantidad de 0,03 ml/pocillo, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con H₂O bidestilada, y se dejó secar. Se observaron las muestras bajo un microscopio de fluorescencia, y se determinó la TCID₅₀/ml.

Resultados

Los resultados de TCID₅₀ indicaron que los cultivos contenían hasta 1×10^6 bacterias/ml. Esto se consiguió en 45 días. En el mismo período de tiempo, se había escalado el volumen de cultivo hasta 3,0 litros.

Ejemplo 3

Cultivo de L. intracellularis en cultivos de células McCoys en suspensión

Preparación de homogenizados intestinales para inóculo

Se preparó un homogenizado intestinal de la manera descrita en el Ejemplo 2. El 19 de mayo de 1995 se depositó en la colección de cultivos tipo estadounidense American Type Culture Colección (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland U.S.A. 20852, bajo el Tratado de Budapest, una muestra de *L. intracellularis* cultivada de acuerdo con el método del ejemplo siguiente, siendo asignada a dicha muestra el número de registro de entrada 55672.

Infección del cultivo celular

Se sembraron con $1,25 \times 10^7$ células McCoys en DMEM/FBS al 10% dos matraces convencionales de 25 cm², y se cultivaron durante 18-24 horas. Las células habían alcanzado 30% de confluencia en el momento de la inoculación. Se diluyó el inóculo en DMEM/FBS al 5%. Cuando el inóculo procedía de un homogenizado intestinal, el medio contenía también vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se dispusieron los cultivos en una cámara de gas, se hizo el vacío, y se repuso el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂, 10% de CO₂, y 82% de H₂. Se incubaron los cultivos durante 3 horas a 37°C, y después se añadieron neomicina y gentamicina. Se cambió el medio a las 24 horas, reponiéndolo con DMEM/FBS al 5%, que contenía L-glutamina, vancomicina (100 µg/ml), neomicina (50 µg/L), gentamicina (50 µg/L), y anfotericina B (2,0 µg/ml). No se precisaron antibióticos cuando el inóculo era un cultivo puro. Se incubaron los cultivos durante 6 días hasta llegar a la confluencia. Se rasparon las células, extrayéndolas de los matraces, y se añadieron a un matraz agitado de 100 ml que contenía 50 ml de DMEM/FBS al 2% y 0,05 g de microsoportes Cultisphere-G Microcarriers. Se agitaron los matraces a 40-50 r.p.m.

Se diluyó 1:2 el cultivo cada 2-3 días, o bien cosechando una mitad del cultivo y añadiendo medio de cultivo y perlas Cultisphere-G nuevos, o bien traspasando el cultivo a un matraz agitado más grande, y añadiendo más medio y

ES 2 294 620 T3

más perlas Cultisphere-G. La concentración final de perlas en el cultivo era aproximadamente 0,001 g de perlas por mililitro.

Traspaso del cultivo

Se traspasó el cultivo a células McCoys nuevas sembrando 1×10^7 células McCoys nuevas en DMEM/FBS al 2% y 0,05 g de perlas Cultisphere-G. Se incubó el nuevo cultivo durante una noche con 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de H₂. Después se inoculó el nuevo cultivo con 25 ml de cultivo infectado, y se incubó bajo concentraciones de O₂ reducidas, tal como se ha indicado antes.

Recolección y conservación de los cultivos

Se recolectaron los cultivos retirando la cantidad deseada de cultivo, y centrifugándola a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendió el pellet en SPG, y se hizo pasar esta suspensión 4 veces a través de una aguja de calibre 22. Se dividieron los cultivos en partes alícuotas, y se congelaron a -70°C. Para purificarla aún más, se centrifugó la muestra a 145 x g durante 5 minutos, a fin de eliminar perlas, núcleos celulares y restos de células. Después se centrifugó el sobrenadante a 3000 x g durante 20 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en diluyente.

Estimación del número de *L. intracellularis* viables en un cultivo de tejido

La cantidad de *L. intracellularis* viables se determinó de la manera descrita en el Ejemplo 2, utilizando una aguja de calibre 22 para lisar las células y empleando células McCoys a razón de 1250 células por pocillo para sembrar las placas de microvaloración.

Resultados

Los resultados de TCID₅₀ indicaron que los cultivos contenían hasta 1×10^6 bacterias/ml. Esto se consiguió en menos de un mes. En el mismo período de tiempo, se había escalado el volumen de cultivo hasta 3,0 litros.

Ejemplo 4

Determinación de la dosis infecciosa de cultivos puros de *L. intracellularis* en animales anfitrión

Sumario

Se completó un estudio con treinta y un cerdos infectando cerdos convencionales, de 6 semanas de edad, con cultivos puros de *L. intracellularis* procedentes de la muestra N72994. Se dividieron al azar los cerdos en 4 grupos, y se estabularon por separado. El grupo 1 contenía 7 cerdos, y fue considerado como grupo testigo negativo, al cual se le administró, o bien cultivo de tejido no infectado, o nada. El grupo 2 contenía 8 cerdos, a los que se administraron 10^7 bacterias por animal. El grupo 3 contenía 8 cerdos, a los que se administraron 10^6 bacterias por animal, y el grupo 4 contenía 8 cerdos, que recibieron 10^5 bacterias por animal.

Se recogieron muestras fecales con un bastoncillo los días 0, 7, 14, 21 y 24, para ser ensayadas mediante PCR. El día 24 se realizó la necropsia a los cerdos, y se extrajeron el íleon, el yeyuno y el colon, para los análisis mediante PCR, histopatología, y tinción FA, todos ellos de la manera anteriormente descrita.

El análisis PCR de la mucosa ileal reveló la presencia de *L. intracellularis* en el 100% del grupo de dosis alta, en el 75% del grupo de dosis media, y en el 50% del grupo de dosis baja. Los resultados de histopatología indicaron un incremento de células mononucleares en la lámina propia y la submucosa en el 88% del grupo de dosis alta, en el 75% del grupo de dosis media, y en el 88% del grupo de dosis baja. Se observó hiperplasia críptica en el 50% del grupo de dosis alta, en el 63% del grupo de dosis media, y en el 50% del grupo de dosis baja. La tinción FA reveló la presencia de *L. intracellularis* en cortes de tejido del íleon, del yeyuno y del colon en el 88% del grupo de dosis alta, en el 63% del grupo de dosis media, y en el 63% del grupo de dosis baja. Los animales testigo resultaron negativos respecto a la presencia de *L. intracellularis* tanto por PCR como por tinción FA y tinción con plata.

En conclusión, se utilizó con éxito un cultivo puro para infectar y causar lesiones de PPE. Se cumplieron los postulados de Koch mediante la identificación y el aislamiento de *L. intracellularis* en los animales infectados.

En los animales sometidos a la prueba de exposición, 100% de los animales que habían recibido dosis alta confirmaron la recuperación y la identificación por medio de tinción con plata, tinción FA, y PCR.

Materiales y métodos

Cultivo de inóculo

Se sembró un matraz convencional de 75 cm² con $3,75 \times 10^5$ células HEP-2 en DMEM/FBS al 10%, y se cultivaron durante 18-24 horas a 37°C y 5% de CO₂ (las células habían alcanzado 30% de confluencia en el momento de la inoculación). Se diluyó un vial de N72994 en 15 ml de DMEM/FBS al 5%. Se dispuso el cultivo en una cámara de

ES 2 294 620 T3

gas, se hizo el vacío, y se repuso el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂, y 83,2% de H₂. Se cambió el medio a las 24 horas, reponiéndolo con DMEM/FBS al 5%.

5 Se incubaron los cultivos durante 6 días, después se rasparon las células, extrayéndolas de los matraces, y se añadieron a un matraz agitado de 100 ml que contenía 50 ml de DMEM/FBS al 5%. Se aumentó escalonadamente el volumen del matraz doblando el volumen de medio de cultivo a intervalos semanales. Se dejó crecer el cultivo durante tres semanas en el matraz agitado.

Recolección de los cultivos

10

Se cosechó el cultivo centrifugándolo a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendió el pellet en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) con FBS al 10%, y se hizo pasar esta suspensión cuatro veces a través de una aguja de calibre 25. Se diluyó el inóculo hasta el volumen final en SPG/FBS al 10%, y se hicieron diluciones 1:10.

15 El inóculo para los testigos estaba compuesto por células HEp-2 no infectadas, diluidas a la misma concentración de células viables que el cultivo infectado. Se cosecharon las células del mismo modo que en el caso del cultivo infectado. Los cerdos testigo recibieron una dosis de células similar a la del grupo de dosis alta.

Cuantificación de *L. intracellularis*

20

La cuantificación del número de *L. intracellularis* viables se realizó determinando la dosis infecciosa de 50 por ciento de los cultivos de tejido (TCID₅₀). Esto se realizó retirando 2 ml de cultivo a ensayar, y lisando las células al hacerlas pasar cuatro veces a través de una aguja de calibre 22. Se diluyó sucesivamente la muestra 1:10 en DMEM/FBS al 5% que contenía vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se añadieron las diluciones a una placa de microvaloración de 96 pocillos, a razón de 0,1 ml por pocillo. Se sembraron las placas de microvaloración con células HEp-2 a razón de 2500 células por pocillo, y se cultivaron durante 18-24 horas antes de la infección. Se emplearon doce pocillos para cada dilución. Se incubó la placa durante 6 días bajo concentraciones gaseosas de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de N₂. Se fijaron las células con 50% de acetona y 50% de metanol, fríos, durante 2 minutos. Se añadieron a los pocillos 0,03 ml de anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis* (McOrist, 1987), diluido 1:2000 en PBS, por cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, y después se lavó 3 veces con PBS. Se añadió FITC anti-ratón, diluido 1:30, en una cantidad de 0,03 ml/pocillo, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con H₂O bidestilada, y se dejó secar. Se observaron las muestras bajo un microscopio de fluorescencia, y se determinó la TCID₅₀/ml.

Animales

El Dr. Kent Schwartz proporcionó treinta y un cerdos, de seis semanas de edad, y de distinto sexo, procedentes de hembras PIC x Lieske, y machos blancos de gran tamaño. El día 0 se distribuyeron los cerdos al azar, en función de su peso, entre cuatro corrales.

40

Instalaciones

Se utilizaron para alojar a los animales cuatro corrales dentro de las instalaciones de un pequeño criadero, estando los corrales separados entre sí al menos 90 cm. Los corrales tenían suelo de alambre y divisores laterales enteros. Una estufa proporcionaba el calor, y se complementaba por zonas con lámparas térmicas. Durante todo el estudio se mantuvo la temperatura entre 25 y 30°C.

Comida y agua

Los animales tuvieron acceso sin restricciones a una dieta a base de maíz y soja molidos, con 19% de proteína, y exenta de antibióticos, en comederos de acero inoxidable. Se proporcionó agua a voluntad mediante bebederos de chupete.

Infección de los cerdos

55

El día 0 se pesó cada animal, y se extrajeron muestras de sangre mediante un tubo capilar aplicado al seno retroorbital. Se separó el suero y se conservó congelado a -20°C. También se recogieron con bastoncillos muestras fecales para la PCR. Se administró a los animales 10 ml de inóculo por vía intragástrica, por medio de un tubo hasta el estómago.

Tratamiento

Nº de cerdos

Testigo - células sin infectar	5
Testigo - sin tratamiento	2
65 Dosis alta	8
Dosis media	8
Dosis baja	8

ES 2 294 620 T3

Los días 0, 10, 17 y 24 se pesó cada animal, y se le extrajo sangre.

Reacción en cadena de polimerasa

5 Se controló mediante PCR la infección de los cerdos, empleando los cebadores y parámetros de ciclo descritos por Jones (1993). Los días 0, 7, 14, 21, y 24 se obtuvieron muestras fecales y de la mucosa de los intestinos, y se analizaron mediante PCR.

Histopatología

10

Se fijaron con formol cortes del íleon, del yeyuno y del colon, se elaboraron de la manera usual, se tiñeron con hematoxilina y con eosina, y también mediante impregnación con plata, y se evaluaron. También se tiñeron cortes por medio de anticuerpos monoclonales específicos para *L. intracellularis*.

15 *Resultados*

Signos clínicos

20 A los 3 días se observaron por primera vez signos clínicos, consistentes en heces sueltas, en el grupo de dosis alta. Los signos presentaron su máximo a los 14 días, y después comenzaron a remitir.

Aumento de peso

25 Se calcularon los aumentos diarios de peso, encontrándose que los grupos de dosis alta y media presentaban menores aumentos de peso que el grupo testigo. Cuando se comparaban los aumentos de peso, se observó que el efecto tenía relación directa con la dosis.

PCR

30 No se observó diarrea hasta el día 14. A los 21 días, 37,5% de los cerdos con dosis alta resultaron positivos según la PCR de las heces. Tras la necropsia, se analizaron mediante PCR las mucosas del íleon, resultando positivo el 100% de los animales con dosis alta, el 75% de los de dosis media, el 50% en el caso de la dosis baja, y 0% en los testigos.

Lesiones de gran tamaño

35

Se hallaron lesiones de gran tamaño en dos cerdos del grupo de dosis alta (animales números 50 y 202). Dichos cerdos presentaban aproximadamente 90 cm de engrosamiento del íleon, con necrosis en el animal número 202.

Histopatología

40

FA

45 La tinción FA de cortes de tejido del íleon, del yeyuno y del colon reveló la presencia de *L. intracellularis* en el 87,5% del grupo de dosis alta, en el 62,5% del grupo de dosis media, en el 62,5% del grupo de dosis baja, y en el 0% de los testigos.

Lesiones microscópicas

50 Se observaron lesiones en el 100% del grupo de dosis alta, en el 75% del grupo de dosis media, en el 87,5% del grupo de dosis baja, y en el 14% de los testigos. Estos valores fueron determinados mediante la observación del incremento de células mononucleares en la lámina propia y en la submucosa, a menudo asociado con hiperplasia de las placas de Peyer. También se observó hiperplasia críptica.

Tinción con plata

55

También se tiñeron con plata los cortes, en busca de bacterias curvadas intracelulares. Este método demostró la presencia de bacterias en el 87,5% del grupo de dosis alta, en el 62,5% del grupo de dosis media, en el 87,5% del grupo de dosis baja, y en el 0% de los testigos.

60 *Discusión*

Los cerdos fueron infectados satisfactoriamente con cultivos puros de *L. intracellularis*. A dosis de 10^7 bacterias, 100% de los animales mostraron infección según la PCR y las lesiones microscópicas. La gravedad de las lesiones y la cantidad de bacterias en los cortes de tejido eran relativamente bajas. Este estudio es un modelo satisfactorio de prueba de exposición deliberada a *L. intracellularis* tal como confirman la presencia de *L. intracellularis* en los cerdos y sus lesiones microscópicas. Las lesiones pueden aumentar si se administra una segunda dosis 7 días después de la primera dosis.

Ejemplo 5

*Experimento de eficacia de una vacuna en hámsters*5 *Objetivo*

Evaluar un modelo en animales de laboratorio para determinar la seguridad y la eficacia en hámsters de una vacuna viva avirulenta de *L. intracellularis*.

10 *Sumario*

Se completó un estudio con 40 hámsters vacunando hámsters de 3 semanas de edad con cultivos puros de una cepa de *L. intracellularis* con elevado número de traspasos, y exponiendo a los animales, 22 días después de la vacunación, a cultivos puros de material virulento, con bajo número de traspasos. Se dividió a los hámsters en 3 grupos. Se vacunó al grupo A con 1 dosis de la cepa N72994 de *L. intracellularis* el día 0. El grupo B fue designado grupo testigo, y no se le administró ningún cultivo de vacuna. Se expuso a los animales de ambos grupos a la infección administrándoles 2 dosis de un cultivo puro de la cepa N343 de *L. intracellularis* los días 22 y 25 después de la vacunación. Al grupo C se le administró la cepa de prueba, N101494, a fin de comparar su virulencia relativa frente a la cepa N343. Los grupos A y B contenían cada uno 15 hámsters, y el grupo C contenía 10 hámsters. Los resultados de las determinaciones de la dosis infecciosa al 50% con cultivo de tejidos (TCID₅₀) indicaron que los hámsters habían quedado vacunados con 10⁵ TCID₅₀ por dosis. La prueba de infección con N343 contenía 10^{5.5} TCID₅₀/dosis. La dosis de prueba para el grupo C fue 10^{2.75} TCID₅₀/dosis. Se recogieron muestras fecales mediante bastoncillos los días 0, 7, 14, 21, 29, 36, y 43 para ser analizadas mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). El día 21 se sacrificaron 5 animales de cada uno de los grupos A y B, y se efectuó su necropsia, para analizar las mucosas mediante PCR, y mediante tinción FA, tinción con hematoxilina y con eosina, y tinción con plata, de cortes de íleon, a fin de determinar la persistencia de la colonización por bacterias en los hámsters vacunados. Los restantes animales fueron sacrificados 21 días después de la prueba de infección, y se efectuó su necropsia mediante un ensayo similar.

Los resultados de PCR indicaron la presencia de *L. intracellularis*, 21 días después de la vacunación, en las mucosas intestinales de 100% de los hámsters del grupo A. Todos los hámsters del grupo B resultaron negativos 21 días después de la vacunación. Veintiún días después de la exposición de prueba, 50% de los hámsters resultaron positivos por PCR en el grupo A, y 100% resultaron positivos en el grupo B. La histopatología de los cortes indicó lesiones de ligeras a graves en 50% de los animales del grupo A y lesiones ligeras en 50% del grupo B 21 días después de la prueba de exposición. Ningún animal presentaba lesiones 21 días después de la vacunación. Los animales del grupo C no presentaban lesiones 21 días después de la prueba de exposición. La tinción FA y la tinción con plata no pudieron demostrar la presencia de *L. intracellularis* en ninguno de los cortes.

En conclusión, se observó una reducción de 50% de la infección, demostrada por PCR, en hámsters vacunados con una cepa de *L. intracellularis* que había experimentado un elevado número de traspasos. Los intestinos fueron colonizados por un número escaso de organismos intracelulares, como lo demuestra la falta de organismos observados en los cortes teñidos con FA y teñidos con plata. Los hámsters del grupo C no mostraron infección en ningún momento del estudio, muy probablemente a causa de la baja dosis de bacterias.

45 *Materiales y métodos**Descripción de los hámsters*

Se emplearon cuarenta hámsters hembra, de 3 semanas de edad, de la variedad Harlan Sprague Dawley.

50 *Cultivo de inóculo**Cultivo para vacuna*

Se empleó un cultivo continuo de *L. intracellularis* cultivado en células HEp-2 durante 29 semanas. El cultivo fue cultivado de una manera similar a la que se indica en el apartado del cultivo para la prueba de exposición, salvo por el hecho de que se traspasaba el cultivo a células HEp-2 nuevas cada 2-3 semanas.

60 *Cultivos para las pruebas de exposición*

Se sembró un frasco de cultivo convencional, de 75 cm², con 3,75 x 10⁵ células McCoys en medio de Eagle modificado por Dulbecco (siglas inglesas DMEM), con suero fetal de bovino (siglas inglesas FBS) al 10%, y se cultivó durante 18-24 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Se retiró el medio de cultivo de las células, y se añadió al frasco un vial de N343 MSC X diluido en 14 ml de DMEM/FBS al 2%. Se dispuso el cultivo en una cámara de gas, se hizo el vacío, y se repuso el gas con hidrógeno y dióxido de carbono para proporcionar una mezcla de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂, y 83,2% de H₂. Se incubó el cultivo durante 6 días, y después se rasparon las células transfiriéndolas a un matraz agitado de 100 ml, que contenía 90 ml de DMEM/FBS al 2% y 0,01 g de perlas Cultisphere-G. Se incubó el cultivo con las concentraciones gaseosas que se han indicado antes. Se aumentó escalonadamente el volumen del

ES 2 294 620 T3

matraz doblando el volumen de medio de cultivo a intervalos semanales. Se cultivó el cultivo durante 25 días en el matraz agitado hasta llegar a un volumen final de 250 ml.

La cepa N101494 fue cultivada de una manera similar a la N343.

5

Cultivos para cosecha

Cultivo para vacuna

10 Se cosechó el cultivo centrifugándolo a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendió el pellet en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) con FBS al 10%, y se hizo pasar esta suspensión 4 veces a través de una aguja de calibre 25. Se diluyó el inóculo hasta el volumen final (15 ml) en SPG/FBS al 10%.

Cultivos para las pruebas de exposición

15

Se cosecharon los cultivos centrifugándolos a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendieron los pellets en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) con FBS al 10%, y se hizo pasar esta suspensión cuatro veces a través de una aguja de calibre 25. Se diluyó el inóculo hasta el volumen final en SPG/FBS al 10% (20 ml para la cepa N343 y 10 ml para la cepa N101494).

20

Dosificación para los hámsters

Vacuna

25 En el día 0 se vacunaron por vía oral todos los hámsters del grupo A, con 1 ml de la vacuna preparada.

Prueba de exposición deliberada

30 Veintidós días después de la vacunación, se administraron a 10 hámsters del grupo A y a 10 hámsters del grupo B, por vía oral, 0,5 ml de la cepa de cultivo N343 para la prueba de exposición. Al grupo C se le administraron 0,5 ml de la cepa de cultivo N101494 para la prueba de exposición.

Cuantificación de L. intracellularis

35 La cuantificación del número de *L. intracellularis* viables se realizó determinando la dosis infecciosa de 50 por ciento de los cultivos de tejido (TCID₅₀). Esto se realizó retirando 2 ml de cultivo a ensayar, y lisando las células al hacerlas pasar cuatro veces a través de una aguja de calibre 22. Se diluyó sucesivamente la muestra 1:10 en DMEM/FBS al 5% que contenía vancomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se dispensaron las diluciones, en un volumen de 0,1 ml por pocillo, en una placa de microvaloración de 96 pocillos que había sido sembrada con células McCoy's a razón de 1250 células por pocillo, y se incubaron durante 18-24 horas a 37°C y 5% de CO₂ antes de la infección. Se emplearon doce pocillos para cada dilución. Se incubó la placa durante 6 días bajo concentraciones gaseosas de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de N₂. El día 6 se fijaron las células con 50% de acetona y 50% de metanol, fríos, durante 2 minutos. Se añadieron a los pocillos 0,03 ml de anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis*, diluido 1:2000 en PBS, por cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, y después se lavó 3 veces con PBS. Se añadió FITC anti-ratón, diluido 1:30, en una cantidad de 0,03 ml/pocillo, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con H₂O bidestilada, y se dejó secar. Se observaron las muestras bajo un microscopio de fluorescencia, y se determinó la TCID₅₀/ml.

40

Seguimiento de la infección de hámsters

50

Se siguió mediante PCR la infección de los hámsters, empleando los cebadores y parámetros de ciclo descritos por Gary Jones. Se recogieron muestras fecales en los días 0, 7, 14, 21, 29, 36, y 43 después de la vacunación. Tras sacrificar a los hámsters también se analizó mediante PCR la mucosa de los intestinos.

Histopatología

55 Se fijaron con formol cortes del íleon y del colon, se elaboraron de la manera usual, se tiñeron con hematoxilina y con eosina, y también mediante impregnación con plata, y se evaluaron. También se tiñeron los cortes por medio de un anticuerpo monoclonal específico para *L. intracellularis*.

60

Aumentos de peso diarios promedios

Se anotaron los pesos de los hámsters al cabo de 21, 28, 35, y 42 días después de la vacunación, a fin de determinar los aumentos de peso diarios promedios.

65

Resultados: Véase la Tabla que figura más adelante.

ES 2 294 620 T3

TCID₅₀

Los resultados de TCID₅₀ indicaron que el grupo al que se administró la vacuna (grupo A) recibió 10^{4.86} TCID₅₀ por hámster. Se sometió a los hámsters de los grupos A y B a la prueba de exposición con la cepa N343, y recibieron 10^{5.5} TCID₅₀. Los hámsters del grupo C, sometidos a la prueba de exposición con la cepa N101494, recibieron 10^{2.75} TCID₅₀ por hámster.

PCR

El análisis mediante PCR demostró la presencia de *L. intracellularis* en 100% de los hámsters vacunados a los que se realizó la necropsia 21 días después de la vacunación. El análisis realizado 43 días después de la vacunación demostró que 100% de los hámsters testigos y 50% de los hámsters vacunados estaban infectados con *L. intracellularis*. Ninguno de los hámsters sometidos a la prueba de exposición con N101494 resultó positivo. No se detectó diarrea en ninguno de los hámsters en ningún momento del estudio.

Histopatología

La tinción H & E no reveló lesiones histológicas en ninguno de los cortes procedentes de hámsters a los que se realizó la necropsia 21 días después de la vacunación. En los cortes preparados 43 días después de la vacunación, 50% del grupo de la vacuna presentaban enteritis linfocítica de ligera a grave, y 50% del grupo testigo presentaba enteritis linfocítica ligera. No se observaron lesiones en el grupo sometido a la prueba de exposición con N101494.

La tinción FA no reveló *L. intracellularis* en ninguno de los hámsters 43 días después de la vacunación.

Discusión

Se observó una reducción de 50% de la infección, demostrada por PCR, en hámsters vacunados con una cepa de *L. intracellularis* que había experimentado un elevado número de traspasos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 294 620 T3

ID	Fecal		Fecal		Fecal		Fecal		Fecal		Mucosa		Mucosa		FA:						
	PCR:	D0	PCR:	D7	PCR:	D14	PCR:	D21	PCR:	D29	PCR:	D36	PCR:	D43		PCR:	día 21	PCR:	día 42	tinción HE	plata
A-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	ligera enteritis	-	-
A-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
A-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	ligera enteritis	-	-
A-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
A-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	-	-	-
A-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
A-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	enteritis grave	-	-
A-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	enteritis moderada	-	-
A-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
A-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	ligera enteritis	-	-
A-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	-	+	-	-	-

ES 2 294 620 T3

5
10
15	NA	NA	NA
20	.	.	.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	NA	NA	NA
30	NA	NA	NA
35	NA	NA	NA
40
45
50
55
60	B-13	B-14	B-15	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	
65														

ES 2 294 620 T3

Ejemplo 6

Propósito del experimento de eficacia de la vacuna porcina

5 El objeto del estudio consistía en evaluar la seguridad, la colonización persistente, y la eficacia de un aislado vivo avirulento y de un aislado de microorganismos muertos de *L. intracellularis* en cerdos de 2-3 semanas de edad. Se llevó a cabo un estudio en animales anfitriones en el cual se vacunaron cerdos de 3 semanas de edad, y después fueron sometidos a una prueba de exposición virulenta con la cepa N343 de *L. intracellularis*, a fin de comparar las diferencias de protección entre las vacunas.

10

Métodos

15 El 11 de diciembre de 1995 se adquirieron a H & K Farms 45 cerdos en total, de 3 semanas de edad. Fueron transportados a Veterinary Resources, Inc., unas instalaciones de investigación situadas cerca de Cambridge, Iowa, donde se les colocó a cada uno una placa para identificar individualmente cada animal. Se mantuvo a los cerdos en estas instalaciones durante dos días antes de iniciar el estudio, para permitir su aclimatación al lugar. A lo largo de todo el estudio recibieron una alimentación exenta de antibióticos.

20 El 13 de diciembre se pesó cada cerdo, se les extrajo sangre para obtener suero, se les calificó clínicamente, y se recogieron muestras fecales mediante bastoncillos. Se dividió aleatoriamente a los animales en grupos de cinco, y se les colocó en cubículos. En una sala separada se dispuso a veinte cerdos, que fueron designados como grupos testigo y testigo estricto. En una segunda sala se dispuso a quince cerdos, para recibir la vacuna ISi-1. Una tercera sala contenía 10 cerdos destinados a recibir la ISi-2.

25 La vacuna viva fue preparada en las instalaciones de investigación y desarrollo NOBL Laboratories Research and Development, y se identificó con el número de serie experimental ISi-1. Esta vacuna ISi-1 (cepa N343) había sido aislada de un cerdo, y fue cultivada de manera continua en cultivo puro durante 29 semanas. Se cultivó la vacuna en células McCoys, dentro de matraces agitados, bajo una atmósfera con contenido de oxígeno reducido, hasta que se observó aproximadamente 100% de infección. Una muestra de la cepa N343, con elevado número de trasposos, empleada para ISi-1, fue traspasada durante 11 semanas más ("N343NP40wk") y depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest el 22 mayo de 1996 en la ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland U.S.A. 20852, siendo asignada a la misma el número de registro de entrada 55783. Se cosecharon los cultivos centrifugándolos a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendieron los pellets en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) con FBS al 10%, y se hizo pasar esta suspensión cuatro veces a través de una aguja de calibre 25. Se centrifugaron los lisados a 35 500 x g durante 5 minutos para aglomerar en un pellet los restos celulares y las perlas de microsoporte. Se separó el sobrenadante, y se conservó a -70° C hasta aproximadamente una hora antes de la vacunación, momento a partir del cual se conservó en hielo hasta su administración.

40 Se cultivó la vacuna de microorganismos muertos (ISi-2), se traspasó durante 12 semanas y media, se cosechó de una manera similar a la antes indicada, y se purificó mediante un gradiente en Percol. Después se conservaron a -70° C las bacterias purificadas, hasta aproximadamente una semana antes de la vacunación, momento a partir del cual se conservaron a 4° C bajo niveles normales de oxígeno atmosférico, que son tóxicos para *L. intracellularis*. Se añadió AIOH a las bacterias para conseguir una mezcla final con 10% de AIOH. Se determinó la concentración de proteína por el método de Biuret.

45

Cuantificación de L. intracellularis viva

50 La cuantificación del número de *L. intracellularis* viables se realizó determinando la dosis infecciosa de 50 por ciento de los cultivos de tejido (TCID₅₀). Se sembraron placas de microvaloración de noventa y seis pocillos con células McCoys a razón de 1250 células por pocillo, y se cultivaron durante 18-24 horas antes de la infección. Se diluyeron sucesivamente las muestras 1:10 en DMEM/FBS al 5% que contenía vancomicina (100 pg/ml) y anfotericina B (2,0 µg/ml). Se añadieron las diluciones a las placas de microvaloración de 96 pocillos, a razón de 0,1 ml por pocillo. Se emplearon doce pocillos para cada dilución. Se incubó la placa durante 6 días a 37°C, y bajo concentraciones gaseosas de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de N₂. Se fijaron las células con 50% de acetona y 50% de metanol, fríos, durante 2 minutos. Se añadieron a los pocillos 0,03 ml de anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis* (desarrollado por el Dr. Steven McOrist), diluido 1:2000 en PBS, por cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, y después se lavó 3 veces con PBS. Se añadió conjugado de inmunoglobulina G y fluorocromo (FITC) anti-ratón, diluido 1:30, en una cantidad de 0,03 ml/pocillo, y se incubó durante 30 minutos at 37°C. Se lavó la placa 3 veces con H₂O bidestilada, y se dejó secar. Se observaron las muestras bajo un microscopio de fluorescencia, y se determinó la 60 TCID₅₀/ml empleando el método de cálculo de Reed-Meunsch.

Los resultados de TCID₅₀ indicaron que la vacuna ISi-1 contenía 1,8 x10⁵ bacterias por mililitro. Un cuarto inóculo era un placebo, y se había obtenido de células de cultivo de tejidos elaboradas de la misma manera que las vacunas.

65

Se analizó el contenido de proteína total de la vacuna de microorganismos muertos, por el método de Biuret, y contenía 0,311 mg/ml.

ES 2 294 620 T3

Se vacunó a los cerdos el 13 de diciembre de 1995. La vacuna viva fue administrada en todos los casos en una dosis de 2 ml por vía intranasal, a razón de 1 ml en cada orificio nasal. La vacuna ISi-2 (de microorganismos muertos) fue administrada por vía intramuscular en una dosis de 1,5 ml por animal, y se repitió 14 días después. A todos los animales testigos se les administraron células no infectadas, del mismo modo que las vacunas vivas.

5 Observación y muestras

A lo largo de todo el estudio se tomaron muestras fecales mediante bastoncillos, y se extrajo suero, a intervalos de 7 días. Se prepararon las muestras fecales para el análisis PCR utilizando el conjunto de cebadores, 5'-TATGGCTGT-CAAACACTCCG-3' y 5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3' para la multiplicación del ADN. Los parámetros de ciclo fueron 93°C durante 5 minutos, 55°C durante 45 segundos, y 72°C durante 45 segundos en el primer ciclo. Se efectuaron treinta y tres ciclos a las temperaturas antes mencionadas, durante 45 segundos por temperatura. El ciclo final consistió en 93°C durante 45 segundos, minutos, 55°C durante 45 segundos, y 72°C durante 2 minutos, con cebadores definidos por Jones y colaboradores.

15 Prueba de exposición deliberada

En los días 26 y 27 después de la vacunación se administró a todos los animales, salvo a los testigos estrictos, un cultivo para prueba de exposición compuesto por cultivos con bajo número de traspasos de las cepas N343 y N72994 de *L. intracellularis*, que habían sido cultivados de manera continua entre 8 y 12 semanas. Se cosecharon los cultivos centrifugándolos a 3000 x g durante 20 minutos. Se resuspendieron los pellets en solución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) con suero fetal de bovino al 10%, y se hizo pasar esta suspensión 4 veces a través de una aguja de calibre 25. Se conservaron a -70° C hasta el momento de la prueba de exposición algunos cultivos cosechados, mientras que otros fueron cultivados hasta el mismo día de la prueba de exposición, y se cosecharon. Se combinaron los inóculos para la prueba de exposición, y se determinó la TCID50 de los cultivos. Se conservaron las muestras sobre hielo hasta el momento de la administración.

El cultivo para prueba de exposición administrado el 8 de enero de 1996 contenía 4×10^4 bacterias/ml y el cultivo para prueba de exposición administrado el 9 de enero de 1996 contenía 3×10^4 bacterias/ml. Se administraron a los cerdos 15 ml de prueba de exposición, ambos días, mediante sonda gástrica. Por tanto, los animales recibieron 6×10^5 bacterias por animal y $4,7 \times 10^5$ bacterias por animal los días 8 de enero de 1996 y 9 de enero de 1996, respectivamente.

Resultados

35 Seguridad

Resultados de la PCR fecal: La detección de *L. intracellularis* por medio de PCR demostró que ningún cerdo estaba diseminando la bacteria al comienzo del estudio. Transcurridos siete días después de la vacunación, todos los cerdos resultaron negativos. Catorce días después de la vacunación, 3 cerdos del grupo ISi-1 grupo eran positivos. En el grupo ISi-1 dos animales eran positivos 21 días después de la vacunación, y todos los demás cerdos eran negativos. En el día 26 después de la vacunación ningún animal estaba diseminando la bacteria, según reveló la PCR. Veintiséis días después de la vacunación se realizó la necropsia de 5 cerdos de los grupos ISi-1 y testigos, y 4 cerdos del grupo ISi-2. Se tomaron muestras del íleon, del colon, del nodo linfático mesentérico, y de las amígdalas, y también de los pulmones de animales con lesiones sospechosas de neumonía.

Se realizó el análisis PCR de las muestras individuales de íleon y de pulmón. Las muestras de amígdalas, de colon y de nódulos linfáticos fueron combinadas por grupo de tratamiento, y se realizó la PCR. A continuación figuran los resultados de los análisis mediante PCR.

Grupo	PCR del íleon			Nódulo linfático	
	26 días después de la vacunación	Colon combinado	Amígdala combinado	mesentérico combinado	Pulmón combinado
ISi-1	1 de 5	+	-	-	1 de 1
ISi-2	0 de 4	-	-	-	0 de 1
Testigos	0 de 5	-	-	-	sin ensayo
Testigos estrictos	sin ensayo	sin ensayo	sin ensayo	sin ensayo	sin ensayo

Se tiñeron cortes histológicos de los ileones, empleando un anticuerpo monoclonal específico contra *L. intracellularis* como anticuerpo primario y conjugado de G-fluorocromo e inmunoglobulina anti-ratón como anticuerpo

ES 2 294 620 T3

secundario. Se observaron *L. intracellularis* en tres de los cinco cerdos del ISi-1. Todos los demás animales resultaron negativos en la tinción con anticuerpo fluorescente.

Se realizó la necropsia de los restantes cerdos 21 días después de la prueba de exposición, y se tomaron las mismas muestras para la evaluación. A continuación se presentan los resultados de la PCR.

	<u>PCR del ileon</u>			<u>Nódulo</u>	
	<u>21 días después de la</u>			<u>linfático</u>	
	<u>prueba de</u>	<u>Colon</u>	<u>Amígdala</u>	<u>mesentérico</u>	<u>Pulmón</u>
	<u>Grupo</u>	<u>exposición deliberada:</u>	<u>combinado</u>	<u>combinado</u>	<u>combinado</u>
15	ISi-1	0 de 10	+	-	-
	ISi-2	0 de 6	-	-	-
	Testigos	4 de 10	-	-	-
20	Testigos estrictos	0 de 5	-	-	-

Se realizaron tinciones FA de los ileones, de la manera antes descrita, resultando positivos 7 de 10 animales en el grupo testigo. Todos los demás animales resultaron negativos respecto a la presencia de *L. intracellularis*.

Se analizó en el suero la producción de anticuerpo IgG por los cerdos tras la exposición a *L. intracellularis*. Se inició el ensayo sembrando placas Terasaki tratadas para cultivo de tejidos, con células McCoys a razón de 125 células/pocillo, y se cultivaron durante 18-24 horas antes de la infección. Después se añadió a los pocillos, a razón de 0,01 ml por pocillo, un cultivo puro de *L. intracellularis* diluido hasta una concentración de 1000-3000 bacterias/ml en DMEM con suero fetal de bovino al 5%. Se incubó la placa durante 6 días bajo concentraciones gaseosas de 8,0% de O₂, 8,8% de CO₂ y 83,2% de N₂. Se fijaron las células con 50% de acetona y 50% de metanol, fríos, durante 2 minutos. Se diluyeron los sueros de los cerdos en proporción 1:75 con PBS estéril. Se añadió el suero diluido a los pocillos, a razón de 0,01 ml por pocillo. Después se incubaron las placas durante 30-60 minutos a 37°C. Se lavaron las placas 5 veces con PBS estéril. Se añadió a cada pocillo 0,01 ml de conjugado de G-fluorocromo e inmunoglobulina IgG anti-cerdo. Se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron las placas 5 veces con H₂O bidestilada, y se dejaron secar. Se lavaron las muestras 5 veces con H₂O bidestilada, y se dejaron secar. Se observaron las muestras bajo un microscopio de fluorescencia, y se marcaron como positivos los pocillos en donde se observaban bacterias, y como negativos los pocillos en donde no se observaban bacterias.

Resultados

	<u>Grupo</u>	<u>Día 0</u>	<u>47 días</u>	
			<u>26 días</u>	<u>después de la vacunación</u>
			<u>después de la vacunación</u>	<u>21 días después de la</u>
				<u>prueba de exposición deliberada:</u>
50	ISi-1	0 de 15	6 de 15	8 de 10
	ISi-2	0 de 10	3 de 10	5 de 6
	Testigos	1 de 15	0 de 15	9 de 10
55	Testigos estrictos	0 de 5	0 de 5	0 de 5

Se analizaron nuevamente, a intervalos de una semana, los animales que habían resultado positivos el día 0. Los resultados indicaron que todos terminaron siendo serológicamente negativos 14 días después de la vacunación. Esto no era un hecho inesperado, ya que los cerdos tenían tres semanas de edad el día 0, y a esta edad los resultados positivos podían ser debidos a anticuerpos maternos.

Se analizaron los sueros junto con un suero testigo positivo obtenido sobre-inmunizando un cerdo con *L. intracellularis* incubado en cultivo puro. El suero testigo negativo empleado fue obtenido de un cerdo gnotobiótico de la universidad South Dakota State University.

La descripción y los ejemplos precedentes son sólo ilustrativos de realizaciones preferidas que permiten conseguir los objetos, características y ventajas de la presente invención, y no se pretende que la presente invención esté limitada a los mismos.

ES 2 294 620 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una vacuna contra *L. intracellularis*, que comprende los pasos de:

- (1) cultivar bacterias *L. intracellularis* para obtener células cultivadas, infectadas con *L. intracellularis*;
- (2) incubar dichas células infectadas a una concentración de oxígeno menor que aproximadamente 18 por ciento al tiempo que dichas células infectadas se mantienen en suspensión;
- (3) recolectar las bacterias *L. Intracellularis*; y
- (4) mezclar las bacterias *L. Intracellularis* con un soporte farmacéuticamente aceptable.

2. El método según la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de traspasar una porción de dichas células infectadas a células nuevas, para incrementar la producción de bacterias *L. intracellularis*.

3. El método según la reivindicación 1, en el cual dichas bacterias *L. intracellularis* se obtienen de un animal infectado con *L. intracellularis*.

4. El método según la reivindicación 3, en el cual dicho animal es un cerdo.

5. El método según la reivindicación 1, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de oxígeno en el intervalo de 0 por ciento a aproximadamente 8 por ciento.

6. El método según la reivindicación 5, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de oxígeno en el intervalo de 0 por ciento a aproximadamente 3 por ciento.

7. El método según la reivindicación 5, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de dióxido de carbono en el intervalo de aproximadamente 6 por ciento a aproximadamente 9 por ciento.

8. El método según la reivindicación 7, en el cual dicha incubación tiene lugar a una concentración de hidrógeno en el intervalo de aproximadamente 73 por ciento a aproximadamente 94 por ciento.

9. El método según la reivindicación 8, en el cual dicha incubación tiene lugar a aproximadamente 0 hasta aproximadamente 8,0 por ciento de O₂, aproximadamente 8,8 por ciento de CO₂ y aproximadamente 83,2 por ciento de H₂.

10. El método según la reivindicación 1, en el cual dichas células de cultivo están seleccionadas del grupo compuesto por células HÉp-2, McCoys e IEC-18.

11. El método según la reivindicación 10, en el cual dichas células McCoys e IEC-18 se encuentran sobre microsoportes.

12. El método según la reivindicación 10, en el cual dichas células de cultivo son células HÉp-2 que son cultivadas en ausencia de microsoportes.

13. Un método para producir una vacuna contra *L. intracellularis*, que comprende los pasos de:

- (1) inocular células de cultivo con un inóculo que comprende bacterias *L. intracellularis*, para infectar dichas células con dichas bacterias;
- (2) incubar dichas células infectadas, a una temperatura de aproximadamente 36°C a aproximadamente 38°C, bajo una concentración de oxígeno de 0% a aproximadamente 8%, mientras se agitan dichas células infectadas, para cultivar las *L. intracellularis* mientras se mantienen en suspensión dichas células infectadas;
- (3) recolectar las *L. Intracellularis*; y
- (4) mezclar las *L. Intracellularis* para obtener un soporte farmacéuticamente aceptable.

14. El método según las reivindicaciones 1 ó 13, en el cual dicho método comprende, además, el paso de inactivar las *L. Intracellularis* cultivadas para obtener una vacuna exterminada.

15. El método según la reivindicación 14, en el cual las *L. Intracellularis* se inactivan utilizando formalina al 0,3% o mediante exposición prolongada a niveles de O₂ ambiente.

ES 2 294 620 T3

16. Un método para producir una vacuna contra *L. intracellularis*, en el cual dicha vacuna comprende una cepa de *L. Intracellularis* atenuada, que comprende los pasos de:

5 (1) producir una cepa de *L. Intracellularis* atenuada, que comprende obtener células de cultivo infectadas con bacterias *L. intracellularis*, incubar dichas células infectadas bajo una concentración de oxígeno de 0 por ciento a aproximadamente 18 por ciento, agitar dichas células infectadas, para cultivar dichas bacterias mientras se mantienen en suspensión dichas células infectadas, traspasar al menos una porción de dichas bacterias cultivadas, recolectar al menos una porción de dichas bacterias cultivadas y seleccionar una cepa atenuada para proporcionar una bacteria *L. intracellularis* atenuada; y

10 (2) mezclar dicha *L. Intracellularis* atenuada en un soporte farmacéuticamente aceptable.

17. El método según la reivindicación 16, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de oxígeno en el intervalo de aproximadamente 0 por ciento a aproximadamente 3 por ciento.

18. El método según la reivindicación 16, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de dióxido de carbono en el intervalo de aproximadamente 6 por ciento a aproximadamente 9 por ciento.

19. El método según la reivindicación 18, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de hidrógeno en el intervalo de aproximadamente 73 por ciento a aproximadamente 94 por ciento.

20. El método según la reivindicación 19, en el cual dicha incubación tiene lugar bajo una concentración de 0 por ciento a aproximadamente 8,0 por ciento de O₂, aproximadamente 8,8 por ciento de CO₂ y aproximadamente 83,2 por ciento de H₂.

25 21. El método según la reivindicación 18, en el cual dichas células de cultivo están seleccionadas del grupo compuesto por células HEp-2, McCoys, e IEC-18.

30 22. El método según la reivindicación 17, en el cual dichas células de cultivo son células HEp-2 que son cultivadas en ausencia de microsoportes.

35 23. El método según la reivindicación 16, en el cual dichas células de cultivo son mantenidas en suspensión durante 6-8 meses.

40

45

50

55

60

65